



AUTOREFERAT

**Mikrosfery lipidowe – analiza dystrybucji
substancji leczniczej w układzie i dostępności farmaceutycznej
jako właściwości determinujących zastosowanie SLM**

dr n. farm. Eliza Wolska

Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Gdańsk 2024

1. Imię i nazwisko

Eliza Wolska

Numer ORCID: 0000-0003-3536-0148

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne

2007 **Magister farmacji**

Akademia Medyczna w Gdańsku, Wydział Farmaceutyczny

Tytuł pracy magisterskiej: „*Sporządzanie zawiesin recepturowych z wykorzystaniem nowoczesnych substancji zwiększających lepkość fazy rozpraszającej*”

Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Małgorzata Sznitowska

2014 **Doktor nauk farmaceutycznych**

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny

Tytuł pracy doktorskiej: „*Zawiesina mikrosfer lipidowych (SLM) jako nowa postać leku do oka z cyklosporyną*”

Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Małgorzata Sznitowska

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2007 – 2015: asystent, Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

2015 – obecnie: adiunkt naukowo-dydaktyczny, Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

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

„**Mikrosfery lipidowe – analiza dystrybucji substancji leczniczej w układzie i dostępności farmaceutycznej jako właściwości determinujących zastosowanie SLM,**”

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi cykl 6 prac oryginalnych powiązanych tematycznie i opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), o sumarycznym współczynniku oddziaływania **Impact Factor (IF): 30.283** i sumarycznej punktacji **MEiN: 610 pkt.** Wszystkie publikacje w cyklu powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych i jestem w nich pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

Szczegółowy udział Współautorów określający indywidualny wkład merytoryczny każdego z Nich w powstanie poszczególnych prac został opisany poniżej w punkcie 4.4. oraz szczegółowo przedstawiony w Załączniku 4 (pkt. I.2. Wkład współautorów w powstanie cyklu publikacji).

[H1] **Eliza Wolska**, Małgorzata Sznitowska, Katarzyna Krzemińska, Maria Ferreira Monteiro. Analytical techniques for the assessment of drug-lipid interactions and the active substance distribution in liquid dispersions of Solid Lipid Microparticles (SLM) produced *de novo* and reconstituted from spray-dried powders. *Pharmaceutics* 2020; 12(7): 1–22.

IF: **6.321**, MEiN: **100**

[H2] **Eliza Wolska**, Géza Regdon, Jr. Thermal analysis in the evaluation of Solid Lipid Microparticles in the form of aqueous dispersion and fine powder. *Applied Sciences* 2023; 13(24): 1–14.

IF: **2.700**, MEiN: **100**

[H3] **Eliza Wolska**. Fine powder of lipid microparticles – spray drying process development and optimization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2021; 64: 1–12.

IF: **5.062**, MEiN: **70**

[H4] **Eliza Wolska**, Marta Brach. Distribution of drug substances in Solid Lipid Microparticles (SLM) – methods of analysis and interpretation. *Pharmaceutics* 2022; 14(2): 1–18.

IF: **5.400**, MEiN: **100**

[H5] **Eliza Wolska**, Martyna Szymańska. Comparison of the *in vitro* drug release methods for the selection of test conditions to characterize Solid Lipid Microparticles. *Pharmaceutics* 2023; 15(2): 1–19.

IF: **5.400**, MEiN: **140**

[H6] Eliza Wolska, Karolina Sadowska. Drug release from lipid microparticles – insights into drug incorporation and the influence of physiological factors. *Pharmaceutics* 2024; 16(4): 1–17.

IF: 5.400, MEiN: 100

Prezentowane wyniki badań, wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego, poza wyżej wymienionymi publikacjami, były także przedstawiane w czasie 2 prezentacji ustnych na konferencji krajowej (Gdańsk) i międzynarodowej (Ankara), jak również w formie prezentacji posterowej (3 konferencje międzynarodowe). Szczegółowy spis – patrz Załącznik 4 (Wykaz osiągnięć naukowych).

4.3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników

Wprowadzenie

Stałe cząstki lipidowe, nazywane też liposferami, to przykład wszechstronnych nośników o wielu potencjalnych zastosowaniach [1–3]. W obrębie stałych cząstek lipidowych można wyróżnić trzy kategorie: SLN (*Solid Lipid Nanoparticles*, stałe nanocząstki lipidowe), NLC (*Nanostructured Lipid Carriers*, nanostrukturalne nośniki lipidowe) i SLM (*Solid Lipid Microparticles*, stałe mikrocząstki lipidowe). SLN, będące jak dotąd najpowszechniejszym przedmiotem badań, zaproponowano na początku lat 90. XX wieku jako nośnik leków alternatywny do emulsji, liposomów i mikrocząstek polimerowych [4]. Otrzymano je poprzez zastąpienie oleju w emulsji typu o/w do podania pozajelitowego matrycą z lipidów stałych w temperaturze ciała ludzkiego [5]. Pewne pokrewieństwo wskazuje się także do innych formułacji, takich jak liposomy czy nanocząstki polimerowe [6]. Z kolei SLM powstały na bazie SLN, ale jako większe cząstki, łączące zalety nośników lipidowych (jak SLN) z formułacjami w skali mikrocząstek (jak mikrosfery polimerowe), przy jednoczesnym wyeliminowaniu ryzyka związanego z rozmiarem „nano”, czy toksyczności i ograniczeń związanych z polimerami. Przewagą mikronośników nad nanocząstkami jest też fakt, że nie przedostają się one do tkanki śródmiąższowej i nie są transportowane przez limfę. Materiał nośnika zwykle nie ulega wchłanianiu, co nie oznacza jednak, że efekt leczniczy ogranicza się do działania miejscowego [7]. Lipidowe postacie leku cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem, ponieważ zapewniają dobrą tolerancję *in vivo* i biodegradowalność, gdyż są zbudowane głównie z fizjologicznych i biozgodnych składników.

Inne niż lipidowe SLM układy mikrocząstek, takie jak mikrosfery, mikrokapsułki czy mikropoletki są szeroko stosowane jako systemy dostarczania leków, ponieważ zapewniają wyższą skuteczność terapeutyczną i diagnostyczną w porównaniu z konwencjonalnymi formami podania substancji leczniczych [8]. Systemy te wytwarzane są z wielu surowców, zwłaszcza polimerowych, tworzących postać nośnika i decydujących o jego właściwościach. Niestety, ze względu na różnorodność form o

różnych rozmiarach (często mierzonych nawet w mm) i substancji pomocniczych tworzących te formułacje klasyfikacja mikrocząstek nie jest oczywista, a stosowane nazewnictwo może być niejednoznaczne lub nawet mylące.

Generalnie mikrosfery definiuje się jako kuliste cząstki o wymiarach w skali mikro, czyli w zakresie od 1 μm do 1000 μm [9]. Z kolei termin mikrocząstka odnosi się jedynie do rozmiaru, ale już niekoniecznie do kształtu (mogą mieć na przykład kształt sferoidalny). Według tego kryterium mikrosfery należy więc uznać za szczególny – kulisty rodzaj mikrocząstek [9]. W ten sam sposób nanosfery określa się zazwyczaj jako cząstki o średnicy mniejszej niż 1 mikron (1 μm) czyli 1000 nm, chociaż niektórzy naukowcy zawężają tę definicję, klasyfikując nanosfery jako cząstki o średnicy od 10 do 200 nm [9]. Ogólnie jednak w najnowszej literaturze terminy „mikrocząstki” i „nanocząstki” odnoszą się do cząstek, których wymiary mierzone są odpowiednio w mikrometrach i nanometrach [10]. SLN i SLM można także określać terminem liposfery, który odnosi się do dyspergowalnych w wodzie cząstek stałych na bazie lipidów, o średnicy od 0,01 do 100 μm , składających się ze stałego hydrofobowego rdzenia lipidowego otoczonego stabilizatorem (związkiem powierzchniowo czynnym), ułatwiającym dyspergowanie fazy lipidowej w fazie wodnej [11].

Dyspersje mikrocząstek, tak jak i mikrosfer, są wielokompartментowymi (wielojednostkowymi) systemami dostarczania leków o zdefiniowanych zaletach fizjologicznych i farmakokinetycznych, oferującymi korzyści zarówno terapeutyczne, jak i technologiczne [7]. Za podstawową cechę charakterystyczną takiego nośnika należy uznać wielozbiornikowy charakter, dzięki któremu dawka substancji leczniczej rozłożona jest na wiele małych, oddzielnych „porcji”, z których jest uwalniania [7]. W przeciwieństwie na przykład do mikrokapsulek o charakterze typowego zbiornika, mikrocząstki mają jednak strukturę matrycy, są więc układem, w którym substancja lecznicza może być rozpuszczona lub jednorodnie albo niejednorodnie zdyspergowana. Opisywane mikrocząstki lipidowe najczęściej występują w postaci wodnej dyspersji, chociaż mogą być też stosowane w postaci proszku.

Niniejsza praca skupia się wokół badań nad SLM o wielkości ograniczonej do kilku (maksymalnie kilkunastu) mikrometrów, których podstawową cechą jest lipidowy charakter matrycy stałej w temperaturze pokojowej i ciała ludzkiego. Taki zakres wielkości badanych SLM zdecydowanie poszerza możliwy obszar ich zastosowań, jednocześnie gwarantując stabilność płynnej dyspersji. Oczekuje się, że wykorzystanie nośników lipidowych w postaci SLM charakteryzujących się powyższymi właściwościami przyczyni się do zwiększenia skuteczności terapeutycznej podawanych w tym nośniku substancji leczniczych nie tylko dzięki korzystnym profilom uwalniania, ale także optymalnym właściwościom organoleptycznym. Nośniki te, jak przedstawiono poniżej, prezentują w porównaniu do innych już stosowanych układów wielozbiornikowych liczne zalety, które staną się możliwe do wykorzystania w wyniku rozwoju i wdrożenia technologii SLM. Jednocześnie, ze względu na lipidowy charakter i konieczność współoddziaływania z cząsteczkami substancji leczniczych, rozmieszczenie leku w matrycy, jak opisano powyżej, może być różne.

Praktycznie nie jest możliwe teoretyczne przewidzenie sposobu rozmieszczenia substancji aktywnej w mikrocząstkach lipidowych, a od tego zależą najważniejsze właściwości SLM, będące podstawą ich wykorzystania. Z tego powodu wskazanie najodpowiedniejszych metod skutecznej oceny instrumentalnej rozmieszczenia leku w stałych mikrocząstkach lipidowych oraz opracowanie metod analizy pozwalających na ilościową ocenę dystrybucji substancji leczniczej w SLM stanowi podstawę dalszego rozwoju i praktycznego wykorzystania tego typu nośnika. Dotychczas opisywane w literaturze metody ograniczają się właściwie do oceny wydajności inkorporacji bez jakiegokolwiek odniesienia się do miejsca lokalizacji w obrębie mikrocząstek. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest przede wszystkim rozmiar mikrocząstek, szczególnie w przypadku badania mikrosfer z dolnego zakresu według definicji wielkości SLM (tj. kilku mikrometrów), które, jak opisano powyżej, mogą być szczególnie atrakcyjne z punktu widzenia zastosowań praktycznych takich nośników leku. Także wykorzystanie różnych technik mikroskopowych do zobrazenia rozmieszczenia substancji leczniczej w SLM bardzo często kończy się niepowodzeniem i nie może być uznane za standardową metodę odpowiednią dla wszystkich substancji czynnych.

Uzasadniając celowość podjętych badań przede wszystkim należy zwrócić uwagę na fakt, że SLM mają o wiele krótszą historię badań i zdecydowanie mniejszą ilość dostępnych danych niż ich odpowiedniki o wielkości „nano”, czyli SLN [12]. Chociaż pod względem składu SLM i SLN są zbliżone, to jednak rozbieżność wielkości co najmniej jednego rzędu (200 nm vs. 2 μ m) skutkuje niezaprzeczalnymi różnicami, zarówno pod względem metod wytwarzania, sposobów i dróg podawania, czy wreszcie właściwości i morfologii cząstek. Z tego powodu o wiele obszerniejsza baza danych doświadczalnych na temat SLN nie może być wyczerpującym źródłem informacji przy rozwoju formulacji SLM. Oczywiście, ze względu na wspomniane podobieństwa i znacznie uboższy zakres danych literaturowych odnoszących się do SLM, często wyniki badań SLN stają się punktem wyjścia lub odniesienia, jednak nie mogą zastąpić analiz mikrocząstek lipidowych, niejednokrotnie istotnie różniących się właściwościami od nanocząstek lipidowych i wymagających też odpowiedniej metodologii badań, dostosowanej przede wszystkim do rozmiaru badanych cząstek. Poza tym w przypadku SLN także nie dysponujemy szczegółowymi danymi ilościowymi na temat dystrybucji leku w formulacji, poza predykcyjnymi modelami rozmieszczenia substancji aktywnej w nanocząstkach, tym bardziej, że ilość leku możliwa do inkorporacji w nanostrukturach jest zdecydowanie mniejsza w porównaniu z mikrocząstkami.

SLM łączą więc zalety różnych systemów dostarczania leków, a wśród podstawowych korzyści ich wyboru jako nośnika leku należy wymienić [11,13–15]:

- zróżnicowane techniki otrzymywania SLM, uzależnione od wielkości mikrocząstek czy postaci (proszek lub dyspersja), niewymagające etapu homogenizacji wysokociśnieniowej, jak w przypadku SLN,
- możliwość wytwarzania SLM w formie proszku bez użycia rozpuszczalników organicznych,
- opłacalna produkcja na dużą skalę,

- cząstki utworzone z lipidu stałego w temperaturze ciała ludzkiego (nie ulegają rozpuszczaniu ani topnieniu po aplikacji), dzięki czemu gwarantują nie tylko efekt przedłużonego uwalniania, ale także ochronę inkorporowanej substancji leczniczej,
- jako nośnik wielokompartimentowy oferują jednolite rozproszenie w miejscu podania, co zapewnia bardziej równomierne wchłanianie i lepiej chroni aplikowaną substancję leczniczą,
- wyższy poziom inkorporacji substancji leczniczej w matrycy lipidowej i bardziej widoczny efekt przedłużonego uwalniania w porównaniu z SLN (ze względu na większy rozmiar cząstek),
- nietoksyczne, dobrze tolerowane nośniki uznawanego za biozgodne i biodegradowalne, jako składniki matrycy lipidowej najczęściej wybierane są tzw. substancje GRAS (*generally recognized as safe*),
- możliwość podania najbardziej powszechnymi drogami, takimi jak doustna czy miejscowa,
- możliwość aplikacji zarówno w formie stałej, jak i płynnej,
- możliwość wyjaławiania termicznego dyspersji i stosowania w formie jałowej.

Pomimo wielu wymienionych zalet, podstawowym celem stosowania SLM jest uzyskanie efektu przedłużonego uwalniania substancji leczniczej, maskowanie smaku substancji czynnej lub jej ochrona, zarówno *in vitro* (np. przed hydrolizą lub utlenieniem) w celu zwiększenia trwałości, jak i *in vivo* (np. w przewodzie pokarmowym przed działaniem kwasu solnego lub enzymów) [16–19].

SLM jako wielokompartimentowe systemy dostarczania leków oferują wyjątkowe korzyści związane z wyborem pożądanej postaci dawkowania odpowiedniej do planowanej drogi podawania leku. SLM można stosować w różnych postaciach farmaceutycznych: w postaci stałej (w formie proszku, kapsułki, tabletki), płynnej (jako dyspersje/zawiesiny) lub półstałej (koncentraty); dlatego można je podawać doustnie [17,20], pozajelitowo [21] (domięśniowo, podskórnie), miejscowo na skórę [22–24] do nosa [25] czy do oka [26], a nawet wziewnie [27–29].

Spośród licznych możliwych zastosowań SLM, przeprowadzone i opisane przeze mnie badania zwykle odnoszą się do podania do oka. Ze względu na wielkość mikrocząstek lipidowych (które pozostają w worku spojówkowym zdecydowanie dłużej, niż szybko wymywane krople w postaci roztworu), możliwość sterylizacji termicznej oraz postać dyspersji, którą można aplikować w formie jałowych kropli do oczu, nośnik ten spełnia wszystkie wymagania dla takiej drogi aplikacji. Ponadto, we wcześniejszych badaniach *in vivo* prowadzonych na królikach wykazałam już zarówno skuteczność, jak i dobrą tolerancję tego nośnika po podaniu do worka spojówkowego [26]. Uwzględniając powyższe kryteria dobrano także większość ze stosowanych substancji leczniczych.

Założenia i cele badawcze

Postęp w dziedzinie nauk farmaceutycznych możliwy jest nie tylko dzięki stosowaniu nowych substancji leczniczych i nowoczesnych nośników leku, ale także dzięki wnikliwej analizie właściwości postaci leku z zastosowaniem odpowiednio dobranych, a czasem nawet opracowanych na potrzeby danego problemu, metod analitycznych, instrumentalnych i badawczych. Wnikliwa analiza właściwości nowoczesnych postaci leku na etapie badań i rozwoju prowadzi do otrzymania optymalnych formułacji, które nie tylko są optymalną kompozycją leku z substancjami pomocniczymi, ale także gwarantują pożądany efekt pod względem siły i czasu działania w określonym miejscu podania czy czasie po aplikacji. Takie postępowanie jest niejednokrotnie bardzo trudne, gdyż już na wczesnych etapach rozwoju w testach *in vitro*, wymaga przewidzenia i uwzględnienia w jak największym stopniu, warunków i czynników oddziałujących na postać leku *in vivo*.

Skuteczność inkorporacji substancji leczniczej w stałych mikrocząstkach lipidowych jest fundamentalną cechą, która determinuje kluczowe właściwości SLM jako postaci leku. Dlatego podstawowym celem badań naukowych, których wyniki zostały zaprezentowane w cyklu prac stanowiących opisywane osiągnięcie naukowe, było wytypowanie i opracowanie najbardziej odpowiednich metod instrumentalnych oraz analitycznych służących do precyzyjnej lokalizacji rozmieszczenia substancji czynnej w matrycy SLM. Właściwość ta jest krytycznym parametrem wyboru mikrosfer lipidowych jako nośnik leku.

Możliwość skutecznej oceny właściwości mikrosfer, w tym przede wszystkim dystrybucji substancji leczniczej w matrycy lipidowej, warunkuje dalszy rozwój SLM jako nowoczesnej, wielokompartimentowej postaci leku. W sytuacji dużej zmienności oddziaływania substancji aktywnych z lipidami i innymi składnikami matrycy SLM właściwe metody oceny rozmieszczenia leku w matrycy i stopnia jego inkorporacji mają kluczowe znaczenie, ponieważ od tego zależy profil uwalniania, ochrona substancji czynnej czy zdolność maskowania jej smaku, a więc podstawowe aspekty stanowiące kryterium wyboru tego nośnika.

Badania prowadzono z wykorzystaniem nowoczesnych technik instrumentalnych i analitycznych. Uzyskane wyniki weryfikowano oceniając korelację z nimi dostępności farmaceutycznej analizowanej z uwzględnieniem także czynników wpływających na SLM *in vivo*. Dążono w ten sposób do lepszego zrozumienia właściwości badanych układów i przewidywania ich zdolności do osiągnięcia zamierzonego efektu.

Opracowanie nowych testów i wskazanie optymalnych metod porównujących krytyczne atrybuty jakości SLM (dystrybucja leku, dostępność farmaceutyczna) miały na celu standaryzację badań takich nośników pod względem metodologicznym. Umożliwia to i ułatwia porównywanie wyników badań pomiędzy różnymi ośrodkami naukowymi.

Szczegółowe cele realizowano w postaci następujących zagadnień badawczych:

- Ocena przydatności i znaczenia wytypowanych nowoczesnych analiz instrumentalnych w charakterystyce dyspersji SLM pod względem rozmieszczenia modelowych substancji leczniczych w poszczególnych fazach układu.
- Ocena przydatności analiz termograwimetrycznych (DSC/TG) do oceny właściwości SLM.
- Opracowanie metodyki badań dystrybucji substancji czynnej w SLM oraz analiza zdolności do inkorporowania i rozmieszczenia w dyspersji SLM kilku wybranych substancji leczniczych odpowiednich do stosowania w postaci kropli do oczu.
- Opracowanie metodyki badań uwalniania substancji aktywnej z SLM oraz optymalizacja parametrów procesu z uwzględnieniem czynników fizjologicznych istotnych *in vivo* po podaniu do oka.

Szczegółowy opis osiągnięcia naukowego

Przeprowadzone badania naukowe skupiały się na kilku aspektach służących jak najdokładniejszej charakterystyce SLM pod względem rozmieszczenia i precyzyjnej lokalizacji inkorporowanej substancji leczniczej w nośniku. W pierwszym etapie oceniano przydatność do wskazanego celu wybranych nowoczesnych metod instrumentalnych. W kolejnym kroku rozwinięto i udoskonalamo opracowaną wcześniej metodę badania dystrybucji substancji aktywnej w dyspersjach SLM. Następnie opracowano także metodologię i zoptymalizowano warunki badania dostępności farmaceutycznej substancji czynnych z SLM z uwzględnieniem czynników fizjologicznych panujących w oku.

W badaniach skupiono się na SLM w postaci dyspersji wodnej przeznaczonej do podania do oka w postaci kropli. We wcześniejszych badaniach *in vivo* na królikach wykazano już dobrą tolerancję tego nośnika po aplikacji do worka spojówkowego. W celach doświadczalnych jako czynniki różnicujące badane formułacje wybrano takie aspekty jak: lipid, substancja lecznicza, stężenie substancji czynnej oraz postać nośnika (dyspersja lub proszek). Analizie poddawano SLM z modelowymi substancjami leczniczymi jak np. cyklosporyna, indometacyna czy klotrimazol, a także innymi; a w celach porównawczych badano SLM placebo. W wybranych doświadczeniach do badań stosowano również SLM w postaci proszku, który otrzymywano w procesie suszenia rozpyłowego. Matryca lipidowa mikrocząstek uformowana była z lipidu stałego Compritol 888 ATO (dibehenian glicerolu), wytypowanego jako najkorzystniejszy we wcześniejszych pracach, jak również z innych lipidów np. Precirol ATO 5 (palmitostearnian glicerolu) czy kwasy stearynowe.

Wyniki badań uzyskane na poszczególnych etapach pracy, jak również wynikające z nich wnioski podsumowano w opisie przedstawionym poniżej. Jest on podzielony na sześć kolejnych części, w których szczegółowo omówiono kolejne publikacje oznaczone literą [H1-H6], wchodzące w skład osiągnięcia (tytuły prac patrz pkt 4.2.).

H1 – ocena przydatności wybranych metod instrumentalnych do analizy inkorporacji i dystrybucji substancji leczniczych w mikrosferach lipidowych

W pierwszym etapie badań do identyfikacji właściwości, rozmieszczenia i oddziaływań substancji czynnych z innymi składnikami mikrosfer lipidowych wykorzystano cztery techniki instrumentalne:

- analizę termiczną opartą o różnicową kalorymetrię skaningową (DSC) połączoną z analizą termograwimetryczną (TG),
- mikroskopię sił atomowych (AFM),
- spektroskopię Ramana oraz
- spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR).

Badaniom poddawano SLM zawierające jako lipid Compritol (dibehenian glicerolu) lub kwas stearynowy, stabilizowane polisorbatem. Modelowymi substancjami leczniczymi inkorporowanymi w mikrocząstkach były cyklosporyna A i spironolakton użyte w różnych stężeniach (0,1–5,3%). Badano nie tylko wodne dyspersje mikrosfer lipidowych otrzymane *de novo*, ale także SLM w formie proszku otrzymanego w procesie suszenia rozpyłowego. Suszenie rozpyłowe wykorzystano jako proces technologiczny, służący dalszemu przetwarzaniu dyspersji SLM, który jednak mógłby wpływać na dystrybucję leku w SLM i stabilność badanych formułacji.

Powyższe badania zostały przeprowadzone w ramach grantu *Miniatura* z Narodowego Centrum Nauki (2017/01/X/NZ7/01717). Przy ich realizacji współpracowałam między innymi z laboratorium badawczo-rozwojowym *Nanores* we Wrocławiu. W wybranych badaniach brała również udział studentka farmacji Maria Ferreira Monteiro z *University of Porto* w Portugalii.

Celem badań było wytypowanie tych metod instrumentalnych, które najlepiej pozwalają scharakteryzować, w sposób bezpośredni lub pośredni, dystrybucję substancji czynnej w SLM, lokalizując ją lub oceniając jej wpływ na właściwości lipidu i innych składników matrycy oraz wykrywając wzajemne oddziaływania pomiędzy tymi składnikami. Ocenie poddawano także wpływ procesu suszenia rozpyłowego dyspersji SLM na właściwości otrzymywanych w ten sposób proszków SLM, jednocześnie rozważając przydatność stosowanych metod do identyfikacji zmian dystrybucji substancji czynnych indukowanych w efekcie suszenia.

Jako pierwszą zastosowano metodę różnicowej kalorymetrii skaningowej wspomaganej analizą termograwimetryczną (DSC/TG). DSC jest powszechnie stosowaną metodą w badaniach liposfer głównie ze względu na polimorfizm tworzących je lipidów. Służy także do oceny stabilności formułacji. Ocena właściwości mikrocząstek lipidowych za pomocą analizy termicznej może być wykorzystywana nie tylko na etapie badań rozwojowych i do oceny stabilności, ale także w kontroli jakości.

Analiza DSC opiera się na fakcie, że różne formy polimorficzne charakteryzują się różnymi temperaturami topnienia i entalpią topnienia, na co wpływ mają także modyfikacje w stanie stałym. Metoda ta może również dostarczać informacji na temat struktury stałych mikrocząstek, czyli tego w jakiej postaci – krystalicznej/amorficznej

znajduje się w matrycy inkorporowana substancja lecznicza. Wiadomo, że problematyczne jest wykrywanie niskich stężeń substancji, a takie zwykle występują w mikrosferach, przez co potwierdzenie inkorporacji leku w matrycy na drodze bezpośredniej analizy jego przemian termicznych może okazać się niemożliwe. Czy w takiej sytuacji ocena wpływu pośrednio, poprzez wpływ na przejścia fazowe lipidu matrycy, będzie miarodajna i pozwoli na określenie powtarzających się trendów? Na to pytanie próbowałam odpowiedzieć planując doświadczenia. Kluczowe okazało się także przygotowanie próbki do badania, szczególnie jeśli SLM występowały w formie dyspersji.

Podjęte badania skupiły się więc na próbach identyfikacji i charakterystyki przemian termicznych pochodzących od substancji czynnych inkorporowanych w SLM i efektów termicznych będących skutkiem oddziaływań substancji czynnych ze składnikami matrycy lipidowej. Tak, jak się spodziewałam, na termogramach DSC nie stwierdzono przemian charakterystycznych dla substancji czynnych. Odnotowano natomiast wyraźne różnice między formulacjami w zależności od lipidu tworzącego matrycę mikrocząstek (Compritol vs. kwas stearynowy), jak również wrażliwość układów na procesy przetwarzania, takie jak emulgowanie w temperaturze powyżej temperatury topnienia lipidu czy suszenie rozpyłowe. Na tym etapie badań nie stwierdziłam zależności wynikających z wpływu cyklosporyny czy spironolaktonu na właściwości termiczne SLM, jednak wyraźne różnice w obserwowanych przemianach i potwierdzenie stabilności termicznej inkorporowanych substancji w warunkach badania (krzywe TG wykluczyły degradację substancji czynnej) były podstawą do kontynuacji badań SLM techniką DSC/TG w późniejszym czasie (patrz H2).

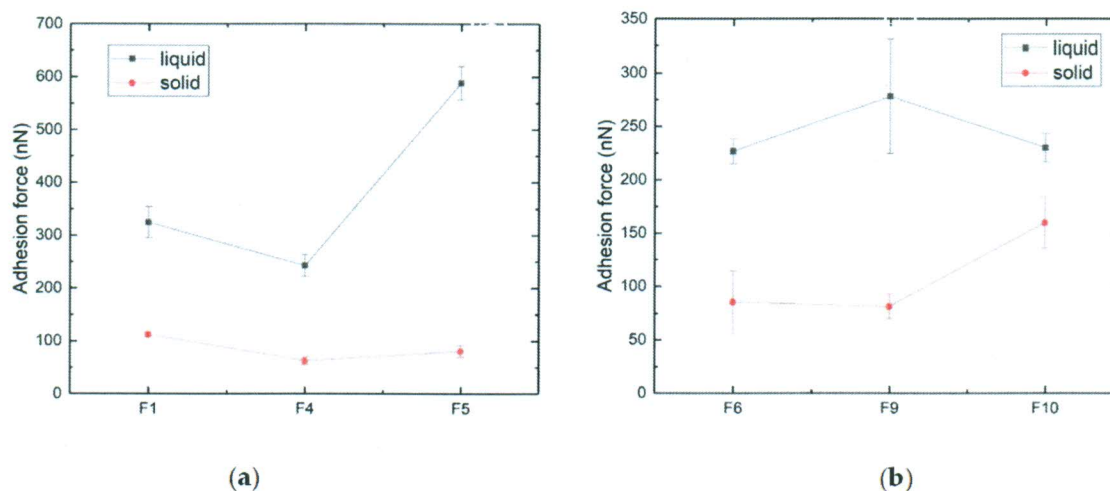
Mikroskopia sił atomowych (AFM) jest metodą, która znalazła już zastosowanie w badaniach nanosfer lipidowych, jednak wyłącznie do obrazowania topografii powierzchni SLN oraz do prezentacji kształtów i rozmiarów nanocząstek [30], czyli bardziej jako specyficzna analiza obrazowania. Tymczasem technikę AFM można również wykorzystać do pomiaru właściwości lepkosprężystych badanych powierzchni (w tym przypadku powierzchni SLM), co będzie źródłem informacji o właściwościach powierzchniowych formulacji, na podstawie oddziaływania powierzchni cząstki z sondą. Wprowadzając AFM do spektrum analiz fizycznych SLM planowałam ocenić możliwość wykorzystania tej techniki i poznać interakcję matrycy lipidowej z substancją czynną oraz wykazać jej dystrybucję w układzie na podstawie badania oddziaływań powierzchniowych.

Metoda mikroskopii sił atomowych staje się obiecującą techniką do wykorzystania w tym obszarze badań, ponieważ pomiar właściwości mechanicznych, takich jak sztywność/elastyczność, mikrotarcie czy adhezja okazuje się precyzyjnym źródłem informacji o właściwościach badanej powierzchni. Niewątpliwą zaletą mikroskopii sił atomowych są pomiary badanych powierzchni z bardzo dużą rozdzielczością. Duży zakres mierzonych sił w przeprowadzonych badaniach świadczy o czułości i łatwości w wykrywaniu zmienności badanej struktury, zależnej od jej składu (rodzaj lipidu, rodzaj substancji czynnej, ilość substancji czynnej zlokalizowanej powierzchniowo) czy

procesów, jakim została poddana (proces suszenia rozpyłowego), a także zmian zachodzących w czasie (badania trwałości).

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń z SLM potwierdzają użyteczność i wskazują na dalszy potencjał zastosowania metody AFM nie tylko do badań topografii cząstek i uzyskiwania rzeczywistych, trójwymiarowych obrazów, ale także do charakteryzowania powierzchni mikrosfer lipidowych poprzez ocenę jej oddziaływania z sondą.

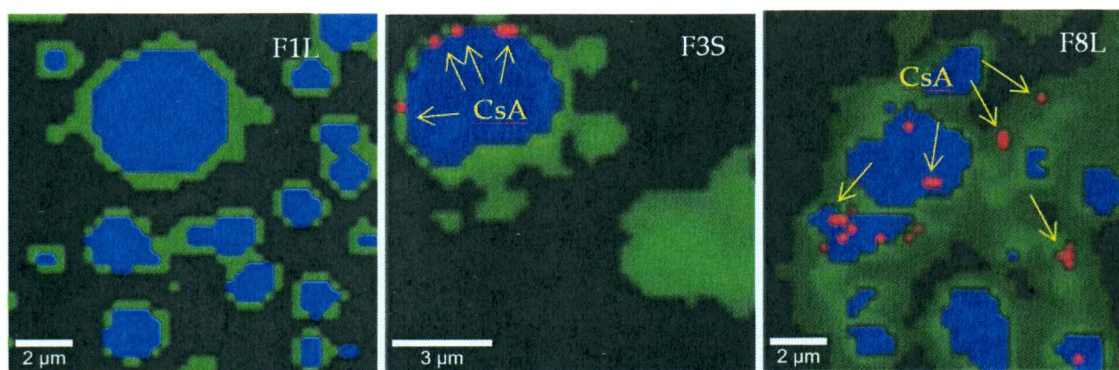
Właściwości nanomechaniczne powierzchni SLM zbadane za pomocą AFM (Ryc. 1) pozwalają na rozróżnienie SLM *placebo* i z substancją czynną zlokalizowaną powierzchniowo, a także obserwację zmian zachodzących pod wpływem suszenia rozpyłowego. Zaletą metody AFM jest stosunkowo proste i mało czasochłonne przygotowanie próbki do badania. Jednocześnie metoda ta jest bardziej wymagająca, na przykład w zakresie doboru odpowiedniej sondy pomiarowej.



Rycina 1. Średnie siły adhezji zmierzone za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) preparatów *placebo* SLM (F1, F6) i z substancją leczniczą (F4, F5, F9, F10), (a) z Compritolem i (b) z kwasem stearynowym, sporządzonych *de novo* (■ płynne dyspersje) oraz po suszeniu rozpyłowym (● stałe, proszki).

Spektroskopia Ramana jest kolejną z zaawansowanych metod mikroskopowej analizy chemicznej zaproponowaną do oceny rozmieszczenia i współoddziaływania substancji czynnych w mikrosferach. Jak wiadomo mapowanie ramanowskie może generować obrazy chemiczne o wysokiej rozdzielczości złożonych materiałów (np. tabletek), co pozwala na ocenę nie tylko różnic w składzie, ale także mikrostrukturze preparatu. Utworzenie takich map chemicznych wymaga obrazowania rozkładu intensywności sygnałów ramanowskich charakterystycznych dla poszczególnych składników w badanej płaszczyźnie. Uzyskanie dwuwymiarowych obrazów przedstawiających rozkład pojedynczych składników chemicznych w mikrocząstkach

lipidowych techniką spektroskopii Ramanowskiej byłoby idealnym potwierdzeniem, spodziewanej na podstawie innych badań, powierzchniowej lokalizacji znacznej frakcji substancji czynnej (patrz H4). Warto podkreślić, że do tej pory takie badania nie były prowadzone w odniesieniu do wielokompartimentowych dyspersji mikrosfer. Niestety w trakcie prowadzonych eksperymentów technika ta nie przyniosła spodziewanych efektów. Chociaż udało się zidentyfikować badane substancje czynne na powierzchni SLM (cyklosporyna, spironolakton), to jednak uzyskane mapy nie potwierdziły powierzchniowej lokalizacji znacznej frakcji substancji leczniczej (Ryc. 2), na co wskazywały badania dystrybucji czy badanie uwalniania. Powodem może być dominacja na uzyskanych mapach chemicznych sygnałów pochodzących głównie od lipidu tworzącego matrycę mikrocząstek, a także innych substancji pomocniczych lokalizujących się powierzchniowo, jak polisorbitat czy polivinylopirolidon. Czynnikiem ograniczającym zastosowanie tej techniki okazał się problem znaczącej intensywności w widmach pasm pochodzących od lipidów nakładających się z pasmami o niewielkiej intensywności pochodzącymi od substancji aktywnych. W spektroskopii ramanowskiej wykrywalność zależy w dużym stopniu od względnej intensywności, a przede wszystkim położenia sygnałów interesującego składnika w porównaniu z sygnałami generowanymi przez matrycę nośnika. Nawet występowanie sygnałów o stosunkowo dużej intensywności jest trudne do wykrycia, gdy nałożą się na nie sygnały matrycy lipidowej. Przy niskich stężeniach leku sygnały są prawie nierozróżnialne spośród szumu linii podstawowej.



Rycina 2. Przykładowe mapy ramanowskie mikrosfer placebo (F1L) i z cyklosporyną – CsA (F3S, F8L). Lipid tworzący matrycę SLM to Compritol (F1L oraz F3S) lub kwas stearynowy (F8L). Formulacja F3S badana po procesie suszenia rozpyłowego dyspersji SLM.

Interferowanie sygnałów, dodatkowo znacznie różniących się intensywnością, zawężyło użyteczność tej metody badania do formulacji z substancją aktywną o korzystnych (tu w rozumieniu pasm pozwalających się różnicować w porównaniu z widmem lipidu) właściwościach spektralnych. Jednocześnie należy dodać, że zaletą spektroskopii ramanowskiej jest niewymagające przygotowanie próbki, a także możliwość prowadzenia obserwacji w stanie ciekłym. Dlatego nie zaleca się całkowitej rezygnacji z

tej techniki badawczej. Raczej należy wskazać na potrzebę przeprowadzenia wstępnej analizy widm przed ostateczną decyzją o zasadności ich kontynuacji lub rezygnacji z tego rodzaju badań, w zależności od specyficznych właściwości testowanych formułacji. Oczywiście brak możliwości zastosowania metody do wszystkich SLM, niezależnie od składu, ogranicza jej użyteczność jako uniwersalnej metody porównawczej.

Jako jedną z rozważanych metod oceny oddziaływań składników SLM z substancją leczniczą i jej rozmieszczenia lub zmian w dystrybucji na skutek suszenia rozpyłowego wykorzystano także spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). O ile techniki spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w roztworze znalazły szerokie zastosowanie w farmacji, to spektroskopia ^1H NMR w badaniach liposfer jest nadal rzadko wykorzystywana, a jej potencjał aplikacyjny jako metody badania SLM nieznany, dlatego również tę metodę postanowiono wykorzystać w założonym celu do badań stałych mikrocząstek lipidowych.

Spektroskopia NMR do szczegółowego badania struktur molekularnych wykorzystuje promieniowanie elektromagnetyczne o częstościach z zakresu radiowego do wykrywania jąder atomowych (^1H) w cząsteczkach. Jak już opisano w przypadku nanosfer lipidowych, sygnały NMR dotyczące triglicerydów są trudne do obserwacji ze względu na bardzo krótkie czasy relaksacji [31,32]. Ze względu na zjawisko relaksacji zależące od stopnia ruchliwości cząsteczek [30], metoda ^1H NMR daje możliwość rozróżnienia ruchomej cieczy od unieruchomionych ciał stałych. W związku z tym oczekiwano, że metoda ta umożliwi ewentualne wykrycie ruchliwości i rearanżacji cząsteczek substancji czynnej wyłączonych z matrycy, gdyby takie zdarzenie wystąpiło. Przeprowadzone badania opierały się na założeniu, że interakcja lipid-substancja czynna i/lub zmiana dystrybucji substancji czynnej w formułacji będzie odzwierciedlona pojawieniem się sygnałów charakterystycznych dla substancji aktywnej lub zmianą szerokości albo amplitudy sygnałów generowanych przez badane mikrosfery.

W przeprowadzonych badaniach nie udało się zidentyfikować sygnałów pochodzących od substancji czynnych, jeśli były one inkorporowane w stałej matrycy lipidowej. Frakcja cyklosporyny znajdującej się w fazie wodnej dyspersji skutkowała obecnością specyficznego sygnału, ale poza charakterystycznym obszarem widma (tzw. *finger print*). Sygnałów takich nie zarejestrowano w przypadku drugiej badanej substancji – spironolaktonu. Widma ^1H NMR formułacji suszonych rozpyłowo prezentowały co prawda charakterystyczne zmiany związane z polimerem dodanym w trakcie suszenia (PVP), jednak nadal nie były widoczne żadne sygnały związane z substancjami czynnymi.

Należy stwierdzić, że stosując spektroskopię ^1H NMR bardzo trudno jest zidentyfikować sygnały pochodzące od substancji leczniczych, które są inkorporowane w stałej matrycy lipidowej, a wolna frakcja substancji daje w widmie mało charakterystyczne zmiany, lub są one w ogóle niewykrywalne.

Rezultaty i wnioski H1

- Za najbardziej przydatne spośród zastosowanych instrumentalnych metod analizy SLM należy uznać techniki DSC/TG i AFM. W przypadku każdej z tych metod niełatwy, ale kluczowy dla uzyskania rzetelnych i powtarzalnych wyników badań, okazał się doświadczalny dobór parametrów pomiarowych i procedury badawczej, szczególnie w przypadku dyspersji SLM, znacznie trudniejszej do badania w porównaniu z proszkiem SLM. Wskazano też zalety i ograniczenia poszczególnych metod.
- DSC uznano za istotne narzędzie do charakteryzowania zmian właściwości mikrocząstek i interakcji lek-lipid w SLM. Metoda ta pozwoliła na wykrycie zmian w SLM z kwasem stearynowym, występujących na skutek większej wrażliwości tego lipidu na temperaturę podczas suszenia rozpyłowego.
- Uzyskane wyniki uzasadniają wykorzystanie metody AFM jako narzędzia przydatnego w analizie nie tylko w celu uzyskania rzeczywistych obrazów topograficznych, ale także w celu analizy obecności i rozkładu substancji czynnej na powierzchniach mikrocząstek lipidowych poprzez ocenę oddziaływań lepkosprężystych powierzchni z sondą.
- Wskazano na ograniczenia w wykorzystaniu Spektroskopii Ramana do mapowania rozmieszczenia substancji czynnej w mikrocząstkach lipidowych, głównie ze względu na spektralne właściwości substancji aktywnych, które w połączeniu z ich niewielkim procentowym udziałem w formulacji utrudniają lub uniemożliwiają opracowanie i dalsze przetwarzanie widm spektralnych i map ramanowskich.
- Badania metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) okazały się najbardziej wymagające z analitycznego punktu widzenia. Dlatego w porównaniu do ilości i wartości uzyskiwanych wyników tę technikę uznano za zdecydowanie nieprzydatną do realizacji założonego celu.
- Wykazano, że możliwe jest suszenie rozpyłowe dyspersji SLM bez wpływu na właściwości mikrocząstek lipidowych, zależy to jednak głównie od rodzaju lipidu tworzącego matrycę mikrosfer i modelowej substancji leczniczej.

H2 – Pogłębiona analiza stałych mikrocząstek lipidowych metodą DSC/TG, wytypowaną jako narzędzie do oceny właściwości związanych z inkorporacją substancji leczniczych w matrycy lipidowej SLM w postaci wodnej dyspersji lub proszku

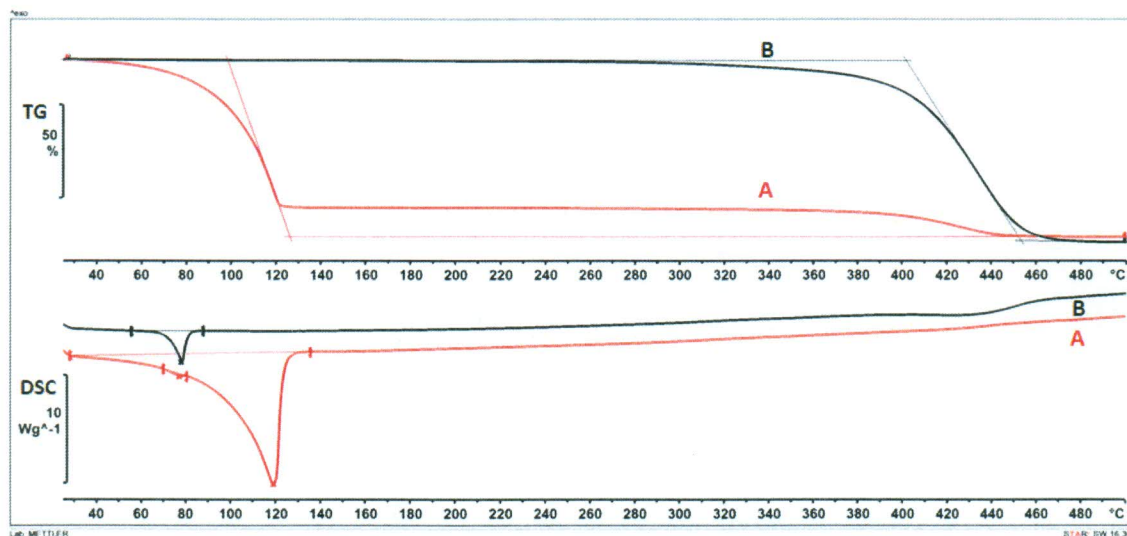
Niniejsza praca jest kontynuacją badań mikrocząstek lipidowych techniką DSC/TG, i została wykonana przy współpracy z Profesorem Géza Regdon, Jr. w Instytucie Technologii Farmaceutycznej (*Institute of Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs*) Uniwersytetu w Szeged, Węgry. Założonym celem badań była bardziej wnikliwa ocena przydatności analizy termicznej do charakterystyki SLM w różnej formie (zawiesina, proszek), na wszystkich etapach rozwoju i przetwarzania postaci leku, a także rozwiązanie trudności związanych z przygotowaniem płynnej próbki (dyspersji mikrosfer) do analizy. W tym celu zastosowano łącznie dwie metody (DSC i TG), co umożliwia tzw. jednoczesną analizę termiczną STA (*simultaneous thermogravimetric analysis*), której zaletą jest uzyskanie kompleksowej charakterystyki termicznej badanej próbki [33]. W przypadku jednoczesnej analizy termogravimetrycznej oba sygnały rejestrowane są jednocześnie na tej samej aparaturze, a warunki panujące podczas badania (atmosfera, ciśnienie, szybkość nagrzewania, to samo naczynie pomiarowe itp.) są identyczne dla analiz TG i DSC, co ma istotne znaczenie dla jakości uzyskiwanych wyników.

Badaniom poddawano dyspersje SLM i suszone rozpyłowo proszki SLM z wybranymi substancjami leczniczymi: cyklosporyną A, spironolaktonem, a także indometacyną. Przeprowadzono również charakterystykę termiczną formułacji *placebo* SLM i mieszanin fizycznych. Formułacje testowano zaraz po sporządzeniu (dyspersje otrzymane *de novo*), po przetworzeniu w postać proszku (wpływ procesu suszenia rozpyłowego), a także w trakcie badań trwałości.

Doświadczenia rozpoczęto od wytypowania najkorzystniejszej metody przygotowania płynnej próbki (dyspersja SLM) do badań. Dotychczas, w literaturze przedmiotu, zaproponowano już kilka metod, jednak obarczonych różnymi ograniczeniami. Praktycznie metoda DSC/TG nadaje się do bezpośredniego badania ciekłych dyspersji SLM, ale wówczas woda usuwana jest w początkowym etapie analizy. Ewentualnie wodę usuwa się w innym procesie, aby analizie poddawać już tylko suchą pozostałość. Kluczowe staje się więc przygotowanie próbki w taki sposób, aby usuwanie wody nie miało wpływu na właściwości mikrosfer badanych na etapie właściwej analizy. Przeprowadzone doświadczenia wykazały celowość wcześniejszego usunięcia wody z dyspersji SLM, ponieważ jej obecność w próbce podczas analizy powoduje, że krzywe DSC i TG wykazują charakterystyczny profil parowania wody, po którym dopiero następuje rozkład termiczny z karbonizacją, co jest trudne do interpretacji z punktu widzenia analizy lipidu. Gdy SLM testuje się bezpośrednio w postaci ciekłej dyspersji, krzywa DSC pokazuje jeden duży pik konwersji, związany głównie z parowaniem wody, w obrębie którego nie jest możliwe wyodrębnienie zdecydowanie mniejszego pikowania lipidów (Ryc. 3). Analogicznie do krzywej DSC, na krzywej TG można wyróżnić dwa etapy rozkładu z utratą masy, które odpowiadają głównie odparowaniu wody, a także rozkładowi pozostałych składników postaci leku. Gdy dyspersje SLM bada

się po wcześniejszym usunięciu wody, na krzywych DSC można wyraźnie wyróżnić pojedynczy etap przejścia endotermicznego (Ryc. 3), bez utraty masy na krzywych TG, co odpowiada procesowi topnienia lipidu tworzącego matrycę SLM. Dopiero analiza DSC suchych próbek pozwala na wyraźne rozróżnienie i analizę zdarzeń związanych z topnieniem lipidów.

Jedną z zalecanych metod usuwania wody jest wstępne podgrzanie próbki w tyglu, a następnie ponowne jej schłodzenie przed analizą. Ze względu na temperaturę powyżej temperatury topnienia lipidów proces ten z pewnością ma wpływ na właściwości preparatu [34,35]. Inną metodą jest liofilizacja dyspersji przed analizą termiczną, jednak suszenie sublimacyjne również może prowadzić do znacznych zmian właściwości próbki na skutek działania obniżonej temperatury czy niekorzystnych sił wpływających na mikrocząstki podczas zamrażania [36]. W celu uniknięcia wstępnego podgrzewania przed analizą lub czasochłonnego i wymagającego procesu liofilizacji, zaproponowano odparowanie wody w temperaturze pokojowej pod sprężonym powietrzem, bez lub po ultrawirowaniu dyspersji. Biorąc pod uwagę niewielką masę mikrocząstek potrzebną do przeprowadzenia analizy DSC, wystarczająca okazała się metoda odparowywania wody z niewielkiej objętości dyspersji pod sprężonym powietrzem w temperaturze pokojowej, bez procesu wirowania generującego siły odśrodkowe, także zdolne do oddziaływania na SLM, co obserwowano na termogramach. Zaproponowaną metodę przygotowania dyspersji SLM wykorzystano we wszystkich następnych eksperymentach.

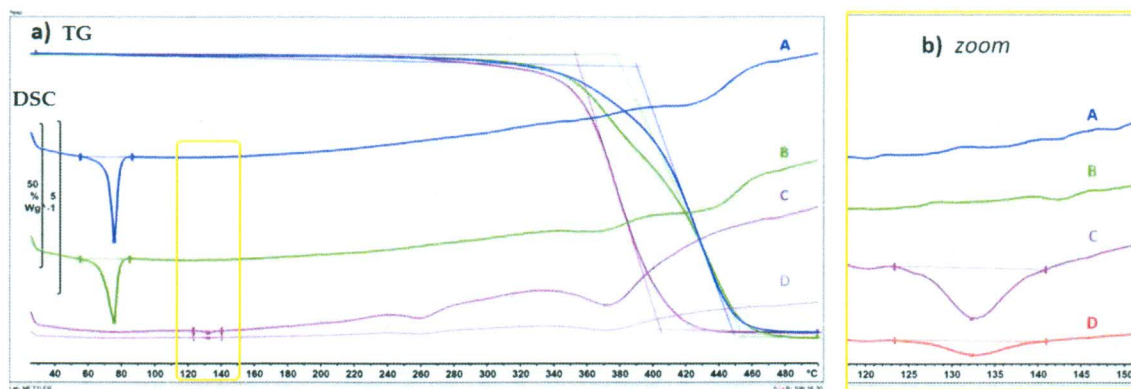


Rycina 3. Krzywe DSC i TG dyspersji SLM z Compritolem: (A) bez odparowania wody i (B) po odparowaniu wody bezpośrednio przed analizą termiczną.

W czasie badań na termogramach SLM nie zaobserwowano piku topnienia żadnej z badanych substancji leczniczych, niezależnie od ich stężenia w preparacie. Co więcej, nie obserwowano transformacji termicznej niezależnie od rozmieszczenia substancji czynnej w SLM. Substancji aktywnej nie udało się wykryć także w sytuacji jej niepełnej

inkorporacji czy po przeprowadzeniu testu, jak w badaniu dystrybucji (wyrząsanie z metanolem i jego odparowanie, patrz H4). W niektórych formulacjach zanik pików topnienia substancji aktywnej w SLM można tłumaczyć faktem niskich stężeń, na co wskazują też wyniki innych zespołów badawczych [37–39], jednak piki te nie są widoczne nawet gdy stosunek np. cyklosporyny do lipidu wynosił 1:2 (Ryc. 4). Dlatego uzasadnione jest też wyjaśnienie tego faktu interakcjami lek-lipid (lub lek-inne składniki postaci leku np. polisorbato) i włączeniem substancji leczniczej w strukturę matrycy na skutek jej rozpuszczenia w stopionym lipidzie podczas procesu produkcyjnego. Taki efekt potwierdzają przeprowadzone badania mieszanin fizycznych.

Przede wszystkim, jak wykazano na przykładzie badanych substancji leczniczych, obecność substancji rozpuszczonej w matrycy mikrosfer przez wpływ na strukturę krystaliczną powoduje obniżenie temperatury topnienia matrycy lipidowej, zależne od stężenia inkorporowanej substancji czynnej, a w widmie DSC przesunięcie pików topnienia lipidu matrycy w stronę niższej temperatury. Tak więc o obecności substancji czynnej i jej wpływie na właściwości SLM w badaniach termicznych można wnioskować jedynie pośrednio, na podstawie spadku temperatury topnienia lipidów (DSC) lub subtelnej zmiany temperatury rozkładu (TG). Co ważne, zachowanie termiczne dyspersji SLM było bardzo podobne, niezależnie od rodzaju wprowadzonej substancji leczniczej, co daje możliwość wykorzystania obserwowanych zmian do oceny właściwości badanych formulacji.



Rycina 4. (a) Krzywe DSC i TG oraz (b) powiększenie: (A) dyspersji SLM z 2% cyklosporyny, (B) dyspersji SLM z 5% cyklosporyny, (C) cyklosporyny oraz (D) pik cyklosporyny przekształconego do poziomu zawartości w SLM (5%).

Rozkład termiczny widoczny na krzywych TG także podlega charakterystycznym zmianom na skutek inkorporacji substancji leczniczej w mikrocząstkach. Przesunięciu, tym razem w stronę wyższych temperatur (nieznaczne spowolnienie procesu degradacji), ulega temperatura rozkładu w SLM z substancją aktywną, podczas gdy temperatura formulacji *placebo* jest taka jak samego lipidu wykorzystanego do otrzymania nośnika, co potwierdza zależność obserwacji od substancji aktywnej. Ten sam efekt zaobserwowano w badanych preparatach z różnymi substancjami.

Jak wskazują uzyskane wyniki, lipid tworzący matrycę mikrocząstek ma istotny wpływ na właściwości SLM otrzymanych po procesie suszenia rozpyłowego. Nie obserwowano zmian termicznych w mikrosferach z Compritolem, który okazał się odporny na warunki procesu suszenia, a także był stabilny podczas przechowywania, w przeciwieństwie do zdecydowanie mniej trwałego kwasu stearynowego. Ulegał on niekorzystnym zmianom, czasami nawet już na początkowym etapie wytwarzania mikrocząstek – w procesie emulgowania na gorąco.

W badaniach STA potwierdzono także stwierdzoną na podstawie innych doświadczeń stabilność zarówno dyspersji, jak i proszków SLM, w których matrycę lipidową stanowi Compritol. W SLM z Compritolem przechowywanych przez 12 miesięcy w lodówce w postaci płynnej dyspersji nie stwierdzono żadnych zmian w testach DSC/TG, niezależnie od rodzaju substancji aktywnej. Te same formułacje były trwałe w postaci proszku (otrzymywanego w procesie suszenia rozpyłowego) przechowywanego w temperaturze pokojowej przez okres 24 miesięcy.

Rezultaty i wnioski H2

- Przeprowadzone badania potwierdziły przydatność analizy STA do oceny interakcji lek–lipid oraz modyfikacji struktury matrycy SLM indukowanej warunkami metody produkcji (metoda emulgowania na gorąco) i dalszym przetwarzaniem (proces suszenia rozpyłowego), a także zjawiskami zachodzącymi podczas badań stabilności.
- Kluczowy dla analizy DSC/TG dyspersji SLM okazał się sposób przygotowania próbki, polegający na odparowaniu wody w temperaturze pokojowej, bez stosowania dodatkowych procesów wpływających na mikrocząstki, jak np. wirowanie.
- Podstawową cechą charakteryzującą widma DSC mikrosfer lipidowych jest intensywny, endotermiczny pik w zakresie temperatury topnienia lipidu. Pik ten jest głównym źródłem informacji o właściwościach i stabilności badanego preparatu SLM.
- Powtarzającą się cechą widm DSC mikrocząstek lipidowych jest brak zobrazowanych przemian termicznych charakterystycznych dla substancji leczniczych zawartych w SLM. Obecność substancji czynnych i ich wpływ na właściwości SLM w badaniach termicznych można oceniać jedynie pośrednio, na podstawie zmian (obniżenia) temperatury związanej z topnieniem lipidów (DSC) lub subtelnej zmiany temperatury rozkładu (TG).

- Niestety badania STA nie pozwalają na stwierdzenie stopnia wbudowania substancji leczniczej w matrycę lipidową mikrocząstek i w tym celu należy zastosować inne techniki badawcze, które pozwolą potwierdzić lub wykluczyć ten fakt.
- Badania DSC/TG potwierdziły brak wpływu procesu suszenia rozpyłowego na właściwości SLM z inkorporowaną substancją czynną i matrycą z Compritolu.
- Badania potwierdziły również 2-letnią stabilność SLM z cyklosporyną.

H3 – Opracowanie i optymalizacja techniki suszenia rozpyłowego wodnej dyspersji SLM z różnymi lipidami tworzącymi matrycę lipidową

Jak już opisano we wstępie, SLM można stosować w postaci płynnej dyspersji (wodna zawiesina mikrosfer) lub drobnego proszku (np. proszki do inhalacji) w zależności od sposobu i zamierzonej drogi podania [13,40,41]. Wytwarzanie SLM w postaci proszku jest również uzasadnione ze względu na zwiększenie długoterminowej trwałości preparatu (fizycznej, chemicznej i mikrobiologicznej) [42,43]. *Ex tempore* proszek może być redyspergowany ponownie do formy płynnej zawiesiny. Pomimo iż badania stabilności potwierdziły, że preparaty zarówno SLM jak i SLN w postaci płynnej zawiesiny pozostają stabilne po 2 latach przechowywania [44,45], w zależności od składu i właściwości inkorporowanej substancji leczniczej w niektórych wodnych dyspersjach SLM istnieje większe ryzyko wystąpienia niekorzystnych zmian, niż w formie proszku. Niekorzystne przemiany fizykochemiczne mogą dotyczyć zarówno matrycy lipidowej lub substancji pomocniczych, jak i substancji czynnej, która może ulec degradacji chemicznej (np. hydrolizie) lub przedwczesnemu uwolnieniu. Ponadto, w niektórych dyspersjach SLM lub SLN zaobserwowano zmiany, takie jak degradacja matrycy cząstek lub agregacja/fuzja liposfer, skutkująca niepożądanym wzrostem wielkości cząstek [13,42]. Po przekształceniu mikrocząstek w formę drobnego, suchego proszku, SLM można przechowywać przez długi czas, bez ryzyka wystąpienia zmian fizykochemicznych charakterystycznych dla dyspersji płynnych. W razie potrzeby otrzymane suche preparaty można stosować nie tylko w postaci proszku, ale także po przywróceniu formy płynnej dyspersji w toku rekonstytucji.

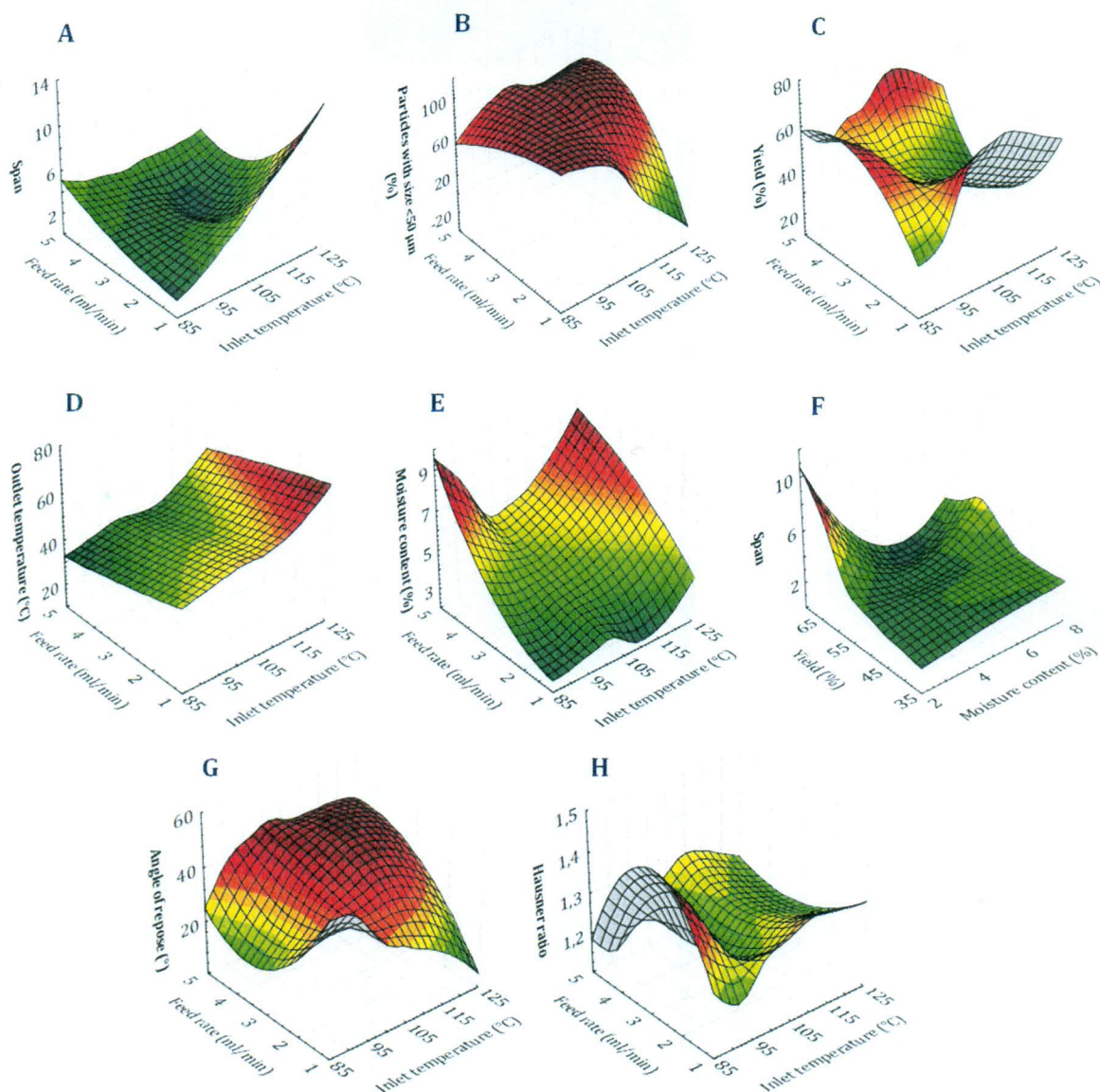
Z powyższych względów badania opisane w publikacjach H1 i H2 prowadzone były nie tylko na dyspersjach wodnych SLM, ale również z wykorzystaniem SLM w formie proszków, które otrzymano w procesie suszenia rozpyłowego wodnych dyspersji SLM.

Istnieje kilka metod wytwarzania SLM w postaci proszku, takich jak zestalanie rozpyłowe (*spray congealing/spray chilling*), suszenie rozpyłowe ale z roztworu organicznego, liofilizacja, mikronizacja kriogeniczna czy technika mikronizacji nadkrytycznej (Particles from Gas-Saturated Solutions) [46]. Głównymi problemami przy wykorzystaniu tych metod są jednak: duży rozmiar otrzymywanych cząstek lipidowych

(nawet do 2000 μm), czasochłonność oraz złożoność procesu i/lub konieczność wykorzystania rozpuszczalników organicznych (np. etanolu, chloroformu, dichlorometanu) [46,47]. Tymczasem zapropionowany dwuetapowy proces składający się z: 1/ przygotowania wodnej dyspersji SLM techniką emulgowania na gorąco, a następnie 2/ usunięcia wody poprzez suszenie rozpyłowe powstałej dyspersji prowadzi do otrzymania drobnego proszku SLM wielkości kilku-kilkunastu mikrometrów bez użycia rozpuszczalników organicznych z jednoczesnym uniknięciem wskazanych powyżej ograniczeń.

Suszenie rozpyłowe jest technologią prostą, szybką i skalowalną, szeroko stosowaną nie tylko w przemyśle farmaceutycznym, ale także spożywczym i chemicznym [46,48]. W procesie suszenia wodna dyspersja ulega rozpyleniu przez dyszę w drobne kropelki, które w kontakcie z gorącym czynnikiem suszącym (najczęściej powietrzem) ulegają wysuszeniu na skutek odparowania wody. Pomimo iż rozpylana ciecz styka się z gorącym gazem, kontakt ten jest bardzo krótki, a działanie chłodzące odparowującego rozpuszczalnika utrzymuje temperaturę kropli na stosunkowo niskim poziomie. Dzięki temu nawet produkty wrażliwe na temperaturę mogą być suszone z zachowaniem swoich właściwości. W ten sposób możliwe jest również suszenie układów lipidowych, nawet w temperaturach powyżej 100°C [40,41]. Ponieważ jednak temperatura ta jest wyższa od temperatury topnienia lipidu tworzącego matrycę mikrosfer, w przypadku źle dobranych parametrów procesu należy spodziewać się zjawiska topienia matrycy lipidowej. To z kolei może skutkować zmianą lub nawet znacznym pogorszeniem początkowych właściwości SLM (głównie dystrybucji czy szybkości uwalniania substancji czynnej), jak również negatywnie wpływać na wydajność suszenia i sprawny przebieg procesu. W efekcie niezbędna jest optymalizacja procesu pozwalająca na zachowanie właściwości suszonych SLM. Chociaż proces suszenia rozpyłowego ma wiele zastosowań w przemyśle farmaceutycznym, jego wykorzystanie do przekształcania wodnej dyspersji SLM w suchy proszek nie jest wystarczająco poznane ani dobrze opisane. Dlatego przed wdrożeniem tej metody do otrzymywania proszku SLM konieczne było przeprowadzenie optymalizacji warunków procesu, co opisano w publikacji H3 (Ryc. 5).

Ze względu na brak doniesień literaturowych, które dotyczą głównie wodnych lub organicznych roztworów substancji aktywnych i polimerów, a nie zawiesin lipidowych, opracowanie technologii suszenia rozpyłowego wodnych dyspersji SLM rozpoczęto od dostosowania parametrów suszenia, takich jak: temperatura wlotowa (od 75 do 120°) i wylotowa powietrza, natężenia przepływu (prędkość podawania suszonego medium, od 1,2 do 6,0 ml/min) czy stężenie suszonej dyspersji (2,5%; 5%; 10%), które decydują o wydajności procesu i właściwościach otrzymywanych proszków. Praktycznym aspektem pracy była identyfikacja najbardziej krytycznych parametrów suszenia i preparatu w celu pomyślnego przeprowadzenia procesu, w wyniku którego otrzyma się produkt o pożądanej wielkości cząstek i niezmienionej morfologii czy dystrybucji.



Rycina 5. Wykresy powierzchniowe 3D przedstawiające wpływ badanych czynników na właściwości suszonych rozpyłowo proszków SLM z dodatkiem Compritolu. Zależność (A) czynnika Span (rozpiętość), (B) procentowego udziału cząstek wielkości $<50\ \mu\text{m}$, (C) wydajności, (D) temperatury wylotowej, (E) wilgotności, (G) kąta zsypania, (H) współczynnika Hausnera od temperatury na wlocie i szybkości pompy podającej suszoną dyspersję; przedstawiono także (F) zależność czynnika Span (rozpiętości) od wydajności i wilgotności. Kolor brązowy odpowiada wartościom najwyższym, a kolor ciemnozielony najniższym.

W pierwszym etapie badań zaprojektowano doświadczenia mające na celu optymalizację parametrów procesu suszenia rozpyłowego dyspersji placebo SLM przygotowanych z użyciem dwóch lipidów: Compritolu lub kwasu stearynowego. Do

monitorowania wybrano temperaturę na wlocie i szybkość podawania suszonego medium. Jako wartości odpowiedzi wybrano takie cechy jak wydajność i jakość produktu końcowego, czyli wielkość cząstek, zawartość wilgoci i sypkość proszku. Zoptymalizowane w pierwszym etapie parametry procesu wykorzystano następnie do wysuszenia dyspersji SLM z modelowymi substancjami aktywnymi: cyklosporyną i spironolaktonem.

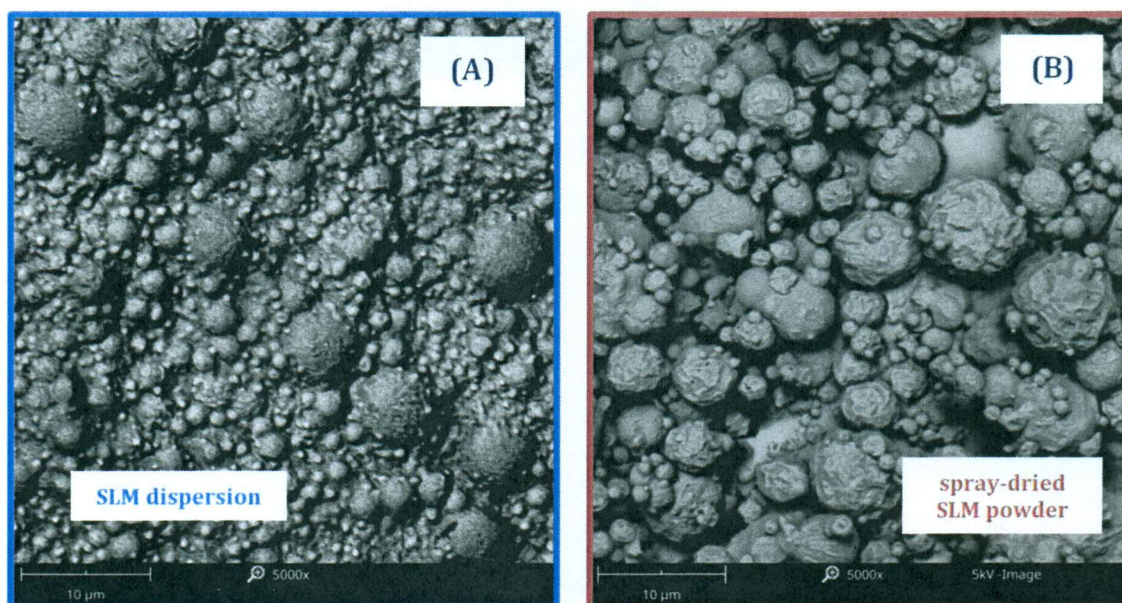
Na podstawie wyników wstępnych analiz wybrano dyspersję zawierającą 5% (w/w) SLM do dalszych badań i oceny parametrów krytycznych. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że tylko wybrane kombinacje badanych parametrów (temperatura wlotowa i prędkość podawania suszonego medium) pozwoliły uzyskać produkt końcowy o pożądanych właściwościach. Zastosowanie trójwymiarowych wykresów powierzchniowych, opracowanych na podstawie wyników eksperymentów przeprowadzonych z różnymi wartościami zmiennych niezależnych, pozwoliło przewidzieć wartości zmiennych zależnych w zależności od warunków procesu (Ryc. 5).

Elastyczność w doborze warunków suszenia zależy przede wszystkim od lipidu tworzącego matrycę mikrocząstek. Wybór warunków suszenia SLM z kwasem stearynowym jest znacznie mniej elastyczny w porównaniu do SLM z Compritołem, dlatego lipid tworzący matrycę mikrosfer należy uznać za podstawowy czynnik decydujący o doborze odpowiednich parametrów suszenia.

Wstępnie rozważano wykorzystanie temperatury wylotowej jako parametru sterującego suszeniem rozpyłowym i optymalizującego jego warunki, jednak biorąc pod uwagę zaobserwowane zależności, ostatecznie uznano, że temperatura powietrza wlotowego, a nie wylotowego jest bardziej odpowiednia do oceny wpływu parametrów procesu na właściwości proszku. Suszone rozpyłowo proszki SLM (Ryc. 6) oceniano pod względem następujących właściwości: wielkość cząstek, zawartość wilgoci, odzysk (wydajność procesu), kąt usypu i współczynnik Hausnera (HR). Zgodnie z przyjętymi założeniami otrzymywany suchy proszek SLM powinien spełniać następujące wymagania: dobra sypkość, procentowy udział cząstek $<50\ \mu\text{m}$ co najmniej 90%, dopuszczalna wydajność co najmniej 50% i wilgotność nie więcej niż 3%.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów, które zebrano w postaci trójwymiarowych wykresów powierzchniowych (Ryc. 5) oraz analiza statystyczna uzyskanych wartości doprowadziły do wskazania najkorzystniejszych warunków prowadzenia procesu suszenia rozpyłowego dyspersji SLM z Compritołem: temperatura na wlocie 90°C i prędkość podaży suszonego medium 2,4 ml/min, oraz dyspersji SLM z kwasem stearynowym: temperatura na wlocie 80°C przy szybkości pompy 3 ml/min.

Stwierdzono, że suszenie rozpyłowe jest skuteczną metodą otrzymywania suchych proszków z wodnych dyspersji SLM (Ryc. 6), a za najważniejszy czynnik, od którego zależą parametry procesu, należy uznać lipid tworzący matrycę SLM. Suszenie rozpyłowe można przeprowadzić całkowicie bez użycia rozpuszczalników organicznych, dzięki temu, że suszona jest wodna dyspersja mikrocząstek lipidowych. Dodatkowo istnieje możliwość optymalizacji procesu suszenia na preparatach *placebo* do warunków, które następnie z powodzeniem zostaną wykorzystane do suszenia SLM z substancją leczniczą.



Rycina 6. Obrazy ze skaningowego mikroskopu elektronowego: (A) wodnej dyspersji SLM przed suszeniem rozpyłowym i (B) proszku SLM otrzymanego po suszeniu rozpyłowym.

Rezultaty i wnioski H3

- Opracowano technikę suszenia rozpyłowego wodnej dyspersji SLM, która umożliwia otrzymywanie stałych mikrocząstek lipidowych w postaci proszku całkowicie bez użycia rozpuszczalników organicznych.
- Sprecyzowano parametry procesu suszenia – zależne od składu SLM, mikrocząstek z dwoma lipidami tworzącymi matrycę lipidową: Compritołem lub kwasem stearynowym, potwierdzając że tylko określony poziom wartości pozwala uzyskać proszek charakteryzujący się pożądanymi właściwościami i zadowalającą wydajnością.
- Optymalne warunki suszenia dobrane podczas suszenia preparatów *placebo* okazały się równie skuteczne, gdy suszeniu poddawano SLM o tym samym składzie, ale z dodatkiem modelowej substancji czynnej. Jest to istotne z punktu widzenia badań laboratoryjnych, gdyż pozwala na optymalizację procesu suszenia rozpyłowego wybranego preparatu z substancją leczniczą przy użyciu formułacji *placebo* z tym samym lipidem tworzącym matrycę mikrocząstek, oszczędzając nierzadko drogą i trudno dostępną substancję leczniczą. Można więc oczekiwać, że warunki zoptymalizowane podczas suszenia SLM *placebo* będą odpowiednie do suszenia wszystkich formułacji o tym składzie, niezależnie od rodzaju inkorporowanej substancji aktywnej.

H4 – Metody analizy i interpretacja dystrybucji substancji leczniczych w mikrosferach lipidowych oraz ocena porównawcza krytycznych właściwości SLM

Ze względu na stały charakter lipidu tworzącego matrycę mikrosfer głównym celem zastosowania SLM jako nośnika leku jest zapewnienie przedłużonego uwalniania, ochrona substancji czynnej lub maskowanie jej smaku [13,15,49]. W każdym z powyższych przypadków dla osiągnięcia pożądanego efektu niezbędne jest skuteczne wbudowanie cząsteczek substancji leczniczej w matrycę lipidową. Dystrybucja leku w nośniku wpływa także na inne właściwości, w tym trwałość preparatu [15,49–52]. Z powyższych powodów ocena rozmieszczenia substancji leczniczej w obrębie stałych mikrocząstek lipidowych jest kluczowym aspektem oceny SLM jako postaci leku. W przeciwieństwie do wcześniejszych badań instrumentalnych (H1 i H2), obecnie opisano metodę analityczną pozwalającą nie tylko na identyfikację rozmieszczenia, ale także ilościową charakterystykę substancji czynnej w poszczególnych fazach formulacji SLM.

W danych literaturowych ilość leku zawartego w SLM zwykle jest charakteryzowana dwoma parametrami: EE – *entrapment efficiency* (efektywność zamykania) i DL – *drug loading* (stopień upakowania/załadowania leku) [22,49,52–55]. Efektywność zamykania to ilość leku wprowadzonego do cząstek lipidowych (pomyślnie zamkniętego) podzielona przez jego całkowitą ilość dodaną do preparatu, a stopień załadowania to ilość leku inkorporowanego na jednostkę masy całego układu lub lipidu. Wyznaczenie tych parametrów w dyspersji SLM polega na wydzieleniu fazy wodnej (poprzez dializę, ultrawierowanie lub filtrację membranową) i oznaczeniu stężenia rozpuszczonej substancji – frakcję rozpuszczoną uważa się za wolny lek, a resztę leku, jako ilość włączoną do mikrocząstek [13,49,54]. Gdy mikrosfery otrzymywane są w postaci suchej (proszek SLM) zawartość substancji czynnej określa się bezpośrednio w cząstkach lipidowych po ich stopieniu i ekstrakcji [13,14,54]. Tak wyznaczone parametry EE i DL są zwykle uważane za miarę przewidywanego potencjału terapeutycznego formulacji. W ten sposób pomijany jest jednak istotny fakt, że lek nie musi być zamknięty w matrycy mikrosfer, tylko może być zlokalizowany w różnych obszarach cząstek lipidowych, czego w żaden sposób nie rozróżniają podawane parametry EE i DL, a co ma kluczowe znaczenie dla właściwości SLM.

Istnieje wiele opisów zakładanego, oczekiwanego lub przewidywanego rozmieszczenia leku w SLM czy SLN [5,56], które jednak wynikają z przyjętych koncepcji wielokompartimentowego nośnika, opartych o wyniki analiz instrumentalnych, modelowania przestrzennego, czy nawet efektu szybkiego uwalniania, a nie z doświadczeń pozwalających ilościowo przedstawić rozmieszczenie leku w dyspersji SLM. Opisywane są próby dokładniejszego zlokalizowania leku w SLM z wykorzystaniem technik obrazowania metodami XPS, SEM, konfokalnej mikroskopii skaningowej, spektroskopii Ramana czy spektroskopii fluorescencyjnej [13,52,56,57], jednak są to metody zdecydowanie bardziej wymagające, skomplikowane i nie zawsze przynoszą oczekiwane skutki lub można je zastosować wybiórczo tylko do niektórych substancji (na przykład prezentujących właściwości fluorescencyjne, wiele substancji ich nie posiada),

co wykazano już także badaniami własnymi (H1-H2). Ponadto takie metody nie dostarczają informacji na temat ilościowego rozkładu substancji leczniczej pomiędzy rdzeniem matrycy lipidowej a powierzchnią cząstek.

Rozkład substancji czynnych pomiędzy poszczególnymi fazami dyspersji SLM zależy od wielu czynników, takich jak hydrofobowość leku, właściwości lipidu, rodzaj i stężenie środka powierzchniowo czynnego czy sposób otrzymywania SLM [13,15,49]. W efekcie proces ten jest na tyle złożony, że niemożliwe staje się przewidzenie dystrybucji leku i jego włączenie do matrycy lipidowej jedynie na podstawie właściwości składników formulacji, czy nawet badań rozpuszczalności. Nie ma bezpośredniej zależności pomiędzy rozpuszczalnością substancji leczniczej oznaczoną w lipidzie, a jej zdolnością do inkorporacji w SLM zawierających w składzie ten lipid.

SLM wytwarzane metodą emulgowania na gorąco (emulsja o/w) są stabilizowane związkami powierzchniowo czynnymi, które w procesie otrzymywania lokalizują się w międzyfazie związanej z powierzchnią SLM [15]. Substancje aktywne wprowadzane do formulacji na etapie sporządzania mogą lokalizować się w różnych obszarach dyspersji SLM: w wewnętrznej części mikrocząstek (tzw. rdzeniu lipidowym), na powierzchni SLM (w tak zwanej międzyfazie) lub w fazie wodnej dyspersji (poza mikrocząstkami). Lokalizacja substancji czynnej uzyskana bezpośrednio po schłodzeniu gorącej emulsji i uformowaniu się stałych mikrocząstek lipidowych może ulegać zmianom w trakcie dalszego przetwarzania (np. w procesie sterylizacji termicznej, prowadzącej do ponownego stopienia mikrocząstek) lub przechowywania (np. w wyniku przemian polimorficznych lipidów matrycy, skutkujących reorganizacją układu przestrzennego cząsteczek lipidów i tworzonych przez nie przestrzeni dla substancji inkorporowanej). W wyniku takich zmian możliwa jest nie tylko redystrybucja substancji w układzie pomiędzy poszczególnymi fazami, ale także precypitacja substancji inkorporowanej w fazie wodnej na skutek wydzielenia z matrycy lipidowej, poza SLM, i wytrącenia w fazie wodnej w wyniku przekroczenia rozpuszczalności.

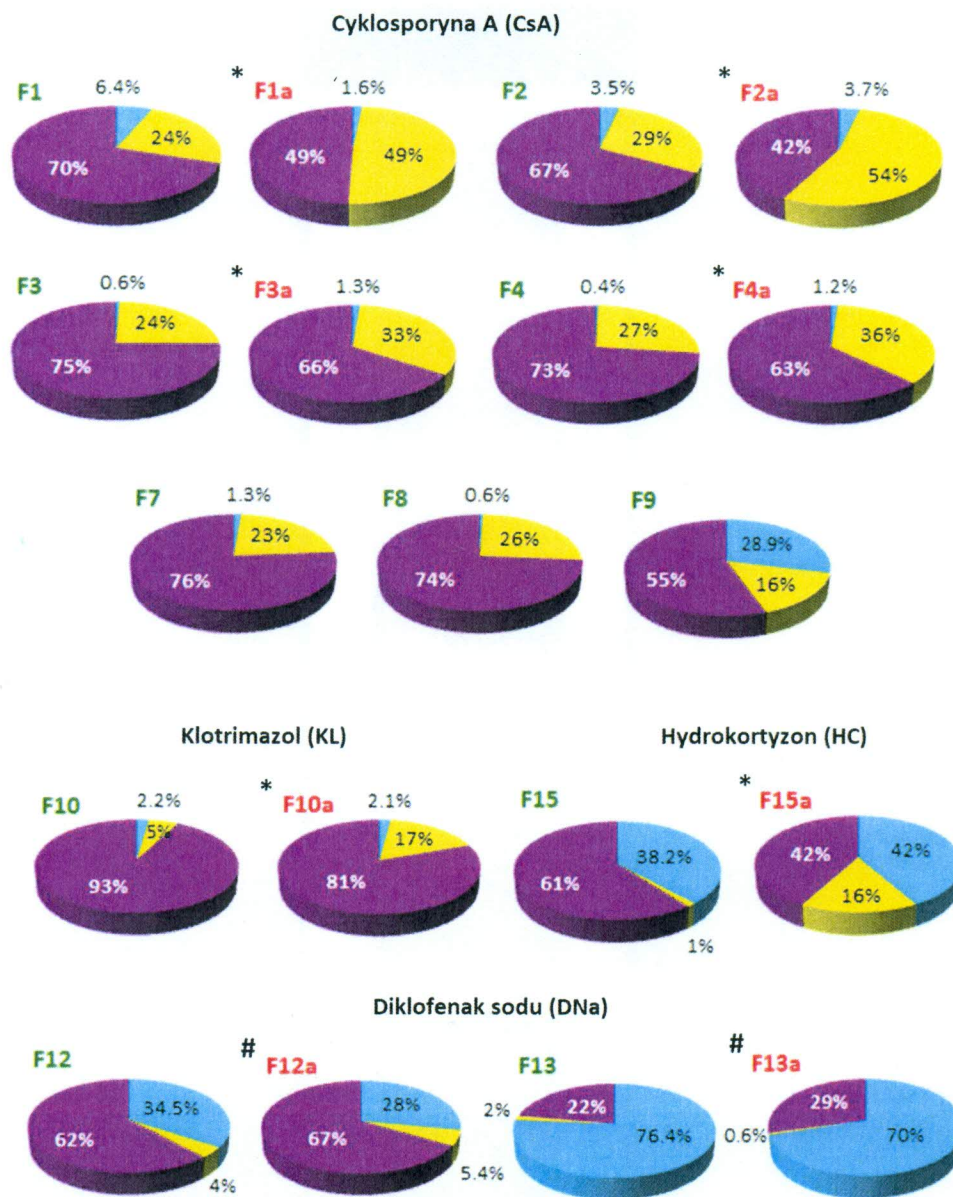
Opisując dystrybucję substancji leczniczych w SLM należy doprecyzować stosowaną nomenklaturę, w której wyróżniamy angielskie terminy: *interphase* oraz *interface* stosowane przy opisie dyspersji liposfer, emulsji i innych układów cząstek, często zamiennie i bez wyjaśnienia [58,59]. W oparciu o dostępne dane przyjęto terminologię definiującą pojęcie "*interface*" jako dwuwymiarową granicę pomiędzy dwiema powierzchniami (lipid-woda) oraz „*interphase*” jako trójwymiarowy obszar pomiędzy dwiema fazami (lipid-chmura środka powierzchniowo czynnego-woda) – tzw. międzyfaza opisywana w przeprowadzonych badaniach.

O obecności znacznej frakcji substancji leczniczej na powierzchni mikrocząstek lub nanocząstek donoszono już w licznych publikacjach [49,57]. Doniesienia te opierały się najczęściej na uzyskanych profilach szybkiego uwalniania znacznej frakcji leku w początkowej fazie (efekt wyrzutu, tzw. *burst effect*), a także na wspomnianych powyżej technikach obrazowania. Jednakże jak dotąd nie przedstawiono badań ilościowych, które pozwoliłyby na szczegółowe określenie rozkładu leku przy uwzględnieniu domen strukturalnych w liposferach (rozdzielenie pomiędzy frakcją zlokalizowaną na

powierzchni i w rdzeniu lipidowym). W układach wielokompartmentowych, takich jak SLM, substancja lecznicza zlokalizowana na powierzchni liposfer jest zakotwiczona w międzyfazie utworzonej przez cząsteczki środka powierzchniowo czynnego stabilizującego układ. Frakcja ta jest stosunkowo łatwo dostępna, więc może skutkować szybkim początkowym uwalnianiem – co w zależności od formulacji może być też cechą korzystną (stabilna dyspersja SLM zapobiega precypitacji leku zlokalizowanego na powierzchni cząstek lipidowych, który jest lepiej rozpuszczalny, niż podany w postaci zawiesiny, a szybkie uwolnienie powierzchniowej frakcji po aplikacji zapewnia łatwo dostępną dawkę inicjującą w miejscu podania). Jednak powierzchniowa lokalizacja przeważającej ilości leku w SLM nie pozwoli skutecznie zamaskować smaku czy zapobiec degradacji chemicznej leku, jeśli w takim celu została zastosowana postać leku. Podsumowując, parametry EE i DL nie uwzględniają rozmieszczenia leku w obrębie matrycy lipidowej mikrocząstek, ani zjawisk zachodzących na powierzchni cząstek, dlatego są niewystarczające do określenia efektywności inkorporacji leku w SLM, a tym samym przydatności tego nośnika dla wybranej substancji leczniczej i celu jego użycia. W związku z powyższym przeprowadzono badania rozkładu modelowych substancji leczniczych w poszczególnych fazach wodnej dyspersji SLM, ze szczególnym uwzględnieniem oceny rozkładu substancji czynnych w obrębie mikrocząstek lipidowych. Wykorzystano własną – opracowaną w toku doświadczeń nad liposferami – technikę wytrząsania dyspersji SLM z rozpuszczalnikiem organicznym (metanolem), pozwalającą na ekstrakcję badanej substancji leczniczej z międzyfazy bez rozpuszczania i uszkodzania matrycy lipidowej mikrocząstek. Procedura ta jest prosta i pozwala na ilościowe określenie frakcji leku zlokalizowanej w międzyfazie. Jako badania wprowadzające do zastosowania proponowanej metody oceniano wpływ metanolu i innych rozpuszczalników organicznych na matrycę mikrosfer lipidowych z wykorzystaniem obrazowania mikroskopowego oraz pomiaru wielkości cząstek. Wykazano, że krótkotrwałe (5 min) wytrząsanie na mieszkadle vortex dyspersji SLM z metanolem (końcowe stężenie 80%) nie powoduje degradacji matrycy, lecz pozwala na całkowite rozpuszczenie substancji leczniczej związanej z powierzchnią mikrocząstek. Również ocena SEM badanych SLM przed i po wytrząsaniu z metanolem potwierdza brak zauważalnych zmian w strukturze mikrosfer.

Zaproponowana procedura obejmuje trzy równoległe etapy: całkowitą ekstrakcję substancji czynnej metanolem po stopieniu liposfer (analiza całkowitej zawartości leku w dyspersji SLM), ultrafiltrację nierozcieńczonej dyspersji SLM (oznaczenie frakcji substancji czynnej rozpuszczonej w fazie wodnej) oraz ekstrakcję substancji leczniczej z międzyfazy metanolem i wydzielenie fazy wodno-metanolowej przez odwirowanie (oznaczana jest wtedy suma zawartości leku w fazie wodnej i w międzyfazie, skrót MP). Taka procedura pozwoliła oznaczyć ilościowo trzy frakcje leku w SLM (Ryc. 7), tj.:

- frakcję wbudowaną w matrycę lipidową (oznaczaną LC),
- frakcję związaną z mikrosferami, ale znajdującą się na powierzchni liposfer (w międzyfazie, oznaczana IF), ta frakcja nie uwzględnia leku z rdzenia SLM (frakcji LC) i
- frakcję rozpuszczoną w fazie wodnej dyspersji (oznaczana AP).



Rycina 7. Dystrybucja cyklosporyny, klotrimazolu, diklofenaku sodu i hydrokortyzonu pomiędzy fazami dyspersji SLM: fazę wodną oznaczono (AP – kolor niebieski), międzyfazę (IF – kolor fioletowy) i matrycę lipidową (LC – kolor żółty). Dyspersje SLM badano przed i po sterylizacji termicznej (formulacje oznaczone literą a). (*): preparaty przed i po sterylizacji, pomiędzy którymi stwierdzono różnice istotne statystycznie (n=3-5). (#): preparaty, które nie były oceniane statystycznie.

Zoptymalizowaną technikę wykorzystano do badania dyspersji SLM z czterema wybranymi substancjami leczniczymi (cyklosporyna, diklofenak sodu, klotrimazol, hydrokortyzon) w różnych stężeniach (Ryc. 7). Wyniki uzyskane w toku takiej procedury porównano z wartościami EE i DL uzyskanymi metodami opisanymi w literaturze, co

doprowadziło do wniosków zasadniczo odmiennych od tych, które wynikają z interpretacji tylko wartości EE i DL.

Mając na uwadze, że wartość EE nie obejmuje jedynie frakcji substancji czynnej z fazy wodnej, wyniki sugerują doskonałą skuteczność inkorporacji szczególnie cyklosporyny czy klotrimazolu w mikrocząstkach lipidowych. Tymczasem wyniki badania dystrybucji wyraźnie wskazują, że wspomniane powinowactwo jest zdecydowanie słabsze, a największa część modelowych substancji w niemal wszystkich badanych preparatach zlokalizowana jest na powierzchni mikrocząstek, a nie w matrycy lipidowej, na co mogłyby wskazywać wysokie wartości EE. Właściwie frakcja zawarta w rdzeniu lipidowym w większości preparatów nie przekracza 30%, a w SLM z diklofenakiem czy hydrokortyzonem wynosi zaledwie 1-6%. Jednocześnie frakcje diklofenaku i hydrokortyzonu odpowiadające wartościom EE (22-62%) są prawie w całości zlokalizowane na powierzchni. Pomimo niskich stężeń leku (0,1-0,5%) nie udało się skutecznie wprowadzić tych cząsteczek do matrycy mikrosfer. Na tej podstawie można wnioskować, że skuteczne i trwałe włączenie substancji leczniczej do rdzenia lipidowego SLM wydaje się znacznie trudniejsze i ograniczone. Chociaż frakcje substancji aktywnych oznaczone w fazie wodnej preparatów były znikome, trudno było uzyskać wysoki udział tych leków w matrycy lipidowej, nawet jeśli wyniki badań rozpuszczalności sugerowały taką możliwość.

Na podstawie uzyskanych wyników badań dystrybucji stwierdzono, że niezależnie od formulacji największa frakcja substancji czynnej (od 52% do nawet 93% całkowitej zawartości) znajdowała się w międzyfazie. Pozostała część znajdowała się głównie w matrycy lipidowej (od 21% do 48%). Ilość leku w fazie wodnej nie przekracza 6,5% poza pojedynczymi formulacjami np. z diklofenakiem.

Wśród preparatów SLM z cyklosporyną rozkład substancji czynnej w dyspersji był podobny: do 70% w międzyfazie, od 24% do nawet 50% w matrycy lipidowej (w zależności od stężenia leku w SLM), z niewielkim ułamkiem substancji w fazie wodnej (Ryc. 7). Taki rozkład niezależny był od lipidu tworzącego matrycę (Compritol lub kwas stearynowy) i uległ znacznemu obniżeniu dopiero po wprowadzeniu do matrycy lipidu ciekłego (jednocześnie znacznie zwiększając frakcję w fazie wodnej). Zwiększenie stężenia fazy lipidowej z 10% do 30% w dyspersji, przy zachowaniu tego samego stężenia cyklosporyny (2%), również nie spowodowało zmiany dystrybucji substancji w poszczególnych fazach. Brak istotnych zmian w rozmieszczeniu cyklosporyny w SLM po zmianach w składzie świadczy o stabilnym powinowactwie tej substancji leczniczej do lipidu SLM, jak również sugeruje, że najprawdopodobniej nie osiągnięto jeszcze maksymalnego poziomu inkorporacji w lipidzie. Powinowactwo diklofenaku i hydrokortyzonu do matrycy lipidowej można uznać za znacznie niższe, skutkujące nieznacznym (2-6%) wbudowaniem w strukturę SLM (Ryc. 7).

Porównując wyniki badania dystrybucji z wynikami uwalniania substancji leczniczej z SLM, można stwierdzić wyraźne zależności, związane z początkowym efektem wyrzutu (*burst effect*), podczas którego uwolniona ilość leku nie przekracza ilości oznaczonej w międzyfazie. Całkowite uwolnienie substancji czynnej, w tym frakcji inkorporowanej w

matrycy lipidowej jest powolne i w warunkach prowadzenia badania (bez enzymów i czynników powodujących degradację matrycy lipidowej) najczęściej niecałkowite.

Chociaż w SLM o tym samym składzie substancji pomocniczych wzrost rozpuszczalności substancji czynnej w lipidach jest zgodny ze zwiększającą się możliwością wbudowania cząsteczek leku w matrycę lipidową, to jednak zależność ta nie jest proporcjonalna, a stężenie leku w liposferach może nawet przekraczać stężenie określone w badaniu rozpuszczalności, co potwierdzono w SLM z cyklosporyną.

Ze względu na zmiany zachodzące w czasie, a związane z transformacją lipidów (przejście z form polimorficznych niestabilnych α i β' o wyższej energii do bardziej stabilnych i uporządkowanych β) badania dystrybucji powinny być także elementem badań trwałości. Na skutek redystrybucji cząsteczki substancji czynnej usunięte z matrycy lipidowej mogą zostać wykluczone poza SLM do fazy wodnej (niekorzystny efekt krystalizacji). Zjawisko wykluczania z matrycy lipidowej (*drug expulsion*) dotyczy także SLN, na przykładzie których zostało niejednokrotnie opisane [4,5,50,51]. Poza tym, substancja aktywna może być przemieszczona z rdzenia do międzyfazy bez niekorzystnego efektu wytrącania poza mikrosferami. Niektóre formułacje, na przykład nawet ze znaczną frakcją cyklosporyny zlokalizowaną w międzyfazie, mogą też być trwałe (brak istotnych statystycznie różnic w badaniach dystrybucji) przez okres co najmniej 2 lat.

Jednocześnie na uwagę zasługuje korzystny wpływ procesu sterylizacji termicznej (istotna w lekach przeznaczonych do podawania pozajelitowego lub do oka) obserwowany w niektórych formułacjach, a objawiający się nawet dość znacznym zmniejszeniem frakcji międzyfazowej i zwiększeniem ilości leku w matrycy lipidowej. Wykrycie tego zjawiska możliwe jest dopiero w wyniku przeprowadzenia zaproponowanych badań dystrybucji rozróżniających ilości substancji czynnej w poszczególnych fazach dyspersji SLM, podczas gdy nie jest to możliwe tylko na podstawie analizy parametrów EE i DL, które nie zmieniają się po sterylizacji.

Przedstawione badania wykazały, że ocena i charakterystyka wielokompartmentowych, lipidowych postaci leku, takich jak dyspersje SLM, oparta wyłącznie na parametrach EE i DL, jest niewystarczająca, a nawet myląca i nieprawidłowa, ponieważ substancji leczniczej zlokalizowanej na powierzchni mikrocząstek i substancji zawartej w rdzeniu lipidowym SLM nie można rozpatrywać w ten sam sposób. W badaniach uwalniania frakcja leku znajdująca się na powierzchni SLM może skutkować efektem szybkiego początkowego uwalniania, poza tym nie będzie chroniona czy maskowana w takim stopniu, jak frakcja inkorporowana w rdzeniu lipidowym cząstek. Parametry EE i DL nie pozwalają na odróżnienie ilości leku związanego z powierzchnią mikrocząstek od ilości faktycznie zawartej w rdzeniach lipidowych mikrocząstek. Wskazują one jedynie na rozdzielenie substancji czynnej pomiędzy fazę wodną i fazę lipidową dyspersji oraz efektywność procesu, ale wyłącznie w rozumieniu przyłączenia substancji aktywnej do lipidu, a nie inkorporacji w nim. Wydaje się bezwzględnie konieczne prezentowanie szczegółowego rozmieszczenia leku między poszczególnymi fazami dyspersji SLM nie tylko w toku badań rozwojowych, ale też trwałości czy kontroli serii. Dlatego w niniejszej

pracy zaproponowano metodę usuwania substancji czynnej z powierzchni mikrocząstek lipidowych za pomocą metanolu bez uszkodzenia matrycy lipidowej i wymycia leku w niej inkorporowanego, a frakcję ogólnie uważaną za włączoną do SLM podzielono na dwie: związaną w międzyfazie i włączoną do rdzenia matrycy lipidowej. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na zasadnicze różnice w ocenie na podstawie zaproponowanego modelu rozkładu w poszczególnych fazach uzyskiwanego po badaniu dystrybucji i dotychczas stosowanych parametrów EE i DL.

Rezultaty i wnioski H4

- Opracowana i zastosowana metoda badania dystrybucji identyfikuje i rozróżnia frakcję leku w fazie wodnej, międzyfazie (czyli zlokalizowaną na powierzchni i w zewnętrznych warstwach mikrosfer), ale przede wszystkim w matrycy lipidowej. Taka charakterystyka SLM stanowi nowe narzędzie pomocne w rozwoju tej postaci leku i zrozumieniu jej działania *in vitro* i *in vivo*.
- Biorąc pod uwagę tylko parametry EE i DL w odniesieniu do badanych SLM jedyny wniosek, jaki można przedstawić dotyczy podziału badanych substancji leczniczych na takie, które prezentują wysoką (EE prawie 100%) efektywność inkorporacji (np. cyklosporyna i klotrimazol) lub niższą EE (np. diklofenak czy hydrokortyzon, na poziomie 24-66%).
- Wyniki badań dystrybucji zaproponowaną metodą ułatwiają krytyczną ocenę stopnia rzeczywistej inkorporacji leku w SLM i sposobu jego rozmieszczenia w matrycy lipidowej. Znacząca część większości testowanych substancji aktywnych zlokalizowana była w międzyfazie, znacznie mniejsza frakcja inkorporowała się w matrycy lipidowej. Wskazuje to – w przeciwieństwie do wyników EE i DL – na ograniczoną inkorporację substancji leczniczych w rdzeniu SLM.
- Dopiero ocena parametrów dystrybucji, takich jak frakcja leku w międzyfazie i rdzeniu lipidowym, pozwoliła wykryć wpływ procesu sterylizacji na strukturę SLM i zmianę rozkładu modelowych substancji w liposferach.
- Wyniki dystrybucji substancji czynnej w poszczególnych fazach SLM można także skorelować z wynikami dostępności farmaceutycznej i profilami uwalniania leku.
- Zaproponowana metoda badania dystrybucji pozwala na ilościowe określenie rzeczywistego stopnia wbudowania substancji leczniczej w matrycę lipidową SLM, a tym samym przydatności nośnika w takiej postaci. Jest stosunkowo prosta i nie wymaga skomplikowanego sprzętu.

H5 – Wybór metody badania uwalniania substancji leczniczej z SLM i optymalizacja warunków procesu w sytuacji braku jednoznacznych wytycznych dla tej postaci leku

Profil uwalniania substancji czynnej inkorporowanej w mikrosferach jest jednym z najważniejszych atrybutów postaci leku, ponieważ podstawowym celem wykorzystania SLM jako nośnika leku jest uzyskanie przedłużonego uwalniania [13]. Wielkość cząstek lipidowych, ich morfologia i obciążenie lekiem, a także sposób inkorporacji (opisana powyżej dystrybucja leku w mikrosferach, patrz H4) są podstawowymi cechami jakościowymi i ilościowymi SLM jako postaci leku i dlatego są indywidualnie oceniane na etapie badań rozwojowych. Cechą wspólną, zależną łącznie od wszystkich tych czynników, jest profil uwalniania leku z nośnika, który staje się w ten sposób najważniejszym badaniem postaci leku, a jednocześnie najbardziej krytycznym z punktu widzenia oczekiwanych efektów *in vivo*.

Badanie uwalniania *in vitro*, nazywane również badaniem dostępności farmaceutycznej, jest powszechnie wykorzystywane, w różnych postaciach leku, nie tylko na etapie ich rozwoju, ale także w czasie kontroli jakości serii produkcyjnych. Jest to tak ważne, ze względu na wpływ poszczególnych czynników na uzyskiwane profile uwalniania, a tym samym możliwość monitorowania zmienności kolejnych partii produktu [60,61].

Jednocześnie ze względu na innowacyjność badanej postaci leku nie ma jednoznacznych wytycznych, ani farmakopealnej metody właściwej i dedykowanej do badania dyspersji SLM, będącej wielokompartментowym układem lipidowym.

Standardowe metody badania uwalniania, zgodnie z wytycznymi Farmakopei Europejskiej (EurPh), Farmakopei Amerykańskiej (USP) czy agencji rejestracyjnych: Europejska Agencja Leków (EMA) i Agencja ds. Żywności i Leków (FDA), ograniczają się głównie do klasycznych postaci dawkowania i nie są odpowiednie dla wielokompartментowych układów dyspersyjnych. Do badania dostępności farmaceutycznej z mikrocząstek lipidowych można zastosować zarówno aparat łopatkowy, jak i komorę przepływową; nie są one jednak optymalnym rozwiązaniem, gdyż wymagają modyfikacji, np. zastosowania odpowiednich adapterów, zapobiegających wypłukiwaniu cząstek, pobieraniu ich podczas próbkowania, sączeniu pobranych porcji płynu akceptorowego itp. [61,62]. Dlatego w przypadku niestandardowych nośników leku rozważa się modyfikacje tradycyjnych metod, a także opracowuje się i stosuje metody niefarmakopealne, biorąc pod uwagę specyfikę badanego produktu. Niestety prowadzi to do mnożenia różnych technik i zdecydowanie utrudnia porównywanie wyników uzyskiwanych przez różnych badaczy. Należy bowiem pamiętać, że różne konfiguracje eksperymentalne także będą miały istotny wpływ na przebieg procesu uwalniania, a w konsekwencji na uzyskiwane wyniki. Niezbędne jest więc poznanie i wskazanie czynników mających największy wpływ na przebieg procesu, aby jak najlepiej zmodyfikować i udoskonalić stosowaną metodologię, jednocześnie dążąc do jej standaryzacji. Będąc świadomym przyczyn występujących różnic i braku ujednolicenia stosowanych technik można też przynajmniej

uniknąć błędnej interpretacji danych, np. podczas porównywania wyników uzyskanych różnymi metodami.

Generalnie, rozpatrując metodologię prowadzenia badania uwalniania z mikrocząstek lipidowych można wyróżnić trzy grupy technik: metody dializacyjne, metody przepływowe oraz bezpośrednie mieszanie z płynem akceptorowym w różnych objętościach [62]. W praktyce najczęściej preferowana jest metoda worka dializacyjnego, ponieważ media i cząstki są już fizycznie oddzielone membraną i nie ma potrzeby dodatkowego oddzielania przed pobieraniem płynu, a także zatrzymywania próbki w układzie [62,63].

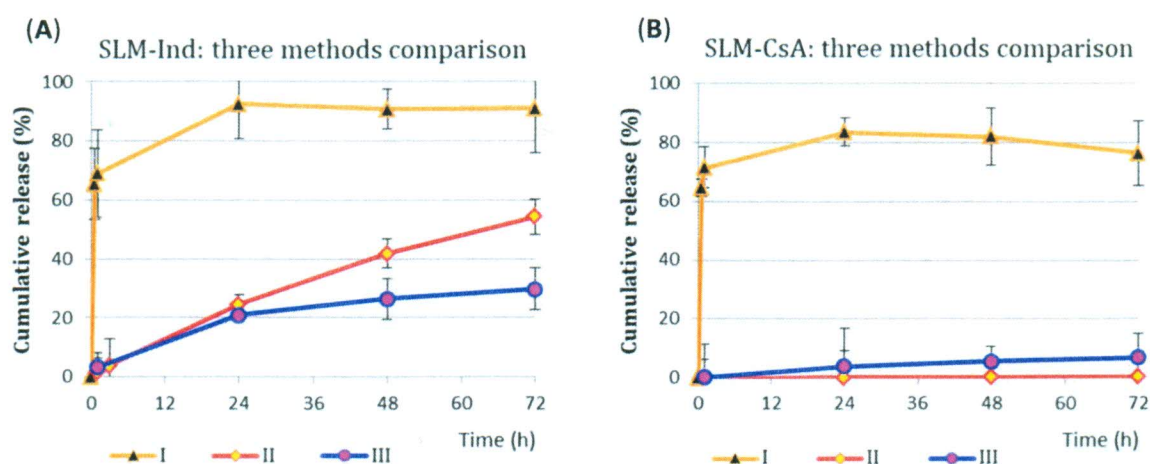
Jak wykazano w przeprowadzonych badaniach, profil uwalniania najlepiej odzwierciedla rozmieszczenie substancji leczniczej w SLM dając też możliwość wykrycia subtelnych różnic w inkorporacji substancji leczniczej, które są trudne do stwierdzenia nawet w badaniu dystrybucji. Tak więc, ze względu na znaczenie badań uwalniania *in vitro* na różnych etapach rozwoju i produkcji SLM, przeprowadzono doświadczenia porównujące zastosowanie różnych metod oceny dostępności farmaceutycznej, ze szczególnym uwzględnieniem różnic w błonach dializacyjnych i płynach akceptorowych, aby wytypować najodpowiedniejszą konfigurację eksperymentalną oraz wskazać czynniki mające największy wpływ na zmienność otrzymywanych danych.

W badaniach porównawczych wykorzystałam preparaty SLM o takim samym składzie. Matrycę lipidową stanowił Compritol, surfaktantem był polisorbát 80, a substancjami leczniczymi indometacyna lub cyklosporyna, które charakteryzowały się podobną dystrybucją substancji czynnej w dyspersji SLM. Badania prowadzono metodą bez błony, techniką rękawa dializacyjnego, jak również w komorach horyzontalnych typu Side-Bi-Side przegrodzonych błoną dializacyjną.

W modelu badania bez membrany dializacyjnej dominującym efektem było szybkie początkowe uwolnienie (Ryc. 8) znacznej frakcji leku (*burst effect*), której ilość jest podobna do ilości oznaczonej w międzyfazie w badaniach dystrybucji. Trudno jest to jednoznacznie stwierdzić, ale najprawdopodobniej efekt szybkiego początkowego uwalniania jest skutkiem nie tylko powierzchniowej lokalizacji znacznej frakcji substancji leczniczej, ale przede wszystkim wynikiem bezpośredniego rozcieńczania i mieszania liposfer z dużą ilością płynu akceptorowego, co nie miałoby miejsca *in vivo*. Efekt przedłużonego uwalniania poprzedzony etapem szybkiego, początkowego uwalniania, opisano już w literaturze zarówno w odniesieniu do SLN, jak i SLM [64–66]. Efekt przedłużonego uwalniania wynika z frakcji leku inkorporowanej w matrycy lipidowej, z której może nie ulec całkowitemu uwolnieniu (zatrzymanie uwalniania np. cyklosporyny na poziomie ok. 80%). Wynika to ze składu płynów akceptorowych, którymi były wyłącznie wodne roztwory surfaktantów (polisorbát 80, laurylosiarczan sodu), nie powodujące degradacji enzymatycznej matrycy lipidowej mikrosfer.

W kolejnym etapie prowadzono badanie uwalniania w aparacie dyfuzyjnym lub worku dializacyjnym przy użyciu odpowiednich membran (Ryc. 8). Badanie z membraną zasadniczo różni się od testu bez membrany, ponieważ przenikanie cząsteczek substancji leczniczej do kompartmentu akceptorowego jest ograniczone nie tylko szybkością

uwalniania z postaci leku czy rozpuszczalnością w płynie akceptorowym, ale także dyfuzją substancji przez membranę. Zastosowana membrana zatrzymuje SLM w kompartmentcie donorowym, ale umożliwia przenikanie rozpuszczonych/uwolnionych cząsteczek leku do kompartmentu akceptorowego. Do najważniejszych zalet takich metod należy oddzielenie SLM od płynu akceptorowego, brak konieczności filtrowania pobranej próbki oraz utrzymanie próbki w układzie. Pojemność worka dializacyjnego i objętość płynu akceptorowego można elastycznie dostosować, w celu zapewnienia warunków *sink* w trakcie trwania badania. Kluczowe znaczenie ma natomiast dobór membrany o odpowiednich właściwościach.



Rycina 8. Profile uwalniania leku *in vitro* uzyskane trzema różnymi metodami (I – bez błony dializacyjnej, II – metoda worka dializacyjnego, III – komory horyzontalne Side-Bi-Side) z (A) SLM z indometacyną (do płynu akceptorowego z polisorbate) i z (B) SLM z cyklosporyną (do płynu akceptorowego z SLS).

Zasadniczą różnicą, obserwowaną w przeprowadzonych badaniach, pomiędzy modelem membranowym a modelem bezmembranowym, był brak efektu wyrzutu (szybkiego początkowego uwalniania znacznej frakcji leku), każdorazowo wyraźnie obserwowanego tylko w modelu bez błony. Ponadto w modelach z membraną widoczne były istotne różnice pomiędzy SLM z różnymi badanymi substancjami, natomiast w metodzie bez membrany profile uwalniania były bardzo podobne. Efekty te potwierdzają istotny wpływ na uzyskiwane wyniki obecności w układzie badanym membrany i wybranego modelu. Świadczą one również o większej czułości metody dwukompartamentowej, pozwalającej na wykrycie subtelnych różnic pomiędzy formułacjami SLM na podstawie obserwowanych profili uwalniania.

Główną właściwością membrany stosowanej w badaniu uwalniania, decydującą o przebiegu procesu jest tzw. punkt odcięcia masy cząsteczkowej (MWCO, *molecular weight cut-off*). Zgodnie z deklaracją producenta membrany MWCO oznacza masę cząsteczkową, poniżej której cząsteczki mogą swobodnie przemieszczać się przez

membranę [67]. Nie ma jasnych wytycznych dotyczących doboru tego parametru membrany w zależności od masy cząsteczkowej badanej substancji leczniczej. W raportach naukowych znajdują się pewne wskazówki, oparte bardziej na własnych doświadczeniach badaczy, na przykład Xu i in. [68] zalecają, aby punkt odcięcia wynosił około 100-krotność masy cząsteczkowej leku. Jednakże na podstawie analizy danych literaturowych można stwierdzić, że powszechnie stosowany MWCO jest zwykle tylko od 12 do maksymalnie 70 razy większy od masy cząsteczkowej badanej substancji [41,68–70]. MWCO membrany dializacyjnej stosowanej w moich badaniach (14 kDa) daje 12- i 40-krotnie większy punkt odcięcia w porównaniu odpowiednio z masą cząsteczkową cyklosporyny i indometacyny. Na tej podstawie należałoby oczekiwać swobodnego przenikania badanych substancji przez membranę.

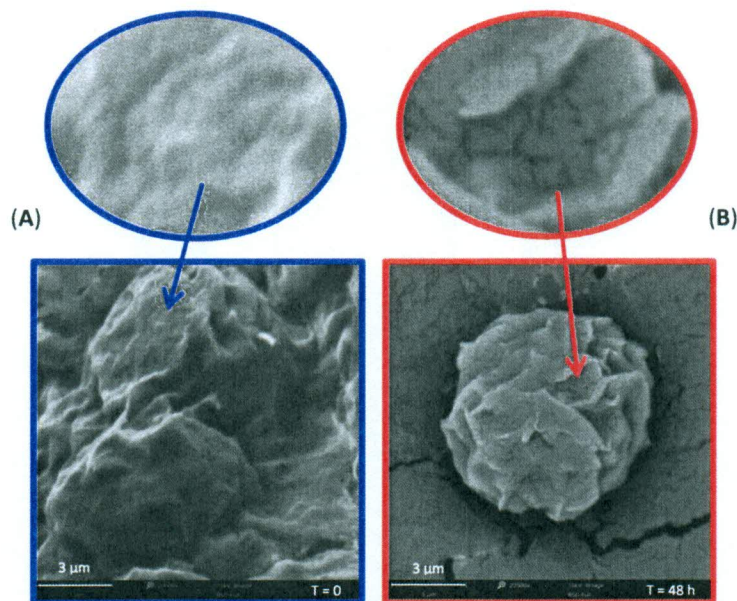
Spośród dwóch metod dwukompartamentowych wykorzystujących błonę dializacyjną za zdecydowanie korzystniejszą uznano technikę rękawa dializacyjnego. Jego zalety opisano już powyżej, podczas gdy drugi z modeli złożony ze szklanych komór horyzontalnych wykazywał istotne ograniczenia. Przede wszystkim przemieszczanie się membrany z uszczelkami względem komory donorowej i akceptorowej stwarzało ryzyko zmniejszenia i tak już niewielkiej powierzchni przenikania. Zaobserwowałam, że szczelność układu oraz łatwość jego przygotowania (prawidłowego zamontowania membrany) do badania zależała m.in. od rodzaju stosowanej błony. Ponadto, po zakończeniu badania stwierdzałam niejednorodność dyspersji w przedziale donorowym, gdzie mikrocząstki lipidowe gromadziły się od strony membrany (w tym miejscu komora jest strukturalnie zwężona), pomimo stosowania mieszania magnetycznego w obu częściach komory przez cały czas trwania badania. Zjawiska tego nie obserwowałam tylko wtedy, gdy dyspersja SLM w komorze donorowej była rozcieńczana przed badaniem.

Dalsze eksperymenty przeprowadziłam z wykorzystaniem różnych membran filtracyjnych w modelu komór poziomych (ponieważ w badaniach chciałam wykorzystać także membrany niemające formy rękawa dializacyjnego). Jako kluczowe czynniki mające wpływ na uzyskiwane wyniki zidentyfikowano przede wszystkim wielkość porów membrany, przez które przenika substancja lecznicza, jak również właściwości hydrofilowe/hydrofobowe membrany. Ze względu na wielkość i strukturę cząsteczki cyklosporyna (1203 kDa) przenikała przez membrany zdecydowanie trudniej niż indometacyna (358 kDa). Porównując różne rodzaje membran (Cuprophane MWCO 10 kDa, membrana celulozowa MWCO 14 kDa, CA 0,2 μ m, PTFE 0,2 μ m) najlepsze przenikanie cyklosporyny zapewniała błona porowata CA, podczas gdy błona filtracyjna PTFE o tej samej wielkości porów była praktycznie nieprzepuszczalna dla tej substancji. Indometacyna przenikała dobrze zarówno przez błony dializacyjne 10 jak i 14 kDa, podczas gdy cyklosporyna wymagała zdecydowanie większego punktu odcięcia. Jednocześnie należy podkreślić, że porównanie profili uwalniania uzyskanych nie tylko z dyspersji SLM, ale również z zawiesiny substancji czynnej dowodzą, że uzyskane wyniki (stosując membrany, które nie hamowały przenikania substancji czynnej) są rezultatem

spowolnienia uwalniania przez nośnik (mikrocząstki lipidowe), a nie są wynikiem braku zdolności dyfuzji przez zastosowaną membranę dializacyjną.

Kolejnymi czynnikami, w istotny sposób wpływającymi na profil uwalniania są: rozpuszczalność substancji czynnej w płynie akceptorowym (wymagana do zapewnienia warunków *sink*; obie substancje są praktycznie nierozpuszczalne w wodzie) oraz różnica stężeń substancji czynnej po obu stronach membrany, będąca siłą napędową procesu, jak również ciśnienie osmotyczne w obu kompartmentach. Z tego powodu w składzie płynów akceptorowych stosowano związki powierzchniowo czynne, zwiększające rozpuszczalność substancji leczniczych (laurylosiarczan sodu w badaniach cyklosporyny i polisorbát 80 w uwalnianiu indometacyny), a także chlorek sodu jako substancję zwiększającą ciśnienie osmotyczne (do wartości fizjologicznej, ok. 300 mosmol/l). Za istotne uznano również rozcieńczanie dyspersji SLM w worku dializacyjnym płynem akceptorowym. Naśladuje to w pewien sposób model bez błony dializacyjnej oraz warunki *in vivo*, w których dochodzi do bezpośredniego wymieszania z płynami ustrojowymi (w przypadku podania do oka z płynem łzowym). Jednocześnie istotny jest stosunek tego rozcieńczenia (np. 1+1), aby ilość dodawanego płynu nie była zbyt duża (tak jak dzieje się w przypadku metody badania bez błony).

Podczas badań uwalniania przeprowadzono także ocenę mikroskopową (SEM) SLM, aby ocenić zmiany, które zachodzą w matrycy lipidowej w wyniku uwalniania substancji leczniczej (Ryc. 9). Mikrocząstki lipidowe badane *de novo* miały kształt sferyczny z „wyboistą”, nierówną powierzchnią, podobną zarówno w przypadku preparatów z cyklosporyną, jak i indometacyną.



Rycina 9. Obrazy z mikroskopu SEM stałych mikrocząstek lipidowych: (A) przed i (B) po 48 h badania uwalniania.

Jak można zobaczyć na Rycinie 9, po zakończeniu badania uwalniania kształt i rozmiar SLM był podobny. Jednocześnie w ich strukturze widoczne były dość wyraźne defekty w postaci pęknięć i szczelin.

Podsumowując, obecnie ze względu na brak jasnych wytycznych oraz powszechną swobodę w doborze aparatury i warunków procesu, porównywanie wyników badań mikrocząstek lipidowych prowadzonych przez różne laboratoria praktycznie nie jest możliwe. W tej sytuacji tylko standaryzacja metod badania uwalniania z wielokompartментowych nośników lipidowych umożliwi ocenę porównawczą wyników z różnych ośrodków.

Rezultaty i wnioski H5

- Badanie dostępności farmaceutycznej polegające na wyznaczeniu profilu uwalniania substancji czynnej z SLM, zależy od wszystkich cech postaci leku, a przede wszystkim od rozmieszczenia substancji aktywnej w obrębie poszczególnych mikrocząstek lipidowych. Z tego powodu jest najlepszym badaniem nie tylko do oceny właściwości biofarmaceutycznych dyspersji SLM, ale także do kontroli jakości.
- Sposób prowadzenia badania uwalniania, czyli metoda i warunki są czynnikami istotnie wpływającymi na uzyskiwane wyniki. Jest to podstawowa wiedza niezbędna przy porównywaniu wyników, aby uniknąć ryzyka uzyskania błędnych wniosków ze względów metodologicznych.
- Przeprowadzone badania wyraźnie wskazują, że stosowanie różnych metod prowadzi do uzyskania różnych profili uwalniania. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń za najwłaściwszą do badania uwalniania substancji leczniczych z SLM uznano metodę worka dializacyjnego.
- Zastosowanie metody badania w komorze horyzontalnej typu Side-Bi-Side, także z membraną dializacyjną, skutkowało uzyskaniem podobnych wyników jak z użyciem metody worka dializacyjnego, jednak metoda ta okazała się najbardziej wymagająca z analitycznego i technicznego punktu widzenia, ze względu na stosunkowo małą powierzchnię przenikania i epizody wycieku płynu z komory akceptorowej.
- Efekt szybkiego początkowego uwalniania (tzw. *burst effect*) co prawda korelował z ilością substancji leczniczej zlokalizowaną powierzchniowo i oznaczoną w badaniach dystrybucji w międzyczasie, jednak występował tylko w metodzie bezpośredniego mieszania SLM z płynem akceptorowym w znacznie większej ilości, co nie odzwierciedla warunków fizjologicznych, a tym samym nie symuluje realnego procesu uwalniania, który mógłby zachodzić *in vivo*.

- Jako kluczowe czynniki decydujące o szybkości uwalniania zidentyfikowano również: membranę dializacyjną (ze względu na MWCO), rodzaj płynu akceptorowego oraz różnicę stężeń substancji leczniczej pomiędzy kompartmentem donorowym i akceptorowym.

H6 – Ocena wpływu czynników fizjologicznych na proces uwalniania *in vitro* substancji leczniczej z SLM na przykładzie mikrocząstek lipidowych z indometacyną przeznaczonych do podania w postaci kropli do oczu

Ten etap doświadczeń jest kontynuacją analizy wpływu poszczególnych warunków metody badania uwalniania na uzyskiwane wyniki dostępności farmaceutycznej substancji leczniczej stosowanej w postaci dyspersji SLM. W poprzednim etapie [H5] jako najbardziej odpowiednią do badania dyspersji SLM wybrano metodę worka dializacyjnego, wskazując jednocześnie na kluczowe znaczenie składu płynu akceptorowego i równie istotną rolę rozpuszczalności badanej substancji w płynie akceptorowym, nie tylko w celu zapewnienia warunków *sink*. Badania kontynuowano, aby wykazać, jak istotne znaczenie mają czynniki fizjologiczne, występujące i oddziałujące na postać leku w miejscu podania, gdy zostaną użyte *in vitro* w badaniu dostępności farmaceutycznej.

We wcześniejszych badaniach wykazano już potencjał dyspersji SLM jako obiecującej postaci leku do stosowania miejscowego do oka w postaci kropli [26], dlatego w niniejszym badaniu skupiono się na wpływie *in vitro* na mikrocząstki lipidowe czynników fizjologicznych, takich jak te, wpływające na SLM w worku spojówkowym (sztuczny płyn łzowy, enzym lizozym).

Inkorporowaną w SLM substancją leczniczą była indometacyna, która jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym, charakteryzującym się dużą skutecznością przeciwbólową i przeciwzapalną. Zaliczana jest do klasy II BCS (*Biopharmaceutics Classification System*), zatem charakteryzuje się słabą rozpuszczalnością i dobrą penetracją przez bariery biologiczne [71]. Indometacyna jest słabo rozpuszczalna w środowisku kwaśnym (przy pH 1,1 około 0,001 mg/ml) i lepiej przy wyższym pH (pH 6,0 to już >0,5 mg/ml) [72]. Jednak rozpuszczalność w wodzie nie zawsze najlepiej koreluje z rozpuszczalnością *in vivo* i w konsekwencji z biodostępnością. Dlatego też stosowanie mediów istotnych biologicznie (*biorelevant media*) jest bardziej odpowiednim podejściem do naśladowania warunków *in vivo* w badaniach uwalniania. Bioistotne płyny to roztwory testowe o tych samych składnikach fizjologicznych i właściwościach podobnych do symulowanych płynów, np. płynu łzowego lub płynu żołądkowo-jelitowego.

Ze względu na wytypowaną drogę aplikacji dyspersji SLM do oka oceniano także wpływ enzymu lizozym (LZ) oraz innych niż chlorek sodu, składników płynu łzowego, dotychczas nie stosowanych w badaniach uwalniania. Ze względu na wspomniane już znaczenie rozpuszczalności substancji leczniczej w medium akceptorowym oceniano także dodatek polisorbatu 80, ponieważ modelową substancją była trudno rozpuszczalna

w wodzie indometacyna. Jest to substancja, która dobrze przenikała w poprzednich badaniach przez stosowaną membranę dializacyjną (MWCO 14 kDa), dlatego stosując wyłącznie taki rodzaj błony, wyeliminowano wpływ tego czynnika na uzyskiwane wyniki.

Według mojej najlepszej wiedzy nie przeprowadzono dotychczas żadnych badań dotyczących uwalniania leku z SLM do płynu akceptorowego zawierającego składniki fizjologiczne, takie jak enzym lizozym, elektrolity płynu łzowego czy inne związki obecne we łzach. Obecnie dostępnych jest tylko kilka badań dotyczących uwalniania leku z cząstek lipidowych (SLN, SLM), w których uwzględniono pewne czynniki fizjologiczne *in vitro*. Badania liposfer przeznaczonych do podawania do oka ograniczają się praktycznie wyłącznie do SLN. Badania te przeprowadzono przy użyciu zmodyfikowanej komory dyfuzyjnej Franza, aparatu do uwalniania wg USP z modyfikacjami lub zmodyfikowanej techniki dyfuzyjnej w worku dializacyjnym w aparacie łopatkowym oraz symulowanego płynu łzowego (STF) jako płynu akceptorowego [73–76]. Co istotne, skład STF stosowanego w tych badaniach ograniczał się tylko do 3–4 soli, takich jak NaCl, NaHCO₃, CaCl₂ czy KCl, co nie odzwierciedla bogatego składu płynu łzowego. Ponadto w badaniach tych nie stosowano żadnych enzymów. Obecnie nie ma żadnych danych na temat wpływu enzymu lizozym na integralność SLM lub SLN, a tym samym na szybkość uwalniania substancji czynnej z tych formułacji. Jak dotąd przeprowadzono tylko dwa badania SLM z użyciem płynów symulujących warunki fizjologiczne, ale w odniesieniu do podawania doustnego, a nie do oczu [52,77].

Efekt przedłużonego uwalniania z SLM zależy od frakcji leku zlokalizowanej w stałej matrycy lipidowej. SLM to cząstki lipidowe, które nie topią się w temperaturze ludzkiego ciała, dlatego całkowite uwolnienie substancji czynnej ze stałej matrycy lipidowej wymaga erozji tej matrycy, na przykład w wyniku działania enzymów lipolitycznych. Poza enzymami oddziałującymi na macierz lipidową do uwolnienia istotne są także inne czynniki fizjologiczne panujące w miejscu podania nośnika lipidowego, takie jak elektrolity zmieniające stabilność enzymów lub rozpuszczalność substancji leczniczej, pH, siła jonowa, perystaltyka przewodu pokarmowego czy rodzaj i stężenie soli żółciowych (w przypadku podawania doustnego) [78]. Specyficznym miejscem aplikacji jest także worek spojówkowy, w którym panujące warunki fizjologiczne to pH około 7,4 i osmolalność płynu łzowego w zakresie od 280 do 293 mOsm/kg po przebudzeniu [79].

Uwalnianie leku jest istotne dla jego biodostępności i skuteczności terapeutycznej [80]. Prawidłowo zaprojektowane badanie uwalniania *in vitro* pozwala nie tylko ocenić jakość i stabilność produktu leczniczego, ale także daje podstawę do przewidywania zachowania się *in vivo*. Ponadto prowadzenie badania zgodnie z wytycznymi farmakopei i zaleceniami organizacji rejestrujących (o ile takie istnieją) pozwala na porównanie wyników badań pomiędzy ośrodkami. Niestety w chwili obecnej nie ma zharmonizowanej normy regulacyjnej (FDA/EMA) dotyczącej metody badania uwalniania do oceny wielokompartментowych nośników lipidowych, jak np. SLM, szczególnie gdy są one przeznaczone do podawania do oka. W tej krytycznej dziedzinie brakuje informacji i

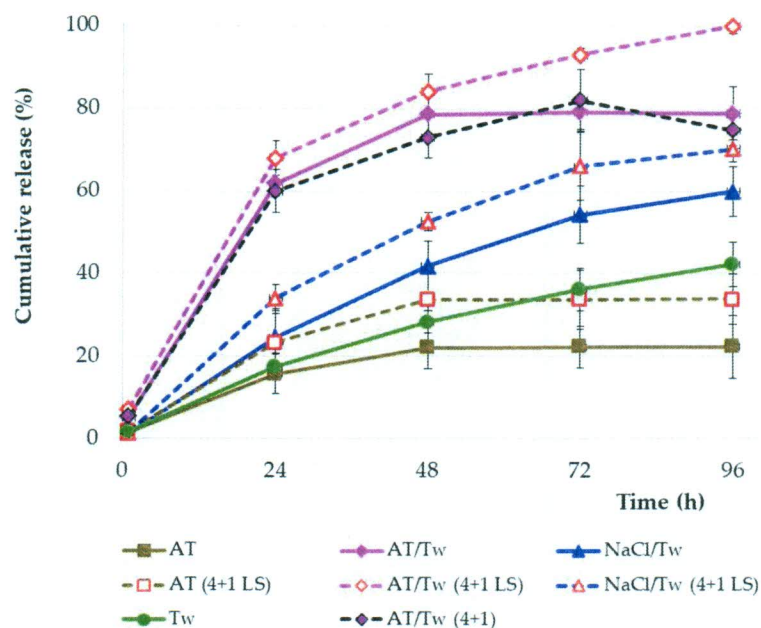
ujednoliconych wskazań, podczas gdy standaryzacja procedur o kluczowym znaczeniu dla wykazania jakości produkcji [80] właściwie nie istnieje.

Prowadzone analizy rozpoczęto od badania rozpuszczalności indometacyny w sztucznym płynie łzowym, roztworach chlorku sodu i polisorbatu, także z dodatkiem lizozymu. W badaniach wykorzystałam sztuczny płyn łzowy, którego skład, tak jak stężenie lizozymu (1,4 mg/ml) dobrano na podstawie dostępnych danych [81–83]. W płynie łzowym znalazły się nie tylko klasyczne elektrolity (chlorki sodu, potasu, amonu, magnezu i wapnia oraz wodorowęglan sodu), ale także kwas mlekowy, kwas cytrynowy czy mocznik, fizjologicznie obecne w worku spojówkowym. Oznaczona rozpuszczalność substancji w sztucznym płynie łzowym była wyższa niż w roztworze polisorbatu, co można wytłumaczyć składem sztucznego płynu łzowego. Za obserwowany efekt odpowiadają między innymi cytrynian sodu i mocznik, dzięki wzmocnieniu solwatacji cząsteczek leku przez wodę [84]. Dodatek polisorbatu zwiększył rozpuszczalność indometacyny zarówno w sztucznym płynie łzowym, jak i w roztworze chlorku sodu, nie wpływając znacząco na wartości pH tych roztworów. Natomiast dodatek lizozymu do jakiegokolwiek cieczy nie wpłynął istotnie na rozpuszczalność badanej substancji, nawet pomimo obniżenia w układach niebuforowanych pH od 0,9 do 1,6 jednostki. Nie stwierdzono istotnych różnic rozpuszczalności w obecności lizozymu, chociaż takiej korelacji można było się spodziewać ze względu na zmianę pH. Podsumowując, nie można oczekiwać zwiększonej rozpuszczalności indometacyny wraz ze wzrostem pH (w zakresie pH 4,5–8,0). W przeprowadzonych badaniach zależność ta była bardzo słabo widoczna, a różnice w pH nie wyjaśniały różnic w rozpuszczalności substancji czynnej. Wyniki badania rozpuszczalności pozwalają na wykorzystanie wszystkich badanych cieczy, z wyjątkiem roztworu chlorku sodu bez dodatku polisorbatu, jako płynów akceptorowych gwarantujących warunki *sink* w proponowanym modelu badawczym.

W badaniach uwalniania przeprowadzonych ze sztucznym płynem łzowym (AT) uwolniło się mniej niż 50% indometacyny w czasie 96 h (Ryc. 10). Chociaż dodatek lizozymu zwiększał uwalnianie nawet dwukrotnie w ciągu 48 h, ostatecznie z SLM uwolniono nie więcej niż 41% dawki. Dodatek polisorbatu spowodował statystycznie istotny wzrost uwolnienia indometacyny z SLM, jednak w dalszym ciągu obserwowano efekt *plateau*, a poziom uwalniania substancji leczniczej nie przekraczał 79%.

Ze względu na swój słabo kwaśny charakter indometacyna wykazuje bardzo niską rozpuszczalność w wodzie [85]. Zastosowanie polisorbatu (Tw) jako substancji powierzchniowo czynnej w składzie sztucznego płynu łzowego uzasadnione jest stanowiskiem Europejskiej Agencji Leków. Zgodnie z wytycznymi EMA [86] generalnie należy stosować środowisko wodne, ale aby w takich warunkach uzyskać odpowiednie uwalnianie substancji aktywnych słabo rozpuszczalnych w wodzie, dopuszczone jest stosowanie środków powierzchniowo czynnych [86]. Uzasadnieniem dodatku polisorbatu – нефизjologicznego składnika – do płynu akceptorowego mogą być także badania opisane przez Siepmanna i in. [87], wg których ograniczona rozpuszczalność leku może odgrywać główną rolę w kontroli uwalniania. Lek uwolniony *in vivo* może się wchłaniać, być szybko transportowany z worka spojówkowego np. do krwiobiegu lub być usuwany

drogą nosowo-łzową. Zastosowany model eksperymentalny *in vitro* to „układ zamknięty” i ostatecznie mogą wystąpić sztuczne efekty nasycenia lekiem w otaczającym ośrodku uwalniającym, „zafałszowując” wynikającą z tego kinetykę uwalniania [87]. Pomimo zapewnienia warunków *sink* szybkość rozpuszczania jest proporcjonalna do gradientu stężeń, zgodnie z równaniem Noyesa-Whitneya [88]. Oprócz efektu powierzchniowego jest to również jeden z efektów wpływających na lepsze uwalnianie Ind w obecności polisorbatu. W ten sposób dodanie polisorbatu *in vitro* w pewnym stopniu równoważy opisane efekty *in vivo*, których nie można idealnie naśladować w zamkniętym modelu badania uwalniania. Tak więc, pomimo iż zarówno sztuczny płyn łzowy, jak i płyn łzowy z dodatkiem polisorbatu zapewniały warunki *sink* i nie różniły się pod względem pH, powinno stosować się połączenie tych składników, dlatego, że to rozpuszczalność (która była wyższa w obecności polisorbatu) należy uznać za siłę napędową uwalniania indometacyny z SLM, a polisorbat zwiększając ją równoważył *in vitro* efekty zachodzące *in vivo*.



Rycina 10. Profile uwalniania indometacyny z dyspersji SLM ($n=3-5$) w worku dializacyjnym do różnych płynów akceptorowych. Linia ciągła oznacza dyspersje SLM badane bez rozcieńczenia, linia przerywana oznacza dyspersje SLM rozcieńczone (4+1) w worku dializacyjnym, a profile uzyskane w obecności lizozymu zaznaczono czerwonym kolorem znaczników.

Jak wykazały obrazy mikroskopowe, powierzchnia mikrocząstek nie jest gładka, ale nieregularna i pomarszczona. Wchodząc w interakcję z tą powierzchnią, polisorbat powoduje jej dalsze zwiększanie się poprzez pogłębianie fałd i rowków w wyniku

rozpuszczania i uwalniania indometacyny z SLM. Ma to wpływ na działanie innych składników płynu akceptorowego. Ponadto, jak wynika z wcześniejszych doświadczeń [H4,H5], uwolnienie nie więcej niż 79% indometacyny w ciągu 96 h, pomimo obecności polisorbatu, było związane z dystrybucją substancji leczniczej w różnych fazach dyspersji SLM. Można zatem stwierdzić, że środek powierzchniowo czynny jest ważny dla uwalniania indometacyny zlokalizowanej głównie na powierzchni SLM. Niecałkowite uwolnienie i osiągnięcie efektu *plateau* po 48 h, przy poziomie uwalniania 79%, potwierdza włączenie około 20% indometacyny do matrycy lipidowej SLM.

Enzym lizozym występuje w dużych ilościach w płynie łzowym i ma działanie przeciwdrobnoustrojowe. Chociaż nie jest typowym enzymem lipolitycznym trawiącym macierz lipidową mikrocząstek, interakcja lizozymu obecnego w warstwie wodnej filmu łzowego z lipidami (kwasami tłuszczowymi, cholesterolem, fosfolipidami i ich mieszaninami) obecnymi w warstwie lipidowej i innych filmach lipidowych jest przedmiotem aktualnych badań [89]. Lizozym jest enzymem hydrolitycznym złożonym ze 129 aminokwasów. Zastosowanie enzymu lizozym w badaniach jest trudne, ponieważ jego aktywność jest funkcją zarówno pH, jak i siły jonowej [90]. Dodatek lizozymu do worka dializacyjnego (rozcieńczanie SLM w worku dializacyjnym naśladuje bezpośrednie mieszanie SLM z płynem łzowym podczas aplikacji do oka), w badaniu uwalniania przeprowadzonym do roztworu chlorku sodu z dodatkiem polisorbatu spowodował wzrost ilości uwolnionej substancji o około 10%. Ten sam efekt zaobserwowano w przypadku sztucznego płynu łzowego. W testach uwalniania przeprowadzonych ze sztucznym płynem łzowym z dodatkiem polisorbatu, zastosowanie lizozymu zwiększyło procent uwolnionej dawki aż do 100%. Fakt ten potwierdza, że uwalnianie substancji czynnej aplikowanej na powierzchnię oka w postaci SLM będzie zależeć nie tylko od obecności lizozymu, ale będzie również związane z płynem łzowym w worku spojówkowym. Zatem *in vitro* dopiero rozcieńczenie mikrocząstek płynem akceptorowym z dodatkiem lizozymu (AT/Tw 4 + 1 LS), w obecności polisorbatu, skutkuje uwolnieniem całej dawki substancji leczniczej (Ryc. 10).

Wpływ lizozymu stwierdzony niezależnie od rodzaju płynu akceptorowego, przy jednoczesnym braku istotnych zmian rozpuszczalności Ind w płynie akceptorowym pod wpływem lizozymu, wskazuje na inny mechanizm zwiększonego uwalniania, bezpośrednio powiązany z SLM. Zmiany profili uwalniania wywołane przez lizozym zależały od jego wpływu na mikrocząstki lipidowe, a także od rodzaju płynu akceptorowego, do którego nastąpiło uwolnienie (w tym od dodatku polisorbatu). W związku z tym należy rozważyć, czy lizozym oddziałuje na mikrocząstki na tyle silnie, aby uwolnić nawet tę część substancji, która jest wbudowana w matrycę lipidową cząstek, czy też wbudowanie indometacyny do mikrocząstek behenianu glicerolu następuje jedynie w zewnętrznych warstwach lipidowych mikrocząstek, co oznacza, że indometacyna jest stosunkowo łatwo dostępna. Próbę wyjaśnienia powyższego efektu podjęto w dalszych badaniach, w których oceniano zawartość worka dializacyjnego po teście uwalniania, a także SLM po inkubacji z naturalnym płynem łzowym.

Tween i lizozym okazały się ważnymi składnikami płynu akceptorowego, pomimo braku interakcji z rdzeniem mikrocząstek. Ich powolne działanie spowodowało uwolnienie indometacyny, która podczas oznaczania frakcji znajdującej się w międzyfazie (test dystrybucji substancji, H4) nie uległa rozpuszczeniu nawet przez metanol. Jest oczywiste, że po podaniu do oka *in vivo* nie będzie kontaktu preparatu z polisorbatem. Jednakże zmiany zaobserwowane na powierzchni mikrocząstek były wystarczające do całkowitego uwolnienia indometacyny *in vitro*, a te same przemiany i deformacje obserwowano także po inkubacji SLM ze łzami bez polisorbatu (patrz poniżej).

Ostatecznie, aby ustalić, czy istnieje wpływ enzymu lizozym oraz warunków fizjologicznych panujących w oku (elektrolity i inne substancje obecne we łzach) na uwalnianie indometacyny z mikrocząstek lipidowych, dyspersje SLM inkubowano z naturalnymi łzami. Zmiany zaobserwowane w SLM z Ind były bardzo podobne do tych po badaniu pozostałości z worka po uwalnianiu, a nawet bardziej wyraźne i nasilone, gdy z naturalnymi łzami inkubowano *placebo* SLM. Wtedy widoczne były nawet agregaty cząstek o wyraźnie zaburzonej strukturze indywidualnej. W preparatach *placebo* wiele cząstek było zdeformowanych i wydawało się, że są popękane i tracą integralność. Widoczne były także różnice w kształcie powierzchni cząstek. Porównując SLM *placebo* i z indometacyną, przed i po inkubacji ze łzami, wyraźnie zaobserwowano większe „zmarszczki” i ostre krawędzie na powierzchni cząstek w porównaniu z gładzszymi i bardziej kulistymi mikrocząstkami o łagodnych krawędziach przed inkubacją. Podsumowując, należy stwierdzić, że został potwierdzony wpływ lizozymu na mikrocząstki lipidowe, choć efekt ten nie jest związany z całkowitą degradacją matrycy lipidowej przez enzym, tylko z efektami powierzchniowymi, co przy ustalonej lokalizacji substancji leczniczej gwarantuje jej dobre uwalnianie. Wyniki badań uwalniania oraz ocena pozostałości po teście, jak i po inkubacji z naturalnymi łzami jednoznacznie wykazały, że możliwe jest uwolnienie 100% Ind z mikrocząstek bez całkowitej degradacji matrycy lipidowej.

Podsumowując, należy stwierdzić, że potwierdzono wpływ enzymu lizozym na mikrocząstki lipidowe, choć efekt ten nie wynika z całkowitej degradacji matrycy lipidowej. Zmiany strukturalne zaobserwowane w mikrocząstkach inkubowanych z naturalnymi łzami dowodzą wpływu składników fizjologicznych na SLM. Jednocześnie roztwór tylko chlorku sodu w obecności lizozymu był niewystarczający do uzyskania efektów zbliżonych do wywoływanych przez naturalne łzy, co sugeruje wpływ płynu łzowego (składniki, pH, siła jonowa) na aktywność enzymu i w konsekwencji wpływ na SLM. Potwierdza to potrzebę jednoczesnego stosowania wszystkich składników fizjologicznych występujących *in vivo*, w połączeniu z surfaktantem gwarantującym dobrą rozpuszczalność (nie tylko poziom *sink*) słabo rozpuszczalnej substancji aktywnej. Uzyskanie uwolnienia całkowitej dawki indometacyny bez jednoczesnej degradacji struktury mikrocząstek sugeruje również lokalizację substancji aktywnej na powierzchni i w zewnętrznych warstwach matrycy lipidowej, dzięki czemu jest ona stosunkowo łatwo dostępna do uwolnienia, bez całkowitej degradacji mikrocząstek. Pomimo tego, w

badanych modelach bez płynu łzowego i lizozymu, uwalnianie indometacyny nie przekraczało 60% w ciągu 96 h.

Spośród wszystkich testów *in vitro* badanie uwalniania jest kluczowym eksperymentem. Kinetyka uwalniania substancji czynnej z SLM dostarcza podstawowych informacji na temat zdolności mikrocząstek lipidowych do modyfikowania uwalniania leku, co jest ważnym parametrem uwzględnianym przy ocenie skuteczności i jakości produktów. Jeśli badanie uwalniania zostanie zaplanowane i wykonane prawidłowo, uzyskane wyniki można powiązać nie tylko z rozkładem substancji czynnej w mikrocząsteczkach, ale przede wszystkim z zachowaniem się postaci dawkowania *in vivo*.

Badania uwalniania w bioodpowiednich mediach mają kluczowe znaczenie dla przewidywania zachowania nośników lipidowych *in vivo*, ponieważ uwzględniają czynniki fizjologiczne występujące w miejscu podania, co ułatwia lepsze zrozumienie właściwości farmaceutycznych preparatów lipidowych oraz interakcji pomiędzy lipidowymi substancjami pomocniczymi, substancjami leczniczymi a środowiskiem fizjologicznym. Złożoność warunków wpływających na postać leku w worku spojówkowym zdecydowanie utrudnia przewidywanie działania leku *in vivo* na podstawie wyników *in vitro* uzyskanych metodami nieuwzględniającymi czynników fizjologicznych.

Przeprowadzone badania zdecydowanie pogłębiają wiedzę o znaczeniu i wpływie czynników fizjologicznych, takich jak działanie enzymu lizozym, siły jonowej, składu jonowego, rozpuszczalności substancji czynnej, panujących w miejscu aplikacji postaci leku, a także wpływu obecności środka powierzchniowo czynnego, na proces uwalniania *in vitro* substancji leczniczej z SLM. Uzyskane wyniki wyjaśniają krytyczne czynniki istotne przy opracowywaniu metody badania uwalniania *in vitro* z dyspersji SLM. Jest to istotne, dlatego, że oczekuje się, iż badania uwalniania z wykorzystaniem czynników fizjologicznych dostarczą już na wczesnym etapie rozwoju formułacji wystarczających informacji na temat właściwości postaci leku oraz ułatwią jej modyfikację i projektowanie w taki sposób, aby osiągnąć pożądaną efekt, bez konieczności prowadzenia eksperymentów w kolejnych fazach (*ex vivo* lub *in vivo* na zwierzętach), zanim zostanie opracowany ostateczny i pożądaną skład formułacji, który w późniejszych fazach potwierdzi tylko swoje właściwości. Optymalizacja procesu uwalniania w oparciu o wskazane parametry ułatwi badania rozwojowe, a także może pomóc w regulacyjnej ocenie tej postaci dawkowania, a tym samym dopuszczeniu do obrotu wielokompartamentowego nośnika w postaci mikrocząstek lipidowych.

Rezultaty i wnioski H6

- W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono wyraźnej zależności pomiędzy rozpuszczalnością indometacyny, a pH badanych płynów akceptorowych, w konsekwencji czego w testach uwalniania nie stwierdzono korelacji między pH (w zakresie 4,5-8,0), a ilością uwolnionej substancji.

- Zastosowanie sztucznego płynu łzowego z dodatkiem enzymu lizozym jako ośrodka biozgodnego w badaniu uwalniania indometacyny z SLM uznano za całkowicie uzasadnione i mające istotny wpływ na uzyskiwane wyniki.
- Wyniki badań uwalniania oraz ocena pozostałości po teście jednoznacznie wykazały, że możliwe jest uwolnienie 100% substancji czynnej z SLM bez całkowitej degradacji matrycy lipidowej mikrocząstek. Jest to konsekwencją charakterystycznej dystrybucji substancji leczniczej w SLM (indometacyna rozmieszczona głównie na powierzchni i w zewnętrznych warstwach mikrocząstek). Efekt ten nie jest możliwy do uzyskania *in vitro* jeśli nie zastosuje się jednocześnie enzymu lizozym, polisorbatu i sztucznego płynu łzowego, odpowiedzialnych za zmiany powierzchniowe w SLM.
- Zmiany strukturalne zaobserwowane w SLM inkubowanych z naturalnymi łzami potwierdziły wpływ składników fizjologicznych na mikrocząstki i były takie same, jak te obserwowane po badaniu pozostałości po uwalnianiu, w którym symulowano warunki fizjologiczne.
- Porównanie wpływu naturalnych łez na SLM z indometacyną z pozostałością po badaniu uwalniania do płynu biopodobnego pozwala oczekiwać podobnego zachowania mikrocząstek lipidowych *in vivo* po aplikacji do worka spojówkowego, jak podczas oceny dostępności farmaceutycznej.

Podsumowanie

W cyklu publikacji, prezentujących poszczególne etapy prac stanowiącym osiągnięcie naukowe, opisano korzyści i ograniczenia z wykorzystania nowoczesnych technik instrumentalnych do badania rozmieszczenia substancji czynnych w stałych mikrocząstkach lipidowych [H1, H2]. Ponadto przedstawiono, opracowane na potrzeby badań SLM jako postaci leku, rozwiązania metodologiczne analizy dystrybucji [H4] i badania uwalniania substancji czynnej [H5, H6]. Ze względu na stosowanie w poszczególnych etapach prac nie tylko płynnej formy dyspersji SLM, ale również SLM w formie proszku, na potrzeby prowadzenia badań oraz przyszłych zastosowań medycznych preparatu opracowano i zoptymalizowano metodę suszenia rozpyłowego wodnych dyspersji SLM [H3].

W prowadzonych badaniach za modelową postać leku przyjęto dyspersję SLM, która mogłaby być stosowana w postaci kropli do oczu. Generalnie jednak, poza doбором czynników panujących *in vivo* w worku spojówkowym do badania uwalniania (np. lizozym, sztuczny płyn łzowy, H6] wszystkie inne analizy nadają się do ogólnego zastosowania w badaniach SLM nie tylko przeznaczonych do podania do oka. Podobnie, zastosowane modelowe substancje czynne nie ograniczają w żaden sposób szerszej

użyteczności i interpretacji prezentowanych wyników. Tam, gdzie zostało to wskazane, właściwości zależą ściśle od inkorporowanej substancji leczniczej (np. dystrybucja w matrycy SLM), w innych sytuacjach procedury mogą odnosić się ogólnie do badanego układu (np. warunki suszenia rozpyłowego opracowane dla formułacji *placebo*). Ponadto, wszystkie wykorzystane jako modelowe substancje lecznicze mogłyby także znaleźć zastosowanie w formie SLM przeznaczonych do podania innymi drogami.

Wyniki uzyskane w toku prac składających się na osiągnięcie naukowe pozwalają wskazać najodpowiedniejsze narzędzia i techniki instrumentalne do oceny właściwości i badań rozwojowych postaci leku w formie SLM.

Innowacyjne podejście do oceny rozmieszczenia inkorporowanej substancji leczniczej w SLM z wykorzystaniem opracowanej metodologii prowadzenia badania dystrybucji substancji czynnej pozwala na ilościową charakterystykę podziału substancji aktywnej pomiędzy rdzeń lipidowy, międzyfazę oraz fazę wodną formułacji SLM.

Wytypowana i zoptymalizowana metoda badania dostępności farmaceutycznej ułatwia ocenę właściwości stałych mikrocząstek lipidowych, w odniesieniu do ich możliwego zachowania *in vivo*, z jednoczesnym wskazaniem czynników mających największy wpływ na uzyskiwane wyniki i stwarzających ryzyko popełnienia błędu zwłaszcza podczas porównywania wyników uzyskanych innymi technikami.

Opracowana metoda suszenia rozpyłowego wodnych dyspersji SLM stanowi metodę otrzymywania SLM w formie proszku bez wykorzystania rozpuszczalników organicznych. Ponadto możliwa jest standaryzacja procesu, w zależności od lipidu tworzącego matrycę mikrocząstek, z wykorzystaniem do tego celu jedynie formułacji *placebo*.

Najistotniejsze wyniki i obserwacje badawcze dokonane w toku prowadzenia eksperymentów prezentowanych w pracach składających się na osiągnięcie naukowe, jak również opracowane metody umożliwią dalszy rozwój badań nad stałymi mikrocząstkami lipidowymi SLM i skuteczną ocenę ich właściwości. Ważnym aspektem jest również osiągnięcie nie tylko optymalizacji, ale przede wszystkim standaryzacji prowadzonych procedur badawczych, jako elementu niezbędnego do porównywania badań między ośrodkami, a w przyszłości rozwoju regulacji rejestracyjnych, które mogłyby ułatwić praktyczne wykorzystanie SLM jako nowoczesnej lipidowej i wielokompartimentowej postaci leku.

Literatura

1. Abdelaziz, H.M.; Gaber, M.; Abd-Elwakil, M.M.; Mabrouk, M.T.; Elgohary, M.M.; Kamel, N.M.; Kabary, D.M.; Freag, M.S.; Samaha, M.W.; Mortada, S.M.; Elkhodairy, K.A.; Fang, J.Y.; Elzoghby, A.O.: Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. *J. Control. Release.* (2018) 269, 374–392.

2. Prow, T.W.; Grice, J.E.; Lin, L.L.; Faye, R.; Butler, M.; Becker, W.; Wurm, E.M.T.; Yoong, C.; Robertson, T.A.; Soyer, H.P.; Roberts, M.S.: Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2011) 63, 470–491.
3. Di Sabatino, M.; Albertini, B.; Kett, V.L.; Passerini, N.: Spray congealed lipid microparticles with high protein loading: Preparation and solid state characterisation. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2012) 46, 346–356.
4. Üner, M.; Yener, G.: Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspective. *Int. J. Nanomedicine* (2007) 2, 289–300.
5. Müller, R.H.; Radtke, M.; Wissing, S.A.: Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2002) 54, 131–155.
6. Müller, R.H.; Mader, K.; Gohla, S.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2000) 50, 161–177.
7. Lengyel, M.; Kállai-Szabó, N.; Antal, V.; Laki, A.J.; Antal, I.: Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Sci. Pharm.* (2019) 87(20), 1–31.
8. da Silva, R.Y.P.; de Menezes, D.L.B.; Oliveira, V.d.S.; Converti, A.; de Lima, Á.A.N.: Microparticles in the development and improvement of pharmaceutical formulations: an analysis of *in vitro* and *in vivo* studies. *Int. J. Mol. Sci.* (2023) 24(6), 1–25.
9. <https://microspheres.us/what-are-microspheres/> [data dostępu 03.2024]
10. Wong, C.Y.; Al-Salamia, H.; Dassa, C.R.: Microparticles, microcapsules and microspheres: A review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. *Int. J. Pharm.* (2018) 537, 223–244.
11. Dudala, T.B.; Yalavarthi, P.R.; Vadlamudi, H.V.; Thanniru, J.; Yaga, G.; Mudumala, N.L.; Pasupati, V.K.: A perspective overview on lipospheres as lipid carrier systems. *Int. J. Pharm. Invest.* (2014) 4, 149–155.
12. Capretto L.; Mazzitelli, S.; Nastruzzi, C.: Design, production and optimization of solid lipid microparticles (SLM) by a coaxial microfluidic device. *J. Control. Release* (2012) 160, 409–417.
13. Jaspert, S.; Piel, G.; Delattre, L.; Evrard, B.: Solid lipid microparticles: Formulation, preparation, characterisation, drug release and applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* (2005) 2, 75–87.
14. López-Iglesias, C.; Quílez, C.; Barros, J.; Velasco, D.; Alvarez-Lorenzo, C.; Jorcano, J.L.; Monteiro, F.J.; García-González, C.A.: Lidocaine-loaded solid lipid microparticles (SLMPS) produced from gas-saturated solutions for wound applications *Pharmaceutics*. (2020) 12 1–16.
15. Scalia, S.; Young, P.M.; Traini, D.: Solid lipid microparticles as an approach to drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* (2015) 12, 583–599.
16. Zhang, Y.; Shena, L.; Wanga, T.; Lia, H.; Huang, R.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Quana, D.: Taste masking of water-soluble drug by solid lipid microspheres: a child-friendly system established by reversed lipid-based nanoparticle technique. *J. Pharm. Pharmacol.* (2020) 72, 776–786.

17. Bertoni, S.; Tedesco, D.; Bartolini, M.; Prata, C.; Passerini, N.; Albertini, B.: Solid lipid microparticles for oral delivery of catalase: focus on the protein structural integrity and gastric protection. *Mol. Pharm.* (2020) 17, 3609–3621.
18. Liu, Y.; Salituro, G.M.; Joong Lee, K.; Bak, A.; Leung, D.H.: Modulating drug release and enhancing the oral bioavailability of torcetrapib with solid lipid dispersion formulations. *AAPS PharmSciTech.* (2015) 16, 1091–1100.
19. Wu, C.; Luo, X.; Baldursdottir, S.G.; Yang, M.; Sun, X.; Mu, H.: *In vivo* evaluation of solid lipid microparticles and hybrid polymer-lipid microparticles for sustained delivery of leuprolide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2019) 142, 315–321.
20. Kim, J.T.; Barua, S.; Kim, H.; Hong, S.C.; Yoo, S.Y.; Jeon, H.; Cho, Y.; Gil, S.; Oh, K.; Lee, J.: Absorption study of genistein using solid lipid microparticles and nanoparticles: Control of oral bioavailability by particle sizes. *Biomol. Ther.* (2017) 25, 452–459.
21. Reithmeier, H.; Herrmann, J.; Göpferich, A.: Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J. Control. Release.* (2001) 73, 339–350.
22. Rahimpour, Y.; Javadzadeh, Y.; Hamishehkar, H.: Solid lipid microparticles for enhanced dermal delivery of tetracycline HCl. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* (2016) 145, 14–20.
23. Gavini, E.; Albertini, B.; Rassa, G.; Di Sabatino, M.; Sanna, V.; Giunchedi, P.; Rodriguez, L.; Passerini, N.: Evaluation of solid lipid microparticles produced by spray congealing for topical application of econazole nitrate. *J. Pharm. Pharmacol.* (2009) 61, 559–567.
24. Lauterbach, A.; Mueller-Goymann, C.C.: Development, formulation, and characterization of an adapalene-loaded solid lipid microparticle dispersion for follicular penetration. *Int. J. Pharm.* (2014) 466, 122–132.
25. Melike, Ü.; Karaman, E.F.: Preliminary studies on solid lipid microparticles of loratadine for the treatment of allergic reactions via the nasal route. *Trop. J. Pharm. Res.* (2013) 12, 287–293.
26. Wolska, E.; Sznitowska, M.; Chorążewicz, J.; Szerkus, O.; Radwańska, A.; Markuszewski, M.J.; Kaliszan, R.; Raczyńska, K.: Ocular irritation and cyclosporine A distribution in the eye tissues after administration of Solid Lipid Microparticles in the rabbit model. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2018) 121, 95–105.
27. Mezzena, M.; Scalia, S.; Young, P.M.; Traini, D.: Solid lipid budesonide microparticles for controlled release inhalation therapy. *AAPS J.* 11 (2009) 771–778.
28. Dolci, L.S.; Panzavolta, S.; Albertini, B.; Campisi, B.; Gandolfi, M.; Bigi, A.; Passerini, N.: Spray-congealed solid lipid microparticles as a new tool for the controlled release of bisphosphonates from a calcium phosphate bone cement. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2018) 122, 6–16.
29. Scalia, S.; Haghi, M.; Losi, V.; Trotta, V.; Young, P.M.; Traini, D.: Quercetin solid lipid microparticles: A flavonoid for inhalation lung delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2013), 49, 278–285.

30. Zimmermann, E.; Souto, E.B.; Müller, R.H.: Physicochemical investigations on the structure of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLNTM) by means of DSC and ¹H NMR. *Pharmazie* (2005) 60, 508–513.
31. Ali, H.; El-Sayed, K.; Sylvester, P.W.; Nazzal, S.: Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: Evidence studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (¹H NMR). *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2010) 77, 286–297.
32. Jennings, V.; Thünemann, A.F.; Gohla, S.H.: Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int. J. Pharm.* (2000) 199, 167–177.
33. <https://hha.hitachi-hightech.com/en/blogs-events/blogs/2022/08/03/what-is-simultaneous-hermogravimetric-analysis-sta/> [data dostępu 03.2024]
34. Jiang, X.; Zhao, Y.; Guan, Q.; Xiao, S.; Dong, W.; Lian, S.; Zhang, H.; Liu, M.; Wang, Z.; Han, J.: Amorphous solid dispersions of cyclosporine A with improved bioavailability prepared via hot melt extrusion: Formulation, physicochemical characterization, and *in vivo* evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2022) 168, 1–9.
35. Silveira, E.F.; Rannier, L.; Nalone, L.; da Silva, C.F.; Chaud, M.V.; de MBarbosa, R.; Junior, R.L.; da Costa, L.P.; Souto, E.B.; Severino, P.: Loading of 5-aminosalicylic in solid lipid microparticles (SLM): Solubility screening of lipid excipients and physicochemical characterization. *J. Therm. Anal. Calorim.* (2020), 139(34), 1151–1159.
36. Bunjes, H.; Unruh, T.: Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2007) 59, 379–402.
37. Wong, P.C.H.; Heng, P.W.S.; Chan, L.W.: A study on the solid state characteristics of spray-congealed glyceryl dibehenate solid lipid microparticles containing ibuprofen. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2016) 42(3), 364–377.
38. Passerini, N.; Qi, S.; Albertini, B.; Grassi, M.; Rodriguez, L.; Craig, D.Q.M.: Solid lipid microparticles produced by spray congealing: Influence of the atomizer on microparticle characteristics and mathematical modeling of the drug release. *J. Pharm. Sci.* (2010) 99(2), 916–931.
39. Onoue, S.; Sato, H.; Ogawa, K.; Kawabata, Y.; Mizumoto, T.; Yuminoki, K.; Hashimoto, N.; Yamada, S.: Improved dissolution and pharmacokinetic behavior of cyclosporine A using high-energy amorphous solid dispersion approach. *Int. J. Pharm.* (2010), 399, 94–101.
40. Li, Y.Z.; Sun, X.; Gong, T.; Liu, J.; Zuo, J.; Zhang, Z.R.: Inhalable microparticles as carriers for pulmonary delivery of thymopentin-loaded solid lipid nanoparticles. *Pharm. Res.* (2010) 27, 1977–1986.
41. Nemati, E.; Mokhtarzadeh, A.; Panahi-Azar, V.; Mohammadi, A.; Hamishehkar, H.; Mesgari-Abbasi, M.; Ezzati Nazhad Dolatabadi, J.; de la Guardia, M.: Ethambutol-loaded solid lipid nanoparticles as dry powder inhalable formulation for tuberculosis therapy. *AAPS PharmSciTech.* (2019) 20, 1–9.

-
42. Ali, M.E.; Lamprecht, A.: Spray freeze drying as an alternative technique for lyophilization of polymeric and lipid-based nanoparticles. *Int. J. Pharm.* (2017) 516, 170–177.
 43. Freitas, C.; Müller, R.H.: Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLN). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1998) 46, 145–151.
 44. Freitas, C.; Müller, R.H.: Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1999) 47, 125–132.
 45. Martins, S.; Thon, I.; Ferreira, D.C.; Souto, E.B.; Brandl, M.: Physicochemical properties of lipid nanoparticles: effect of lipid and surfactant composition. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2011) 37, 815–824.
 46. Battaglia, L.; Gallarate, M.; Panciani, P.P.; Ugazio, E.; Sapino, S.; Peira, E.; Chirio, D.: Techniques for the preparation of solid lipid nano and microparticles. *Appl. Nanotechnol. Drug Deliv.* (2014), DOI: 10.5772/58405.
 47. Albertini, B.; Passerini, N.; González-Rodríguez, M.L.; Perissutti, B.; Rodriguez, L.: Effect of Aerosil on the properties of lipid controlled release microparticles. *J. Control. Release.* (2004) 100, 233–246.
 48. Santos, D.; Mauricio, A.C.; Sencadas, V.; Santos, J.D.; Fernandes, M.H.; Gomes, P.S.: Spray drying: an overview. *IntechOpen. Chapter* (2018) 2, 9–35.
 49. Gugu, T.H.; Chime, S.A.; Attama, A.A.: Solid lipid microparticles: An approach for improving oral bioavailability of aspirin. *Asian J. Pharm. Sci.* (2015) 10, 425–432.
 50. Andonova, V.; Peneva, P.: Characterization methods for solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC). *Curr. Pharm. Des.* (2018) 23, 6630–6642.
 51. Gordillo-Galeano, A.; Mora-Huertas, C.E.: Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2018) 133, 285–308.
 52. Liu, P.C. Christophersen, J.; Yang, M.; Nielsen, H.M.; Mu, H.: The impact of particle preparation methods and polymorphic stability of lipid excipients on protein distribution in microparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2017) 43, 2032–2042.
 53. Chinaeke, E.E.; Chime, S.A.; Onyishi, V.I.; Attama, A.A.; Okore, V.C.: Formulation development and evaluation of the anti-malaria properties of sustained release artesunate-loaded solid lipid microparticles based on phytolipid., *Drug Deliv.* (2015) 22, 652–665.
 54. Gavini, E.; Sanna, V.; Sharma, R.; Juliano, C.; Usai, M.; Marchetti, M.; Karlsen, J.; Giunchedi, P.: Solid lipid microparticles (SLM) containing juniper oil as anti-acne topical carriers: Preliminary studies. *Pharm. Dev. Technol.* (2005) 10, 479–487.
 55. Islam, N.; Irfan, M.; Zahoor, A.F.; Syed, H.K.; Khan, I.U.; Iqbal, M.S.; Rasul, A.; Abbas, N.; Hussain, A.; Mohsin, N.U.A.; Qayyum, M.A.; Arshad, M.S.; Inam, S.: Evaluation of solubility and dissolution of lamotrigine using lipid based microparticulate carriers: An *in-vitro* analysis. *Pak. J. Pharm. Sci.* (2020) 33, 299–306.

-
56. Boreham, A.; Volz, P.; Peters, D.; Keck, C.M.; Alexiev, U.: Determination of nanostructures and drug distribution in lipid nanoparticles by single molecule microscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2017) 110, 31–38.
57. Noack, A.; Hause, G.; Mäder, K.: Physicochemical characterization of curcuminoid-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* (2012) 423, 440–451.
58. da Silva, J.C.; Borrin, T.R.; Ruy, P.; Brito, T.C.; Pinheiro, A.C.; Vicente, A.A.; de Pinho, S.C.: Characterization, physicochemical stability, and evaluation of *in vitro* digestibility of solid lipid microparticles produced with palm kernel oil and tristearin *Food Sci. Technol.* (2014) 34, 532–538.
59. Hallan, S.S.; Kaur, P.; Kaur, V.; Mishra, N.; Vaidya, B.: Lipid polymer hybrid as emerging tool in nanocarriers for oral drug delivery. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* (2016) 44, 334–349.
60. <https://www.intertek.com/pharmaceutical/gmp-cmclaboratory/pharmaceutical-dissolution-testing/> [data dostępu 03.2024]
61. Zolnik, B.S.; Raton, J.-L.; Burgess, D.J.: Application of USP Apparatus 4 and *in situ* fiber optic analysis to microsphere release testing. *Dissolution Technol.* (2005) 12, 11–14.
62. Shen, J.; Burgess, D.J.: Accelerated *in-vitro* release testing methods for extended-release parenteral dosage forms. *J. Pharm. Pharmacol.* (2012) 64, 986–996.
63. Brown, C.K.; Friedel, H.D.; Barker, A.R.; Buhse, L.F.; Keitel, S.; Cecil, T.L.; Kraemer, J.; Morris, J.M.; Reppas, C.; Stickelmeyer, M.P.; et al. FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech* (2011) 12, 782–794.
64. Albertini, B.; Bertoni, S.; Perissutti, B.; Passerini, N.: An investigation into the release behavior of solid lipid microparticles in different simulated gastrointestinal fluids. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2018) 173, 276–285.
65. Agubata, C.O.; Nzekwe, I.T.; Attama, A.A.; Mueller-Goymann, C.C.; Onunkwo, G.C.: Formulation, characterization and anti-malarial activity of homolipid-based artemether microparticles. *Int. J. Pharm.* (2015) 478, 202–222.
66. Souto, E.B.; Wissing, S.A.; Barbosa, C.M.; Müller, R.H.: Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.* (2004) 278, 71–77.
67. <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/technical-documents/technicalarticle/protein-biology/protein-concentration-and-buffer-exchange/dialysis-tubing> [data dostępu 03.2024]
68. Xu, X.; Khan, M.A.; Burgess, D.J.: A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes. *Int. J. Pharm.* (2012) 426, 211–218.
69. Silva, A.; Amaral, M.H.; Gonzalez, E.; Santos, D.; Ferreira, D.: Solid lipid nanoparticles (SLN)-based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of risperidone: Preparation and characterization studies *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2012) 93, 241–248.
-

-
70. Cavalli, R.; Caputo, O.; Gasco, M.R.: Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2000) 10, 305–309.
71. Abbas, N.; Sarwar, K.; Irfan, M.; Hussain, A.; Mehmood, R.; Arshad, M.S.; Shah, P.A.: Formulation and evaluation of indomethacin loaded nanosponges for oral delivery. *Acta Poloniae Pharm. Drug Res.* (2018) 75, 1201–1213.
72. Comer, J.; Judge, S.; Matthews, D.; Towers, L.; Falcone, B.; Goodman, J.; Dearden, J.: The intrinsic aqueous solubility of indomethacin. *ADMET DMPK* (2014) 2, 18–32.
73. Satyanarayana, S.D.; Abu Lila, A.S.; Moin, A.; Moglad, E.H.; Khafagy, E.-S.; Alotaibi, H.F.; Obaidullah, A.J.; Charyulu, R.N.: Ocular delivery of bimatoprost-loaded solid lipid nanoparticles for effective management of glaucoma. *Pharmaceuticals* (2023) 16, 1001, 1–15.
74. Eid, H.M.; Elkomy, M.; El Menshawe, S.F.; Salem, H.: Development, optimization, and *in vitro/in vivo* characterization of enhanced lipid nanoparticles for ocular delivery of ofloxacin: The influence of pegylation and chitosan coating. *AAPS PharmSciTech* (2019) 20, 183, 1–14.
75. Khames, A.; Khaleel, M.; El-Badawy, M.F.; El-Nezhawy, A.O.H.: Natamycin solid lipid nanoparticles - sustained ocular delivery system of higher corneal penetration against deep fungal keratitis: Preparation and optimization. *Int. J. Nanomed.* (2019) 14, 2515–2531.
76. Khare, A.; Singh, I.; Pawar, P.; Grover, K.: Design and evaluation of voriconazole loaded solid lipid nanoparticles for ophthalmic application. *J. Drug Deliv.* (2016) ID 6590361, 1–11.
77. Christophersen, P.C.; Zhang, L.; Yang, M.; Nielsen, H.; Müllertz, A.; Mu, H.: Solid lipid particles for oral delivery of peptide and protein drugs I - elucidating the release mechanism of lysozyme during lipolysis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2013) 85, 473–480.
78. Dong, Y.; Hengst, L.; Hunt, R.; Feng, X.; Kozak, D.; Choi, S.; Ashraf, M.; Xu, X.: Evaluating drug distribution and release in ophthalmic emulsions: impact of release conditions. *J. Control. Release* (2020) 327, 360–370.
79. Ammar, H.O.; Salama, A.; Ghorab, M.; Mahmoud, A.A.: Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. *AAPS PharmSciTech* (2009) 10, 808–819.
80. The United States Pharmacopoeia Website. <https://www.usp.org/small-molecules/dissolution> [data dostępu 03.2024]
81. Tseng, R.C.; Chen, C.C.; Hsu, S.M.; Chuang, H.S.: Contact-lens biosensors. *Sensors* (2018) 18(8), 2651, 1–24.
82. Villatoro, A.J.; Fernández, V.; Claros, S.; Alcoholado, C.; Cifuentes, M.; Merayo-Llves, J.; Andrades, J.A.; Becerra, J.: Regenerative therapies in dry eye disease: From growth factors to cell therapy. *Int. J. Mol. Sci.* (2017) 18(11), 1–14.
83. Alexeev, V.; Das, S.; Finegold, D.; Asher, S.: Photonic crystal glucose-sensing material for noninvasive monitoring of glucose in tear fluid. *Clin. Chem.* (2005) 50, 2353–2360.
84. El-Sabbagh, H.; Ghanem, A.H.; Abdel-Alim, H.M.: Solubilization of indometacin. *Die Pharm.* (1978) 33, 529–531.
-

85. Tres, F.; Treacher, K.; Booth, J.; Hughes, L.P.; Wren, S.A.C.; Aylott, J.W.; Burley, J.C.: Indomethacin-Kollidon VA64 extrudates: A mechanistic study of pH-dependent controlled release. *Mol. Pharm.* (2016) 13, 1166–1175.
86. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP); Committee for Medicinal Products for Veterinary use (CVMP); Quality Working Party. Reflection paper on the dissolution specification for generic solid oral immediate release products with systemic; *European Medicines Agency*: Amsterdam, The Netherlands, (2017) p. 44.
87. Siepmann, J.; Siepmann, F.: Sink conditions do not guarantee the absence of saturation effects. *Int. J. Pharm.* (2020), 577(119009), 1–39.
88. Gao, Y.; Glennon, B.; He, Y.; Donnellan, P.: Dissolution kinetics of a BCS class II active pharmaceutical ingredient: diffusion-based model validation and prediction. *ACS Omega* (2021) 6, 8056–8067.
89. Torrent-Burgués, J.: Lysozyme influence on monolayers of individual and mixed lipids. *Coll. Interfaces* (2022) 6(15) 1–16.
90. Sigma-Aldrich. Product information, Lysozyme from chicken egg white, catalog number L7651. <https://www.sigmaaldrich.com> [data dostępu 03.2024]

4.4. Wkład w powstanie cyklu publikacji składających się na osiągnięcie

We wszystkich publikacjach prezentowanych w ramach osiągnięcia [H1-H6] jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Szczegółowy udział wszystkich Współautorów określający indywidualny wkład merytoryczny każdego z Nich w powstanie poszczególnych prac został przedstawiony w Załączniku 4 (pkt. I.2. Wkład współautorów w powstanie cyklu publikacji). Jest on opracowany i zgodny z deklaracją przyjętą i złożoną przez Autorów, która jest integralną częścią każdej publikacji – sekcja "Author Contributions" (poza H3, w której jestem jedynym autorem). Z powyższych powodów do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego nie dołączono powtórnych oświadczeń Współautorów publikacji. Jednocześnie sekcja "Author Contributions" zawarta w poszczególnych artykułach i stanowiąca podstawę zestawienia w załączniku 4 każdorazowo została opracowana zgodnie z kryteriami CRediT (*Contributor Roles Taxonomy*) kwalifikującymi do autorstwa. W publikacjach H4, H5 i H6 współautorami są magistrantki wykonujące prace magisterskie w Katedrze Farmacji Stosowanej GUMed przy współpracy ze mną, których promotorem była Profesor Małgorzata Sznitowska.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Pracę naukową rozpoczęłam 2007 roku pod kierunkiem Profesor Małgorzaty Sznitowskiej w Katedrze Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Jako pracownik naukowo-dydaktyczny na stanowisku asystenta realizowałam badania naukowe w ramach pracy doktorskiej, które dotyczyły przede wszystkim opracowania formułacji SLM optymalnej do podania cyklosporyny A do oka. Znaczną część tamtych doświadczeń obejmowały zagadnienia związane z możliwością i bezpieczeństwem stosowania dyspersji SLM do oka. Ze względu na brak tego rodzaju badań (dostępne prace, którymi się kierowano dotyczyły głównie SLN do podania do oka) przeprowadzono eksperymenty na królikach potwierdzające brak działania drażniącego i bezpieczeństwo stosowania do oka zarówno dyspersji SLM *placebo*, jak również z cyklosporyną A. Po uzyskaniu takich wyników w kolejnym etapie oceniano stężenia cyklosporyny w poszczególnych tkankach oka po wielokrotnej aplikacji w postaci SLM. Badania *in vivo* na zwierzętach prowadziłam przy współpracy z Katedrą i Kliniką Okulistyki Wydziału Lekarskiego oraz Zakładem Biofarmacji i Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Ten bardzo wartościowy okres badań zaowocował doświadczeniami nie tylko z zakresu przygotowywania wniosków do Komisji Etycznej, ale także możliwością rozwinięcia umiejętności i zasad pracy laboratoryjnej ze zwierzętami. Zebrane wyniki opisanych doświadczeń stanowiły podstawę rozprawy doktorskiej. W 2014 roku uzyskałam z wyróżnieniem tytuł doktora nauk farmaceutycznych nadany przez Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy doktorskiej była prof. dr hab. n. farm. M. Sznitowska.

Trudności napotkane w trakcie badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej nad stałymi mikrocząstkami lipidowymi, związane z charakterem SLM, jako nowoczesnej postaci leku, dla której brakuje nie tylko badań *in vivo*, ale także wytycznych regulacyjnych, farmakopealnych czy nawet wiedzy wynikającej z dotychczasowych doświadczeń i praktyk, stały się podstawą późniejszych badań mających przyczynić się do rozwoju tej lipidowej postaci leku, które częściowo zostały przedstawione w ramach prezentowanego osiągnięcia. Kontynuując podjętą tematykę rozpoczęto badania charakteryzujące właściwości SLM z różnymi substancjami leczniczymi.

W opisywanym okresie przed uzyskaniem stopnia doktora realizowałam między innymi w latach 2012-2014 zadanie badawcze (MN-01-0085/08) „*Badanie wchłaniania wybranych substancji leczniczych stosowanych w okulistyce przez rogówkę zwierząt doświadczalnych w zależności od użytego nośnika lipidowego*” finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, służące rozwojowi młodych naukowców. Kolejnym realizowanym projektem było w 2014 r. zadanie badawcze dofinansowane w

ramach dotacji i wsparcia działalności naukowej w zakresie realizacji nowych projektów badawczych dla Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zatytułowane „*Porównanie właściwości reologicznych nowoczesnych i tradycyjnych postaci leku do oka z cyklosporyną A*”.

Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora, z uwzględnieniem prac, na podstawie których powstała rozprawa doktorska, obejmuje 3 prace oryginalne o łącznej wartości współczynnika oddziaływania $IF = 7,937$ i punktacji MEiN = 104 (Załącznik 4). Wyniki prowadzonych przeze mnie badań przed doktoratem prezentowałam również w formie 17 doniesień na zjazdach i konferencjach naukowych o zasięgu krajowym (11) i międzynarodowym (6) (Załącznik 4).

5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Obroniona przeze mnie rozprawa doktorska została zgłoszona w 2015 roku przez Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego do II edycji ogólnopolskiego konkursu Lider Nauk Farmaceutycznych. Decyzją Komisji Konkursowej pod przewodnictwem prof. Janusza Pluty, prezesa Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, uzyskałam tytuł Lidera Nauk Farmaceutycznych za rozprawę doktorską. Poza zaszczytnym tytułem, nagrodą za I miejsce w konkursie był dla mnie trzymiesięczny staż naukowy w laboratoriach firmy farmaceutycznej Gedeon Richter, a dla Wydziału Farmaceutycznego złoty medal *Scientia nobilitat*. Czas spędzony w laboratoriach Pionu Rozwoju Produktu (Dział Analityczny, Dział Medyczny, Dział Rejestracji Leków, Oddział Półtechniki) pozwolił mi zdobyć wiedzę i praktyczne doświadczenie w zakresie badań rozwojowych, wdrożeniowych i *pharmacovigilance*.

Po zajęciu stanowiska adiunkta w grupie pracowników naukowo-dydaktycznych kontynuowałam badania nad właściwościami SLM, nie tylko w formie dyspersji, ale także proszku otrzymywanego metodą suszenia rozpyłowego. Moje zainteresowania naukowe obejmują także inne układy lipidowe, takie jak emulsje submikronowe czy oleje samoemulgujące (SEO). W zakresie tematu badań *in vivo* na królikach dotyczących układów samoemulgujących współpracowałam między innymi z Zakładem Farmacji Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Z tą samą jednostką współpracowałam również w zakresie badań nad postaciami leku z chitosanem. Badania z obszaru emulsji submikronowych i trwałości układów dyspersyjnych, takich jak SLM planuję rozwijać w przyszłości przy współpracy z Politechniką Gdańską.

W celu doskonalenia umiejętności związanych z pracą ze zwierzętami uczestniczyłam w dwóch tygodniowych kursach doskonalących: „*Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie*” oraz „*Szkolenie dla osób wykonujących procedury, uczestniczących w wykonywaniu procedur i sprawujących opiekę nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku*”

realizowanych zgodnie z programem określonym w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 2015 r. (Załącznik 4).

Po uzyskaniu stopnia doktora byłam wnioskodawcą, a w latach 2018-2019 kierownikiem i wykonawcą projektu naukowego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura-1 (NCN 2017/01/X/NZ7/01717). Zadania badawcze projektu pod tytułem „*Identyfikacja oddziaływań substancji czynnej z lipidem i ocena zmian jej dystrybucji w liposferach pod wpływem procesu suszenia rozpyłowego*” realizowane były między innymi we współpracy z laboratorium badawczym *Nanores* we Wrocławiu. Wyniki badań w zakresie powyższego grantu zostały opublikowane i opisane w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego, były również prezentowane na konferencjach (Załącznik 4).

W latach 2015-2016 oraz 2017-2018 realizowałam dwa projekty finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, służące rozwojowi młodych naukowców. Zarówno w pierwszym (MN-01-0181/08/510 „*Wpływ warunków technologicznych na dystrybucję substancji leczniczych w fazach dyspersji mikrosfer i nanosfer lipidowych*”), jak i w drugim zadaniu badawczym (MN-01-0306/08/510 „*Opracowanie i optymalizacja procesu liofilizacji i redispersji zawiesiny mikrosfer lipidowych SLM z wybranymi substancjami czynnymi*”) byłam kierownikiem i wykonawcą projektu.

Dzięki Europejskiemu Programowi Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych (COST, UNGAP) w 2018 r. miałam możliwość uczestniczyć w trzydniowych warsztatach poświęconych w całości lipidowym postaciom leku (część wykładowa i laboratoryjna) pt. *The fundamentals of formulating with functional lipid excipients for modulating drug release, increasing solubility, and enhancing bioavailability*, na Uniwersytecie w Kopenhadze, w Danii.

Z kolei w ramach sieci CEKA PharmTech programu CEEPUS wspierającego wymianę akademicką w zakresie kształcenia i doskonalenia zawodowego nauczycieli akademickich uczestniczyłam w miesięcznym stażu zagranicznym (2022) na Uniwersytecie w Szeged, Węgry. (CEEPUS Mobility grant no.: CIII-RS-1113-05-2122-M-152952). Podczas pobytu w Instytucie Technologii Farmaceutycznej (Institute of Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs) Uniwersytetu w Szeged kontynuowałam, między innymi, nawiązaną wcześniej współpracę z prof. Geza Regdonem jr. w zakresie analizy termogravimetrycznej (DSC/TG). Wyniki tej współpracy i powstała na ich podstawie publikacja są także częścią zgłaszanego osiągnięcia.

W 2023 r. uczestniczyłam również w 2-tygodniowym zagranicznym stażu dydaktycznym na Uniwersytecie degli Studi di Bari Aldo Moro, Dipartimento di Farmacia, w Bari, Włochy, który odbywał się w ramach projektu *Wielomodułowy program poprawy efektywności i jakości funkcjonowania Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego* współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020.

Realizacja wymienionych projektów oraz praca badawcza samodzielna i prowadzona we współpracy z wymienionymi ośrodkami została przedstawiona w cyklu 6 prac wchodzących w zakres tematyki mojego postępowania habilitacyjnego [H1-H6], a także w innych pracach, wymienionych poniżej, z mojego dorobku naukowo-badawczego (patrz też Załącznik 4):

Lista publikacji spoza cyklu prac zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego:

Wolska Eliza; Sznitowska Małgorzata; Chorażewicz Juliusz; Krzemińska Katarzyna; Szerkus Oliwia; Radwańska Aleksandra; Markuszewski Michał Jan; Kaliszan Roman; Raczyńska Krystyna; *Microscopic and biopharmaceutical evaluation of emulsion and self-emulsifying oil with cyclosporine*. Pharmaceuticals (2023) vol. 16, nr 12, 1–14.

Impact Factor: 4,6 punktacja MEiN: 140

Potaś Joanna; Szymańska Emilia; Wróblewska Magdalena; Kurowska Izabela; Maciejczyk Mateusz; Basa Anna; **Wolska Eliza**; Wilczewska Zofia; Winnicka Katarzyna; *Multilayer films based on chitosan/pectin polyelectrolyte complexes as novel platforms for buccal administration of clotrimazole*. Pharmaceutics (2021) vol. 13, nr 10, 1–23.

Impact Factor: 6,525 punktacja MEiN: 100

Wolska Eliza; Sznitowska Małgorzata; Chorażewicz Juliusz; Szerkus Oliwia; Radwańska Aleksandra; Markuszewski Michał Jan; Kaliszan Roman; Raczyńska Krystyna; *Ocular irritation and cyclosporine A distribution in the eye tissues after administration of Solid Lipid Microparticles in the rabbit model*. Eur. J. Pharm. Sci. (2018) vol. 121, 95–105

Impact Factor: 3,532 punktacja MEiN: 35

Sznitowska Małgorzata; **Wolska Eliza**; Barańska Helena; Cal Krzysztof; Pietkiewicz Justyna; *The effect of a lipid composition and a surfactant on the characteristics of the solid lipid microspheres and nanospheres (SLM and SLN)*. Eur. J. Pharm. Biopharm. (2017) vol. 110, 24–30.

Impact Factor: 4,491 punktacja MEiN: 40

Wolska Eliza; Kluk Anna; Zarazińska Magda; Boniecka Magdalena; Sznitowska Małgorzata; *Choice of excipients for gelly-like pulp prepared ex tempore "on a spoon"- "placebo" and with sartans*. Drug Dev. Ind. Pharm. (2016) vol. 42, nr 6, 998–1007.

Impact Factor: 2,295 punktacja MEiN: 25

Poza publikacjami naukowymi wchodzącymi w zakres prezentowanego osiągnięcia i pozostałymi publikacjami rezultatem prowadzonych przez mnie badań są także liczne doniesienia konferencyjne (łącznie 10 po uzyskaniu stopnia doktora), w tym konferencje naukowe o zasięgu krajowym (5) i międzynarodowym (5) (szczegóły w Załączniku 4).

Mój dorobek naukowy w okresie po uzyskaniu stopnia doktora (z wyłączeniem publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego IF = 30,283 / MEiN = 610) obejmuje 9 prac naukowych: 5 oryginalnych i 4 podglądowe o łącznej punktacji IF = 21,443 / MEiN = 573. W momencie składania wniosku łącznie mój dorobek naukowy obejmuje prace o współczynniku oddziaływania IF = 59,663 / MEiN = 1287. Szczegółowe dane przedstawiono w załączonym opracowaniu bibliograficznym przygotowanym przez Bibliotekę Główną Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Poza realizacją projektów i zadań badawczych, zarówno przed, jak i po uzyskaniu stopnia doktora, byłam także zaangażowana we współpracę z firmami reprezentującymi przemysł farmaceutyczny i kosmetyczny (szczegóły patrz Załącznik 4).

Jestem recenzentem 25 manuskryptów dla następujących czasopism naukowych: *Acta Poloniae Pharmaceutica, Pharmaceutics, Pharmaceuticals, International Journal of Molecular Sciences, Diagnostics, Applied Sciences, Coatings, Molecules, Foods, Fermentation, Chemosensors, Processes.*

Poza wyżej wymienionymi w zakresie doskonalenia naukowego odbyłam szereg szkoleń i kursów, zarówno krajowych, jak i zagranicznych, przydatnych w planowaniu eksperymentów, prowadzeniu badań i rzetelnej ocenie uzyskiwanych danych. Na przykład: szkolenie z Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP) i Systemu zapewnienia jakości w chemiczno-technologicznym laboratorium badawczym prowadzone przez firmę PewniK, szkolenie statystyczne z programu Statistica Zestaw Farmaceutyczny, firma StatSoft.

W zakresie doskonalenia zawodowego uczestniczę w kursach prowadzonych w ramach szkolenia ciągłego farmaceutów zgodnie z aktualnym rozporządzeniem Ministra Zdrowia z 20 lutego 2018. Ponadto uczestniczę w zebraniach naukowo-szkoleniowych przydatnych w pracy zawodowej nauczyciela akademickiego, organizowanych między innymi przez Gdańską Okręgową Izbę Aptekarską czy Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. Przykładowe kursy i szkolenia to organizowana cyklicznie Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa z zakresu prowadzenia opieki farmaceutycznej, czy późniejsze Nauczanie Opieki Farmaceutycznej w świetle ustawy o zawodzie farmaceuty współorganizowane przez Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum w Krakowie, PTFarm oraz Uniwersytet Medyczny w Lublinie. Coroczne konferencje pt. Gdańskie Dni Cukrzycy i Nadciśnienia Tętniczego, Szkolenie z aktualizacji zaleceń Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego, Postępy w farmakoterapii wybranych chorób przewodu pokarmowego czy skuteczności leków przeciwbólowych.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Działalność dydaktyczna

Od momentu zatrudnienia w Katedrze Farmacji Stosowanej aktywnie uczestniczę w działalności dydaktycznej prowadząc ćwiczenia, seminaria i wykłady ze studentami różnych lat i kierunków:

kierunek Farmacja

- Technologia Postaci Leku I – Receptura apteczna, ćwiczenia laboratoryjne, III rok
- Technologia Postaci Leku II, ćwiczenia laboratoryjne, IV rok
- Technologia Postaci Leku III, ćwiczenia laboratoryjne, V rok
- Szkolenie Apteczne, ćwiczenia, III rok
- Farmacja praktyczna z opieką farmaceutyczną, ćwiczenia, seminaria, V rok
- Technologia Postaci Leku III, wykład (Niezgodności recepturowe), V rok
- Fakultety, seminaria (Opieka farm. nad pacjentem z chorobą wrzodową), V rok
- Fakultety, ćwiczenia (Receptura leków dermatologicznych), IV rok

kierunek Przemysł Farmaceutyczny i Kosmetyczny

- Technologia Formulacyjna, ćwiczenia laboratoryjne (emulsje), I rok
- Technologia Formulacyjna, ćwiczenia laboratoryjne (leki do oczu, SOPy), II rok

kierunek Master of Pharmacy (English Division)

- Pharmaceutical Technology II, ćwiczenia laboratoryjne, IV rok
- Pharmaceutical Technology III, ćwiczenia laboratoryjne, V rok

W ramach współpracy ze Studium Kształcenia Podyplomowego na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego prowadzę zajęcia (ćwiczenia, seminaria i wykłady) z zakresu kształcenie podyplomowego dla:

- Specjalizacji z Farmacji Aptecznej
- Specjalizacji z Farmacji Szpitalnej
- Studiów Podyplomowych „Farmacja Przemysłowa”

W latach 2008-2024 była opiekunem 18 prac magisterskich (w tym 1 praca na kierunku English Division) wykonywanych przez studentów Wydziału Farmaceutycznego w Katedrze Farmacji Stosowanej, których promotorem była prof. Małgorzata Sznitowska.

Uczestniczyłam w opracowywaniu nowego wydania skryptu obejmującego zagadnienia receptury aptecznej dla studentów III roku Kierunku Farmacja. Skrypt ten od 2018 r. jest corocznie aktualizowany. Współpracowałam również przy przygotowaniu wybranych rozdziałów aktualnej wersji podręcznika Farmacja Stosowana: technologia postaci leku, jak również wybranych monografii Farmakopei Polskiej IX.

- [1] Gajewska Monika; Sznitowska Małgorzata. **Podstawy receptury aptecznej: materiały do ćwiczeń dla studentów farmacji.** zespół aut.: Hanna Bartyłak, Agnieszka Chodkowska, Monika Gajewska, Joanna Karolewska-Szalbierz, Maciej Małecki, Danuta Partyka, Marcin Płaczek, Elżbieta Rutkowska, Małgorzata Sznitowska, Janina Szulc, Katarzyna Winnicka, **Eliza Wolska**. Pod Red. Moniki Gajewskiej i Małgorzaty Sznitowskiej. Warszawa: *Fundacja Pro Pharmacia Futura* (2024).
- [2] **Wolska Eliza**; Gajewska Monika; Trofimiuk Monika; Sznitowska Małgorzata. Przetwory roślinne i postacie leków roślinnych; red. nauk. Małgorzata Sznitowska; **Farmacja stosowana: technologia postaci leku**; Warszawa: *PZWL Wydawnictwo Lekarskie* (2017): 495–530.
- [3] Sznitowska Małgorzata; **Wolska Eliza**; Płaczek Marcin; Pietkiewicz Justyna; Turk Magdalena; Kluk Anna; Cal Krzysztof; Gajewska Monika; Sołohub Krzysztof. Substancje pomocnicze; red. nauk. M. Sznitowska; **Farmacja stosowana: technologia postaci leku**; Warszawa: *PZWL Wydawnictwo Lekarskie* (2017) 881-930.

6.2. Działalność organizacyjna

Od roku 2008 jestem **opiekunem z ramienia Uczelni nadzorującym przebieg sześciomiesięcznej praktyki zawodowej studentów VI roku kierunku Farmacja Wydziału Farmaceutycznego**.

Od roku 2008 jestem **opiekunem z ramienia Uczelni nadzorującym przebieg miesięcznej praktyki zawodowej studentów III roku kierunku Farmacja w aptekach ogólnodostępnych i studentów IV roku kierunku Farmacja w aptekach szpitalnych**.

Od roku 2017 sprawuję **funkcję zastępcy opiekuna studentów III roku kierunku Farmacja na wydziale Farmaceutycznym**.

Od roku 2018 odpowiadam za **organizację zajęć i plan ćwiczeń z receptury aptecznej (TPL I, III rok Farmacji)**, jak również za **organizację i przebieg egzaminu praktycznego z Receptury aptecznej (TPL III, V rok Farmacji) w Katedrze Farmacji Stosowanej**.

W 2008 r. zostałam członkiem Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, a od 2013 r. jestem członkiem Zarządu Gdańskiego Oddziału PTFarm i pełnię funkcję skarbnika oddziału. Współpracuję również przy opiece i organizacji zbiorów Izby Muzealnej Gdańskiego Oddziału PTFarm. Jestem członkiem Ogólnopolskiej Sekcji Opieki Farmaceutycznej Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego.

Jestem członkiem Kolegium Elektorów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego na kadencję 2024-2028.

6.3. Działalność popularyzująca naukę

Współautorstwo publikacji popularno-naukowych dotyczących między innymi zagadnień z receptury aptecznej. Artykuły publikowane na przykład w czasopiśmie *Farmacja Polska* dedykowanym farmaceutom pracującym w aptekach miały na celu dostarczanie czytelnikom rzetelnej informacji z zakresu technologii postaci leku i rozpowszechnianie praktycznej wiedzy z dziedziny farmacji.

Wolska Eliza; Kupiec Agata. Rozwiązania zapewniające lepszą tolerancję i skuteczniejszą aplikację kropli do oczu. Solutions for better tolerance and more effective application of eye drops. *Farm. Pol.* (2021) 77(9).

Wolska Eliza; Gajewska Monika; Sznitowska Małgorzata. Trudności w sporządzaniu recepturowych kropli do oczu z cyklosporyną A. Problems in pharmaceutical compounding of eye-drops with cyclosporine A. *Farm. Pol.* (2019) 75(11).

Wolska Eliza; Łukasz Katarzyna. Liofilizacja różnych postaci leku i znaczenie krioprotektantów. *Świat Przem. Farm.* (2017) 2.

Wolska Eliza; Boniecka Magdalena; Sznitowska Małgorzata. Superdezintegranty: substancje pomocnicze w suplementach diety w postaci tabletek. Superdisintegrants: excipients in dietary supplements in the form of tablets. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* (2016) 23.

Prowadzenie zajęć (ćwiczenia, wykłady) i udział w organizowaniu wydarzeń o charakterze konferencji, kursów czy szkoły letniej dla przedstawicieli uczelni i przemysłu, zarówno z kraju jak i z zagranicy:

- w ramach współpracy z zakładami farmaceutycznymi Polpharma kurs dla przedstawicieli nauki i przemysłu z Kazachstanu (2013),
- szkolenie: *Topical, liquid and semisolid preparations: excipients, technology, analysis training course*, organizowane dla przedstawicieli firmy IMCD (2019)

- Szkoła Letnia Technologii Farmaceutycznej dla przedstawicieli uczelni i przemysłu farmaceutycznego z Polski (2007-2019)

Prowadzenie wykładów i seminariów (2019-2020) dla uczestników Uniwersytetu Trzeciego Wieku w ramach projektu „Uruchomienie Uniwersytetu Trzeciego Wieku w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym” współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

7.1. Nagrody i wyróżnienia za działalność naukową i dydaktyczną

Jestem laureatem **zespolowej nagrody dydaktycznej** dla nauczycieli akademickich w konkursie „Nowoczesna edukacja w GUMed” za stosowanie aktywizujących metod w nauczaniu przedmiotu „Farmacja praktyczna w aptece” (2022).

Otrzymałam **zespolową nagrodę organizacyjną II stopnia** Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za organizację nauczania w ramach 23 przedmiotów na kierunku Farmacja oraz kierunku Przemysł Farmaceutyczny i Kosmetyczny (2021).

Zajęłam **I miejsce** w drugiej edycji (2015) ogólnopolskiego konkursu **Lider Nauk Farmaceutycznych**, uzyskując tytuł Lidera Nauk Farmaceutycznych za rozprawę doktorską, a w nagrodę uzyskałam możliwość odbycia trzymiesięcznego stażu naukowego w laboratoriach firmy farmaceutycznej Gedeon Richter.


dr n. farm. Eliza Wolska

.....
(podpis wnioskodawcy)