



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Farmaceutyczny

z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

dr n. farm. Marta Szekalska

Ocena możliwości wykorzystania polisacharydów pochodzenia naturalnego –
alginianu sodu i fukoidanu w projektowaniu nowoczesnych postaci leku
dla wybranych substancji czynnych w aspekcie różnych dróg podania

Załącznik nr 3

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

ZAKŁAD FARMACJI STOSOWANEJ

Kierownik Zakładu: prof. dr n. farm. Katarzyna Winnicka

Białystok 2023

SPIS TREŚCI

1. DANE PERSONALNE	2
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE.....	2
3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH.....	2
4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE.....	3
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	3
4.2. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	3
4.3. AUTOREFERAT WRAZ Z OMÓWIENIEM OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
4.3.1. Wprowadzenie	4
4.3.2. Założenia i cele badawcze	6
4.3.3. Ocena możliwości wykorzystania alginianu sodu i fukoidanu do otrzymywania mikrocząstek metodą suszenia rozpyłowego oraz analiza ich właściwości	7
4.3.4. Ocena możliwości wykorzystania alginianu sodu do otrzymywania hydrożeli oraz analiza ich właściwości	13
4.3.5. Ocena możliwości wykorzystania alginianu sodu do otrzymywania lametek podpoliczkowych oraz analiza ich właściwości	18
4.4. PODSUMOWANIE	23
4.5. BIBLIOGRAFIA	24
5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ	28
6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ	30
6.1. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA.....	30
6.1.1. Kształcenie przeddyplomowe.....	30
6.1.2. Kształcenie podyplomowe.....	30
6.1.3. Opieka naukowa nad studentami.....	31
6.2. OSIĄGNIĘCIA W ZAKRESIE POPULARYZACJI NAUKI	32
6.3. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA	33
7. PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ I OSIĄGNIĘCIA ZAWODOWE	34
7.1. Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora.....	34
7.2. Przebieg pracy po uzyskaniu stopnia doktora.....	35
7.3. Doskonalenie zawodowe.....	37
7.4. Doskonalenie naukowe	37
7.5. Doskonalenie dydaktyczne	39
7.6. Nagrody i wyróżnienia	40

1. DANE PERSONALNE

Marta Szekalska

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE

2010 Dyplom magistra farmacji, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Tytuł pracy: "Wstępne badania fitochemiczne ziela uczepeu zwistego
Bidens cernua L. (Asteraceae)"

Promotor: dr n. farm. Monika Tomczyk

2010 Prawo wykonywania zawodu farmaceuty na obszarze Rzeczypospolitej Polskiej –
uprawnienie (nr 01009187) wydane uchwałą Okręgowej Rady Aptekarskiej
w Białymstoku z dnia 29.04.2010 r.

2015 Dyplom specjalisty w specjalności farmacja apteczna, Studium Kształcenia
Poddyplomowego na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego
w Białymstoku

2017 Dyplom doktora nauk farmaceutycznych, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Tytuł pracy: "Ocena możliwości zastosowania mikrosfer alginianowych
jako nośników modelowych substancji leczniczych"

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Katarzyna Winnicka

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH

01.10.2010 – 01.04.2021 – asystent badawczo-dydaktyczny, Zakład Farmacji Stosowanej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

01.04.2021 – 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 Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.).

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

„Ocena możliwości wykorzystania polisacharydów pochodzenia naturalnego –
alginianu sodu i fukoidanu w projektowaniu nowoczesnych postaci leku
dla wybranych substancji czynnych w aspekcie różnych dróg podania”

4.2. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem 7 prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku oddziaływania **IF = 31,723** (punktacja zgodna z IF obowiązującym w danym roku opublikowania pracy) oraz punktacją **MEiN = 795** (punktacja MEiN zgodna z obowiązującym w danym roku/okresie wykazem ministerialnym czasopism). We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem, a w sześciu pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oraz oświadczenia współautorów publikacji zostały zamieszczone w *Załączniku nr 6*.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

[P1] Szekalska M., Sosnowska K., Czajkowska-Kośnik A., Winnicka K.: Calcium chloride modified alginate microparticles formulated by the spray drying process: a strategy to prolong the release of freely soluble drugs. *Materials*, 2018, 11, E1522.

IF = 2,972; MEiN = 35

[P2] Szekalska M., Wróblewska M., Czajkowska-Kośnik A., Sosnowska K., Misiak P., Wilczewska A. Z., Winnicka K. The spray-dried alginate/gelatin microparticles with luliconazole as mucoadhesive drug delivery system. *Materials*, 2023, 1, 403.

IF = 3,4; MEiN = 140

[P3] Szekalska M., Ciłkowska A., Wróblewska M., Winnicka K. The impact of gelatin on the pharmaceutical characteristics of fucoidan microspheres with posaconazole. *Materials*, 2021, 14, 4087, Article ID 4087.

IF = 3,748; MEiN = 140

[P4] Szekalska M., Sosnowska K., Tomczykowa M., Winnicka K., Kasacka I., Tomczyk M. In vivo anti-inflammatory and anti-allergic activities of cynaroside evaluated by using hydrogel formulations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 121:109681.

IF = 6,530; MEiN = 100

[P5] Szekalska M., Sosnowska K., Wróblewska M., Basa A., Winnicka K. Does the freeze-thaw technique affect the properties of the alginate/chitosan glutamate gels with posaconazole as a model antifungal drug? *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 6775.

IF = 5,6; MEiN = 140

[P6] Szekalska M., Wróblewska M., Trofimiuk M., Basa A., Winnicka K. Alginate oligosaccharides affect mechanical properties and antifungal activity of alginate buccal films with posaconazole. *Marine Drugs*, 2019, 17, 672.

IF = 4,073; MEiN = 100

[P7] Szekalska M., Czajkowska-Kośnik A., Maciejewski B., Misztalewska-Turkowicz I., Wilczewska A. Z., Bernatoniene J., Winnicka K. Mucoadhesive alginate/pectin films crosslinked by calcium carbonate as carriers of a model antifungal drug – posaconazole. *Pharmaceutics* 2023, 15, 2415.

IF = 5,4; MEiN = 140

4.3. AUTOREFERAT WRAZ Z OMÓWIENIEM OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

4.3.1. Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój w obszarze medycyny i farmacji przebiega na wielu płaszczyznach. Jeden z kierunków obejmuje syntezę innowacyjnych substancji farmakologicznie czynnych. Otrzymywanie nowych związków chemicznych to trudny proces, a wytworzenie substancji farmakologicznie czynnej (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) nie daje gwarancji wprowadzenia jej na rynek farmaceutyczny. Agencja ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*, FDA) w 2022 roku zatwierdziła jedynie 37 leków i produktów biologicznych, obejmujących nowe substancje farmakologicznie czynne, a także innowacyjne połączenia leków już występujących na rynku farmaceutycznym [1]. W związku z tym obszar szczególnego zainteresowania stanowią poszukiwania rozwiązań technologicznych umożliwiających otrzymywanie nowoczesnych postaci leków dostosowanych do właściwości substancji czynnej, miejsca podania oraz jednostki chorobowej. Postać leku, czyli forma aplikacyjna odgrywa kluczową rolę w farmakoterapii – decyduje o sposobie podania, wpływa na profil uwalniania API oraz komfort pacjenta podczas leczenia, co w istotny sposób

przyczynia się do wymiernego efektu terapeutycznego [2]. Zaawansowane badania naukowe w obszarze polimerów pozwalają na szerokie ich wykorzystanie w technologii farmaceutycznej. Polimery stosowane są nie tylko jako substancje pomocnicze umożliwiające otrzymanie tradycyjnych postaci leków, ale także jako substancje farmakologicznie czynne, adiuwanty, środki krwiozastępcze, czy umożliwiające produkcję systemów umożliwiających kontrolowane uwalnianie substancji leczniczych [3].

Polisacharydy to polimeryczne cząsteczki cukrów prostych połączonych wiązaniami glikozydowymi. Stanowią one ważną grupę polimerów naturalnych, charakteryzującą się dużą różnorodnością. Polisacharydy posiadają szereg unikalnych właściwości. Do istotnych zalet tych polimerów należy zdolność do pęcznienia oraz tworzenia żeli w wyniku reakcji z substancjami chemicznymi lub kontaktu z fizycznymi czynnikami sieciującymi. Posiadają również zdolność do interakcji z błoną śluzową w przebiegu procesu mukoadhezji – złożonego zjawiska, które polega na przyleganiu warstwy polimeru do błony śluzowej zapewniając wydłużony czas przebywania postaci leku w miejscu aplikacji oraz przedłużone uwalnianie substancji leczniczej [4].

Do grupy naturalnych polisacharydów należy alginian sodu – sól sodowa kwasu alginowego występująca w ścianach komórkowych glonów morskich, głównie brunatnic należących do klasy *Phaeophyceae*. Kwas alginowy jest liniowym kopolimerem składającym się głównie z reszt dwóch kwasów uronowych: β -D-mannuronowego i α -L-guluronowego połączonych kowalencyjnie wiązaniami β (1-4) glikozydowymi. Z uwagi na szerokie wykorzystanie w technologii farmaceutycznej monografia alginianu sodu została umieszczona w Farmakopei Europejskiej i Farmakopei Stanów Zjednoczonych [5,6]. Dodatkowo, FDA zalicza polimer ten do substancji uważanych za bezpieczne (*Generally Regarded as Safe*, GRAS) do podawania doustnego. Alginian sodu posiada szerokie zastosowanie w technologii farmaceutycznej. W produkcji tabletek wykorzystywany jest jako substancja wiążąca i rozsadzająca, podczas otrzymywania preparatów półstałych polimer pełni funkcję środka zagęszczającego i zawieszającego, a w emulacjach typu o/w – stabilizatora [7,8]. Dodatkowo, alginian sodu posiada szereg właściwości *per se*. Na rynku farmaceutycznym istnieje wiele preparatów otrzymanych z wykorzystaniem alginianu, które wskazane są w objawowym leczeniu choroby refluksowej przełyku. Pod wpływem kontaktu z kwaśną treścią żołądka polimer pęcznieje i działa jak fizyczna bariera, która zmniejsza częstotliwość występowania epizodów zarzucania kwaśnej treści żołądkowej do przełyku. Produkty lecznicze zawierające w swoim składzie alginian sodu są bezpieczne i mogą być stosowane u dzieci oraz kobiet w ciąży. Istnieje także szereg doniesień na temat jego aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwwirusowej i przeciwgrzybiczej, a także działania hipoglikemicznego oraz hipolipemicznego polimeru [9].

Fukoidan to naturalny, bogaty w grupy siarczanowe polisacharyd z grupy fukanów wyizolowany z alg brunatnych, jak np. *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. Podstawową jednostkę struktury chemicznej polimeru stanowi szkielet zbudowany z cząsteczek α -L-fukopiranozy, która może posiadać podstawniki w postaci grup siarczanowych, acetylowych czy innych monosacharydów (tj. mannozy, galaktozy, ksylozy, glukozy czy kwasu uronowego). Rosnące zainteresowanie wykorzystaniem fukoidanu wynika z jego szerokiej aktywności biologicznej *per se* – jest obiecującą substancją o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwgrzybiczym i przeciwwirusowym. Możliwość wykorzystania polimeru w medycynie i farmacji wynika również z jego bezpieczeństwa, biogodności i biodegradowalności, co zostało potwierdzone kategorią GRAS [10,11].

Unikalne właściwości polimerów polisacharydowych oraz wielokierunkowe techniki ich modyfikacji skutkują szerokim zastosowaniem w biomedycynie i farmacji. Z uwagi na szereg zalet takich jak biogodność, nietoksyczność, dostępność czy zdolność do żelowania są powszechnie

wykorzystywane w preparatach farmaceutycznych. Stosowane są także w intensywnych badaniach dotyczących projektowania innowacyjnych postaci leków zapewniających przedłużone i kontrolowane uwalnianie substancji czynnych [12].

W porównaniu z konwencjonalnymi tabletkami czy kapsułkami, które należą do układów jednozbiornikowych, więcej zalet posiadają wielokompartментowe postacie leku. Poprzez większą powierzchnię uwalniania leku i krótszą drogę dyfuzji oferują one szerokie możliwości modyfikacji dostępności farmaceutycznej i biologicznej, co w konsekwencji umożliwia poprawę skuteczności terapeutycznej i zmniejszenie toksyczności leków [13]. Przykładem wielokompartментowych postaci leków są mikrocząstki, które można podzielić się na dwie grupy: mikrokapsułki i mikrosfery. Mikrosfery posiadają substancję leczniczą inkorporowaną w matrycy polimerowej, mikrokapsułki natomiast składają się z rdzenia zawierającego substancję leczniczą oraz z polimerowej otoczki [14,15]. Do nowoczesnych i zaawansowanych metod stosowanych w produkcji mikrocząstek należy proces suszenia rozpyłowego, który polega na suszeniu rozpylanego roztworu, emulsji lub zawiesiny polimeru wraz z substancją leczniczą za pomocą dyszy w strumieniu gazu obojętnego. Technika suszenia rozpyłowego jest metodą stosowaną zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej umożliwiającą powstanie kulistych cząstek o niskiej zawartości wilgoci, stosunkowo wysokiej zawartości leku i wydajności produkcji [16].

Hydrożele to półstała postać leku charakteryzująca się trójwymiarową strukturą złożoną z polimeru oraz fazy wodnej. Sieć hydrożelu powstaje dzięki wiązaniom chemicznym, wiązaniom wodorowym, oddziaływaniom międzycząsteczkowym o charakterze elektrostatycznym (tzw. siły *van der Waalsa*), siłom jonowym czy też interakcjom pomiędzy łańcuchami polimeru. Z uwagi na wysoką zawartość wody zapewniają uczucie chłodzenia, a baza hydrożelowa może wywierać działanie ochronne lub nawilżające na skórę. Hydrożele o właściwościach mukoadhezyjnych zapewniają dłuższy kontakt postaci leku w miejscu aplikacji umożliwiając przedłużenie uwalniania substancji czynnej, dlatego wskazane są do aplikacji na błony śluzowe jamy ustnej, pochwy, nosa czy oka [17].

Lamelki podpoliczkowe stanowią stosunkowo nową, stałą postać leku przybierającą kształt cienkich polimerowych filmów o powierzchni w zakresie od 2 do 8 cm². Składają się z polimeru, substancji pomocniczych oraz substancji leczniczej [18]. Monografia ogólnych postaci leku w rozdziale „Preparaty do stosowania w jamie ustnej” zawarta w FP XII wymienia preparaty mukoadhezyjne, do których należą lamelki mukoadhezyjne aplikowane na błonę śluzową jamy ustnej, na dziąsła lub podpoliczkowo [5]. Dzięki interakcji polimerów z błoną śluzową jamy ustnej lamelki wydłużają czas kontaktu postaci leku w miejscu aplikacji, umożliwiając poprawę skuteczności terapii miejscowej dodatkowo chroniąc zmieniony chorobowo obszar. Wykazano również, że umożliwiają one redukcję dawki i częstotliwości stosowania, co wpływa na zmniejszenie toksyczności, poprawę skuteczności i biodostępności leków o działaniu ogólnym. Polimerowe filmy mogą być sporządzane z wykorzystaniem szeregu różnych metod, z których najczęściej stosowaną jest metoda wylewania (odparowania rozpuszczalnika, tzw. *solvent casting*) [19].

4.3.2. Założenia i cele badawcze

Naturalne, wielofunkcyjne polimery polisacharydowe umożliwiają opracowywanie nowoczesnych postaci leku o odpowiednich właściwościach aplikacyjnych zapewniając uzyskanie odpowiedniego efektu terapeutycznego. Dodatkowo, wykorzystywane są nie tylko jako substancje pomocnicze w technologii farmaceutycznej, ale także jako związki farmakologicznie czynne. Stanowią obiekt intensywnych badań pod kątem właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych,

przeciwwirusowych, przeciwzapalnych i przeciwalergicznych *per se*. W związku z tym, przedmiotem moich badań była ocena możliwości zastosowania naturalnych polimerów polisacharydowych – alginianu sodu oraz fukoidanu, posiadających unikalne właściwości fizykochemiczne oraz udokumentowaną aktywność biologiczną, w projektowaniu nowoczesnych postaci leku dla wybranych substancji leczniczych w aspekcie różnych dróg podania.

Pracę realizowano w trzech głównych obszarach badawczych:

- projektowanie nowoczesnych nośników leków złożonych z polimerów – alginianu sodu oraz fukoidanu i substancji czynnych (chlorowodorku metforminy, lulikonazolu, posakonazolu i cynarozylu) z wykorzystaniem różnych technik farmaceutycznych (suszenie rozpyłowe, metoda odparowania rozpuszczalnika, technika zamrażania i rozmrażania) oraz ocena wpływu przeprowadzonych procesów technologicznych na właściwości fizykochemiczne otrzymanych postaci leku;
- projektowanie postaci leków w oparciu o wprowadzenie modyfikacji alginianu sodu oraz fukoidanu w wyniku różnych procesów (sieciowania jonowego, tworzenia kompleksów polielektrolitowych lub połączenia z innymi polimerami pochodzenia naturalnego) oraz ocena wpływu wprowadzonych zmian na właściwości fizykochemiczne wykonanych nośników;
- ocena wpływu alginianu sodu oraz fukoidanu na właściwości biologiczne (aktywność przeciwgrybiczą, przeciwzapalną i przeciwalergiczną) zaprojektowanych preparatów.

4.3.3. Ocena możliwości wykorzystania alginianu sodu i fukoidanu do otrzymywania mikrocząstek metodą suszenia rozpyłowego oraz analiza ich właściwości

Powszechnie znaną i szeroko wykorzystywaną metodą otrzymywania alginianowych mikrocząstek jest technika wykorzystująca proces sieciowania jonowego określanego jako model „egg box”. Mechanizm otrzymywania trójwymiarowej i stabilnej sieci związany jest z oddziaływaniem grup karboksylowych monomerów kwasu guluronowego obecnych w łańcuchu polimeru z jonami metali dwuwartościowych jak np. Ca^{2+} , Sr^{2+} i Ba^{2+} lub trójwartościowych takich jak Fe^{3+} i Al^{3+} . W procesie żelowania alginianu sodu jednym z głównie wykorzystywanych donorów jonów wapnia jest chlorek wapnia (CaCl_2). Do zalet sieciowania CaCl_2 należy szybkość procesu oraz możliwość prowadzenia reakcji w środowisku wodnym i w niskiej temperaturze [7]. Zastosowanie czynnika sieciującego prowadzi do zmniejszenia rozpuszczalności matrycy polimerowej, co może być wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym.

Celem badania opisanego w pracy **P1** było zastosowanie modyfikacji mikrocząstek alginianowych poprzez sieciowanie za pomocą CaCl_2 w jednoetapowym procesie suszenia rozpyłowego. W dostępnej literaturze istnieje wiele doniesień dotyczących otrzymywania mikrocząstek alginianowych, natomiast jednoetapowy proces suszenia przedstawiony w publikacji **P1** charakteryzuje się większą powtarzalnością w porównaniu do metod tradycyjnych oraz wpisuje się w innowacyjne podejście otrzymywania sieciowanych alginianowych mikrocząstek. Rozpuszczalność API wywiera wyraźny wpływ na mechanizm i kinetykę jej uwalniania. Szybkie rozpuszczanie substancji czynnych stanowi jeden z głównych problemów w procesie projektowania preparatów farmaceutycznych o przedłużonym uwalnianiu. W związku z tym zastosowaną modyfikację alginianu sodu wykorzystano w celu przedłużenia uwalniania leku pierwszego rzutu stosowanego

w leczeniu cukrzycy insulino niezależnej – chlorowodoru metforminy, który wykorzystano jako modelową substancję czynną łatwo rozpuszczalną w wodzie [20].

Na podstawie szeregu badań eksperymentalnych nad otrzymaniem sieciowanych alginianowych mikrocząstek, z uwagi na optymalną lepkość, wytypowano roztwory CaCl_2 w stężeniu 0,05% i 0,1%, które zostały wykorzystane do sieciowania 2% roztworu alginianu. Doświadczalnie ustalono także parametry suszenia rozpyłowego umożliwiające uzyskanie mikrocząstek. W procesie technologicznym otrzymano sieciowane formułacje placebo oraz sieciowane formułacje zawierające chlorowodorek metforminy. Mikrocząstki niesieciowane zastosowano jako kontrolę. Otrzymany produkt poddano następnie analizie farmaceutycznej. Przeprowadzona ocena mikroskopowa za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego wykonana we współpracy z dr Anną Basą z Zakładu Chemii Materiałów Uniwersytetu w Białymstoku wykazała, że otrzymane mikrocząstki posiadały kulisty kształt, a zastosowanie czynnika sieciującego jedynie w sposób nieznaczny wpłynęło na wzrost ich średnicy. Dodatkowo zaobserwowano, że modyfikacja alginianu poprzez sieciowanie CaCl_2 skutkowała niewielkim spadkiem wydajności procesu. Warto podkreślić, że modyfikacja polimeru nie wpłynęła na procentową zawartość substancji leczniczej w mikrocząstkach, która wynosiła powyżej 70% we wszystkich formułacjach. Dodatkowo zaobserwowano, że proces sieciowania spowodował nieznaczne zmniejszenie wydajności enkapsulacji.

Badania właściwości pęczniejących zaprojektowanych mikrocząstek przeprowadzono z wykorzystaniem roztworu kwasu solnego (0,1M HCl, pH 1,2) i wyrażono je jako współczynnik pęcznienia (SR). Wykazano, że mikrocząstki usieciowane za pomocą CaCl_2 wykazywały niższe wartości SR niż formułacja niezmodyfikowana. Fakt ten jest wynikiem tworzenia się nierozpuszczalnego alginianu wapnia w wyniku procesu sieciowania, co utrudnia dopływ wody do matrycy mikrocząstek [21]. Stwierdzono również, że formułacje zawierające chlorowodorek metforminy charakteryzowały się wyższymi wartościami SR w porównaniu z mikrocząstkami placebo, co związane było z rozpuszczeniem się substancji leczniczej.

Alginian sodu należy do anionowych polimerów mukoadhezyjnych, a grupy karboksylowe obecne w cząsteczce umożliwiają proces adhezji w wyniku powstania wiązań wodorowych z grupami hydroksylowymi glikoprotein mucyny [7]. W związku z tym istotnym badaniem otrzymanych mikrocząstek była ocena właściwości mukoadhezyjnych, które przeprowadzono z wykorzystaniem analizatora tekstury oraz trzech warstw adhezyjnych: krążka żelatynowego, warstwy mucyny oraz błony śluzowej żołądka świni. Błona śluzowa żołądka świni ze względu na podobieństwo histologiczne do błony śluzowej żołądka człowieka, stanowiła cenny model warstwy adhezyjnej wykorzystany do odzwierciedlenia warunków *in vivo* [22]. Wyniki przeprowadzonych badań, które wyrażono jako siłę (F_{\max}) i pracę adhezji (W_{ad}), wykazały, że wszystkie formułacje charakteryzowały się właściwościami mukoadhezyjnymi. Zaobserwowano, że proces sieciowania istotnie wpłynął na zwiększenie siły i pracy adhezji, co było związane z obecnością jonów Ca^{2+} . Dodatni ładunek mikrocząstek sieciowanych, potwierdzony podczas analizy potencjału Zeta, umożliwił utworzenie dodatkowych wiązań z kwasem sialowym i innymi grupami anionowymi obecnymi w mucynie i ujemnie naładowanej błonie śluzowej [23].

Kluczowym badaniem zaprezentowanym w publikacji **P1** była analiza profilu uwalniania substancji czynnej z niezmodyfikowanych mikrocząstek, usieciowanych mikrocząstek oraz z produktu handlowego w postaci tabletek o niemodyfikowanym uwalnianiu, który pełnił funkcję kontroli. W celu imitacji kwaśnego środowiska żołądka jako medium akceptorowe zastosowano roztwór kwasu solnego (0,1 M HCl, pH 1,2). Wyniki badania dostępności farmaceutycznej wykazały, że wszystkie formułacje mikrocząstek charakteryzowały się efektem wyrzutu (tzw. *burst effect*), który był spowodowany

szybkim rozpuszczeniem łatwo rozpuszczalnego chlorowodoru metforminy związanego na powierzchni mikrocząstek. Zaobserwowano, że proces sieciowania istotnie wpłynął na przedłużenie profilu uwalniania chlorowodoru metforminy. Substancja czynna najwolniej uwalniała się z formułacji charakteryzującej się wyższą zawartością CaCl_2 osiągając ok. 97% po 12 godzinach badania. Analiza dostępności farmaceutycznej była skorelowana ze zdolnością do pęcznienia mikrocząstek – wraz ze spadkiem zdolności absorpcji wody, uwalnianie leku było przedłużone. Sieciowanie za pomocą jonów Ca^{2+} doprowadziło do powstania stabilnej struktury mikrocząstek, poprawiło wytrzymałość mechaniczną sieci polimerowej i zmniejszyło jej zdolność do pęcznienia, co istotnie wpłynęło na profil uwalniania. Analizę mechanizmu uwalniania substancji leczniczej przeprowadzono za pomocą równań matematycznych: kinetyki zerowego i pierwszego rzędu oraz modeli Higuchi, Korsmeyer-Peppas oraz Hixson-Crowell. Wykazano, że chlorowodorek metforminy uwalniał się z mikrocząstek zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu, zależną od stężenia substancji czynnej. Dominującym mechanizmem uwalniania chlorowodoru metforminy ze zmodyfikowanych formułacji mikrocząstek była dyfuzja przebiegająca zgodnie z prawem Ficka połączona z erozją związaną z obecnością czynnika sieciującego. Dodatkowo, na podstawie międzynarodowych wytycznych opracowanych przez Agencję Żywności i Leków (FDA) oraz Europejską Agencję Leków (EMA) dotyczących dostępności farmaceutycznej substancji czynnych i biorównoważności dla badanych postaci leku obliczono współczynniki równoważności – współczynnik różnicy f_1 oraz współczynnik podobieństwa f_2 [24,25]. Wskaźniki te wykazały znaczącą różnicę profilu uwalniania między formułacjami usieciowanymi a niesieciowanymi oraz produktem handlowym charakteryzującym się niezmodyfikowanym uwalnianiem chlorowodoru metforminy. Analizę termiczną mikrocząstek przeprowadzono za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) w celu oceny stabilności termicznej, potencjalnych przemian polimorficznych i reakcji chemicznych oraz określenia stopnia krystaliczności. Uzyskane wyniki potwierdziły wystąpienie interakcji pomiędzy alginianem sodu oraz czynnikiem sieciujących CaCl_2 .

Pomimo ciągłego postępu medycyny zakażenia grzybicze stanowią poważny problem terapeutyczny. Wśród grupy różnych rodzajów zakażeń grzybiczych jednym z częściej występujących jest kandydoza. Wywołują ją oportunistyczne grzyby z rodzaju *Candida*, które są składnikiem ludzkiej flory przewodu pokarmowego, pochwy czy skóry i nie powodują żadnych objawów chorobowych u większości ludzi. Jednak w przypadku obniżonej odporności grzyby te mogą wywoływać infekcje dermatologiczne i ogólnoustrojowe. Leczenie kandydozy to długotrwały i trudny proces. Niska skuteczność leczenia związana jest z ograniczoną liczbą dostępnych substancji przeciwgrzybiczych wraz z występowaniem wielu lekoopornych gatunków grzybów [26]. Dlatego też jedną ze strategii leczenia grzybic jest poszukiwanie nowych postaci leku umożliwiających skuteczną i bezpieczną terapię. W porównaniu z tradycyjnymi nośnikami, wielokompartментowe postacie leków, do których należą mikrocząstki, zapewniają krótszą drogę dyfuzji oraz większą powierzchnię uwalniania substancji leczniczej, co może w istotny sposób wpłynąć na poprawę efektu terapeutycznego [13]. Podjęto zatem badania nad zastosowaniem polisacharydowych polimerów pochodzenia naturalnego – alginianu sodu i fukoidanu w celu otrzymania mikrocząstek będących nośnikami substancji przeciwgrzybiczych.

Poza sieciowaniem jonowym alginian sodu z uwagi na swój anionowy charakter posiada zdolność tworzenia struktury żelowej również w rezultacie oddziaływań elektrostatycznych z polimerami posiadającymi ładunek dodatni, tworząc tzw. kompleksy polielektrolitowe [27]. Żelatyna typu A jest naturalnym polipeptydem otrzymywanym w wyniku rozkładu kolagenu za pomocą kwasów. W jej łańcuchu obecne są grupy aminowe o ładunku dodatnim, które umożliwiają oddziaływanie z ujemną wolną grupą karboksylową alginianu [28]. Chociaż połączenia alginianu sodu

i żelatyny próbowano od wielu lat wykorzystywać w technologii postaci leków, otrzymanie mikrocząstek opartych na alginianowo-żelatynowym kompleksie polielektrolitowym w jednoetapowym procesie suszenia rozpyłowego stanowi innowacyjną metodę, którą przedstawiono w pracy **P2**. Zaprojektowane mikrocząstki wykorzystano jako nośnik przeznaczony do podania dopochwowego dla stosunkowo nowego leku przeciwgrzybiczego zatwierdzonego przez FDA w 2013 roku – lulikonazolu. Lulikonazol zaliczany jest do przeciwgrzybiczych substancji czynnych należących do grupy pochodnych imidazolu. Mechanizm jego działania przeciwgrzybiczego związany jest z hamowaniem demetylazy 14 α -lanosterolu, prowadzącego do zaburzenia syntezy składnika błony komórkowej grzybów – ergosterolu. Zaliczany jest do II klasy Systemu Klasyfikacji Leków (*Biopharmaceutics Classification System*, BCS), a zatem charakteryzuje się niską rozpuszczalnością i dobrym przenikaniem przez błony biologiczne, co wpływa na jego zróżnicowaną biodostępność. W związku z tym w celu poprawy właściwości terapeutycznych substancji czynnych należących do tej grupy wskazane jest opracowanie postaci leków o kontrolowanym i przedłużonym uwalnianiu [29,30].

Na podstawie badań wstępnych wytypowano stężenia alginianu sodu i żelatyny, które wykorzystano do otrzymania alginianowo-żelatynowych kompleksów polielektrolitowych. Przeprowadzona ocena lepkości oraz zmętnienia metodą turbidymetryczną potwierdziły interakcję pomiędzy polimerami. Otrzymane roztwory zawierające alginianowo-żelatynowe kompleksy polielektrolitowe poddano procesowi suszenia rozpyłowego z wykorzystaniem parametrów ustalonych eksperymentalnie. Analiza mikrocząstek przeprowadzona za pomocą mikroskopu elektronowego wykazała, że otrzymane formułacje charakteryzowały się kulistym kształtem i gładką powierzchnią z charakterystycznymi niewielkimi wypukłościami. Wydajność produkcji uzyskano na poziomie 50%, a zawartość substancji leczniczej w mikrocząstkach oscylowała w okolicach 45%. Zaobserwowano, że wszystkie otrzymane formułacje charakteryzowały się niską zawartością wilgoci.

Analiza właściwości pęczniejących z wykorzystaniem płynu imitującego środowisko pochwy (ang. *simulated vaginal fluid*, SVF, pH 4,2) wykazała, że współczynnik pęcznienia (SR) mikrocząstek alginianowych charakteryzował się najwyższymi wartościami. Dodatek żelatyny i lulikonazolu wpłynął na zmniejszenie właściwości pęczniejących otrzymanych formułacji. Badanie właściwości mukoadhezyjnych wykazało, że mikrocząstki alginianowe i alginianowo-żelatynowe charakteryzowały się adhezją do błony śluzowej pochwy świni. Wartości siły i pracy adhezji wzrastały wraz ze wzrostem stężenia żelatyny w mikrocząstkach, która w swojej budowie posiada wysoki udział grup hydrofilowych (grup aminowych i karboksylowych) odpowiedzialnych za elastyczność szkieletu polimeru. Natomiast obecność substancji czynnej w formułacjach wpłynęła na zmniejszenie występowania interakcji polimerów z warstwą adhezyjną. W badaniu dostępności farmaceutycznej lulikonazolu, przeprowadzonym w medium imitującym środowisko pochwy, zaobserwowano gwałtowny wyrzut leku (tzw. *burst effect*). Obecność żelatyny w mikrocząstkach wpłynęła na znaczne przedłużenie profilu uwalniania substancji czynnej. Uzyskane dane wskazują, że uwalnianie lulikonazolu odbywało się zgodne z kinetyką zerowego rzędu (czyli niezależnie od jego stężenia), a jego głównym mechanizmem była dyfuzja połączona z rozpadem mikrocząstek. Analizę termiczną oraz badania z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) przeprowadzono we współpracy z prof. Agnieszką Wilczewską i pracownikami Zakładu Polimerów i Syntezy Organicznej Uniwersytetu w Białymstoku. Uzyskane dane otrzymane w wyniku oceny termogravimetrycznej (TGA) oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) wskazały na stabilność termiczną wszystkich formułacji. Dodatkowo termogramy uzyskane z analizy DSC oraz wyniki otrzymane z badania FTIR

potwierdziły obecność oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy łańcuchami alginianu sodu i żelatyny świadczących o powstaniu kompleksu polielektrolitowego.

Kluczowym badaniem zaprojektowanych mikrocząstek była analiza właściwości przeciugrzybiczych, które zbadano zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) za pomocą metody dyfuzyjnej w żelu agarowym wobec gatunków grzybów: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* i *Candida krusei* [31]. Wykazano, że formułacje zawierające lulikonazol charakteryzowały się zdolnością do zahamowania wzrostu wszystkich badanych szczepów: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* i *Candida krusei*. Zaobserwowano, że obecność żelatyny w mikrocząstkach poprawiła aktywność przeciugrzybiczą w sposób zależny od stężenia. Warto podkreślić, że formułacje placebo wykazywały strefy zahamowania wzrostu gatunków *Candida albicans* i *Candida parapsilosis*, co świadczy o właściwościach przeciugrzybiczych polimerów wchodzących w skład mikrocząstek. Istnieje wiele doniesień wskazujących, że alginian sodu *per se* hamuje rozwój grzybów. Prawdopodobnie związane jest to z ujemnym ładunkiem polimeru, który w wyniku interakcji z błoną komórkową prowadzi do wycieku zawartości wewnątrzkomórkowej. Dodatkowo polimer zakłóca pobieranie składników odżywczych przez komórkę grzyba w wyniku utworzenia wokół niej lepkiej warstwy. Alginian sodu może również utrudniać odżywianie drobnoustrojów poprzez chelatowanie metali, co prowadzi do hamowania metalozależnej produkcji białek [9,32]. Podobnie istnieją doniesienia na temat działania przeciwdrobnoustrojowego żelatyny, która związana jest z tworzeniem lepkiej warstwy wokół komórki patogenu oraz może odgrywać kluczową rolę w hamowaniu adhezji do komórek gospodarza [33].

W pracy **P3** zawarto badania dotyczące wykorzystania fukoidanu w celu otrzymania mikrocząstek zwanych fukosferami metodą suszenia rozpyłowego. Fukoidan wytypowano z uwagi na istniejące doniesienia dotyczące jego właściwości przeciugrzybiczych [10]. W związku z tym, że roztwory fukoidanu charakteryzują się niską lepkością i w odróżnieniu do innych polisacharydów polimer ten nie jest stosowany jako substancja zagęszczająca i żelująca, podjęto próbę połączenia go z żelatyną – substancją pochodzenia naturalnego, szeroko stosowaną w technologii postaci leku [28]. Opracowane fukosfery wykorzystano jako nośnik dla substancji przeciugrzybiczej o szerokim spektrum działania – posakonazolu. Posakonazol to syntetyczny azolowy lek przeciugrzybiczy z grupy pochodnych triazolu, należący do II klasy BCS, co świadczy o jego dobrym przenikaniu przez błony biologiczne, ale bardzo słabej rozpuszczalności w wodzie [34].

W wyniku przeprowadzenia szeregu badań wstępnych wytypowano odpowiednie stężenia polimerów oraz optymalnych parametrów procesu suszenia rozpyłowego, które umożliwiły otrzymanie fukosfer. Otrzymane mikrocząstki posiadały kształt kulisty, co potwierdzono podczas analizy przeprowadzonej za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. W pierwszym etapie suszenia otrzymano formułacje placebo – fukosfery i fukosfery zmodyfikowane za pomocą żelatyny. Wykonano także fukosfery oraz fukosfery zmodyfikowane za pomocą żelatyny zawierające posakonazol. Otrzymane mikrocząstki charakteryzowały się stosunkowo wysoką zawartością substancji czynnej, wydajnością procesu i niską zawartością wilgoci. Zaobserwowano, że dodatek żelatyny wpłynął na zwiększenie średnicy otrzymanych mikrocząstek.

W kolejnym etapie otrzymane fukosfery oraz fukosfery zmodyfikowane żelatyną zbadano pod kątem możliwości aplikacji doustnej oraz dopochwowej. W związku z tym analizę właściwości pęczniących i badanie dostępności farmaceutycznej oceniono w dwóch mediach – z wykorzystaniem płynu pochwowego (ang. *simulated vaginal fluid*, SVF, pH 4,2) i roztworu kwasu solnego (0,1 M HCl, pH 1,2), które imitowały odpowiednio środowisko pochwy i żołądka. Wyniki badania pęcznienia w obu mediach, wyrażone jako współczynnik pęcznienia (SR), wykazały, że obecność żelatyny w matrycy

mikrocząstek znacząco zwiększyła zdolność do pęcznienia w porównaniu z mikrocząstkami zawierającymi tylko fukoidan. Dodatek żelatyny, która tworzy roztwory o wyższej lepkości, poprawia stabilność mikrocząstek i ogranicza wnikanie wody do matrycy fukosfer. Niemodyfikowane fukosfery z uwagi na dobrą rozpuszczalność w płynie pochwowym charakteryzowały się pęcznieniem tylko przez 30 minut, ulegając po tym czasie degradacji. W medium imitującym środowisko żołądka, z uwagi na prawdopodobną hydrolizę kwasową fukoidanu, która prowadzi do obniżenia szybkości rozpuszczania polimeru, zaobserwowano wydłużony czas pęcznienia fukosfer. Gdy jako płyn akceptorowy wykorzystano roztwór kwasu solnego (0,1 M HCl, pH 1,2) odnotowano także znaczące przedłużenie profilu uwalniania posakonazolu w przypadku wszystkich formulacji. Dodatkowo, pęczniąca żelatyna obecna w mikrocząstkach złożonych z fukoidanu i żelatyny utrudniała dopływ wody, zapewniała wolniejszą degradację mikrocząstek i w efekcie wolniejszą dyfuzję substancji czynnej z polimerowej matrycy. Formuła GF6 (otrzymana poprzez suszenie rozpyłowe roztworów zawierających 20% fukoidanu i 5% żelatyny) charakteryzowała się najbardziej przedłużonym profilem uwalniania substancji leczniczej — po 8 godzinach uwolniło się zaledwie ok. 33% posakonazolu. Dane uzyskane z badania uwalniania w SVF (pH 4,2) sugerują, że posakonazol uwalniał się zgodnie z kinetyką zerowego rzędu. Tymczasem, gdy w badaniu zastosowano 0,1 M HCl (pH 1,2), proces ten odbywał się zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. Otrzymane wyniki z analizy wykorzystującej model Higuchi oraz wartości wykładnika dyfuzji n otrzymanego z równania Korsmeyer-Peppas wykazały, że dominującym mechanizmem uwalniania substancji czynnej z mikrocząstek była dyfuzja przebiegająca zgodnie z prawem Ficka niezależnie od zastosowanego medium. Ponadto wartości współczynnika korelacji R^2 w zakresie od 0,71 do 0,95 otrzymane na podstawie modelu Hixson-Crowell wskazują, że proces ten był dodatkowo kontrolowany przez erozję mikrocząstek.

Polimery mukoadhezyjne znacznie wydłużają czas kontaktu postaci leku z błoną śluzową. Podczas projektowania dopochwowych formulacji ważnym aspektem jest ich interakcja z błoną śluzową, która umożliwia pozostanie postaci leku w miejscu aplikacji i chroni ją przed wypływem. Z kolei preparaty mukoadhezyjne po podaniu doustnym wydłużają czas przebywania leku w żołądku, co jest szczególnie ważne dla substancji trudno rozpuszczalnych i charakteryzujących się niską biodostępnością [4]. W przeprowadzonym badaniu właściwości mukoadhezyjnych, w celu imitacji warunków *in vivo*, jako warstwy adhezyjne zastosowano błonę śluzową pochwy i żołądka świni. Zaobserwowano, że zarówno fukosfery, jak i fukosfery modyfikowane żelatyną wykazywały właściwości mukoadhezyjne. Wyższe wartości siły i pracy adhezji odnotowano w przypadku wykorzystania błony śluzowej pochwy. Jest to ściśle związane z wyższymi wartościami SR w medium (SVF, pH 4,2) stosowanym do zwilżania mikrocząstek przed badaniem. Proces tworzenia wiązań mukoadhezyjnych pomiędzy polimerem a błoną śluzową jest skorelowany z pęcznieniem, które stanowi pierwszy etap adhezji. Dodatkowo zaobserwowano, że obecność żelatyny wpłynęła na poprawę właściwości mukoadhezyjnych zaprojektowanych mikrocząstek. Zjawisko to było szczególnie widoczne w przypadku formulacji zawierających posakonazol. Mikrocząstki placebo natomiast charakteryzowały się wyższymi wartościami zarówno siły, jak i pracy adhezji w porównaniu z formulacjami zawierającymi posakonazol, niezależnie od zastosowanej warstwy adhezyjnej. Fakt ten może być konsekwencją zablokowania dostępu polimeru do błony śluzowej przez cząsteczki substancji leczniczej. Mechanizm właściwości mukoadhezyjnych fukoidanu nie jest jednoznacznie określony. Można jednak stwierdzić, że w związku z tym, że fukoidan należy do polimerów anionowych, proces mukoadhezji związany jest głównie z obecnością grup karboksylowych, które tworzą wiązania wodorowe z grupami hydroksylowymi glikoprotein mucyny [7]. Termogramy otrzymane w wyniku analizy DSC wykazały obniżenie temperatury topnienia posakonazolu w mikrosferach i zanik ostrego

piku przy 138,73°C, co może świadczyć o zmniejszeniu krystaliczności substancji czynnej w procesie suszenia rozpyłowego i przejście w stan amorficzny. W porównaniu do postaci krystalicznej, forma amorficzna umożliwia poprawę rozpuszczalności, a w efekcie zwiększenia wchłaniania i redukcję dawki leczniczej [35].

Otrzymane mikrocząstki oceniano pod kątem aktywności przeciwgrzybiczej zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) za pomocą metody dyfuzyjnej w żelu agarowym wobec gatunków grzybów: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* i *Candida krusei* [31]. Otrzymane wyniki wykazały, że zaprojektowane formułacje hamowały wzrost badanych komórek z rodzaju *Candida*. Zaobserwowano korzystny wpływ dodatku żelatyny we wszystkich formułacjach. Najbardziej wrażliwe okazały się grzyby z gatunku *Candida parapsilosis*, które charakteryzowały się największą strefą zahamowania wzrostu. Warto podkreślić, że zarówno fukosfery jak i fukosfery modyfikowane za pomocą żelatyny formułacji placebo wykazywały aktywność przeciwgrzybiczą. Fakt ten jest związany z obecnością fukoidanu w mikrocząstkach. Istnieje bowiem szereg doniesień dotyczących jego przeciwwirusowego, przeciwgrzybiczego i przeciwbakteryjnego działania. Prezentowane są dwa możliwe mechanizmy wyjaśniające działanie przeciwdrobnoustrojowe tego polimeru. Fukoidan posiada w swojej budowie grupy siarczanowe, które mogą wiązać się z powierzchnią komórek bakterii, powodując w ten sposób uszkodzenie ich błony komórkowej. Druga teoria natomiast dotyczy wychwytywania jonów kationowych w podłożu przez ujemnie naładowane siarczanowe cząsteczki polisacharydu, co wpływa na zmniejszenie dostępności składników pokarmowych dla mikroorganizmów [10,11].

Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że w jednoetapowym procesie suszenia rozpyłowego można otrzymać niemodyfikowane i modyfikowane polisacharydowe wielokompartментowe nośniki dla leków przeciwgrzybiczych oraz substancji czynnych łatwo rozpuszczalnych w wodzie. Posiadają one zdolność do pęcznienia, mukoadhezji oraz przedłużenia profilu uwalniania. Dodatkowo, zastosowanie polimerów o udokumentowanych właściwościach biologicznych poprawia aktywność przeciwgrzybiczą zastosowanych substancji czynnych.

4.3.4. Ocena możliwości wykorzystania alginianu sodu do otrzymywania hydrożeli oraz analiza ich właściwości

W kolejnym etapie moje badania zostały skoncentrowane na wykorzystaniu alginianu sodu w procesie otrzymywania bioadhezyjnych hydrożeli do podania miejscowego na skórę. W pracy **P4** opublikowanej w 2019 roku zawarto badania dotyczące wykorzystania alginianu sodu jako nośnika dla cynarozydu – flawonoidowej pochodnej luteoliny występującej w nadziemnych częściach Uczępu trójlistkowego (*Bidens tripartita*, *Asteraceae*). Fitoskładniki, zwłaszcza związki flawonoidowe występujące w roślinach z rodziny *Asteraceae* posiadają szerokie spektrum działania farmakologicznego obejmującego m.in. właściwości przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwcukrzycowe, przeciwbólowe i przeciwutleniające [36]. W związku z tym po raz pierwszy podjęto badania nad opracowaniem preparatów hydrożelowych zawierających cynarozyd, które przeanalizowano pod kątem farmaceutycznym oraz dokonano oceny aktywności przeciwzapalnej i przeciwalergicznej *in vivo* z wykorzystaniem myszy. Badania zostały wykonane we współpracy z dr hab. Michałem Tomczykiem z Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i dr Moniką Tomczyk z Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, gdzie cynarozyd został wyizolowany z frakcji etylowej nadziemnych części *Bidens tripartita* zgodnie z ogólną procedurą izolacji flawonoidów i scharakteryzowany różnymi metodami

(za pomocą spektroskopii świetlnej UV-VIS, spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego i spektroskopii mas).

Bioadhezyjne hydrożele do podania miejscowego to nowoczesne preparaty o istotnych zaletach, takich jak wydłużony czas przebywania w miejscu aplikacji oraz nietłusta konsystencja [17]. Bardzo ważnym aspektem podczas otrzymywania hydrożeli jest wybór polimeru. Jako nośnik dla cynarozydu wytypowano alginian sodu, który jest polimerem anionowym o właściwościach bioadhezyjnych, powszechnie stosowanym w opatrunkach i preparatach do stosowania miejscowego. Zaprojektowane podłoże hydrożelowe stanowił roztwór alginianu sodu z dodatkiem glicerolu lub glikolu propylenowego. Następnie w bazie hydrożelowej zawieszono cynarozyd wykorzystując jego dwa różne stężenia 5% i 10%. Zaobserwowano, że wszystkie opracowane formułacje charakteryzowały się jednorodną konsystencją, a cząstki cynarozydu były równomiernie zawieszone w nośniku barwiąc bazę hydrożelu na żółto. Wartości pH hydrożeli formułacji placebo znajdowały się w zakresie pH obojętnego. Dodatek cynarozydu natomiast spowodował obniżenie pH do wartości od $5,1 \pm 0,1$ do $6,1 \pm 0,2$, czyli wartości zbliżonych do pH zdrowej skóry. Zaobserwowano, że obecność pochodnej luteoliny w bazie hydrożelowej spowodowała wzrost wartości lepkości. Właściwości bioadhezyjne oceniano z wykorzystaniem analizatora tekstury oraz skóry myszy bezwłosych Cby.Cg-Foxn1nu/cmdb, którą wykorzystano w celu imitacji warunków *in vivo*. Skórę myszy pozyskano z Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego od zwierząt przeznaczonych do pobrania narządów, a procedura ta nie wymagała zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Zaobserwowano, że wszystkie badane hydrożele wykazywały właściwości bioadhezyjne. Dodatkowo, wraz ze wzrostem stężenia cynarozydu wartości siły i pracy adhezji ulegały zmniejszeniu, co może być wynikiem utrudnienia kontaktu polimeru z warstwą skóry.

Profil uwalniania pochodnej flawonoidowej przeprowadzono przy użyciu aparatu do badania dostępności farmaceutycznej wyposażonego w teflonowe komory ekstrakcyjne. Uwalnianie cynarozydu badano z wykorzystaniem syntetycznej, celulozowej błony dializacyjnej Cuprophan. Zaobserwowano, że formułacja zawierająca w swoim składzie glicerol charakteryzowała się stosunkowo szybkim uwalnianiem cynarozydu ($1351,09 \pm 83,80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ po 4 godzinach). Fakt ten może być spowodowany zwiększoną elastycznością łańcuchów polimeru związany z obecnością glicerolu, co ułatwiło penetrację medium do nośnika i w konsekwencji dyfuzję flawonoidu. Uwalnianie cynarozydu przebiegało najwolniej z formułacji, w których zastosowano alginian sodu bez dodatkowych substancji pomocniczych. Na podstawie równań matematycznych wykazano, że uwalnianie z formułacji zawierających 5% cynarozydu przebiegało zgodnie z kinetyką zerowego rzędu, a w przypadku formułacji z dodatkiem 10% cynarozydu zaobserwowano kinetykę pierwszego rzędu. Ponadto wyniki pozyskane z analizy wykorzystującej równanie Korsmeyer-Peppas świadczą o tym, że uwalnianie pochodnej flawonoidowej ze wszystkich formułacji oparte było na anomalnym transporcie, który łączy proces dyfuzji i pęcznienia.

Z uwagi na to, że szybkość działania preparatu stosowanego miejscowo ma istotne znaczenie w przypadku aktywności przeciwzapalnej i przeciwalergicznej formułacje uwalniające największą ilość cynarozydu wytypowano do badań *in vivo* dotyczących oceny aktywności przeciwzapalnej z wykorzystaniem modelu zapalenia indukowanego karagenem oraz aktywności przeciwalergicznej w modelu zapalenia ucha wywołanego oksazolonem. Analizę przeprowadzono w Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wykorzystaniem siedmiotygodniowych, zdrowych samców myszy C57BL6/cmdb o masie $22 \pm 2 \text{ g}$ (zgoda Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach na przeprowadzenie doświadczenia nr 91/2017).

Ocenę aktywności przeciwzapalnej cynarozydru przeprowadzono z wykorzystaniem modelu zapalenia indukowanego karagenem, który jest badaniem przesiewowym o wysokiej powtarzalności najczęściej stosowanym w kierunku oceny właściwości przeciwzapalnych nowych leków [37,38]. Wstrzyknięcie karagenu w łapę myszy powoduje wystąpienie ostrych oraz miejscowych stanów zapalnych charakteryzujących się obrzękiem, przeczulicą bólową i rumieniem. Pierwszy etap stanu zapalnego pojawia się w ciągu godziny po iniekcji karagenu i jest częściowo wynikiem urazu związanego z ukłuciem połączonym z uwolnieniem serotoniny, histaminy, bradykininy i substancji P. Drugi etap modelu zapalenia indukowanego karagenem następuje po 1 godzinie i jest związany z uwalnianiem prostaglandyn i różnych cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6, IL-10 i TNF- α [37]. Objętość łapy myszy mierzono z wykorzystaniem pletyzmometru, a działanie przeciwzapalne wyrażono jako procentowy przyrost obrzęku po wstrzyknięciu karagenu. Badania wykazały, że cynarozyd skutecznie hamował proces zapalny, a aktywność przeciwzapalna była zależna od dawki. Wykazano, że formuacja, która zawierała 5% cynarozydu wykazywała działanie przeciwzapalne przez godzinę. Natomiast formuacja zawierająca 10% cynarozydu charakteryzowała się zmniejszeniem tworzenia obrzęku przez 4 godziny i hamowała oba etapy zapalenia. Aktywność tej formuacji była porównywalna z produktem handlowym zawierającym diklofenak, który wykorzystano jako kontrolę. Zawiesina wodna zawierająca 5% cynarozydu wykazywała istotnie słabsze działanie przeciwzapalne, co może być związane z krótszym czasem przebywania w miejscu aplikacji w porównaniu z preparatami hydrożelowymi. Warto zaakcentować, że formuacja placebo w postaci bazy hydrożelowej również wykazywała działanie przeciwzapalne. Istnieje szereg badań potwierdzających aktywność przeciwzapalną alginianu sodu *per se*. Podaje się, że mechanizm tego działania polega na hamowaniu produkcji mediatorów stanu zapalnego, takich jak tlenek azotu, reaktywne formy tlenu, prostaglandyna E2, cyklooksigenaza czy też cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , TNF- α i IL-6 [39].

Model zapalenia ucha wywołany oksazolonem jest powszechnie stosowany do imitacji alergii kontaktowej zapalenia skóry. Aplikacja oksazonu powoduje reakcję alergiczną zdominowaną przez limfocyty Th2, która objawia się świądem z rozrostem naskórka, dermatozą rumieniową i obrzękową [40,41]. Przedstawione symptomy wykazują podobieństwo do atopowego kontaktowego zapalenia skóry u ludzi [42]. W przeprowadzonym badaniu wykazano, że hydrożele zawierające cynarozyd w obu badanych stężeniach (5% i 10%) charakteryzowały się właściwościami przeciwalergicznymi. Ponadto zaobserwowano, że zastosowanie alginianowego hydrożelu placebo znacznie wpłynęło na zmniejszenie obrzęku ucha wywołanego oksazolonem. Aktywność przeciwalergiczną polimeru potwierdzają różne badania, które wykazały kwas alginowy może hamować uwalnianie histaminy przez mastocyty szczurów oraz zmniejszać produkcję immunoglobuliny E [43].

Analizę histopatologiczną oraz badania immunohistochemiczne wykonano we współpracy z prof. Ireną Kasacką z Zakładu Histologii i Cytofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Otrzymane wyniki wykazały wyraźne zmniejszenie stanu zapalnego oraz nacieków zapalnych w obrębie skóry łapy i ucha myszy po aplikacji formuacji zawierających cynarozyd. Zmiany cytomorfologiczne w keratynocytach, ogólna morfologia naskórka i zmiany histopatologiczne w skórze właściwej były zależne od dawki. Po zastosowaniu hydrożelu zawierającego 5% cynarozydu zaobserwowano niewielką infiltrację leukocytów o polimorficznym jądrze i nieznacznie zwiększoną grubość naskórka. Analiza histopatologiczna tkanek łapy i ucha wykazała, że hydrożel zawierający 10% cynarozydu posiadał podobne działanie do leku referencyjnego, który zastosowano jako kontrolę. Warto podkreślić, że zmiany zapalne w komórkach naskórka uległy znacznemu zmniejszeniu również w grupach myszy, u których stosowano alginianowy hydrożel placebo.

Analizę immunohistochemiczną skóry poddanej działaniu karagenu i oksazolonu przeprowadzono z wykorzystaniem jądrowego antygenu komórek proliferacyjnych (ang. *Proliferating cell nuclear antigen*, PCNA), komórek tucznych oraz przeciwciał CD3 i CD68. PCNA jest białkiem pomocniczym zaangażowanym w replikację DNA i mechanizmy naprawy DNA. Wykorzystywany jest jako marker proliferacji komórkowej służący do oceny potencjału nowotworowego komórek i w diagnostyce wybranych chorób autoimmunologicznych [44]. Analiza immunohistochemiczna skóry poddanej działaniu karagenu i oksazolonu wykazała zwiększoną immunoreaktywność jądrową wobec PCNA. Wykazano, że w naskórkowych keratynocytach myszy traktowanych cynarozidem ekspresja jądrowego antygenu komórek proliferacyjnych była istotnie niższa w porównaniu z myszami należącymi do grupy kontrolnej. Dodatkowo, wykazano że po zastosowaniu preparatu placebo również zaobserwowano zredukowaną liczbę komórek PCNA.

Atopowe zapalenie skóry jest przewlekłą, nawracającą i zapalną chorobą skóry, a jej patogenеза nie jest do końca poznana. Powstaje w wyniku złożonej interakcji czynników genetycznych, immunologicznych i środowiskowych oraz obejmuje aktywację i naciek komórek prozapalnych, takich jak limfocyty T, makrofagi, komórki tuczne i eozynofile [45]. W związku z tym przeprowadzono badanie umożliwiające oznaczenie frekwencji komórek tucznych oraz białek CD3 i CD68 w skórze łapy i ucha myszy z wykorzystaniem przeciwciał skoniugowanych z barwnikami. Białko CD3, które jest obecne na wszystkich etapach rozwoju limfocytów T, umożliwia diagnostykę chorób autoimmunologicznych, zakaźnych i nowotworowych. Białko CD68, z kolei jest ważnym markerem cytochemicznym używanym do identyfikacji makrofagów i monocytów w analizie histochemicznej tkanek objętych stanem zapalnym [46]. Podstawową rolą mastocytów jest indukcja miejscowego stanu zapalnego (w tym alergii) w odpowiedzi na różne czynniki egzogenne poprzez wydzielanie mediatorów, takich jak histamina, serotonina, prostaglandyny i leukotrieny [47]. W komórkach łapy i ucha myszy ze zmianami chorobowymi skóry zaobserwowano wzmożony naciek komórek zapalnych, głównie infiltrację komórek CD3 (charakterystycznych dla limfocytów T) i CD68 (świadczących o obecności makrofagów i monocytów). Zaobserwowano, że liczba pozytywnie wybarwionych markerów CD3, CD68 i komórek tucznych znacznie zmniejszyła się po aplikacji hydrożeli zawierających cynarozyd. Warto zaznaczyć, że stosowanie alginianowego hydrożelu placebo również wpłynęło na redukcję nacieku komórek zapalnych. Uzyskane dane sugerują, że miejscowe stosowanie cynarozidu zawieszonego w alginianowej bazie hydrożelowej umożliwiło znaczną redukcję liczby limfocytów T i mastocytów w skórze myszy objętej stanem zapalnym. Obecne wyniki wyraźnie wskazują, że alginian sodu o potencjalnym działaniu przeciwalergicznym i przeciwzapalnym jest odpowiednim nośnikiem stosowanym w leczeniu stanu zapalnego i atopowego zapalenia skóry.

Kolejny etap moich badań dotyczących oceny możliwości wykorzystania alginianu sodu w procesie otrzymywania hydrożeli obejmował wykonanie alginianowych kriożeli, które przedstawiono w pracy **P5**. Kriożelowanie to stosunkowo nowa technika fizyczna, która w porównaniu z sieciowaniem chemicznym umożliwia otrzymanie preparatów żelowych bez wpływu na biogodność, biodegradowalność i toksyczność polimeru. Metoda ta opiera się na trzech etapach: zamrażaniu roztworu polimeru, jego przechowywaniu w stanie zamrożonym oraz rozmrażaniu. Podczas zamrażania rozpuszczone cząsteczki polimeru ulegają koncentracji, a krystalizacja rozpuszczalnika prowadzi do zminimalizowania przestrzeni pośród polimerowych łańcuchów. Po rozmrożeniu, w wyniku połączeń między cząsteczkami polimeru poprzez siły *van der Waalsa* i wiązania wodorowe, powstaje kriożel [48]. W celu poprawy stabilności mechanicznej i termicznej oraz właściwości adhezyjnych podjęto próbę otrzymania kriożeli złożonych z połączenia polimerów – alginianu sodu i chitozanu, polisacharydowej pochodnej chityny. W wyniku reakcji

między grupami karboksylowymi anionowego alginianu a grupami aminowymi kationowego chitozanu powstają kompleksy polielektrolitowe. Otrzymane alginianowo-chitozanowe kriożele wykorzystano jako nośnik dla posakonazolu.

Na podstawie badań eksperymentalnych wytypowano odpowiednie stężenia polimerów oraz warunki umożliwiające otrzymanie alginianowo-chitozanowych kompleksów polielektrolitowych. W kolejnym etapie dobrano odpowiednią ilość cykli zamrażania i rozmrażania, które umożliwiły otrzymanie kriożeli. W tak przygotowanej bazie zawieszono posakonazol. Preparaty hydrożelowe placebo oraz zawierające substancję czynną wykorzystano jako kontrole. Zaobserwowano, że opracowane hydrożele i kriożele charakteryzowały się jednorodnością i nie wykazywały rozdziału faz. Analiza mikroskopowa wykonana z wykorzystaniem mikroskopu optycznego formulacji zawierających posakonazol wykazała, że cząsteczki substancji leczniczej były równomiernie rozmieszczone w nośniku. Ocenę hydro- i kriożeli za pomocą mikroskopu elektronowego przeprowadzono po uprzedniej liofilizacji otrzymanych formulacji. Zaobserwowano, że hydrożele złożone z alginianu i chitozanu charakteryzowały się bardziej zwartą strukturą w porównaniu do formulacji złożonych tylko z alginianu. Średnia zawartość posakonazolu mieściła się w zakresie norm farmakopealnych (90–110% deklarowanej zawartości) [6]. Badanie pH przygotowanych żeli wykazało, że otrzymane wartości mieściły się w przedziale od $4,93 \pm 0,03$ do $7,17 \pm 0,02$, co wskazuje na niewielkie ryzyko podrażnienia skóry. Zaobserwowano, że technika zamrażania i rozmrażania oraz obecność chitozanu istotnie wpłynęły na zwiększenie lepkości we wszystkich formulacjach.

Alginian sodu i chitozan to polimery, które dzięki swoim właściwościom bioadhezyjnym znajdują szerokie zastosowanie w opatrunkach oraz preparatach do stosowania miejscowego [7,49]. Chitozan, w odróżnieniu od alginianu sodu, należy do kationowych polimerów adhezyjnych, a jego grupy aminowe oddziałują poprzez wiązania wodorowe i oddziaływania jonowe z ujemnie naładowanym kwasem sialowym, jednym ze składników mucyny [49]. W celu symulacji warunków *in vivo* analizę właściwości bioadhezyjnych przeprowadzono z wykorzystaniem skóry myszy bezwłosych Cby.Cg-Foxn1nu/cmdb pozyskanej z Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Zaobserwowano, że wszystkie badane hydrożele i kriożele posiadały korzystne właściwości adhezyjne. Uzyskane dane wykazały, że kriożele charakteryzowały się istotnym wzrostem właściwości bioadhezyjnych, co było zależne od stężenia chitozanu. Obecność posakonazolu doprowadziła do zmniejszenia wartości siły i pracy adhezji w porównaniu do formulacji placebo.

Analiza właściwości reologicznych wykazała, że wszystkie badane hydrożele i kriożele charakteryzowały się zmniejszeniem lepkości wraz ze wzrostem naprężenia ścinającego, co wskazuje na ich nienewtonowski charakter. W praktyce zjawisko to umożliwia tworzenie się cienkiej warstwy żelu na skórze podczas aplikacji [50]. Analiza tekstury jest kluczowym badaniem podczas optymalizacji preparatów do stosowania miejscowego. Parametry takie jak twardość, spoistość, ściśliwość i adhezja dostarczają informacji na temat zachowania się hydrożeli w kontakcie z siłą zewnętrzną podczas wyjmowania z pojemnika, o rozsmarowywalności i czasie retencji w miejscu aplikacji. Preparaty do stosowania na skórę powinny charakteryzować się odpowiednią twardością i ściśliwością oraz odpowiednimi właściwościami mechanicznymi umożliwiającymi łatwe wyjmowanie z pojemnika i rozprowadzanie na skórze. Otrzymane wyniki wykazały, że wszystkie formulacje charakteryzowały się odpowiednimi właściwościami mechanicznymi. Kriożele charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami twardości, ściśliwości, spoistości i adhezji w porównaniu z tradycyjnymi hydrożelami. Zaobserwowano, że parametry mechaniczne były zależne od stężenia chitozanu, a najwyższe wartości odnotowano w preparatach zawierających 2% polimeru. Uzyskane wyniki sugerują, że technika zamrażania i rozmrażania oraz dodatek chitozanu znacząco poprawiły właściwości mechaniczne żeli

alginianowych. Badanie uwalniania posakonazolu wykazało, że technika zamrażania i rozmrażania istotnie wpłynęła na dostępność farmaceutyczną – kriozele umożliwiły przedłużenie uwalniania w porównaniu z tradycyjnymi preparatami hydrożelowymi, które było zależne od stężenia chitozanu ($63,69 \pm 24,86 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ po 4 godzinach badania z formułacji kriożelu złożonej z 2% alginianu sodu i 2% chitozanu). Fakt ten jest ściśle związany z lepkością otrzymanych formułacji. Analiza matematyczna danych uzyskanych z badania dostępności farmaceutycznej dowiodła, że posakonazol z hydrożeli uwalniał się w procesie dyfuzji, a z kriożeli natomiast w procesie transportu anormalnego, niezgodnego z dyfuzją Ficka. Wskaźniki różnicy f_1 i podobieństwa f_2 wykazały, że technika *freeze-thaw* znacząco wpłynęła na profil uwalniania posakonazolu z otrzymanych formułacji [24,25].

Analiza termiczna opracowanych hydro- i kriożeli wykonana za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) wykazała powstanie kompleksu elektrolitowego pomiędzy alginianem sodu i chitozanem, co zostało potwierdzone poprzez zmiany kształtu szerokich pików endotermicznych oraz brak obecności pików poszczególnych polimerów w termogramach hydro- i kriożeli.

W związku z tym, że alginian sodu i chitozan to polimery o udowodnionych właściwościach przeciwrzybiczych *per se*, istotne badanie stanowiła ocena wpływu tych polimerów na aktywność przeciwrzybiczą otrzymanych formułacji hydro- i kriożeli [9,49]. Zaskakujące było jednak to, że hydrozele i kriozele placebo nie wykazywały zdolności hamowania wzrostu badanych grzybów z rodzaju *Candida*. Fakt ten można wytłumaczyć niskim stężeniem polimerów w preparatach żelowych. Analiza aktywności przeciwrzybiczej hydrożeli i kriożeli zawierających posakonazol wykazała, że preparaty hydrożelowe charakteryzowały się większą zdolnością hamowania wzrostu gatunków *Candida albicans* i *Candida krusei* niż preparaty kriożelowe. Zjawisko to może być skorelowane z lepkością badanych formułacji – hydrozele posiadały niższe wartości lepkości niż kriozele, co prawdopodobnie wpłynęło na ich lepszą penetrację przez podłoże agarowe. Preparaty kriożelowe wykazywały wyższe wartości strefy zahamowania wzrostu w przypadku komórek *Candida parapsilosis*. Dodatkowo, zaobserwowano, że obecność chitozanu poprawiła aktywność przeciwrzybiczą badanych preparatów, co było szczególnie widoczne podczas analizy z wykorzystaniem grzybów z gatunku *Candida parapsilosis*. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań na temat zastosowania alginianowo-chitozanowych kriożeli uzyskanych techniką zamrażania i rozmrażania jako miejscowych nośników dla leków przeciwrzybiczych.

4.3.5. Ocena możliwości wykorzystania alginianu sodu do otrzymywania lamelek podpoliczkowych oraz analiza ich właściwości

Najbardziej naturalną, a zarazem najpopularniejszą drogą podania leku jest droga doustna. Istnieją jednak pewne ograniczenia związane z tym sposobem aplikacji, takie jak np. inaktywacja substancji czynnej czy efekt pierwszego przejścia. Błona śluzowa jamy ustnej, ze względu na budowę i dostępność wskazuje na możliwość wykorzystania jej jako miejsca stosowania preparatów farmaceutycznych [51]. Dlatego w kolejnym etapie badań skoncentrowałam się na ocenie wykorzystania alginianu sodu do otrzymywania lamelek podpoliczkowych oraz analizie ich właściwości.

W publikacji **P6** zawarłam badania dotyczące otrzymywania podpoliczkowych lamelek złożonych z alginianu sodu w połączeniu z alginianowymi oligosacharydami – produktem depolimeryzacji alginianu przez wiązkę alginianową [32]. Istnieją doniesienia, że oligosacharydy alginianowe posiadają właściwości przeciwtleniające, przeciwzapalne i przeciwbakteryjne. Hamowanie wzrostu komórek grzybów i nasilanie działania leków przeciwrzybiczych wobec komórek gatunku *Candida* wskazuje na ich potencjalną rolę w leczeniu zakażeń grzybiczych [52]. Pomimo tego, że oligosacharydy są obiecującym środkiem w terapii przeciwrzybiczej, nie podjęto jeszcze żadnych

badan dotyczących oceny zastosowania ich jako nośników substancji leczniczych. Dlatego w niniejszym badaniu określono wpływ alginianu sodu i jego oligosacharydów na aktywność przeciwgrzybiczą posakonazolu. Jako metodę żelowania polimerów zastosowano zamrażanie-rozmrażanie (tzw. *freeze-thaw*). Prezentowane badania wykonano w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki („Perspektywy wykorzystania alginianu sodu i jego oligosacharydów do otrzymywania mukoadhezyjnych lametek z posakonazolem do podania dopoliczkowego” działanie naukowe finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w konkursie Miniatura 2, nr DEC-2018/02/X/NZ7/02622, realizowane w latach 2019-2020).

Badania wstępne porównujące dwie metody otrzymywania filmów – klasyczną technikę odparowania rozpuszczalnika oraz metodę zamrażania-rozmrażania wykazały, że filmy wykonane przez zamrażanie i rozmrażanie charakteryzowały się znacznie lepszymi właściwościami mechanicznymi, pęczniejącymi i mukoadhezyjnymi. W kolejnym etapie badań wytypowano odpowiednie stężenia alginianu sodu i alginianowych oligosacharydów. Otrzymane roztwory wylewano do pojemników ze szkła akrylowego, poddawano eksperymentalnie ustalonym cyklom zamrażania i rozmrażania, a następnie suszono w temperaturze pokojowej. Błony polimerowe podzielono na lamelki o wymiarach 2x3 cm, które poddano analizie. Zaobserwowano, że lamelki formulacji placebo były miękkie, suche, nieklejące o niskiej zawartości wilgoci. Ocena mikroskopowa z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wykazała, że filmy składające się tylko z alginianu sodu posiadały gładką i jednorodną powierzchnię. Formułacje zawierające oligosacharydy natomiast charakteryzowały się niejednorodnością i porowatością.

Grubość lametek jest ważnym czynnikiem wpływającym na właściwości mechaniczne i pęczniące oraz dostępność farmaceutyczną substancji czynnej. Zaobserwowano, że grubość filmów istotnie wzrastała wraz ze wzrostem stężenia alginianu sodu i obecności posakonazolu. Formułacje zawierające tylko oligosacharydy charakteryzowały się mniejszą grubością. Lamelki nie wykazywały istotnych różnic w grubości w obrębie formulacji, co wskazuje na powtarzalność procesu technologicznego. Stwierdzono, że zawartość substancji czynnej w filmach mieściła się w zakresie wymagań farmakopealnych [5], co sugeruje, że rodzaj polimeru i jego stężenie nie miały wpływu na jednolitość zawartości leku w prezentowanych warunkach doświadczalnych. Przygotowane lamelki posiadały wartości pH w zakresie od $6,7 \pm 0,1$ do $7,3 \pm 0,3$, co wskazuje na niskie ryzyko podrażnienia błony śluzowej jamy ustnej. Czas rozpadu jest kluczową cechą wpływającą na dostępność farmaceutyczną substancji czynnej i zależy od objętości zastosowanego w badaniu medium. Dlatego też oznaczano go za pomocą dwóch metod – w aparacie farmakopealnym przeznaczonym do badania czasu rozpadu (z wykorzystaniem 700 ml tzw. „sztucznej śliny”, pH 6,8) i z wykorzystaniem szalki Petriego zawierającej medium w objętości imitującej objętość śliny w jamie ustnej człowieka (7 ml). Dłuższy czas rozpadu lametek zaobserwowano w przypadku wyższego stężenia alginianu sodu, grubości lametek, obecności posakonazolu w formulacji oraz gdy zastosowano mniejszą objętość medium podczas analizy.

Właściwości mechaniczne odgrywają istotną rolę w procesie pakowania, transportu, przechowywania czy stosowania lametek przez pacjentów. Dlatego też zaprojektowane filmy przeanalizowano za pomocą czterech różnych parametrów: wytrzymałości na rozciąganie, procentu wydłużenia, modułu Younga i wytrzymałości na zginanie. Uzyskane wyniki wykazały, że formułacje alginianowe były sztywne, a obecność oligosacharydów w preparatach doprowadziła do uzyskania bardziej miękkich i elastycznych filmów. Badanie właściwości pęczniejących w roztworze o składzie symulującym skład ludzkiej śliny (tzw. „sztuczna ślina”, pH 6,8), wykazało, że formułacje o wysokim stężeniu alginianu sodu charakteryzowały się wyższymi właściwościami SR. Filmy oligosacharydowe

natomiast reprezentowały wysoką, ale krótką zdolność do pęcznienia, co było związane z utratą integralności błony w wyniku penetracji medium do matrycy i jej rozpuszczenia.

Podczas projektowania lamelek podpoliczkowych ważnym parametrem jest korzystna interakcja z błoną śluzową, która utrzymuje postać leku w miejscu podania. Dlatego też ocenę właściwości mukoadhezyjnych przeprowadzono trzema metodami – z wykorzystaniem analizatora tekstury, poprzez oznaczenie czasu retencji *ex vivo* w zmodyfikowanym aparacie przeznaczonym do badania czasu rozpadu oraz w badaniu *in vivo* przeprowadzonym na zdrowych ochotnikach (zgoda Komisji Bioetycznej nr R-I-002/293/2018). W analizie właściwości mukoadhezyjnych z wykorzystaniem analizatora tekstury jako warstwę adhezyjną zastosowano błonę śluzową policzków cielęcych. Zaobserwowano, że wyższe wartości siły adhezji posiadały formułacje składające się wyłącznie z alginianu sodu, natomiast wyższymi wartościami pracy adhezji charakteryzowały się filmy przygotowane wyłącznie z oligosacharydów. Najdłuższy czas retencji *ex vivo* z wykorzystaniem cielęcej błony śluzowej policzka zaobserwowano w filmach alginianowych – wysokie stężenie polimeru i grubość opóźniały rozpuszczanie lamelki, co z kolei zwiększało czas jej retencji. Badanie właściwości mukoadhezyjnych w warunkach *in vivo* przeprowadzone na zdrowych ochotnikach z wykorzystaniem filmów placebo potwierdziło, że formułacja złożona z alginianu sodu charakteryzowała się znacznie dłuższym czasem przylegania.

Badanie dostępności farmaceutycznej przeprowadzone w roztworze o składzie symulującym skład ludzkiej śliny (tzw. „sztuczna ślina”, pH 6,8), wykazało stopniowe uwalnianie posakonazolu bez efektu wyrzutu. Zaobserwowano, że formułacja złożona tylko z alginianu sodu zapewniła przedłużone uwalnianie substancji czynnej, które po 5 godzinach wynosiła $98,4 \pm 7,1\%$. W przypadku formułacji składającej się wyłącznie z oligosacharydów alginianowych 100% posakonazolu odnotowano w medium akceptorowym już po 3 godzinach badania, co było związane z lepszymi właściwościami pęczniającymi. Na podstawie analizy matematycznej stwierdzono, że substancja lecznicza uwalniała się zgodnie z kinetyką zerowego rzędu w procesie dyfuzji połączonej z erozją filmów. Analiza termiczna otrzymanych lamelek przeprowadzona za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej wykazała nieznaczne przesunięcie termogramów w kierunku niższych wartości temperatur, co mogło być spowodowane procesem zamrażania i rozmrażania.

Alginian sodu posiada szerokie zastosowanie w technologii farmaceutycznej głównie jako substancja pomocnicza wykorzystywana do otrzymywania różnych postaci leku, natomiast oligosacharydy alginianowe – charakteryzujące się znacznie niższą masą cząsteczkową – są intensywnie badane pod kątem aktywności biologicznej i mikrobiologicznej. Wykazano, że oligosacharyd alginianowy Oligo G o wysokiej zawartości kwasu guluronowego (>85%) posiada właściwości antybakteryjne i hamujące tworzenie biofilmu, wzmacniając działanie wybranych antybiotyków [53]. Ponadto Oligo G wykazuje zdolność do ograniczania procesu namnażania i wzrostu komórek grzybów oraz nasilenia aktywności konwencjonalnych środków przeciugrzybiczych [54]. Właściwości te mogą być szczególnie istotne w przypadku syntetyzowania nowych substancji czynnych, jak i opracowywania innowacyjnych postaci leków. Aktywność przeciugrzybiczą lamelek alginianowych i alginianowo-oligosacharydowych zbadano zgodnie z wytycznymi CLSI metodą dyfuzji w agarze, a uzyskane wyniki wyrażono jako średnią średnicę strefy zahamowania wzrostu. Zaobserwowano, że wszystkie formułacje, w wyniku stopniowego pęcznienia i uwalniania posakonazolu hamowały wzrost komórek badanych gatunków *Candida*. Formułacja składająca się tylko z oligosacharydów wykazywała większą strefę zahamowania wzrostu wobec *Candida albicans* i *Candida parapsilosis*. W przypadku gatunku *Candida krusei* – aktywność przeciugrzybicza była porównywalna we wszystkich formułacjach. Ponadto wykazano, że formułacje placebo charakteryzowały się aktywnością przeciugrzybiczą wobec

wszystkich badanych gatunków. Wykazano, że obecność oligosacharydów w lamelkach poprawiła działanie przeciugrzybicze wobec *Candida albicans* i *Candida parapsilosis*. Wyniki te dowodzą, że alginian sodu i oligosacharydy alginianowe można wykorzystywać jako nośniki dla substancji przeciugrzybiczych przeznaczone do stosowania w jamie ustnej.

Pektyna, należąca do grupy naturalnych polisacharydów, podobnie jak alginian sodu posiada zdolność do żelowania pod wpływem kationów dwuwartościowych w procesie sieciowania jonowego zwanym „egg box”. Dodatkowo też posiada właściwości mukoadhezyjne i pęczniące [55]. Zaprezentowane w pracy **P6** wyniki świadczą o tym, że filmy alginianowe charakteryzowały się twardą i sztywną strukturą. W związku z tym podjęto badania dotyczące wykorzystania połączenia alginianu sodu i pektyny w celu poprawy właściwości mechanicznych lametek, które zawarto w pracy **P7**. Filmy opracowano we współpracy z prof. Jurgą Bernatoniene z Department of Drug Technology and Social Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences w Kownie (Litwa). Ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie obu polimerów ich zastosowanie w postaciach leków o przedłużonym uwalnianiu jest ograniczone. W związku z tym w celu otrzymania alginianowo-pektynowych filmów zastosowano sieciowanie polimerów z wykorzystaniem węglanu wapnia (CaCO_3) w obecności glukonolaktonu. Chlorek wapnia (CaCl_2), najczęściej stosowany donor jonów Ca^{2+} , prowadzi do szybkiego i niekontrolowanego żelowania polimerów. Hydroliza kwaśnego glukonolaktonu prowadzi do uwolnienia jonów H^+ , co z kolei powoduje stopniowe uwalnianie jonów wapnia z cząstek CaCO_3 i w efekcie wydłużenie procesu żelowania. Wydłużenie czasu procesu umożliwia tworzenie jednolitych struktur żelowych i pozwala na wylewanie usieciowanej mieszaniny do form przed zakończeniem żelowania [56]. Zaprezentowane rozwiązanie stanowi innowacyjny sposób otrzymywania sieciowanych lametek alginianowych.

Ze względu na optymalne wartości lepkości, do procesu sieciowania wytypowano dwa optymalne stężenia czynników sieciujących – 0,05% i 0,07% CaCO_3 oraz 0,19% i 0,214% glukonolaktonu. W przypadku formułacji lametek zawierających posakonazol zastosowano glikol polietylenowy (PEG 400), który pełnił funkcję solubilizatora. Mieszaninę zawierającą roztwór polimerów, czynniki sieciujące i substancję czynną umieszczono w formach ze szkła akrylowego o powierzchni 9×9 cm. Wysuszone w temperaturze 40°C błony polimerowe podzielono na lamelki o wymiarach 2×2 cm.

Analiza filmów przeprowadzona za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego wykonana we współpracy z dr. Bartoszem Maciejewskim podczas pobytu naukowo-badawczego w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dostarczyła szczegółowych informacji na temat struktury otrzymanych formułacji. Wykazano, że nieusieciowane i usieciowane lamelki placebo charakteryzowały się gładką i jednorodną powierzchnią. Przekrój poprzeczny formułacji usieciowanych charakteryzował się porowatą i nieregularną strukturą.

Zaobserwowano, że filmy placebo, zarówno nieusieciowane, jak i usieciowane, były suche, miękkie, nieklejące i przezroczyste z lekko żółtym zabarwieniem alginianu sodu. Natomiast formułacje zawierające posakonazol charakteryzowały się białą barwą. Masa lametek zwiększała się wraz z obecnością czynników sieciujących i substancji leczniczej. Dodatek pektyny nieznacznie wpłynął na zmianę gramatury filmów. Formułacje usieciowane charakteryzowały się znacznie większą grubością niż lamelki nieusieciowane. Uzyskane wyniki pomiaru pH mieściły się w optymalnym zakresie, wskazującym na zgodność z fizjologicznym pH jamy ustnej. Lamelki charakteryzowały się wartościami zawartości substancji leczniczej zgodnymi z wymogami zawartymi w Farmakopei Polskiej XII [5]. Zaobserwowano, że obecność pektyny, posakonazolu i czynników sieciujących wpłynęła

na wydłużenie czasu rozpadu, który analizowano w aparacie farmakopealnym przeznaczonym do badania czasu rozpadu oraz z wykorzystaniem medium umieszczonym na szalce Petriego.

Właściwości mechaniczne przygotowanych nieusieczowanych i usieczowanych lametek oceniono we współpracy z dr. Bartoszem Maciejewskim podczas pobytu w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wykazano, że dodatek pektyny istotnie wpływał na zmniejszenie wartości modułu Younga, wytrzymałości na rozciąganie, ale zwiększył procent wydłużenia, co zapewniło większą elastyczność filmów. Proces sieciowania pozwolił na otrzymanie znacznie mocniejszych, sztywniejszych i mniej elastycznych lametek.

Stwierdzono, że wszystkie przygotowane filmy wykazywały zdolność do pęcznienia w medium imitującym skład ludzkiej śliny, a formułacje usieczowane charakteryzowały się wyższymi wartościami SR. Pęcznienie lametek było ściśle skorelowane z procesem erozji. Lamelki nieusieczowane po zanurzeniu w medium ulegały stopniowemu rozpuszczeniu, co skutkowało zmniejszeniem stopnia pęcznienia. Formułacje usieczowane charakteryzowały się zmniejszoną erozją, były bardziej stabilne i mogły absorbować wodę przez dłuższy czas. Właściwości mukoadhezyjne przygotowanych lametek, przedstawione jako siła i praca adhezji, oceniano przy użyciu analizatora tekstury oraz błony śluzowej policzków wieprzowych jako warstwy adhezyjnej w celu imitacji warunków *in vivo*. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność pektyny nieznacznie wpłynęła na poprawę właściwości mukoadhezyjnych. Proces sieciowania natomiast znacznie obniżał siłę i pracę adhezji, które zmniejszały się wraz ze wzrostem stężenia czynników sieciujących. Wyższe stężenie jonów Ca^{2+} prowadziło do powstania sztywniejszej alginianowo-pektynowej matrycy filmu, hamowało absorpcję medium, co w efekcie odpowiadało za zmniejszenie właściwości mukoadhezyjnych. Analiza czasu retencji *ex vivo* przeprowadzona w zmodyfikowanym aparacie przeznaczonym do badania rozpadu wykazała, że usieczowane formułacje placebo charakteryzowały się wyższym czasem retencji w porównaniu z lamelkami nieusieczowanymi. Filmy nieusieczowane charakteryzowały się mniejszą stabilnością i krótszym czasem rozpadu.

Badanie dostępności farmaceutycznej posakonazolu z otrzymanych formułacji nieusieczowanych i usieczowanych przeprowadzono w medium imitującym skład ludzkiej śliny (tzw. „sztuczna ślina”, pH 6,8). Wykazano, że substancja lecznicza została całkowicie uwolniona w ciągu 2 godzin ze wszystkich formułacji. Obecność pektyny prowadziła do szybszego uwalniania posakonazolu ($68,85 \pm 3,53\%$ po 15 minutach badania) w porównaniu do filmów składających się tylko z alginianu sodu ($41,92 \pm 8,95\%$ po 15 minutach). Zaobserwowano, że proces sieciowania wpłynął na przedłużenie uwalniania substancji czynnej. Sieciowanie za pomocą jonów Ca^{2+} prowadzi do powstania bardziej stabilnej struktury, poprawia odporność mechaniczną sieci polimerowej i zmniejsza jej zdolność do pęcznienia, co w efekcie wpływa na zmniejszenie szybkości rozpuszczania substancji leczniczej w medium akceptorowym [7,57]. Warto podkreślić, że uwalnianie posakonazolu z lametek usieczowanych zawierających pektynę było wolniejsze niż z usieczowanych filmów zawierających tylko alginian sodu. Analiza matematyczna wyników uzyskanych z badania dostępności farmaceutycznej wykazała, że mechanizm uwalniania posakonazolu opierał się na dyfuzji połączonej z erozją matrycy lametek.

Badanie aktywności przeciwgrzybiczej otrzymanych filmów przeprowadzono metodą dyfuzyjną z wykorzystaniem gatunków *Candida albicans*, *Candida krusei* i *Candida parapsilosis*. Największe strefy zahamowania wzrostu wykazano w przypadku gatunku *Candida parapsilosis*. Porównując formułacje placebo zaobserwowano, że najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą posiadała formułacja złożona tylko z alginianu sodu. Natomiast w przypadku preparatów zawierających posakonazol najsilniejszym efektem przeciwgrzybiczym charakteryzowała się formułacja złożona

z alginianu sodu i pektyny. Proces sieciowania wpłynął znacząco na obniżenie właściwości przeciwgrzybiczych.

Analizę termiczną (TGA, DSC) oraz badanie z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR-IR) lamelek przeprowadzono we współpracy z prof. Agnieszką Wilczewską i pracownikami Zakładu Polimerów i Syntezy Organicznej Uniwersytetu w Białymstoku. Analiza termogravimetryczna wykazała stabilność termiczną zaprojektowanych filmów. Podczas analizy termogramów uzyskanych z badania lamelek z wykorzystaniem DSC nie zaobserwowano piku posakonazolu przy 169.52°C, co może świadczyć o przejściu substancji czynnej w postać amorficzną w związku z dodatkiem solubilizatora – glikolu polietylenowego [35]. Dodatkowo, obecność charakterystycznych sygnałów dla substancji leczniczej, polimerów oraz czynników sieciujących otrzymanych podczas analizy spektroskopowej FTIR-IR świadczyła o kompatybilności posakonazolu z substancjami pomocniczymi.

4.4. PODSUMOWANIE

Opisane osiągnięcie naukowe dotyczy oceny możliwości wykorzystania polisacharydowych polimerów pochodzenia naturalnego – alginianu sodu oraz fukoidanu w procesie projektowania nowoczesnych postaci leków: mikrocząstek, hydrożeli i lamelek z wykorzystaniem różnych technik obejmujących suszenie rozpyłowe, metodę odparowania rozpuszczalnika czy technikę zamrażania i rozmrażania. Wykorzystane polimery poddano modyfikacjom w wyniku procesu sieciowania jonowego, tworzenia kompleksów polielektrolitowych lub połączenia z innymi polimerami pochodzenia naturalnego oraz zbadano wpływ wprowadzonych zmian na właściwości fizykochemiczne i biologiczne (aktywność przeciwgrzybiczą, przeciwzapalną i przeciwalergiczną) zaprojektowanych preparatów.

Uzyskane wyniki prezentowane w jednotematycznym cyklu publikacji podsumowują mój dorobek naukowy, w którym można wskazać następujące osiągnięcia:

1. Otrzymywanie polisacharydowych mikrocząstek techniką suszenia rozpyłowego
 - a) zastosowanie modyfikacji alginianu sodu poprzez sieciowanie za pomocą chlorku wapnia (tzw. model „egg box”) w celu otrzymania doustnych mikrocząstek w innowacyjnym, jednoetapowym procesie suszenia rozpyłowego stanowiących strategię przedłużenia profilu uwalniania chlorowodorku metforminy – modelowej substancji łatwo rozpuszczanej w wodzie [P1]
 - b) wykorzystanie alginianowo-żelatynowych kompleksów polielektrolitowych do otrzymywania mikrocząstek z lulikonazolem w innowacyjnym, jednoetapowym procesie suszenia rozpyłowego przeznaczonych do podania dopochwowego. Dokonano oceny wpływu zastosowanej modyfikacji oraz parametrów procesu suszenia na właściwości fizykochemiczne i przeciwgrzybicze wykonanych formułacji wobec gatunków grzybów *Candida* [P2]
 - c) otrzymywanie fukosfer oraz fukosfer zmodyfikowanych żelatyną zawierających posakonazol w jednoetapowym procesie suszenia rozpyłowego oraz analiza wpływu zastosowanych modyfikacji na właściwości fizykochemiczne i przeciwgrzybicze wykonanych nośników wobec gatunków grzybów *Candida* pod kątem podania doustnego i dopochwowego [P3]

2. Otrzymywanie hydrożeli alginianowych przeznaczonych do podania na skórę
 - a) zaprojektowanie składu hydrożeli alginianowych stanowiących nośnik dla flawonoidowej pochodnej luteoliny (cynarozydu) oraz dokonanie oceny właściwości farmaceutycznych otrzymanych formułacji. Zbadano także wpływ zastosowanego polimeru na aktywność przeciwzapalną cynarozydu z wykorzystaniem modelu zapalenia indukowanego karagenem oraz na aktywność przeciwalergiczną w modelu zapalenia ucha wywołanego oksazolonem w badaniach *in vivo* przeprowadzonych u myszy [P4]
 - b) wykonanie hydrożeli i kriożeli złożonych z alginianowo-chitozanowych kompleksów polielektrolitowych sieciowanych za pomocą metody zamrażania i rozmrażania (tzw. *freeze-thaw technique*) zawierających posakonazol oraz przeprowadzenie analizy ich właściwości fizykochemicznych i aktywności przeciwgrzybiczej wobec wybranych gatunków grzybów z rodzaju *Candida* [P5]
3. Otrzymywanie lametek podpoliczkowych
 - a) otrzymywanie lametek podpoliczkowych złożonych z alginianu sodu i oligosacharydów alginianowych (produkt depolimeryzacji alginianu przez wiązkę alginianową) za pomocą metody zamrażania i rozmrażania (tzw. *freeze-thaw technique*) zawierających posakonazol oraz przeprowadzenie analizy ich właściwości fizykochemicznych i aktywności przeciwgrzybiczej wobec wybranych gatunków grzybów z rodzaju *Candida* [P6]
 - b) innowacyjne wykonanie lametek podpoliczkowych składających się z alginianu sodu i pektyny sieciowanych za pomocą węgla wapnia jako nośnik dla posakonazolu. Przeprowadzono także analizę ich właściwości fizykochemicznych i aktywności przeciwgrzybiczej wobec wybranych gatunków grzybów z rodzaju *Candida* [P7]

Reasumując, przeprowadzone badania wskazują na potencjał zastosowania alginianu sodu i fukoidanu w technologii suszenia rozpyłowego mikrocząstek oraz wykorzystania alginianu sodu w otrzymywaniu hydrożeli i lametek podpoliczkowych. Uzyskane wyniki wskazują, że otrzymane nośniki wykazują się właściwościami mukoadhezyjnymi, co z kolei może wpłynąć na przedłużenie kontaktu postaci leku w miejscu aplikacji, uwalniania substancji czynnej i w konsekwencji do poprawy efektu terapeutycznego. Zaobserwowano, że zastosowanie naturalnych polimerów – alginianu sodu i fukoidanu wpływa na poprawę właściwości przeciwzapalnych i przeciwalergicznym cynarozydu oraz przeciwgrzybiczych lulikonazolu i posakonazolu. Dodatkowo wprowadzone modyfikacje wpływają na przedłużenie profilu uwalniania. Przedstawiona w cyklu publikacji metodologia otrzymywania nowoczesnych postaci farmaceutycznych opartych na alginianie sodu oraz fukoidanie, a także przeprowadzona ich charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna stanowi poszerzenie wiedzy na temat możliwości wykorzystania tych polimerów w technologii nowoczesnych postaci leków.

4.5. BIBLIOGRAFIA

1. FDA U.S. Food and Drug Administration. Online: <https://www.fda.gov/>
2. Vargason A. M., Anselmo A. C., Mitragotri S. The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nat Biomed Eng* **2021**, 5, 951–967.

3. Li J., Yu F., Chen Y., Oupický D. Polymeric drugs: advances in the development of pharmacologically active polymers. *J Control Release* **2015**, 219, 369-382.
4. Boddupalli B., Mohammed Zulkar N. K., Nath R., Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: an overview. *J Adv Pharm Tech Res* **2010**, 1, 381.
5. Prezes Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Farmakopea Polska XII, Warszawa 2020.
6. The United States Pharmacopeia. The United States Pharmacopeial Convention; USP 41–NF 36; The United States Pharmacopeia: Rockville, MD, USA, 2016.
7. Szekalska M., Puciłowska A., Szymańska E., Ciosek P., Winnicka K. Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Polym Sci* **2016**, 2016, 1–17.
8. Hariyadi D. M., Islam N. Current status of alginate in drug delivery. *Adv Pharmacol Pharm Sci* **2020**, 2020, 1–16.
9. Draget K. I., Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocol* **2011**, 25, 251–256.
10. Luthuli S., Wu S., Cheng Y., Zheng X., Wu M., Tong H. Therapeutic effects of fucoidan: a review on recent studies. *Mar Drugs* **2019**, 17, 487.
11. Saeed M., Arain M. A., Ali Fazlani S., Marghazani I. B., Umar M., Soomro J., Bhutto Z. A., Soomro F., Noreldin A. E., Abd El-Hack M. E., Elnesr S. S., Farag M. R., Dhama K., Chao S., Alagawany M. A comprehensive review on the health benefits and nutritional significance of fucoidan polysaccharide derived from brown seaweeds in human, animals and aquatic organisms. *Aquacult Nutr* **2021**, 27, 633–654.
12. Barclay T. G., Day C. M., Petrovsky N., Garg S. Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery. *Carbohydr Polym* **2019**, 221, 94–112.
13. Gautam L., Shrivastava P., Yadav B., Jain A., Sharma R., Vyas S., Vyas S. P. Multicompartment systems: a putative carrier for combined drug delivery and targeting. *Drug Discov Today* **2022**, 27, 1184–1195.
14. Yawalkar A. N., Pawar M. A., Vavia P. R. Microspheres for targeted drug delivery - a review on recent applications. *J Drug Deliv Sci Technol* **2022**, 75, 103659.
15. Bah M. G., Bilal H. M., Wang J. Fabrication and application of complex microcapsules: a review. *Soft Matter* **2020**, 16, 570–590.
16. Baumann J. M., Adam M. S., Wood J. D. Engineering advances in spray drying for pharmaceuticals. *Ann Rev Chem Biomol Eng* **2021**, 12, 217–240.
17. Ahmed E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: a review. *J Adv Res* **2015**, 6, 105–121.
18. Shipp L., Liu F., Kerai-Varsani L., Okwuosa T. C. Buccal films: a review of therapeutic opportunities, formulations & relevant evaluation approaches. *J Control Release* **2022**, 352, 1071–1092.
19. Abruzzo A., Vitali B., Lombardi F., Guerrini L., Cinque B., Parolin C., Bigucci F., Cerchiara T., Arbizzani C., Gallucci M. C., Luppi B. Mucoadhesive buccal films for local delivery of *Lactobacillus brevis*. *Pharmaceutics* **2020**, 12, 241.
20. Wang Y.-W., He S.-J., Feng X., Cheng J., Luo Y.-T., Tian L., Huang Q. Metformin: a review of its potential indications. *DDDT* **2017**, 11, 2421–2429.
21. Qin Y., Hu H., Luo A. The conversion of calcium alginate fibers into alginic acid fibers and sodium alginate fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 101, 4216–4221.
22. Jackson S. In vitro assessment of the mucoadhesion of cholestyramine to porcine and human gastric mucosa. *Eur J Pharm Biopharm* **2001**, 52, 121–127.
23. Pawar V. K., Kansal S., Garg G., Awasthi R., Singodia D., Kulkarni G. T. Gastroretentive dosage forms: a review with special emphasis on floating drug delivery systems. *Drug Deliv* **2011**, 18, 97–110.
24. Extended Release Oral Dosage Forms: Development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations; Guidance for Industry; Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U.S. Government

- Printing Office: Washington, DC, USA, 1997. Online: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070239.pdf>.
25. European Medicines Agency. Investigation of Bioequivalence; European Medicines Agency: London, UK, Online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf.
26. Zhang Z., Bills G. F., An Z. Advances in the treatment of invasive fungal disease. *PLoS Pathog* **2023**, *19*, e1011322.
27. Potaś J., Winnicka K. The potential of polyelectrolyte multilayer films as drug delivery materials. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 3496.
28. Alipal J., Mohd Pu'ad N. A. S., Lee T. C., Nayan N. H. M., Sahari N., Basri H., Idris M. I., Abdullah H. Z. A review of gelatin: properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Mater Today: Proc* **2021**, *42*, 240–250.
29. Scher R. K., Nakamura N., Tavakkol A. Luliconazole: a review of a new antifungal agent for the topical treatment of onychomycosis. *Mycoses* **2014**, *57*, 389–393.
30. Samineni R., Chimakurthy J., Konidala S. Emerging role of biopharmaceutical classification and biopharmaceutical drug disposition system in dosage form development: a systematic review. *Turk J Pharm Sci* **2022**, *19*, 706–713.
31. Rex J.H. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd Ed.; CLSI Document M27-A3; Clinical & Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2008. Online: https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf
32. Pritchard M. F., Jack A. A., Powell L. C., Sadh H., Rye P. D., Hill K. E., Thomas D. W. Alginate oligosaccharides modify hyphal infiltration of *Candida albicans* in an *in vitro* model of invasive human candidosis. *J Appl Microbiol* **2017**, *123*, 625–636.
33. Klotz S. A., Smith R. L. Gelatin fragments block adherence of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins. *Microbiology* **1995**, *141*, 2681–2684.
34. Moore J. N., Healy J. R., Kraft W. K. Pharmacologic and clinical evaluation of posaconazole. *Expert Rev Clin Pharmacol* **2015**, *8*, 321–334.
35. Wang Y., Wang Y., Cheng J., Chen H., Xu J., Liu Z., Shi Q., Zhang C. Recent advances in the application of characterization techniques for studying physical stability of amorphous pharmaceutical solids. *Crystals* **2021**, *11*, 1440.
36. Bouyahya A., Taha D., Benali T., Zengin G., El Omari N., El Hachlafi N., Khalid A., Abdalla A. N., Ardianto C., Tan C. S., Ming L. C., Sahib N. Natural sources, biological effects, and pharmacological properties of cynaroside. *Biomed Pharmacother* **2023**, *161*, 114337.
37. Patil K. R., Mahajan U. B., Unger B. S., Goyal S. N., Belemkar S., Surana S. J., Ojha S., Patil C. R. Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 4367.
38. Pharmacology Discovery Services. Online: <https://www.pharmacologydiscoveryservices.com/catalogmanagement/viewitem/inflammation-carrageenan-induced-mouse/553510>.
39. Nguyen V.-T., Ko S.-C., Oh G.-W., Heo S.-Y., Jeo, Y.-J., Park W. S., Choi I.-W., Choi S.-W., Jung W.-K. Anti-inflammatory effects of sodium alginate/gelatin porous scaffolds merged with fucoidan in murine microglial BV2 cells. *Int J Biol Macromol* **2016**, *93*, 1620–1632.
40. Pharmacology Discovery Services. Online: <https://www.pharmacologydiscoveryservices.com/catalogmanagement/viewitem/dermatitis-contact-oxazolone-induced/555510>.
41. Gerber P. A., Buhren B. A., Schrupf H., Homey B., Zlotnik A., Hevezi P. The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes. *Biol Chem* **2014**, *395*, 577–591.
42. Bae Y. J., Park K. Y., Han H. S., Kim Y. S., Hong J. Y., Han T. Y., Seo S. J. Effects of particulate matter in a mouse model of oxazolone-induced atopic dermatitis. *Ann Dermatol* **2020**, *32*, 496.

43. Asada M., Sugie M., Inoue M., Nakagomi K., Hongo S., Murata K., Irie S., Takeuchi T., Tomizuka N., Oka S. Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **1997**, *61*, 1030–1032.
44. Kasacka I., Piotrowska Ż., Weresa J., Filipek A. Comparative evaluation of CacyBP/SIP protein, β -catenin, and immunoproteasome subunit Imp7 in the heart of rats with hypertension of different etiology. *Exp Biol Med* **2018**, *243*, 1199–1206.
45. Radi G., Campanti A., Diotallevi F., Martina E., Marani A., Offidani A. A systematic review of atopic dermatitis: the intriguing journey starting from physiopathology to treatment, from laboratory bench to bedside. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2700.
46. Barros M. H. M., Hauck F., Dreyer J. H., Kempkes B., Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80908.
47. Moon T. C., Befus A. D., Kulka M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Front Immunol* **2014**, *5*.
48. Zhao Y., Shen W., Chen Z., Wu T. Freeze-thaw induced gelation of alginates. *Carbohydr Polym* **2016**, *148*, 45–51.
49. Kou S. (Gabriel), Peters L., Mucalo M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. *Carbohydr Polym* **2022**, *282*, 119132.
50. Carvalho F. C., Calixto G., Hatakeyama I. N., Luz G. M., Gremião M. P. D., Chorilli M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* **2013**, *39*, 1750–1757.
51. Boegh M., Foged C., Müllertz A., Mørck Nielsen H. Mucosal drug delivery: barriers, in vitro models and formulation strategies. *J Drug Deliv Sci Technol* **2013**, *23*, 383–391.
52. Pritchard M. F., Powell L. C., Jack A. A., Powell K., Beck K., Florance H., Forton J., Rye P. D., Dessen A., Hill K. E., Thomas D. W. A low-molecular-weight alginate oligosaccharide disrupts pseudomonal microcolony formation and enhances antibiotic effectiveness. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61*, e00762-17.
53. Pritchard M. F., Powell L. C., Khan S., Griffiths P. C., Mansour O. T., Schweins R., Beck K., Buurma N. J., Dempsey C. E., Wright C. J., Rye P. D., Hill K. E., Thomas D. W., Ferguson E. L. The antimicrobial effects of the alginate oligomer OligoG CF-5/20 are independent of direct bacterial cell membrane disruption. *Sci Rep* **2017**, *7*, 44731.
54. Powell L. C., Adams J. Y. M., Quoraishi S., Py C., Oger A., Gazze S. A., Francis L. W., Von Ruhland C., Owens D., Rye P. D., Hill K. E., Pritchard M. F., Thomas D. W. Alginate oligosaccharides enhance the antifungal activity of nystatin against candidal biofilms. *Front Cell Infect Microbiol* **2023**, *13*, 1122340.
55. Freitas C. M. P., Coimbra J. S. R., Souza V. G. L., Sousa R. C. S., Structure and applications of pectin in food, biomedical, and pharmaceutical industry: a review. *Coatings* **2021**, *11*, 922.
56. Growney Kalaf E. A., Flores R., Bledsoe J. G., Sell S. A. Characterization of slow-gelling alginate hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications. *Mater Sci Eng C* **2016**, *63*, 198–210.
57. Awasthi R., Kulkarni G. T., Ramana M. V., De Jesus Andreoli Pinto T., Kikuchi I. S., Molim Ghisleni D. D., De Souza Braga M., De Bank P., Dua K. Dual crosslinked pectin–alginate network as sustained release hydrophilic matrix for repaglinide. *Int J Biol Macromol* **2017**, *97*, 721–732.

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

W związku z realizacją moich badań naukowych oraz zainteresowań zawodowych odbyłam następujące staże:

Ośrodki zagraniczne:

- Pobyt naukowo-badawczy w Department of Drug Technology and Social Pharmacy (Lithuanian University of Health Sciences) pod kierownictwem prof. Jurgi Bernatoniene dotyczący poszerzenia umiejętności z zakresu techniki suszenia rozpyłowego ekstraktów roślinnych oraz nabycie umiejętności wykorzystania techniki ekstruzji do otrzymywania nowoczesnych postaci leków **(1-30.06.2023 r., 30 dni, Kowno, Litwa, Załącznik nr 7)**. Efektem współpracy był manuskrypt opublikowany w czasopiśmie *Pharmaceutics* (Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.2., praca nr 15).

Ośrodki krajowe:

- Pobyt badawczy w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierownictwem prof. Małgorzaty Sznitowskiej dotyczący technik mikroskopowych oraz poszerzenia umiejętności badania właściwości mechanicznych filmów z wykorzystaniem analizatora tekstury Texture Analyzer TA.XT2 **(12-16. 09.2022 r., 5 dni, Gdańsk, Załącznik nr 7)**. Wynikiem pobytu był manuskrypt opublikowany w czasopiśmie *Pharmaceutics* (Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.2., praca nr 15).
- Pobyt naukowo-badawczy w Onkologicznej Grupie Badawczej firmy Celon Pharma S.A. pod kierownictwem dr Delfiny Popiel w zakresie nabycia umiejętności przeprowadzenia wstępnych badań dotyczących aktywności przeciwnowotworowej nowych związków wobec komórek niedrobnokomórkowego raka płuc **(08-12.08.2022 r., 5 dni, Kuzuń Nowy, Załącznik nr 7)**

Przedstawiony cykl prac dotyczących projektowania nowoczesnych form farmaceutycznych stanowi opracowanie technologii wykorzystania polisacharydowych polimerów pochodzenia naturalnego – alginianu sodu oraz fukoidanu w procesie otrzymywania mikrocząstek, lametek i hydrożeli zawierających chlorowoderek metforminy, lulikonazol, posakonazol i cynarozyd. Zaprezentowany zbiór monografii zawiera także charakterystykę opracowanych postaci leków w aspekcie właściwości fizykochemicznych i biologicznych, które przeprowadzono podczas pracy w Zakładzie Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, którego kierownikiem jest prof. Katarzyna Winnicka. W celu dokonania pełnej oceny otrzymanych postaci leku podjęto współpracę naukową z pracownikami jednostek Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, takich jak Zakład Histologii i Cytofizjologii, Zakład Farmakognozji, Zakład Chemii Leków, Zakład Bromatologii, Zakład Chemii Organicznej oraz Zakład Analizy i Bioanalizy Leków. Podczas pracy naukowej prowadzono także szereg wieloosrodkowych badań obejmujących współpracę z instytucjami krajowymi i zagranicznymi.

Współpraca z instytucjami zagranicznymi:

- współpraca z pracownikami Department of Drug Technology and Social Pharmacy (Lithuanian University of Health Sciences) kierowanym przez prof. Jurgę Bernatoniene, której efektem było dwukrotne uczestnictwo w warsztatach oraz prezentacja wykładu "Role of rheological and bioadhesion tests in the development of cosmetic products" w ramach międzynarodowego projektu Erasmus+ Blended Intensive Programme „Creating safe cosmetic products” (3.10 – 01.11.2022 r. i 25.09-24.10.2023). W wyniku nawiązanej współpracy odbyłam miesięczny pobyt podczas programu Erasmus+ (30 dni, 1-30.06.2023 r., Załącznik nr 7), który związany był z zapoznaniem się z techniką ekstruzji służącą do otrzymywania nowoczesnych postaci leków oraz poszerzeniem umiejętności suszenia rozpyłowego ekstraktów roślinnych. Dodatkowo nawiązana współpraca została poszerzona o badania filmów alginianowych oraz mini tabletek. Efektem współpracy był manuskrypt opublikowany w czasopiśmie *Pharmaceutics* (Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.2., praca nr 15).
- efektem współpracy z prof. Stanem Srčičem z Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana (Słowenia) w zakresie badań fizykochemicznych nośników leku zawierających modyfikowany fizycznie chitozan była publikacja w czasopiśmie *Marine Drugs* (Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.1, praca nr 6).
- współpraca z prof. Anitą Hafner i pracownikami Department of Pharmaceutical Technology, University of Zagreb (Chorwacja). Badania adhezji mikrocząstek oraz żeli zaowocowała 3 publikacjami zamieszczonymi w *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, Drying Technology i European Journal of Pharmaceutical Sciences* (Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.2., prace nr 2,7,9).

Współpraca z instytucjami krajowymi:

- współpraca z pracownikami Katedry i Zakładu Farmacji Stosowanej pod kierownictwem prof. Małgorzaty Sznitowskiej w zakresie poznania techniki suszenia rozpyłowego, analizy mikroskopowej za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego oraz właściwości mechanicznych filmów, etylocelulozowych mikrocząstek z rupatadyną skutkowało powstaniem dwóch prac opublikowanych w czasopismach *Polymers i Pharmaceutics* (Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.2., prace nr 3 i 15). W ramach współpracy z ośrodkiem odbyłam krótkoterminowy staż naukowy (12-16. 09.2022 r., 5 dni, Załącznik nr 7).
- współpraca z prof. Agnieszką Zofią Wilczewską oraz pracownikami Zakładu Polimerów i Syntezy Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku w zakresie analiz fizykochemicznych jest efektem manuskryptów opublikowanych w *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, Materials i Pharmaceutics* (Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.1., praca nr 9 oraz Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.2., prace nr 13 i 15).
- współpraca z prof. Patrycją Ciosek-Skibińską z Katedry Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej dotycząca maskowania smaku z wykorzystaniem tzw. „sztucznego języka” przyczyniła się do powstania trzech publikacji zamieszczonych w czasopismach *International Journal of Polymer Science, Acta Pharmaceutica i Polymers* (Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.1., prace nr 8 i 12 oraz Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.2., praca nr 3).

- wieloletnia współpraca z dr Anną Basą z Zakładu Chemii Materiałów Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku w zakresie analizy mikroskopowej zaowocowała powstaniem 6 prac zamieszczonych w czasopismach *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, *Acta Pharmaceutica*, *Polymers*, *Marine Drugs* i *International Journal of Molecular Sciences* (Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.1., prace nr 9 i 15 oraz Załącznik nr 4, rozdział II, pkt 1.2., prace nr 3, 6, 12, 14).
- współpraca z dr Delfiną Popiel, kierownikiem Onkologicznej Grupy Badawczej firmy Celon Pharma S.A. (Kazuń Nowy) w zakresie nabycia umiejętności przeprowadzenia badań wstępnych dotyczących aktywności przeciwnowotworowej nowych związków wobec komórek niedrobnokomórkowego raka płuc. W ramach współpracy z ośrodkiem odbyłam krótkoterminowy staż naukowy (08-12.08.2022 r., 5 dni, Załącznik nr 7).
- współpraca z prof. Adamem Tylickim i dr Magdaleną Czerniecką z Pracowni Cytobiochemii Wydziału Biologii Uniwersytetu w Białymstoku umożliwiła rozszerzenie moich badań o analizę mikrobiologiczną obejmującą ocenę aktywności przeciwgrzybiczej metodą dyfuzyjną. Wynikiem współpracy była organizacja przeze mnie pracowni mikrobiologicznej w Zakładzie Farmacji Stosowanej (2018 r.)

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

6.1. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

6.1.1. Kształcenie przeddyplomowe

- od momentu zatrudnienia w Zakładzie Farmacji Stosowanej aktualizacja i prowadzenie zajęć dla studentów III, IV i V roku Farmacji z przedmiotu Technologia Postaci Leku (od 2010 r. do chwili obecnej)
- od momentu zatrudnienia w Zakładzie Farmacji Stosowanej aktualizacja i prowadzenie zajęć dla studentów V roku Farmacji z przedmiotu Farmacja praktyczna w aptece z opieką farmaceutyczną (od 2010 r. do chwili obecnej)
- Od 2015 roku opracowanie i prowadzenie wykładu dla studentów IV roku kierunku Farmacja: „Suszenie. Liofilizacja i wytrawianie surowców roślinnych”.

6.1.2. Kształcenie podyplomowe

- Od 2021 roku opracowanie oraz prowadzenie wykładów oraz ćwiczeń w ramach szkolenia specjalizacyjnego dla farmaceutów w ramach Modułu V "Opieka farmaceutyczna" organizowanego przez Studium Kształcenia Podyplomowego na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku:

„Rozpoznawanie, klasyfikowanie i rozwiązywanie problemów związanych ze stosowaniem leków, w tym zaplanowanie i wykonanie przeglądu lekowego”

„Naukowe podstawy praktyki farmaceutycznej (*Pharmacy Evidence Based*) i ich wykorzystanie w planowaniu i prowadzeniu usług z zakresu opieki farmaceutycznej”

„Opieka farmaceutyczna nad pacjentem z alergią”

- Prowadzenie warsztatów w ramach kształcenia ciągłego farmaceutów „Leki recepturowe wykonywane w warunkach aseptycznych” (11.05.2019 r., Białystok)
- Wykład on-line podczas konferencji naukowo-szkoleniowej organizowanej w ramach kształcenia ciągłego farmaceutów „Opieka farmaceutyczna nad pacjentem z alergią i chorobami skóry” Studium Kształcenia Podyplomowego na Wydziale Farmaceutycznym UMB (28-29.04.2021 r.)
- Wykład on-line podczas programu szkoleniowego dotyczącego najnowszych trendów w recepturze aptecznej w ramach kształcenia ciągłego farmaceutów „Cygnolina w recepturze – co warto wiedzieć” organizowanego przez Akademię Fagronu i Okręgową Izbę Aptekarską w Krakowie (16.11.2023 r.)
- Kierownik specjalizacji z Farmacji aptecznej 6 magistrów Farmacji (od 2017 r. – do chwili obecnej)

6.1.3. Opieka naukowa nad studentami

- W latach 2015-2018 opiekun 4 prac magisterskich
- Od 2019 promotor 3 prac magisterskich:
 - „Ocena wpływu sieciowania chlorkiem wapnia na jakość alginianowych mikrocząstek z chlorowodorkiem metforminy”, Katarzyna Zuzanna Żukowska, Farmacja (2019 r.)
 - „Wpływ dodatku polimeru pochodzenia naturalnego na właściwości farmaceutyczne hydrożeli alginianowych”, Joanna Zajączkowska, Farmacja (2022 r.)
 - „Ocena możliwości otrzymywania mikrocząstek z lulikonazolem na bazie alginianowo-żelatynowych kompleksów polielektrolitowych metodą suszenia rozpyłowego.” Weronika Pieńkusz, Farmacja (2023 r.)
- Opieka naukowa nad studentami biorącymi udział w konferencjach BIMC (Białystok International Medical Congress for Young Scientists)
 - Mińczuk J., Szekalska M., Winnicka K. Capsules with alginate microspheres with ranitidine hydrochloride as multicompartiment dosage form. 11th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, Poland (2016 r.)
 - Lachowicz J., Szekalska M., Winnicka K. Hard gelatin capsules with alginate microspheres containing metronidazole. 12th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, Poland (2017 r.)
 - Rogowska D., Szekalska M., Wróblewska M., Winnicka K. Comparison of parenteral dosage forms preparation by using volumetric and gravimetric technique with the computer software. 13th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, Poland (2018 r.)

Chyży A., Szekalska M., Winnicka K. Metformin-loaded alginate microparticles as an antidiabetic carrier with swelling properties. 13th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, Poland (2018 r.)

- Opieka naukowa nad studentkami z Portugalii biorącymi udział w wymianie naukowej organizowanej przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Studentów Medycyny (IFMSA) (sierpień, 2023 r.)

6.2. OSIĄGNIĘCIA W ZAKRESIE POPULARYZACJI NAUKI

- uczestnictwo w warsztatach oraz prezentacja wykładu "Role of rheological and bioadhesion tests in the development of cosmetic products" w ramach międzynarodowego projektu Erasmus+ Blended Intensive Programme „Creating safe cosmetic products” organizowanego przez Department of Drug Technology and Social Pharmacy Lithuanian University of Health Sciences (3.10 – 01.11.2022 r. i 25.09-24.10.2023 r., Załącznik nr 7)

- Publikacje popularno-naukowe (11 prac opublikowanych latach 2011-2023):

Przybysławska M., Winnicka K. Mikro kapsułki – budowa i perspektywy zastosowania. *Farmacja Polska* **2011**, 67 (11), 776–781. MEiN = 3

Przybysławska M., Winnicka K. Technologie otrzymywania mikrokapsulek. *Farmacja Polska* **2012**, 68 (4) 283–289. MEiN = 3

Szekalska M., Winnicka K. Wykorzystanie *sapo kalinus* w recepturze aptecznej. *Recepta.PL* **2018**, 6–7, 34–37. MEiN = 1

Olechno K., **Szekalska M.**, Sosnowska K., Winnicka K. O wykorzystaniu leków gotowych w półstałych preparatach recepturowych. Cz. 1. *Recepta.PL* **2022**, 3 (243), 28–33. MEiN = 5

Olechno K., **Szekalska M.**, Winnicka K. O wykorzystaniu leków gotowych w półstałych preparatach recepturowych. Cz. 2. *Recepta.PL* **2022**, 4 (244), 42–45. MEiN = 5

Olechno K., **Szekalska M.**, Winnicka K. O doborze podłoża maściowego. Cz. 1. *Recepta.PL* **2022**, 1, 30–36. MEiN = 5

Olechno K., **Szekalska M.**, Winnicka K. O doborze podłoża maściowego. Cz. 2: Możliwości wykorzystania lekobazy PhC, lekobazy LUX i Pentravanu. *Recepta.PL* **2022**, 242 (2), 28–34. MEiN = 5

Szekalska M., Olechno K., Winnicka K. Preliminary evaluation of alginate/pectin buccal films with posaconazole prepared by solvent casting technique. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, **2023**, 69, Supl. 1, 121-122.

Olechno K., **Szekalska M.**, Winnicka K. O wykorzystaniu progesteronu w recepturze aptecznej. *Recepta.PL* **2023**, 1 (247), s. 34-37. MEiN = 5

Olechno K., **Szekalska M.**, Winnicka K. O wykorzystaniu wodzianu chloralu w recepturze aptecznej. *Recepta.PL* **2023**, 2 (248), s. 34-38. MEiN = 5

Olechno K., **Szekalska M.**, Winnicka K. O wykorzystaniu leków recepturowych w chorobach proktologicznych. *Recepta.PL* **2023**, 3 (249), s. 28-33. MEiN = 5

- Organizacja, nadzór merytoryczny i prowadzenie warsztatów "Jak zrobić tabletki i żelki z witaminą C oraz jak udzielić porad pacjentowi w aptece?" dla uczniów szkół podstawowych, ponadpodstawowych oraz dzieci w wieku przedszkolnym w ramach akcji promocyjnych:
 - "Studium w UMB" (2016 r., 2017 r., 2023 r.)
 - IV i V edycja miejskiego projektu Białostockie Talenty XXI wieku (2017 r., 2018 r.)
 - XV, XVI, XVIII, XIX Podlaski Festiwal Nauki i Sztuki (2017 r., 2018 r., 2022 r., 2023 r.)
 - warsztaty dla podopiecznych Fundacji "Dzieło Nowego Tysiąclecia" (2017 r.)
 - warsztaty dla dzieci w przedszkolu im. Ks. F. Blachnickiego w Białymstoku (2019 r.)
 - warsztaty dla podopiecznych Fundacji KLANZA pochodzących z Ukrainy (2022 r.)
 - warsztaty dla klasy I szkoły podstawowej Zespołu Szkół Mistrzostwa Sportowego w Białymstoku (2022 r.)
 - warsztaty w ramach promocji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku dla licealnej młodzieży z Siedlec (2023 r.)
- udział w przedsięwzięciu badawczo-wdrożeniowym „Niezbędnik hotelarza cz. III – Eco is HOT” w ramach projektu EcoCentrum Kompetencji BOF – utworzenie branżowego centrum kompetencji w obszarze efektywności gospodarowania energią i zasobami – organizacja, nadzór merytoryczny, opracowanie receptur oraz prowadzenie warsztatów dotyczących wykorzystania pozostałości hotelarskich w recepturze kosmetyków w ramach podejścia „zero waste” do gospodarowania odpadami (2022 r.)
- udział w przedsięwzięciu badawczo-wdrożeniowym „Głos na Eco włos – ekologiczny fryzjer” w ramach projektu EcoCentrum Kompetencji BOF – utworzenie branżowego centrum kompetencji w obszarze efektywności gospodarowania energią i zasobami – organizacja, nadzór merytoryczny i prowadzenie warsztatów dotyczących opracowania receptur preparatów kosmetycznych stosowanych w pielęgnacji włosów (2022 r.)
- udział w przygotowaniu scenariusza oraz uczestnictwo w filmie z cyklu Teraz już wiem – cykl filmów edukacyjnych pt. „Tabletka tabletkie nierówna, czyli o nowoczesnych postaciach leku” (03.2023 r.)

6.3. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

- Członek zespołu kontrolującego praktyki zawodowe na kierunku Farmacja (od 2017 r. do chwili obecnej)
- Członek Państwowej Komisji Egzaminacyjnej przeprowadzającej Państwowy Egzamin Specjalizacyjny Farmaceutów w dziedzinie Farmacja Aptečna (od 09.10.2018 r. do chwili obecnej)
- Członek komisji egzaminacyjnej podczas Państwowego Egzaminu Specjalizacyjnego Farmaceutów w dziedzinie Farmacja Aptečna (Białystok, 14-15.12.2018 r.)
- Członek komisji konkursowej podczas konferencji 13th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok (2018 r.)

- Organizacja pracowni mikrobiologicznej w Zakładzie Farmacji Stosowanej, dzięki współpracy z prof. Adamem Tylickim i dr Magdaleną Czerniecką z Pracowni Cytobiochemii Wydziału Biologii Uniwersytetu w Białymstoku (2018 r.)
- Funkcja Guest Editor numeru specjalnego pt. "New Technology for Prolonged Drug Release" czasopisma *Pharmaceutics* (13.12.2021 r. – 20.05.2023 r., Załącznik nr 7)
- Funkcja Guest Editor numeru specjalnego pt. "New Technology for Prolonged Drug Release, 2nd Edition" czasopisma *Pharmaceutics* (od 31.05.2023 r. – do chwili obecnej, Załącznik nr 7)

7. PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ I OSIĄGNIĘCIA ZAWODOWE

7.1. Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

W 2004 roku podjęłam studia na kierunku Farmacja Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Pracę magisterską zatytułowaną "Wstępne badania fitochemiczne ziela uczezu zwisłego *Bidens cernua* L. (*Asteraceae*)" przeprowadzoną pod kierunkiem dr n. farm. Moniki Tomczyk obroniłam w czerwcu 2009 roku, uzyskując tytuł magistra farmacji. Tematyka pracy dotyczyła wykonania ekstraktów z ziela uczezu zwisłego *Bidens cernua* oraz dokonania ich wstępnej analizy fitochemicznej. Przygotowane wyciągi oceniano pod kątem zawartości związków flawonoidowych, saponin, garbników, steroli, triterpenów oraz alkaloidów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i chromatografii cienkowarstwowej. W 2010 roku rozpoczęłam pracę w Zakładzie Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku na stanowisku asystenta. Moje zainteresowania i prace badawcze związane były z projektowaniem, sporządzaniem oraz oceną jakości wielokompartментowych postaci leków o właściwościach mukoadhezyjnych. W badaniach naukowych prowadzonych przed uzyskaniem stopnia doktora skupiłam się na technologii otrzymywania alginianowych mikrosfer metodą suszenia rozpyłowego. W celu zapoznania się z techniką w ramach współpracy z Katedrą i Zakładem Farmacji Stosowanej kierowaną przez prof. Małgorzatę Sznitowską odbyłam krótkoterminowy staż naukowo-badawczy (2 dni, 2011 r.). W toku badań opracowałam technologię otrzymywania mikrocząstek zawierających substancje charakteryzujące się różną rozpuszczalnością w wodzie tj. metronidazol, chlorowodorek ranitydyny i chlorowodorek metforminy. Otrzymane mikrocząstki zostały poddane szczegółowej analizie. W związku z tym, że istnieją doniesienia na temat aktywności hipoglikemicznej alginianu sodu podjęłam badania nad wpływem zastosowanego polimeru na działanie chlorowodoru metforminy. Przeprowadziłam badania *in vitro* obejmujące oznaczenie wychwytu glukozy przez komórki *Saccharomyces cerevisiae* oraz oznaczenie aktywności α -amylazy. Wyniki badań potwierdziły działanie synergistyczne alginianu sodu i chlorowodoru metforminy. W związku z tym w kolejny etap moich badań obejmował ocenę wpływu polimeru na aktywność hipoglikemiczną chlorowodoru metforminy w badaniu *in vivo* z wykorzystaniem zwierzęcego modelu cukrzycy typu 2 u szczurów rasy Wistars (zgoda Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 156/2015). Analiza histopatologiczna narządów zwierząt wykazała, że mikrocząstki alginianowe umożliwiły zmniejszenie zmian degeneracyjnych powstałych w wyniku hiperglikemii.

W kolejnym etapie badań otrzymane mikrocząstki zostały przeanalizowane pod kątem technologicznym możliwości ich zastosowania jako wypełnienia twardych kapsułek żelatynowych. Przeprowadzone badania wykazały, że kapsułki zawierające mikrocząstki z metronidazolem oraz mikrocząstki sieciowane chitozanem zawierające chlorowodorek metforminy zapewniały przedłużone uwalnianie substancji leczniczej. Dodatkowo zaobserwowano, że zarówno mikrosfery

jak i kapsułki zawierające mikrosfery z chlorowodorkiem ranitydyny nie wykazały stabilności w teście przyspieszonego starzenia.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Prace stanowiły rozprawę doktorską zatytułowaną „Ocena możliwości zastosowania mikrosfer alginianowych jako nośników modelowych substancji leczniczych” przygotowaną pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Winnickiej, która umożliwiła mi uzyskanie tytułu doktora nauk farmaceutycznych 29 czerwca 2017 roku.

W obszarze moich zainteresowań, poza przedstawionymi alginianowymi mikrosferami otrzymywanymi w procesie suszenia rozpyłowego znajdowały się także techniki otrzymywania oraz badania jakości hydrożeli z dendrymerami, tabletek szybko rozpadających się w jamie ustnej (ODT), mikrocząstek metakrylanowych z chlorowodorkiem cetyryzyny, chitozanowych mikrocząstek z klotrimazolem sieciowanych za pomocą fosforanu glicerolu.

Szereg przeprowadzonych przeze mnie badań stanowiło temat projektów naukowych finansowanych z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w których pełniłam funkcję kierownika lub współwykonawcy projektu. W latach 2013-2014 pełniłam funkcję **współwykonawcy** projektu „Opracowanie innowacyjnego preparatu o właściwościach obniżania indeksu glikemicznego spożywanych posiłków” w ramach programu InnoTech w ścieżce programowej IN-TECH, finansowanego przez **Narodowe Centrum Badań i Rozwoju** (INNOTECH-K2/IN2/25/182039/NCBR/13, kierownik projektu prof. Adam Jacek Krętowski, *Załącznik nr 7*). Mój udział w projekcie polegał na przeprowadzeniu badań technologicznych wyciągów z fasoli, zielonej kawy, morwy białej, inuliny, glukomannanu i tylakoidów szpinaku.

7.2. Przebieg pracy po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam pracę w Zakładzie Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, a w 2021 roku objęłam stanowisko adiunkta badawczo-dydaktycznego. Zainteresowanie tematyką nowoczesnych nośników farmaceutycznych oraz wykorzystaniem związków polimerowych w projektowaniu postaci leków stało się przedmiotem kolejnych projektów badawczych, zarówno naukowych finansowanych z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, jak i działania naukowego w ramach konkursu **Miniatura 2** organizowanego przez **Narodowe Centrum Nauki** pt. „Perspektywy wykorzystania alginianu sodu i jego oligosacharydów do otrzymywania mukoadhezyjnych lametek z posakonazolem do podania dopoliczkowego” (DEC-2018/02/X/NZ7/02622, budżet działania 50 000 zł), w których pełniłam funkcję kierownika (*Załącznik nr 7*).

Podjęłam prace dotyczące projektowania nowoczesnych postaci farmaceutycznych opartych na wykorzystaniu naturalnych polimerów polisacharydowych – alginianu sodu i fukoidanu oraz ich modyfikacji za pomocą technik sieciowania (za pomocą CaCl_2 , CaCO_3 , zamrażania i rozmrażania oraz tworzenia kompleksów polielektrolitowych) oraz łączenia z innymi polimerami pochodzenia naturalnego (żelatyna, chitozan, pektyna, oligosacharydy alginianowe). Na podstawie szeregu badań wstępnych opracowałam technologię otrzymywania:

- mikrocząstek (alginianowo-żelatynowych z lulikonazolem, fukoidanowo-żelatynowych z posakonazolem oraz alginianowych sieciowanych za pomocą CaCl_2 zawierających chlorowodorek metforminy)
- hydrożeli (alginianowych z cynarozidem oraz hydro- i kriożeli alginianowo-chitozanowych sieciowanych techniką tzw. *freeze-thaw* z posakonazolem)

- lamelek podpoliczkowych (alginianowo-oligosacharydowych z posakonazolem sieciowanych techniką tzw. *freeze-thaw*, alginianowo-pektynowych z posakonazolem sieciowanych za pomocą CaCO_3)

Otrzymane postacie leków poddałam analizie farmaceutycznej. Badania prowadziłam głównie w Zakładzie Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Podejmowałam współpracę naukową z pracownikami jednostek Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (Zakład Histologii i Cytofizjologii, Zakład Farmakognozji, Zakład Chemii Leków, Zakład Bromatologii, Zakład Chemii Organicznej oraz Zakład Analizy i Bioanalizy Leków). Badania w zakresie analizy mikroskopowej oraz analizy fizykochemicznych przeprowadziłam we współpracy z pracownikami Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Podczas krótkoterminowego pobytu naukowo-szkoleniowego w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej kierowanej przez prof. Małgorzatę Sznitowską dokonałam analizy mikroskopowej filmów alginianowo-pektynowych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego oraz przeprowadziłam ocenę ich właściwości mechanicznych.

Istotnym elementem badań była ocena wpływu zastosowanych polimerów na aktywność biologiczną substancji leczniczych. Dzięki współpracy z prof. Adamem Tylickim i dr Magdaleną Czerniecką z Pracowni Cytobiochemii Wydziału Biologii Uniwersytetu w Białymstoku rozszerzyłam swój warsztat badawczy o analizę mikrobiologiczną obejmującą ocenę aktywności przeciwwgrzybiczej metodą dyfuzyjną. Nabyte umiejętności pozwoliły mi na przeprowadzenie badań wpływu alginianu sodu oraz wprowadzonych modyfikacji w opracowanych przeze mnie postaciach na aktywność przeciwwgrzybiczą posakonazolu i lulikonazolu wobec gatunków *Candida albicans*, *Candida krusei* i *Candida parapsilosis*.

W związku z istniejącymi doniesieniami na temat działania przeciwzapalnego i przeciwalergicznego alginianu sodu dokonałam oceny wpływu polimeru na aktywność flawonoidowej pochodnej luteoliny (wyizolowanej i zbadanej we współpracy z dr hab. Michałem Tomczykiem z Zakładu Farmakognozji i dr Moniką Tomczyk z Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku). Przeprowadzone badania *in vivo* z wykorzystaniem myszy oraz przeprowadzona analiza histopatologiczna i immunochemiczna przeprowadzona we współpracy z prof. Ireną Kasacką z Zakładu Histologii i Cytofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wykazały, że alginian sodu wywiera korzystny efekt przeciwzapalny.

W wyniku przeprowadzenia szeregu doświadczeń z zakresu technologii farmaceutycznej poszerzyłam wiedzę na temat roli alginianu sodu i fukoidanu jako przedstawicieli naturalnych polimerów polisacharydowych w projektowaniu nowoczesnych postaci leku. Planowanie badań oraz ocena danych umożliwiły pogłębienie moich umiejętności w zakresie analizy jakościowej otrzymanych formułacji. Otrzymane wyniki badań zawarłam w 7 powiązanych tematycznie publikacjach, które stanowią podstawę do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Zainteresowania dotyczące właściwości mukoadhezyjnych polimerów oraz ich analiza z wykorzystaniem zwierzęcego modelu błony śluzowej imitującego warunki *in vivo* zaowocowało współpracą z pracownikami Department of Pharmaceutical Technology, University of Zagreb (Chorwacja). Mój wkład opierał się na przeprowadzeniu badań mukoadhezji pektynowych mikrocząstek oraz ustaleniu zależności pomiędzy składem 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 związku z tym, że doznania smakowe stanowią istotną rolę w przypadku doustnych postaci leku uczestniczyłam w badaniach dotyczących zastosowania etylocelulozy jako polimeru maskującego nieprzyjemny smak fumaranu rupatadyny w postaci mikrocząstek suszonych rozpyłowo. Moje szerokie doświadczenie w otrzymywaniu mikrosfer w procesie suszenia rozpyłowego pozwoliło na otrzymanie szeregu formułacji, które następnie poddano analizie farmaceutycznej. Ważnym etapem badań

była ocena stopnia zamaskowania smaku, którą wykonano z wykorzystaniem tzw. „sztucznego języka” we współpracy z prof. Patrycją Ciosek-Skibińską z Katedry Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej.

Umiejętności w zakresie badań mikrobiologicznych dotyczących oceny aktywności przeciwwgrzybiczej sprawiły, że w obszarze moich badań znalazły się także żele z metronidazolem do stosowania w jamie ustnej oraz oleożele i biżele z ketokonazolem wykonane przez dr Magdalenę Wróblewską z Zakładu Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Efektom współpracy międzyuczelnianej był mój udział w warsztatach oraz prezentacja wykładu „Role of rheological and bioadhesion tests in the development of cosmetic products” w ramach projektu Erasmus+ Blended Intensive Programme „Creating safe cosmetic products” organizowanego przez Department of Drug Technology and Social Pharmacy (Lithuanian University of Health Sciences) kierowanego przez prof. Jurgę Bernatoniene (w 2022 i w 2023 roku). W ramach nawiązanej współpracy podczas 30-dniowego pobytu w czerwcu 2023 roku podjęłam badania dotyczące otrzymywania alginianowych mikrokapsułek z posakonazolem na drodze ekstruzji. Podczas stażu poszerzyłam również umiejętności w zakresie suszenia rozpyłowego ekstraktów roślinnych. Dodatkowo nawiązana podczas pobytu współpraca została poszerzona o wspólne badania dotyczące alginianowych filmów podpoliczkowych oraz mini tabletek.

W związku z realizacją moich badań naukowych oraz zainteresowań zawodowych odbyłam krótkoterminowy pobyt w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (5 dni w 2022 r.), w jednostce badawczo-rozwojowej (Onkologiczna Grupa Badawcza Celon Pharma S.A., 5 dni w 2022 r.) oraz pobyt 30 dniowy w Department of Drug Technology and Social Pharmacy (Lithuanian University of Health Sciences, Kowno, Litwa, 30 dni w 2023 r., *Załącznik nr 7*).

Przedstawiony dorobek naukowy obejmuje:

- 27 publikacji naukowych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (w tym prace poglądowe) o sumarycznym współczynniku oddziaływania Impact Factor wg listy Journal Citation Reports **IF = 76,488** (punktacja zgodna z IF obowiązującym w danym roku opublikowania) oraz punktacją **MEiN = 1862** (punktacja MEiN zgodna z obowiązującym w danym roku/okresie wykazem ministerialnym czasopism)
- 11 publikacji popularyzujących nauki farmaceutyczne,
- 27 wystąpień konferencyjnych, w tym 8 na konferencjach międzynarodowych,
- 4 wystąpienia na wykładach na zaproszenie.

7.3. Doskonalenie zawodowe

- Specjalizacja z farmacji aptecznej (2015 r., *Załącznik nr 7*)
- Kursy i szkolenia w ramach szkolenia ciągłego farmaceutów zgodnie z aktualnym rozporządzeniem Ministra Zdrowia z 20 lutego 2018 r. (od 2010 r. do chwili obecnej)

7.4. Doskonalenie naukowe

- V i X Letnia Szkoła Technologii Farmaceutycznej organizowana przez Katedrę i Zakład Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk (2011 r., 2017 r.)

- Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń na zwierzętach oraz za ich przeprowadzenie, szkolenie dla osób wykonujących procedury na zwierzętach, szkolenie dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach, Białystok (13-17.07.2015 r.)
- Seminarium chromatograficzne, Merck, Warszawa (2016 r.)
- Seminarium i warsztaty poświęcone skaningowym mikroskopom elektronowym firmy Phenom World Firma PIK Instruments, Białystok (2016 r.)
- Seminarium na temat badania uwalniania substancji czynnej z różnych form leków metodami farmakopealnymi USP 1,2,3,4,5,6,7, Warszawa (2016 r.)
- Seminarium „Innowacje techniczne i aplikacyjne w analizie chemicznej: najnowsze rozwiązania i zastosowania spektroskopii oraz chromatografii” organizowane przez firmę SHIM-POL A.M. Borzymowski oraz Wydział Biologiczno-Chemiczny Uniwersytetu w Białymstoku (2017 r.)
- Warsztaty: „Różnice pomiędzy utrzymywaniem zwierząt w klatkach konwencjonalnych i systemach klatek IVC, urządzenia do anestezji i uśmiercania zwierząt laboratoryjnych, przeprowadzenie badań w klatkach metabolicznych systemy do badań telemetrycznych dla małych i dużych zwierząt”, Anima Vivari, Białystok (2017 r.)
- Udział w programie szkoleniowym dla lekarzy i farmaceutów dotyczącym najnowszych trendów w recepturze aptecznej organizowanym w ramach Akademii Fagronu – łącznie 36 webinarów (2021-2023 r.)
- Uczestnictwo w wykładach online Pharmaceutical Technology: „Ensuring stability excellence for global consumer and OTC products”, “Small molecule testing – regulatory expectations, risk assessment and analytical strategies” i “Scale up considerations for dry powder inhaler manufacturing by spray drying” (2023 r.)
- Uczestnictwo w serii wykładów online „Amorphous Solid Dispersions by Spray Drying” organizowanych przez Pharmaceutical Technology dotyczących procesu suszenia rozpyłowego obejmujących trzy webinary: „Evaluating the best formulations for amorphous solid dispersions by spray drying”, “ASDs by spray drying: process development & scale-up”, “Commercial reality and lifecycle management of ASD” (2023 r.)
- Uczestnictwo w webinarze organizowanym przez Hanson Research: „In vitro permeation as a development tool for transdermal and topical patches” (2023 r.)
- Uczestnictwo w Sympozjum online organizowanym przez platformę Pharmaceutical Technology „Emerging Trends in the Pharma Industry: Drug Development, Sustainability, and Digitalization” (27-29.06.2023 r.)
- Wykonanie recenzji manuskryptów do czasopism:
Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research – 23 recenzje (w latach 2017-2023)

Czasopisma z wydawnictwa MDPI: *Materials, Polymers, Pharmaceuticals, Processes, Foods, Clean Technologies, Plants, ChemEngineering, Biomolecules, Marine Drugs, International Journal of Molecular Sciences, Cancers, Nanomaterials, Molecules, Processes, Journal of Functional Biomaterials, Micromachines, Clean Technologies, Applied Sciences* – 53 recenzje (w latach 2018-2023)

Journal of Drug Delivery Science and Technology – 5 recenzji (w latach 2019-2023)

Journal of Biomolecular Structure & Dynamics Molecules – 1 recenzja (2022 r.)

Pharmaceutical Development and Technology – 4 recenzje (w latach 2022-2023)

Journal of Chemistry – 2 recenzje (2021 r.)

Carbohydrate – 1 recenzja (2021 r.)

7.5. Doskonalenie dydaktyczne

– Warsztaty:

„Zarządzanie informacją medyczną – zasady dobrych praktyk” w ramach projektu: „Rozwój kompetencji dydaktycznych pracowników Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku” Uniwersytet Medyczny w Białymstoku (25 godzin dydaktycznych, 22-24.06.2018 r.)

„Zarządzanie informacją o pacjencie oraz informacją kierowaną do pacjenta” warsztaty organizowane przez Zakład Farmacji Społecznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w ramach projektu: „Rozwój kompetencji dydaktycznych pracowników Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku”, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku (50 godzin dydaktycznych, 20-22 oraz 27-29.04.2018 r.)

– Szkolenia:

Kurs pedagogiki i dydaktyki zakończony uzyskaniem certyfikatu organizowany przez Pracownię Dydaktyki, Studium Filozofii i Psychologii Człowieka, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku (2012 r.)

Kurs: „Język angielski medyczny dla celów dydaktycznych” na poziomie B2 realizowany w ramach projektu: „Wyższa jakość kształcenia kluczem do rozwoju Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku” Uniwersytet Medyczny w Białymstoku (2012 – 2013)

„Implementacja metody design thinking w procesie rozwiązywania problemów metodycznych w analizie chemicznej wykorzystującej chromatografię cieczową (HPLC)”, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku (2018 r.)

„Wykorzystanie metody design thinking w dydaktyce” szkolenie w ramach projektu: „Rozwój kompetencji dydaktycznych pracowników Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku” (10-11.04.2018 r.)

64-godzinny kurs certyfikujący eksperckiego szkolenia z tutoringu realizowanego w ramach projektu „Program zintegrowanego rozwoju jakości kształcenia na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku” przeprowadzonego przez Szkołę Tutorów Akademickich Collegium Wratislaviense (13.09-23.09.2021 r.)

Szkolenie „Techniki prezentacji i wystąpień publicznych a innowacyjna dydaktyka” realizowane w ramach projektu „Program zintegrowanego rozwoju jakości kształcenia na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku” przeprowadzone przez Collegium Wratislaviense (21-22.06.2021r.)

Szkolenie „Nowoczesne metody dydaktyczne” realizowane w ramach projektu „Doskonałość dydaktyczna uczelni” 16 godzin dydaktycznych, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku (3-4.07.2023 r.)

7.6. Nagrody i wyróżnienia

- III Nagroda w V edycji konkursu Lider Nauk Farmaceutycznych organizowanego przez Gazetę Farmaceutyczną pod patronatem firmy Gedeon Richter (konkurs na najlepsze prace doktorskie w dziedzinie nauk farmaceutycznych, 2018 r., *Załącznik nr 7*)
- 8 nagród Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za osiągnięcia naukowe:
 - 1 Nagroda I° (za osiągnięcia naukowe w 2019 roku)
 - 5 Nagród II° (za osiągnięcia naukowe w 2015, 2016, 2017, 2018 i 2020 roku)
 - 2 Nagrody III° (za osiągnięcia naukowe w 2011 i 2021 roku)
- I miejsce w konkursie za najlepszy plakat pt. *“Otrzymywanie alginianowych mikrokapsulek z metronidazolem metodą suszenia rozpyłowego”* podczas konferencji “Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych”, Lublin (2012 r.)
- I miejsce w konkursie za najlepszy plakat pt. *“Quality evaluation of microparticles with cetirizine dihydrochloride obtained by the spray drying technique”* podczas konferencji “Pharmacy Today and Tomorrow – Theory and Practice”, Lublin (2015 r.)

.....
Podpis wnioskodawcy