

**НАРАТИВЕН ИЗВЕШТАЈ
ЗА НАУЧНОИСТРАЖУВАЧКИ ПРОЕКТ**

финансиран од интегративните средства на Универзитетот

Единица на УКИМ – носител на проектот	Фармацевтски факултет
Наслов на проектот	<i>In vitro</i> испитувања на ефикасност и безбедност на микропартикулиран систем-носач на биоактивни компоненти од природно потекло за третман на хронични рани
Акроним	МИКРОЕФИРА
Клучни зборови	Хронични рани, природни суровини, микрочестички, антиинфламаторен ефект, антиоксидативно дејство, регенерирачко дејство, биокомпатибилност
Научноистражувачко подрачје	Медицински науки и здравство
Научноистражувачко поле	Медицинска технологија, Фармацевтска технологија
Поднесок по конкурс (бр./датум)	02-1160/4 од 23.11.2021
Период на реализација (од - до)	12 месеци 2021/2022
Одлука за прифаќање на извештај од ННС/НС (бр./датум)	02-89/4 од 1.02.2023 г.
Главен истражувач (име и презиме, звање, потпис)	Марија Главаш Додов, Проф. Д-р

Скопје, 16.01.2023 година

Декан

Проф. Д-р Зоран Стерјев



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

Врз основа на член 55 од Статутот на Фармацевтски факултет Скопје во состав на Универзитетот „Св.Кирил и Методиј“ Скопје (Универзитетски гласник бр.459/2019) и Конкурсот за доделување средства за финансирање на научноистражувачки проекти, Наставно-научниот совет на својата X-та седница одржана на 1.2.2023 година ја донесе следнава

ОДЛУКА

за прифаќање на завршен извештај на научноистражувачки проект

1. Фармацевтски факултет во Скопје во состав на Универзитетот „Св.Кирил и Методиј“ Скопје, го прифати завршниот извештај на научноистражувачки проект со наслов: „In vitro испитувања на ефикасност и безбедност на микропартикулиран систем-носач на биоактивни компоненти од природно потекло за третман на хронични рани“ главен истражувач проф. д-р, по објавен конкурс на Универзитетот „Св.Кирил и Методиј“ Скопје

Раководител на проектот д-р Марија Главаш Додов, редовен професор.

2. Составен дел на одлуката е завршниот извештај за реализација на проектот.

3. Одлуката влегува во сила со денот на донесувањето.

Образложение

Согласно на насоките и критериумите определени во Конкурсот за доделување средства за финансирање на научноистражувачки проекти, реализација на проектот и доставениот завршен извештај, Наставно-научниот совет се одлучи како во диспозитивот на одлуката.

Доставено до:

- УКИМ
- проф. д-р М.Г.Додов
- сметководство
- архива

Декан

Проф. д-р Зоран Стерјев



Изготвил: Д. Анческа

Учесници во реализацијата на проектот

Главен истражувач	Проф. Д-р Марија Главаш Додов, Фармацевтски факултет
Членови на истражувачкиот тим	
Истражувач	Проф. Д-р Катерина Горачинова, Фармацевтски факултет
Истражувач	Проф. Д-р Кристина Младеновска, Фармацевтски факултет
Истражувач	Проф. Д-р Рената Славеска Раички, Фармацевтски факултет
Истражувач	Проф. Д-р Маја Симоноска Црцаревска, Фармацевтски факултет
Истражувач	Проф. Д-р Никола Гешковски, Фармацевтски факултет
Истражувач	Проф. Д-р Радмил Поленаковиќ, Машински факултет
Истражувач	Доц. Д-р Трајче Велковски, Машински факултет
Млад истражувач	ас. М-р Љубица Михаилова, Фармацевтски факултет
Млад истражувач	ас. М-р Душко Шалабалија, Фармацевтски факултет
Млад истражувач	Студент Филип Горачинов, Фармацевтски факултет
Млад истражувач	Студент Теодора Тасевска, Фармацевтски факултет

Резиме на остварените резултати

Со примена на спреј-сушење и дефинирани процесни параметри добиени беа составните компоненти на МС (сув прашок од слуз од градинарски полжав и суви екстракти од кантарион и невен). Дополнително, како суровина беше користено 20% комерцијално масло од канабис. Физичко-хемиската карактеризација на прашкастата слуз од полжав укажа на присуство на честички со големина од~ 4,7 μm ,

со вредности за SPAN факторот од 1,46, површинска наелектризираност во дестилирана вода од \sim -2,3 mV и во вештачки ексудат за рани од \sim 0,07 mV, како и содржина од 83,5% на вкупни протеини, што оди во прилог на потенцијалот за ефикасен третман на хронични рани. МС беше карактеризирана од аспект на содржината на вкупни феноли и флавоноид, имајќи ја во предвид значајноста во процесот на заздравување на раните поради анти-оксидативните, анти-инфламаторните и антимицробните својства.

Со користење на спреј-сушење подготвени беа вкргено-поврзани цитозан-TRP микрочестички со инкорпорирана МС. Подготвени беа три различни формулации на микрочестички со различна количина на инкорпорираните компоненти. Истите беа стерилизирани со примена на гама зраци во јачина од 25 kGy. По стерилизацијата, согласно микробиолошкиот квалитет, подготвените формулации одговараат на Ph. Eur. методот за стерилност и оттука се соодветни за третман на отворени рани. Подготвените формулации на микрочестички се карактеризираа со сферична форма и големина од \sim 5,9 μ m, со тесна, унимодална дистрибуција (Span факторот од 1,26 до 2). Во однос на површинската наелектризираност, различните формулации се карактеризираа со негативна површинска наелектризираност во дестилирана вода и во вештачки ексудат за рани. Содржината на вкупни протеини во цитозанските микрочестички се движеше од \sim 18,2 до 20,6% на протеини во 100 mg микрочестички. Содржината на вкупните феноли и флавоноиди во микрочестичките изнесуваше од 0,299 до 0,45 mg за феноли и од 0,157 до 0,743 \pm 0,02 mg за флавоноиди во 100 mg микрочестички, соодветно. Подготвените формулации покажаа сигнификантен степен на бабрење, но и значајно антиоксидативно дејство во споредба со празните микрочестички, што јасно укажува на дејството на МС енкапсулирана во микрочестичките и потенцијалот на нејзиното терапевтско дејство. *In vitro* испитувањата на клеточни култури укажаа дека дизајнираните формулации не се цитотоксични, а студиите на биоатхеизија покажаа дека сите формулации успешно се интернализираат во кератиноцитите и фибробластите. Дополнително, испитувањето на регенеративното дејство (Scratch assay) покажа дека и двете клеточни линии третирани со било која од трите формулации резултираа со поголем % на заздравување во однос на нетретираниите клетки.

Посебен сегмент во истражувањата беше фокусиран на анализа на можностите за комерцијализација на добиените резултати од проектот. При тоа, беше направена анализа на пазарот на меѓународно и домашно ниво за производи кои се користат за лекување на рани и за козметичка употреба (на база на микрочестички од природни суровини) и дадени се сугестии за користење на интегриран модел за комерцијализација на ваков вид на производи кој би можел да се користи во понатамшни активности за развој на ваков вид на технологија.

Abstract

By applying the spray-drying method and with defined process parameters, the constituent components of MS were obtained, i.e. dry powder of garden snail mucus and dry extracts of St. John's wort and calend. Additionally, 20% commercial cannabis oil was used as raw material. Physicochemical characterization of powdered snail mucus indicated the presence of particles with a size of 4.7 μ m, with SPAN factor values of 1.46, a surface charge in distilled water of \sim -2.3 mV and in artificial exudate for wounds of \sim 0.07 mV, as well as a content of 83.5% total protein, which supports the potential for effective treatment of chronic wounds. Plant extracts and cannabis

oil (MS) were characterized in terms of total phenolic and flavonoid content, considering their importance in the wound healing process due to their anti-oxidative, anti-inflammatory and antimicrobial properties. Using the spray-drying method, cross-linked chitosan-TPP microparticles with incorporated MS were prepared. Three different formulations of microparticles with different amounts of incorporated components were prepared. They were sterilized by applying gamma rays at a strength of 25 kGy. After sterilization, according to the microbiological quality, the prepared formulations correspond to Ph. Eur. sterility method and hence are suitable for the treatment of open wounds. The prepared microparticle formulations were characterized by a spherical shape and a size of $\sim 5.9 \mu\text{m}$, with a narrow, unimodal distribution (Span factor of 1.26 to 2). Regarding the surface charge, the different formulations were characterized by negative surface charge values in distilled water and in artificial wound exudate. The total protein content of chitosan microparticles ranged from ~ 18.2 to 20.6% protein in 100 mg of microparticles. The content of total phenols and flavonoids in the microparticles ranged from 0.299 to 0.45 mg for phenols and from 0.157 to 0.743 ± 0.02 mg for flavonoids in 100 mg of microparticles, respectively. The prepared formulations showed a significant degree of swelling, but also a significant antioxidant effect compared to the empty microparticles, which clearly indicates the action of MS encapsulated in microparticles and the potential of its therapeutic effect. In vitro cell culture studies indicated that the designed formulations were not cytotoxic, and bioadhesion studies showed that all formulations were successfully internalized into keratinocytes and fibroblasts. In addition, the examination of the regenerative effect (Scratch assay) showed that both cell lines treated with any of the three formulations gave a higher % of healing compared to untreated cells. An analysis of the international and domestic market was made for products used for wound healing and cosmetic use (based on microparticles from natural raw materials) and suggestions were given for the use of an integrated model for the commercialization of this type of products that could be used in further activities for the development of this type of technology.

Цели на истражувањето предвидени со проектот:

Цел 1. Изработка и карактеризација на стерилни микрочестички со енкапсулирана мултикомпонентна смеса-МС.

- Процесирање, производство и стерилизација на спреј-сушени микрочестички со енкапсулирана мултикомпонентна смеса-МС (прашок од слуз од полжав и спреј-сушени растителни екстракти (невен-*Calendula officinalis* или кантарион - *Hypericum perforatum* или канабис - *Cannabis sativa*)) и нивна фицичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација
- Анализа на пазар и бази на патентни податоци за слични производи

Цел 2. *In vitro* испитувања на ефикасност и безбедност на стерилни микрочестички со вградена МС преку определување на антиоксидативно дејство, утврдување на антиинфламаторна и на регенеративна активност и испитувања на биокомпатибилност и цитотоксичност на фибробласти во насока на избор на оптимална формулација

Гантограм на реализирани активности:

Цели / активности	Временска рамка за реализација на проектот (месеци)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Цел 1 Изработка и карактеризација на стерилни микрочестички со енкапсулирана МХС													P1
Активност 1.1 - Производство на микрочестички со енкапсулирана МХС													
Активност 1.2 - Стерилизација и испитување на стерилност на микрочестички со енкапсулирана МХС													
Активност 1.3 - Карактеризација на микрочестички со енкапсулирана МХС (физичко-хемика и биофармацевтска)					И1								
Активност 1.4 - Анализа на пазар и бази на патентни податоци за слични производи и дефинирање на методологија за комерцијализација и добивање на финален производ													И2
Цел 2 <i>In vitro</i> ефикасност и безбедност на оптимални микрочестички со вградена МХС													P2
Активност 2.1 - Испитување на антиоксидативно дејство (со соодветни методи, <i>in vitro</i> тестови)													
Активност 2.2 - Утврдување на антиинфламаторна и на регенеративна активност (со примена на најчесто користените тестови на избрани клетки, фибробласти и/или кератиноцити)													
Активност 2.3 - Испитување на биокомпатибилност и цитотоксичност на фибробласти													И3

1. *И – исполнет индикатор
2. *Р – испорачан резултат

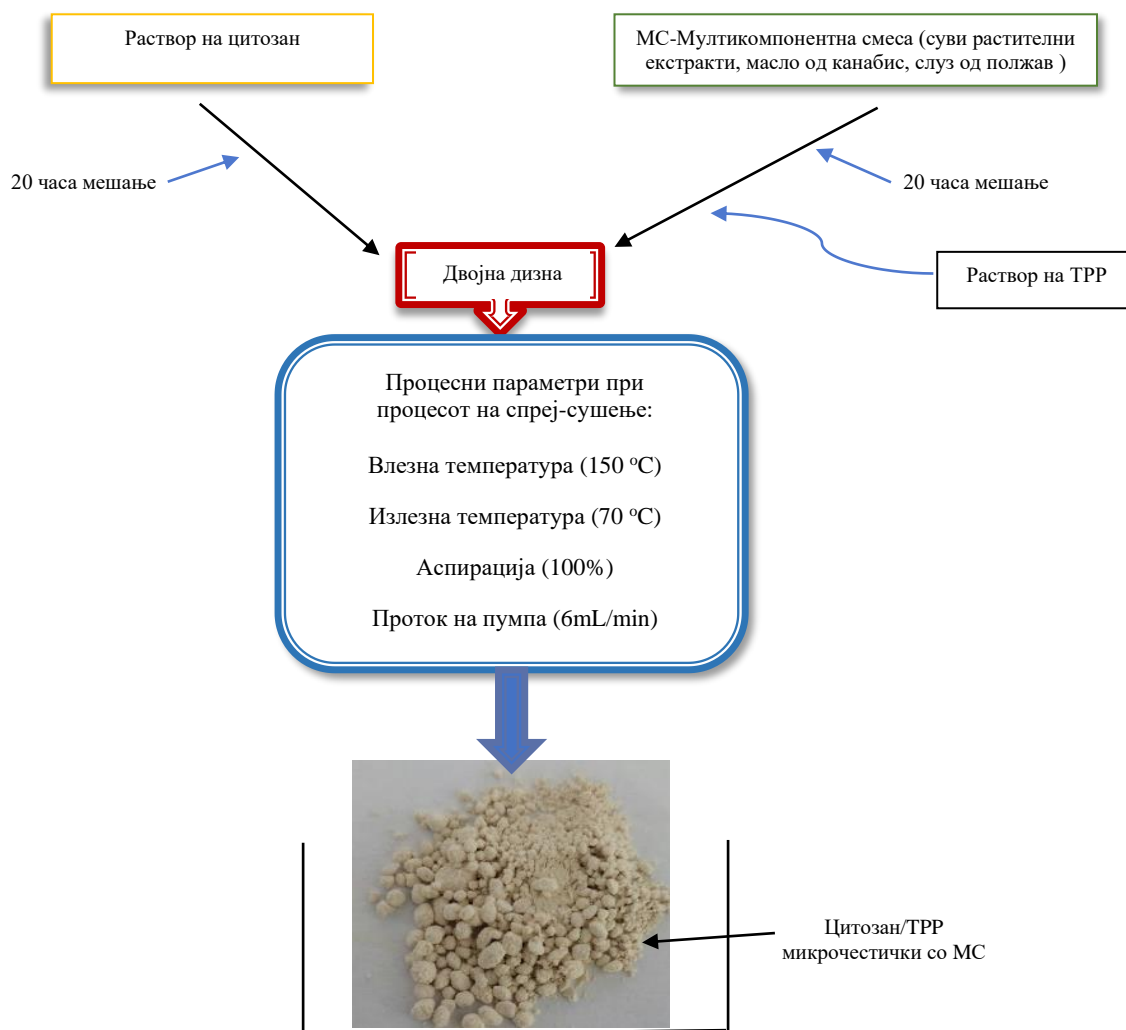
Детален осврт на реализацијата на истражувањето и остварените резултати

Формулација и производство на микрочестички со МС

Со метод на спреј-сушење беа подготвени сув прашок од слуз од градинарски полжави, суви екстракти од невен и кантарион, како и цитозански микрочестици со ТРР со вградени мултикомпонентна смеса (МС) од добиените природни суровини.

Дополнително, во МС како суровина беше користен 20% комерцијално масло од канабис..

На Слика 1 даден е шематски приказ на изработката на микрочестичките со енкапсулирана МС.



Слика 1. Шематски приказ на постапка на изработка на микрочестичките со МС.

За истражувањата, беа подготвени три различни формулации на микрочестички (примероци Ф1-Ф3) со примена на техниката на сушење со распрснување (Buchii Mini Spray dryer B-290).

Формулациите беа подготвени од 2 g прашок од слуз од полжави и различни количини од исушени екстракти. Како cross-linker беше користен натриум триполифосфат (ТРР). Соодносот на количините на растителните сировини во сите формулации секогаш изнесуваше 2:2:1 (исушен етанолен екстракт од *H. perforatum* : *C. officinalis* : масло од канабис), но вкупната количина на растителните сировини се зголемуваше со секоја формулација. Имено, Формулација 1 содржи 0,01 g масло од канабис, 0,02 g сув етанолен екстракт од *H. perforatum* и 0,02 g сув етанолен екстракт од *C. officinalis*; Формулација 2 содржи 0,015 g масло од канабис, 0,03 g сув етанолен екстракт од *H. perforatum* и 0,03 g сув етанолен екстракт од *C. officinalis* и Формулација 3 содржи 0,02 g масло од канабис, 0,04 g сув етанолен екстракт од *H. perforatum* и 0,04 g сув етанолен екстракт од *C. Officinalis*. Растителните сировини и слузта беа растворени во 25 mL вода во тек на 20 часа, а истовремено беше подготвен и раствор од 0,5 g цитозан во 50 mL 1% глацијална оетна киселина. По 20 часа, на смесата од растителни сировини и слуз беше додаден раствор на ТРР (1,5 g ТРР растворен во 25 mL дестилирана вода). Процесот на спреј-сушење беше извршен така што смесата од екстракти, слуз и ТРР поминуваше низ едниот канал на двојната диза, додека цитозанскиот раствор беше пропуштен низ надворешната диза со иста брзина, со што беа формирани соодветни микрочестички.

Покрај овие три формулации беа подготвени и празни микрочестички со цел да се користат за споредба во испитувањата на антиоксидативниот потенцијал и др. испитувања на клеточни култури. Празните микрочестички се формулираа со подготовка на раствор на 0,5 g цитозан во 50 mL 1% глацијална оетна киселина и 1,5 g ТРР во 50 mL дестилирана вода. Потоа, растворите беа сушени со распрснување низ двојна диза на 150 °C, со брзина на проток од 6 mL/min.

Стерилизација на подготвените микрочестички со МС

Стерилизацијата на микрочестиците беше извршена со примена на гама зраци во јачина од 25 kGy, како што е пропишано во Европската Фармакопеја (Ph. Eur 5.1.1).

За таа цел, микробиолошкиот квалитет на микрочестиците беше евалуиран пред и по нивната стерилизација, според критериумите за прифатливост на Европската фармакопеја за микробиолошки квалитет на нестерилни фармацевтски препарати и супстанции за фармацевтска употреба (Ph. Eur. 5.1.4). Стерилизираните микрочестици беа евалуирани според Ph. Eur. 04/2011:20601 монографијата за стерилност. Покрај микробиолошкиот квалитет на микрочестиците, беше испитуван и микробиолошкиот квалитет на слуз од полжави како нестерилна супстанција за фармацевтска употреба. Резултатите од определувањето на микробиолошкиот квалитет на слузта од полжави се прикажани во Табела 1. Во примерокот од слуз беше пронајдено макроскопско и микроскопско присуство на грам позитивни бацили со и без спора (*Bacillus spp.*) во соодветните граници пропишани од Европската фармакопеја, што значи дека слузта одговара на барањата за микробиолошки квалитет на нестерилни фармацевтски препарати и супстанции за фармацевтска употреба.

Табела 1. Резултати од испитување на микробиолошки квалитет на слуз од полжави

Параметар	Спецификација	Резултат
Вкупен број на аеробни микроорганизми – ТАМС	$\leq 10^3$ CFU/g	1000 CFU/g
Вкупен број на габи и мувли – ТУМС	$\leq 10^3$ CFU/g	40 CFU/g
<i>Candida albicans</i>	Отсутна/0.1 g	Одговара
<i>Staphylococcus aureus</i>	Отсутна/0.1 g	Одговара
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Отсутна/0.1 g	Одговара

Резултатите од определувањето на микробиолошкиот квалитет на стерилизираните микрочестици покажаа дека микрочестиците одговараат на монографијата за стерилност на Европската фармакопеја (Ph. Eur. 04/2011:20601 “Sterility”) со што истите се соодветни за третман на хронични, отворени рани.

Карактеризација на МС

Карактеризација на сув прашок од слуз од полжав

Сувиот прашок од слуз од полжави беше добиен од свежо екстрахирана слуз од градинарски полжави. При тоа, од 1000 mL течна слуз од полжави беа добиени ~2 g на сув прашок. Истиот претставува жолтеникав прашок со специфичен мирис.

Определувањето на големината на честичките на добиениот прашок (техника на ласерска дифрактометрија) покажа дека средниот дијаметар на честичките на прашкастата слуз изнесува $4,691 \pm 0,01 \mu\text{m}$, со вредности за SPAN факторот од 1,46, што укажува на тесна и унимодална дистрибуција на честичките според големина.

Прашокот беше карактеризиран и од аспект на вкупна количина на протеини застапени во прашкастата слуз преку методот на Биуретска реакција. Во испитуваниот прашок од слуз од полжави детерминирано е присуство на $83,46 \pm 5,2\%$ на вкупни протеини, изразено на говедски серум албумин (БСА). Определувањето на количината на вкупни протеини беше од суштинско значење, имајќи во предвид дека тие би резултирале со интеракција со протеините во кожата, стимулирајќи го процесот на регенерација на епителот и формирањето на сврзно ткиво што е особено значајно за ефикасен третман на раните.

. Зета потенцијалот на слузта од полжави беше измерен во дестилирана вода и вештачки ексудат за рани. Добиените резултати укажаа дека средниот зета потенцијал на честичките на прашкастата слуз од полжави испитуван во дестилирана вода изнесуваше $-2,3 \pm 0,12 \text{ mV}$, споредно со тој во вештачки ексудат за рани ($0,07 \pm 0,02 \text{ mV}$), што оди во прилог на потенцијалот за ефикасен третман на раните.

Карактеризација на растителни компоненти

При подготовката на сувиот екстракт од невен од 100 g на цвет на невен се добиени ~4,4 g на сув екстракт со карактеристична жолтеникава боја и слаб и пријатен мирис.

Во однос на сувиот екстракт од кантарион, од 100 g на херба на кантарион беа добиени ~6,5 g на сув екстракт со светло кафеава боја и слаб и пријатен мирис.

Определување на вкупни феноли

Определувањето на вкупните флавоноиди застапени во сувите екстракти беше направено според модифициран метод на Singleton.

Резултатите добиени од определувањето на фенолите кај сувите екстракти од невен и кантарион, како и маслото од канабис изнесуваа ~7, 19 и 10% на вкупни феноли изразени преку процент на гална киселина, соодветно. Од нив може да се забележи дека екстрактот од кантарион се карактеризира со најголема содржина, а екстрактот од невен со најмала содржина на феноли изразено на гална киселина, како стандардна супстанца за споредба.

Определување на вкупни флавоноиди

Вкупните флавоноиди застапени во сувите екстракти беа определени според методот на Talari со мали модификации.

Резултатите од определувањето на вкупните флавоноиди кај сувите екстракти од невен и кантарион, како и маслото од канабис покажаа дека во растителните преработки се застапени ~20, 92 и 90% на вкупн флавоноиди изразени преку процент на кверцетин, соодветно.

Определување на вкупни феноли и флавоноиди во МС (смеса од екстракти од кантарион, невен и масло од канабис)

Вкупните феноли и флавоноиди беа определени во МС со составена од сув екстракт од невен, кантарион и 20% масло од канабис во сооднос 1:1:0,5, соодветно.

Во вака подготвената смеса, по одредување на вкупните феноли според методот на Singleton добиено беше дека содржината на присутни феноли е $18,731 \pm 0,44\%$, пресметано на гална киселина во 100 g МС.

Вкупните флавоноиди беа определени според методот на Talari, при што добиените резултати укажаа дека содржината на вкупни флавоноиди изнесува $40,541 \pm 0,02\%$ на кверцетин во 100 g сув екстракт.

Значајно е да се истакне дека, фенолите и флавоноидите се важни компоненти во процесот на заздравување на раните поради нивните антиоксидативни, антиинфламаторни и антимикробни дејства. Имено, полифенолите покажуваат силна про-инфламаторна активност и се важни во привлекувањето на инфламаторните клетки на местото на инфламација, што значајно влијае врз процесот за заздравување на раните. Дополнително, овие компоненти ја промовираат пролиферацијата и миграцијата на ендотелните клетки и фибробластите што учествуваат во различните фази на заздравување на хроничните рани.

Карактеризација на цитозански микрочестички со вградена МС од природно потекло

При подготовката на микрочестичките, од 100 mL на појдовни компоненти беа добиени ~1,4 g на микрочестички. Истите беа во форма на прашкаста смеса, со карактеристична жолтеникаво-кафеава боја и специфичен мирис кој потекнува од нивните составни компоненти (слуз од полжав и суви екстракти).

Определување на вкупната содржина на протеини во микрочестички со МС

Вкупната содржина на протеини беше определена на ист начин како и кај слузта од градинарски полжав. Подготвените формулации покажаа содржлива на вкупни протеини од 18, 6 до 20,7% во 100 mg на микрочестички. При тоа не беше забележана статистички значајна разлика (еднонасочна ANOVA, $p < 0.05$) во вкупната содржина на протеини кај трите формулации, што најверојатно се должи на истото количество на слуз од полжави искористено при подготовка на формулациите.

Определување на вкупни феноли во микрочестички

Присуството на вкупни феноли беше детерминирано со методот на Singleton, направен како и при определувањето на вкупни феноли на екстрактите и МС. Добиеените резултати се изразени како содржина

(mg) на МС застапена во 100 mg микрочестички изнесуваше 0,3; 0,44 и 0,45 mg/100 mg за формулациите 1, 2 и 3, соодветно.

Од резултатите може да се заклучи дека има статистички значајна разлика (еднонасочна ANOVA, $p < 0.05$) во присуството на феноли во формулациите на микрочестички со МС. Разликата во присуство на фенолите во формулациите најверојатно се должи на различната количинска застапеност на МС. Очекувано, најголема содржина на феноли се забележува во Формулацијата 3 поради најголемата иницијална количина на МС.

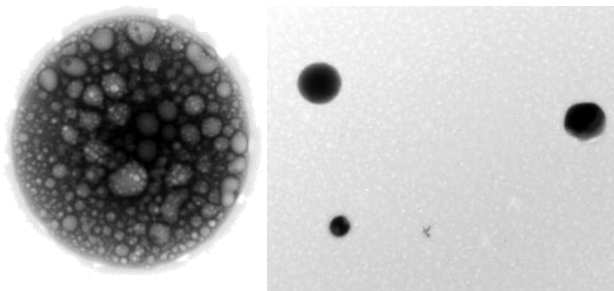
Определување на вкупни флавоноиди во микрочестички со МС

Вкупните флавоноиди беа определени според методот на Talari, на ист начин како и при определување на вкупни флавоноиди кај МС. Добиените резултати, изразени како содржина (mg) на МС присутна во 100 mg микрочестички изнесуваа 0,16; 0,44 и 0,74 mg/100 mg за формулациите 1, 2 и 3, соодветно.

Добиените резултати укажуваат на статистички значајна разлика (еднонасочна ANOVA, $p < 0.05$) помеѓу содржината на флавоноидите во различните формулации што се должи на различните количински застапености на МС во формулациите. Содржината на флавоноиди е најголема во Формулацијата 3 поради најголемиот количински удел на МС во таа формулација, споредено со формулациите 1 и 2, соодветно.

Морфолошка карактеризација на микрочестички

Со користење на ТЕМ, беше потврдено формирањето на микрочестичките со сферична форма (Слика 2).



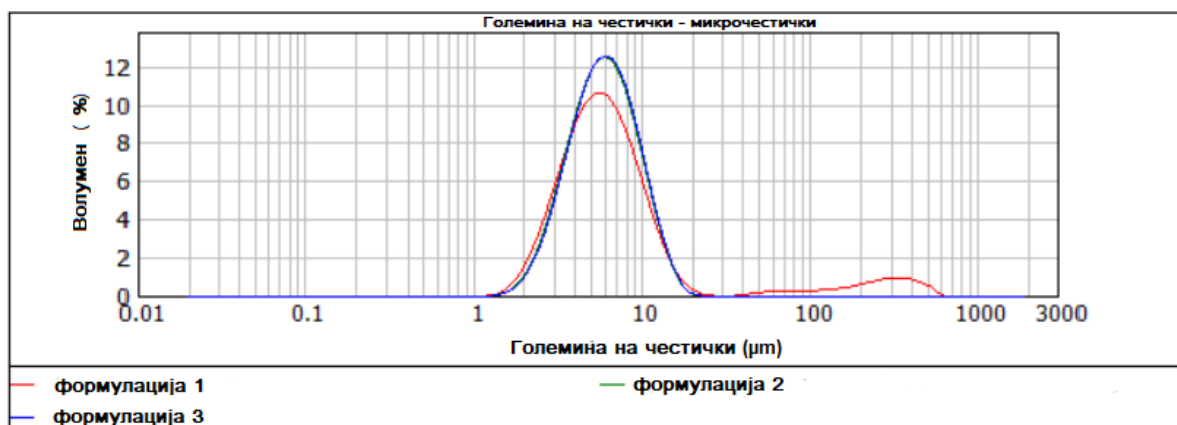
Слика 2. ТЕМ прикази на подготвените микрочестички со МС.

Големина и дистрибуција по големина на микрочестички

Големината на микрочестичките и дистрибуцијата на честичките по големина беше определена на ист начин како и кај слузта од градинарски полжав. Добиените резултати за средниот дијаметар на микрочестичките на подготвените формулации изнесуваше $\sim 5,9 \mu\text{m}$ со релативно тесна унимодална дистрибуција на честичките по големина (< 2) (Слика 3).

Од добиените резултати може да се заклучи дека нема значајна статистичка разлика (еднонасочна ANOVA, $p < 0.05$) во средниот дијаметар на микрочестичките кај сите подготвени формулации, додека пак постои статистичка значајна разлика (еднонасочна ANOVA, $p < 0.05$) меѓу Span факторот (ширината на дистрибуцијата на честичките по големина).

Добиените резултати покажуваат дека сите подготвени формулации се карактеризираат со тесна и унимодална дистрибуција на честичките по големина.

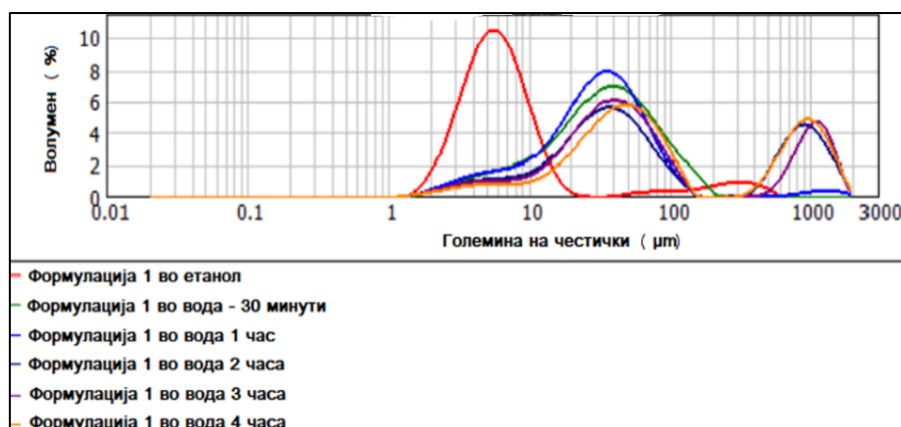


Слика 3. Графички приказ на дистрибуција на честички по големина на подготвените формуации на микрочестички со МС.

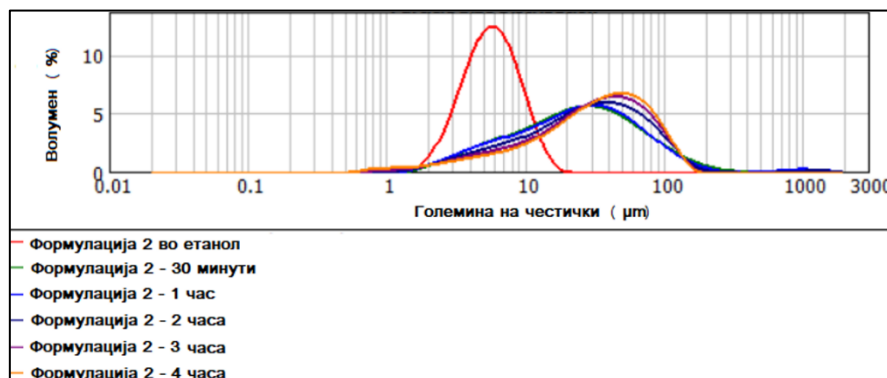
Степен на бабрење

Степенот на бабрење на подготвените формуации на микрочестички во дестилирана вода, изразен преку однос на зголемување на дијаметарот е прикажан на Сликите 4-6.

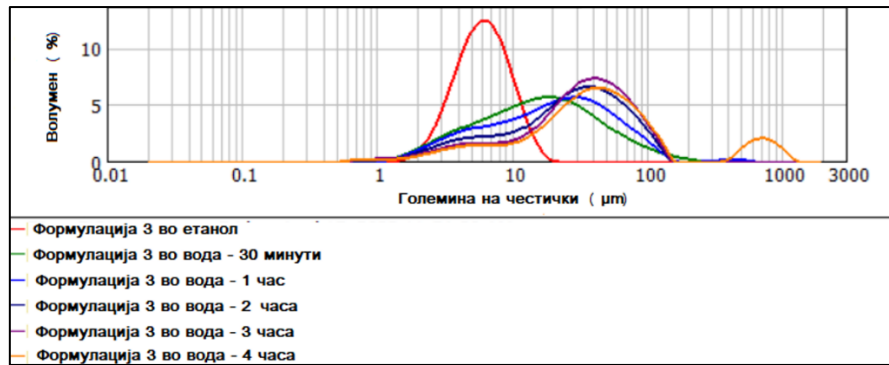
Резултатите добиени за вредностите на средниот дијаметар на микрочестичките при нивно бабрење во дефинираните временски интервали покажаа негово сигнификантно зголемување (еднонасочна ANOVA, $p < 0.05$). Определувањето на степенот на бабрење е значаен фактор затоа што овој процес може да влијае на времето на задржување на микрочестичките на местото на делување, би можел да влијае врз с процесот на апсорпција на ексудатот од самата рана и оттука дополнително да влијае на брзината на ослободување на активните компоненти од МС енкапсулирана во микрочестичките.



Слика 4. Бабрење на микрочестичките од Ф1 во различни временски периоди.



Слика 5. Бабрење на микрочестичките од Ф2 во различни временски периоди.



Слика 6. Бабрење на микрочестичките од Ф3 во различни временски периоди.

Зета потенцијал

Измерениот зета потенцијал на сите три формулации на микрочестички со МС во дестилирана вода и во вештачки ексудат за рани се движеше од $-33,9$ до -42 mV, одосно од $-30,7$ до $-35,2$ mV, соодветно.

Од добиените резултати може да се заклучи дека вредностите за зета потенцијалот во вештачки ексудат за рани се помали во споредено со оние во дестилирана вода при што постои статистичка значајна разлика (еднонасочна ANOVA, $p < 0.05$).

Литературните податоци генерално укажуваат дека цитозанските микрочестички се карактеризираат со позитивен површински полнеж што се должи на особините на цитозанот како полимер. Сепак, полнежот на честичките зависи и од присуството на другите составни компоненти во формулацијата и тоа пред се од видот и количината на средството за вкрстено поврзување, кое во овој случај е TRP. При тоа, кога TRP е застапен во вишок доаѓа до премин на позитивната површинска наелектризираност во негативна. Имено, при подготовка на цитозанските микрочестички (примероци Ф1-Ф3), количеството на TRP во цитозанскиот раствор е во сооднос 1,5:0,5, што значи дека TRP е застапен во вишок. Со поголемата застапеност на TRP во формулациите доаѓа до заситување на цитозанските места за врзување со TRP, па така се добиваат негативно наелектризирана цитозански/TRP микрочестички.

Анализа на пазар и бази на патентни податоци за слични производи и дефинирање на методологија за комерцијализација и добивање на финален производ

Направената анализа на домашниот и меѓународниот пазар за производи кои генерално имаат состојки од слуз од полжав, покажа дека доминира употребата на овие состојки во козметичката индустрија со доминантен фокус на нега на кожата, иако во понудата се наоѓаат и производи кои користат екстракти од полжави, а кои се наменети за проблеми со коските и зглобовите, итн.

Проценките на пазарите за оваа индустрија покажуваат голем потенцијал за раст. Според анализата на реноманантата компанија за маркетинг истражувања Transparency Marketing Research меѓународниот пазар за козметички производи поврзани со состојки од полжави за 2021 година е проценет на 2,1 милијарди долари, при што се очекува дека со проценет годишен раст од 5,8% во 2032 година вредноста на глобалниот пазар би пораснала на 2,1 милијарди долари.

Во однос на домашниот пазар направена е анализа на понудата на производи кои содржат состојки од полжав, при тоа како доминантни производители на вакви производи се лоцирани:

- Natura Therapy:
 - o НАТУРА пакет (во комбинација со течен куркумин и колаген) – препарат за зглобови и коски (Снеил Комплекс, пластично пакување 30 капсули)
- Olreo:
 - o COSRX Advanced Snail 92 All in One Cream
 - o COSRX Advanced Snail 96 Mucin Power Essence
 - o Benton Aloe BHA Skin Toner Mini Deluxe 30 ml
 - o Benton Snail Bee High Content Skin Mini Deluxe
 - o Snail Bee Ultimate серум
- Cell-1:
 - o Cell-1 Skin care

- Green Master:
 - o Schneckengel
 - o Schneckencreme
- TianDe:
 - o Тоник-бустер со муцин
 - o Мултифункционален крем за лице Snail secret
 - o Крема за раце Муцин
 - o Мултифункционален крем за околу очи
- Хербал +:
 - o Гел со екстракт од слуз од полжав
- PURITO:
 - o Purito Snail Repair Advanced Serum

Вториот дел од маркетинг истражувањето подразбираше анализа на меѓународниот пазар за лекување на рани. Генерално, пазарот за третман на рани за 2030 година се проценува на речиси 13,7 милијарди долари, со проценка за годишна стапка на раст од 4,13% во периодот од 2023 до 2030 година. Во истото истражување се информира дека во однос на крајните корисници на овие производи, за 2022 година, најголема група на корисници е болничкиот сектор (43%), потоа специјализираните клиници за третман на рани (23%), употреба на производите во домашни услови (17%) и друго.

При анализата на домашниот пазар не е најден ниту еден производ кој користи состојки од полжав, а се однесува на третирање на било каков вид на рани.

Анализата на базата на патентните податоци укажа дека досега се патентирани 5 слични пронајдоци во кои се споменуваат микропартикулиран систем-носач на биоактивни компоненти (со состојки од слуз од полжав, канабис и други растителни суровини) (US9125964B2, IN202041030334, WO2019/155389A1, WO2020/201439A1, WO2020/144564A1).

Истражувањата укажаа дека досега не е патентирана ваква МС, ниту се формулирани микрочестички со наведените полимери и МС.

Анализата на пазарите во ЕУ со производи за третман на хронични рани укажа дека ваков тип на производ не е достапен во било која дозирана форма (маст/крема/гел, фластер, преврска).

Ваквите анализи се охрабрувачки и покажуваат дека пристапот кој се користи во овој проект е релативно уникатен и дека има голем простор за развој и за комерцијализација на ваквиот вид на производи.

Со цел да се дојде до финален производ, потребно е спроведените истражувања да се доведат до финална фаза и на крај да се комерцијализираат истите.

Според светската здравствена организација, моменталниот бизнис модел за комерцијализација на фармацевтските истражувања иако има значителен технолошки и терапевтски напредок, сепак, има и неколку недостатоци:

- Потребите за иновации се занемарени во области каде што пазарниот поттик е премногу мал или ризичен (од аспект на базични инвестиции).
- Конкуренцијата меѓу поединците/институциите во областа на истражување и развој може да ја забави иновативноста и комерцијализацијата заради попречување или блокирање на споделувањето на знаењето како општо добро, што генерално ја движи науката, а и целото општество напред.
- Монополските права може да го ограничат производството на крајни производи, генерирајќи вештачки недостиг и намалувајќи ја глобалната достапност на производи.
- Високите цени на крајниот производ веќе се вградени во системот уште во фазата на дизајнот, бидејќи високиот профит на крајниот производ се главниот поттик за привлекување приватни инвестиции во истражување и развој.

Динамичниот пазар и зголемените трошоци на развој на нови производи побаруваат воведување на нови поинновативни модели на комерцијализација на фармацевтските истражувања, и во оваа насока. Саро et al. (2014) го предлагаат следниот интегративен модел за комерцијализација на производи во фармацевтската индустрија (Слика 9). Ваквиот модел е особено интересен за разгледување кај посиромашните и земјите во развој, како што е и нашата држава.

Иако не е таксативно наведено во првата и втората фаза од интегративниот модел, треба да се смета на поддршката на инкубаторите/акцелераторите кои помагаат во изнајдување на дополнителни финансиски средства за завршување на сите истражувања (покрај истражувачка опрема ова вклучува и правни совети за заштита на интелектуалната сопственост, анализа на пазарните сегменти, контакти со потенцијални клиенти итн.)

Токму во оваа насока и се препорачува развојот на моделот за комерцијализација на истражувањата кои беа предмет во овој проект (Сл. 7).

Класичен интегриран модел за истражување и развој во фармацевтската индустрија



Напреден повеќефункционален фармацевтски модел на комерцијализација (со вклучување на партнерски организации во процесот)



Слика 7. Класичен наспроти напреден повеќефункционален модел за комерцијализација на фармацевтските истражувања.

In vitro ефикасност и безбедност на оптимални формулации на микрочестички со вградена МС *Испитување на антиоксидативно дејство*

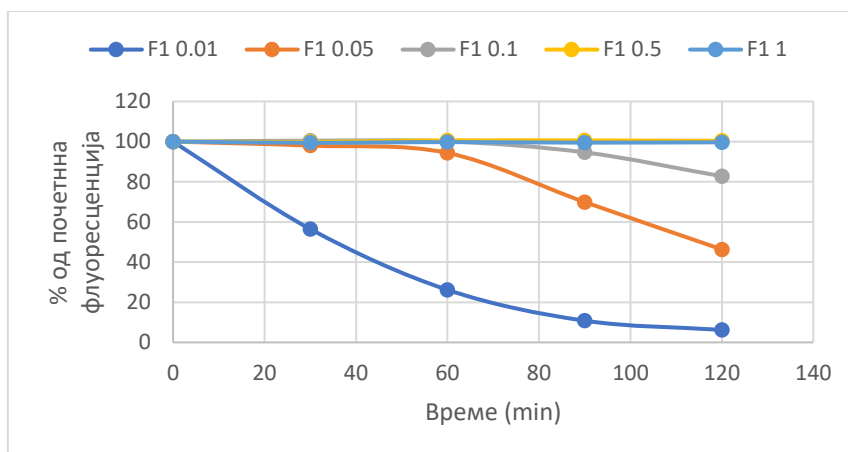
Резултатите од ORAC тестот покажаа значителна антиоксидативна активност кај трите формулации од микрочестички и истата е концентрациски зависна (Сл. 8).

Формулација 1 во концентрација од 0,01 mg/mL покажа значително намалување на флуоресценцијата во бунарчињата, при што во првите 30 мин. флуоресценцијата опадна за 42,24%, а за 120 мин. флуоресценцијата беше намалена за 94,48%.

Во концентрација од 0,05 mg/mL по 30 мин. флуоресценцијата остана 100%, а за 120 мин. истата беше намалена за 49,35%.

Во концентрација од 0,1 mg/mL по 30 мин., флуоресценцијата остана 100%, а за 120 мин. истата беше намалена за 18,51%.

За концентрациите од 0.5 и 1 mg/mL флуоресценцијата остана константна на околу 100% интензитет.

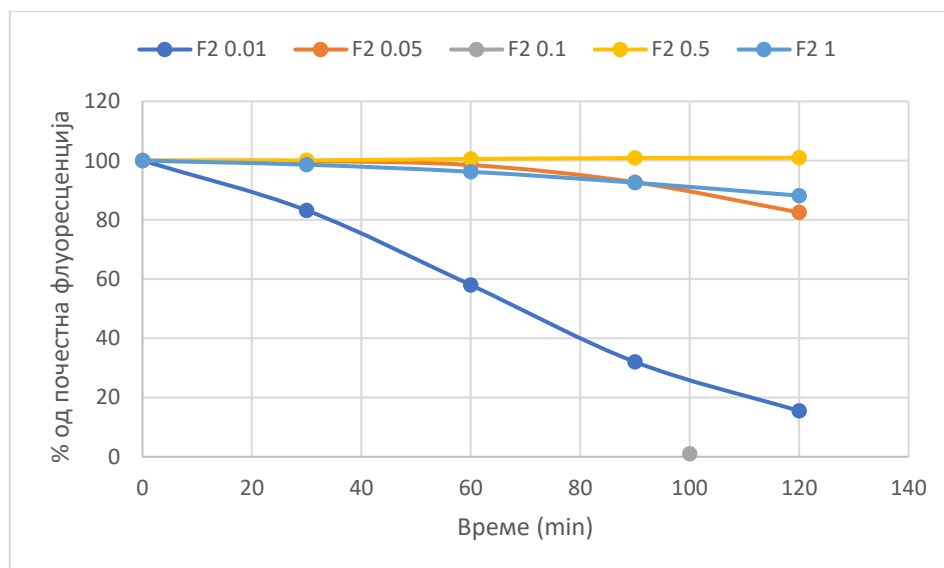


Слика 8. Резултати од ORAC тестот изведен на различни концентрации на Формулација 1 во временски период од 120 минути.

Формулацијата 2 (Слика 9) во концентрација од 0,01 mg/mL покажа намалување на флуоресценцијата во првите 30 мин. за 16,94%, а за 120 минути истата беше намалена за 84,41%.

Во концентрација од 0,05 mg/mL по 30 мин.и флуоресценцијата остана 100%, а за 120 минути истата беше намалена за 17,75%.

За концентрациите од 0.1, 0.5 и 1 mg/mL флуоресценцијата остана константна, на околу 100% интензитет.

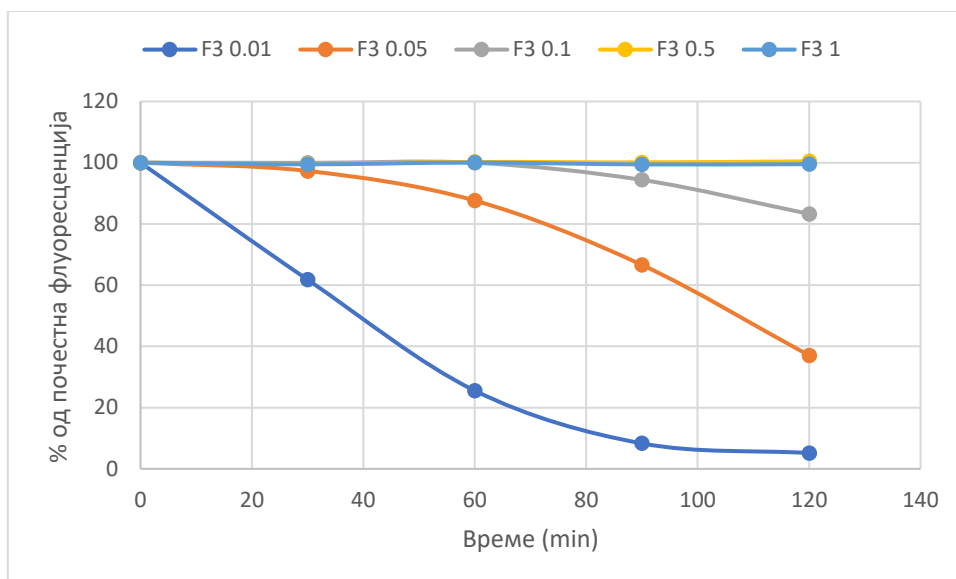


Слика 9. ORAC тест изведен на различни концентрации на Формулација 2 во временски период од 120 минути.

Формулација 3 (Слика 10) во концентрација од 0,01 mg/mL покажа намалување на флуоресценцијата во првите 30 минути за 35,53%, а за 120 минути флуоресценцијата опадна за 94,85%.

Во концентрација од 0,05 mg/mL по 30 минути флуоресценцијата опадна за 4,89%, а за 120 минути за 62,96%.

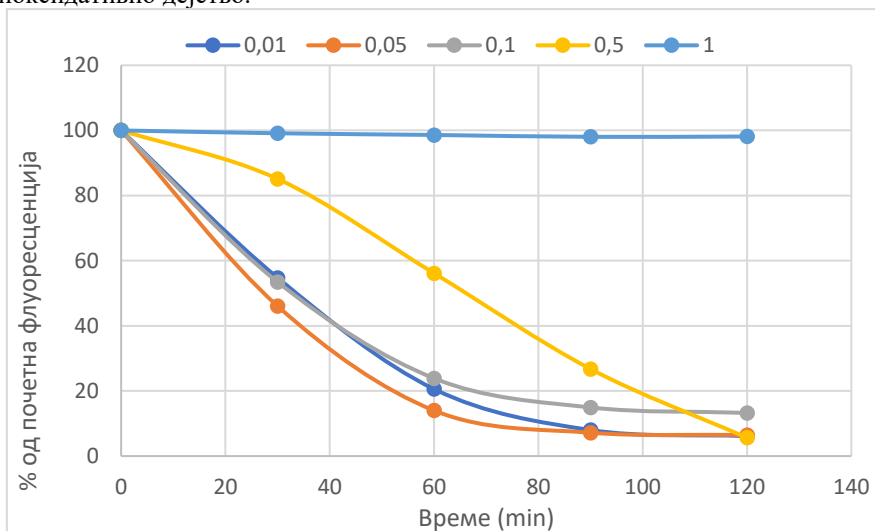
За концентрациите од 0,1 mg/mL по 30 минути флуоресценцијата остана околу 100%, а за 120 минути се намали за 28,02%, а во концентрациите од 0,5 и 1 mg/mL флуоресценцијата остана константна на околу 100% интензитет.



Слика 10. ORAC тест изведен на различни концентрации на Формулација 3 во временски период од 120 минути.

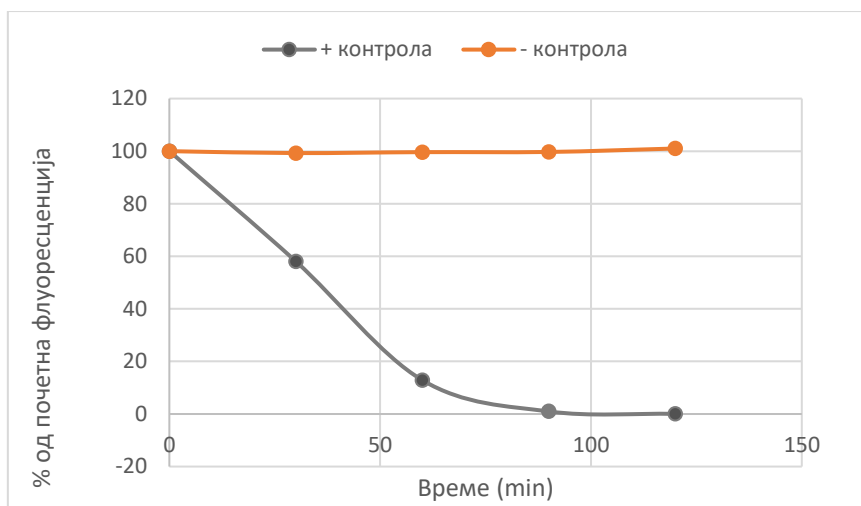
За потврда на овие резултати, беше испитано и влијанието на празни микрочестици, кои не содржат МС врз спречувањето на оксидативното дејство на ААРН радикало (Сл. 11). При тоа се забележа драстично опаѓање на флуоресценцијата во текот на 120 минути во концентрациски опсег на празни микрочестици од 0,01 до 0,5 mg/mL, додека кај растворот на празни микрочестици во концентрација од 1 mg/mL флуоресценцијата остана константна околу 100% во текот на 120 минути.

Ваквите резултати најверојатно се должат на присуството на цитозан како основен полимер кој покажува антиоксидативно дејство.



Слика 11. ORAC тест изведен на различни концентрации на празни микрочестици во временски период од 120 минути.

Покрај испитуваните формулаци и празни микрочестици, беа спроведени позитивни и негативни контроли со цел да се види како флуоресценцијата ќе се менува во присуство на ААРН радикал без употреба на антиоксиданс (позитивна контрола) и како се менува флуоресценцијата без присуство на ААРН радикал (Сл. 12). Позитивната контрола покажа значително намалување на флуоресценцијата во текот на 120 минути, додека негативната контрола не покажа значајна промена во флуоресценцијата.



Слика 12. Резултати од позитивна и негативна контрола на ORAC тестот во временски период од 120 мин.

DPPH тест

Пред испитување на микрочестиците, DPPH тестот беше направен врз стандардни раствори на кверцетин, аскорбинска киселина и бутил хидроксианизол во концентрации од 0,01, 0,05 и 0,1 mg/mL работен раствор, односно 0,48, 2,38 и 4,80 µg/mL финален раствор, со цел да се овозможи споредба на антиоксидативна активност на трите подготвени формулации.

Резултатите од DPPH тестот на стандардите се прикажани во Табела 2, а IC₅₀ вредностите се прикажани во Табела 3.

Како што може да се забележи, кверцетинот покажува највисок инхибициски капацитет од стандардите со IC₅₀ вредност од 0,0586 mg/mL, односно потребен е 0,0586 mg/mL раствор на кверцетин да инхибира 50% од DPPH радикалот. Аскорбинската киселина и ВНА покажуваат послаб инхибициски капацитет, со IC₅₀ вредност на аскорбинската киселина од 0,0919 mg/mL, а за ВНА 0,1011 mg/mL.

Табела 2. Процент на инхибиција на стандардни раствори од кверцетин, аскорбинска киселина и ВНА добиени со DPPH тест

Концентрација (µg/mL)	Апсорбанца на стандард			Процент на инхибиција на стандард (%)		
	Кверцетин	Аскорбинска киселина	ВНА	Кверцетин	Аскорбинска киселина	ВНА
0,48	0,8604	0,8989	0,8727	15,23	11,44	14,02
2,38	0,5266	0,6793	0,6777	48,12	33,07	33,23
4,80	0,2276	0,4666	0,5168	77,58	54,03	49,08

Табела 3. IC₅₀ вредности на стандардни раствори од кверцетин, аскорбинска киселина и ВНА изразени како mg/mL

Стандард	IC ₅₀ (mg/mL)
Кверцетин	0,0586
Аскорбинска киселина	0,092
ВНА	0,1011

Во однос на микрочестиците, забележана беше концентрациски зависна инхибиција на DPPH слободниот радикал и процентот на инхибиција се зголемуваше со секоја последователна формулација (Табела 4 и 5). Оттука, Формулација 3 покажа највисока активност при инхибиција на 50% од DPPH слободниот радикал.

Табела 4. Процент на инхибиција на трите формулации од микрочестици добин со DPPH тест

Апсорбанца на примерок	% на инхибиција на примерок
------------------------	-----------------------------

Концентрација (µg/mL)	Ф1	Ф2	Ф3	Ф1	Ф2	Ф3
0,48	0,699	0,721	0,724	2,157	0,222	0,235
2,38	0,696	0,717	0,714	2,521	0,761	1,094
4,80	0,690	0,703	0,693	3,333	2,62	4,08

Табела 5. IC₅₀ вредности на трите формулации од микрочестици изразени како mg/mL

Примероци	IC ₅₀ (mg/mL)
Формулација 1	1,8018
Формулација 2	0,9532
Формулација 3	0,7637

За разлика од трите формулации на микрочестички со МС, празните микрочестици базирани на цитозан и ТПП не покажаа антиоксидативна активност, што јасно укажува на дејството на МС енкапсулирана во микрочестичките и потенцијалит на нејзиното дејство.

In vitro испитувања на клеточни култури

Засадување, одгледување и пресадување на клеточни линии

За потребите на испитувањата со клетки, беа набавени две клеточни линии, клеточна линија на хумани кератиноцити (HaCaT) и хумани дермални фибробласти (HDF) и соодветни клеточни медиуму како и реагенси, согласно протоколите и препораките на производителите.

- Засадување, одгледување и пресадување на HDF

Вијалата со замрзнати HDF се одмрзнува на 37 °C и се истура во шише T-75 што содржи 15 mL клеточен медиум. Медиумот се заменува со нов медиум по 24 часа инкубација на °C, 5% CO₂. Медиумот се менува на секои 2-3 дена до постигнување на 80% конфлуентност на клетките. По постигнување на конфлуентност, медиумот се отстранува, а клетките се промиваат со PBS. По отстранување на PBS, се додаваат 6 mL на Trypsin-EDTA (шишето се протресува за да се осигура дека растворот на Trypsin-EDTA целосно го се распределил низ целото дно со клеточен монослој). Понатаму, 5 mL од Trypsin-EDTA се отстрануваат, а одвојувањето на клетките од дното на шишето се гледаат под микроскоп додека клетките добијат сферична форма (процесот трае 2-4 минути). На суспензијата со клетки се додаваат 5 mL клеточен медиум и истата се префрла во епрувети по што следи чекор на центрифугирање (1500 rpm, 3 мин). Супернатантот се отстранува, а седиментираните клетки се суспендираат во 5 mL медиум. За потребите на тестовите со клеточни линии, клетките се бројат (микроскопски) и по соодветни пресметки се засадуваат одреден број на клетки про бунарче. За пресадување на клетките 1 mL од суспензијата со клетки се префрла во ново шише T-75 кое содржи 15 mL медиум и се повторува процесот до наредното пресадување.

- Засадување, одгледување и пресадување на HaCaT

Вијалата со замрзнати HDF се одмрзнува на 37 °C и се истура во епрувета што содржи 5 mL клеточен медиум. Епруветата се центрифугира (1500 rpm, 3 мин), а потоа супернатантот се отстранува и седиментираните клетки се суспендираат во 5 mL медиум. Суспензијата на клетки се додава на шише T-75 што содржи 10 mL клеточен медиум. Шишето со клетки се става во инкубатор (37°C, 5% CO₂), а медиумот се менува на секои 2-3 дена до постигнување на 80% конфлуентност на клетките. По постигнување на конфлуентност, медиумот се отстранува, а клетките се промиваат со PBS. По отстранување на PBS, се додаваат 7 mL на Trypsin-EDTA (шишето се протресува за да се осигура дека растворот на Trypsin-EDTA целосно го се распределил низ целото дно со клеточен монослој). По инкубација од 8 минути (37°C, 5% CO₂), шишето се протресува, со цел да се одвојат клетките од неговото дне. На суспензијата со клетки се додаваат 15 mL клеточен медиум и истата се префрла во епрувети по што следи чекор на центрифугирање (1500 rpm, 3 мин). Супернатантот се отстранува, а седиментираните клетки се суспендираат во 5 mL медиум. За потребите на тестовите со клеточни линии, клетките се бројат (микроскопски) и по соодветни пресметки се засадуваат одреден број на клетки про бунарче. За пресадување на клетките 1 mL од суспензијата со клетки се префрла во ново шише T-75 кое содржи 15 mL медиум и се повторува процесот до наредното пресадување.

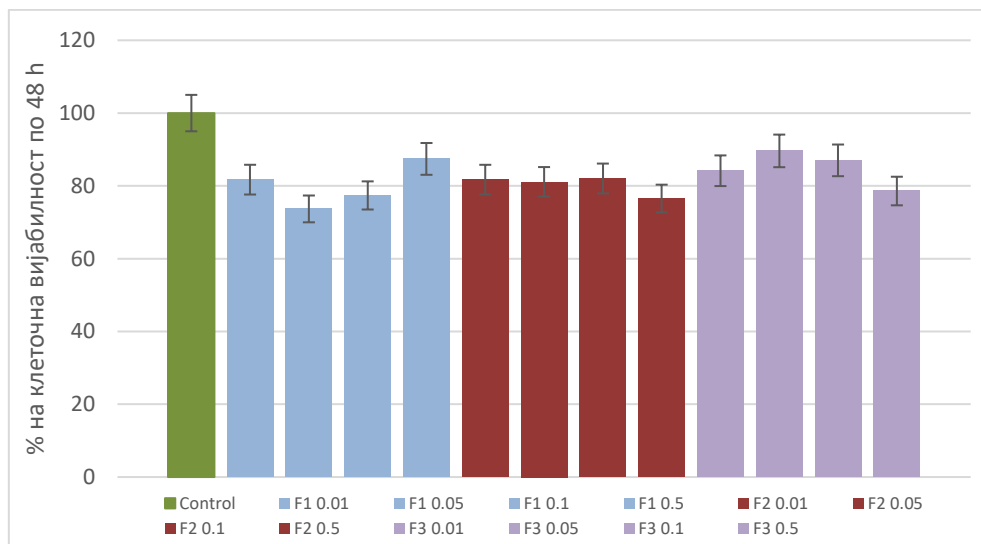
Испитување на биокомпатибилност и цитотоксичност

За предвидените испитувања беше користена клеточна линија на кератиноцити (HaCaT). Најпрво, клетките беа засадени во плочи со 96 бунарчница (5000 клетки про бунарче во 200 µL клеточен медиум). Откако клетките постигнаа 80% конфлуентност, клеточниот медиум беше отстранет и заменет со нов, а во него беа диспергирани формулациите на микрочестички во концентрациски опсег од 0,01 – 0,5 mg/mL.

По инкубирање на кератиноцитите со трите избрани формулации по 48 часа беше додадено МТТ реагенс во секое бунарче и повторно беа инкубирани 4 часа, по што фромазански кристали формирани во секое бунарче беа растворени во DMSO и плочите беа прочитани со примена на Microplate reader (VICTOR Perkin Elmer, USA) на 570 nm.

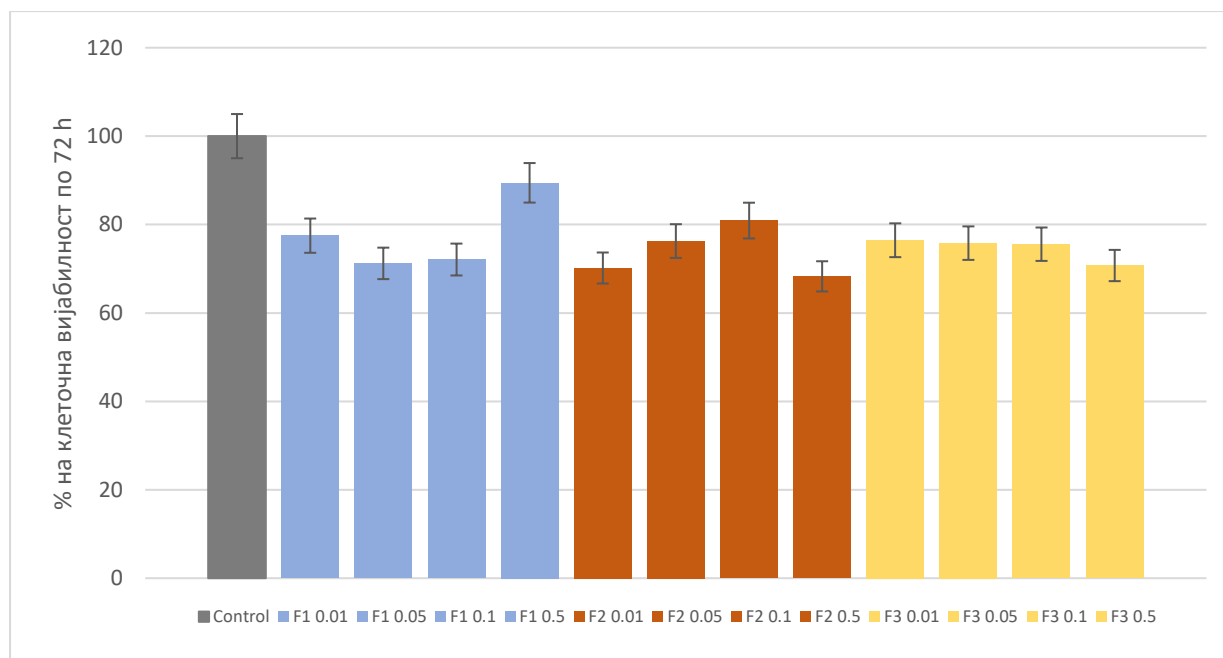
Кератиноцитите инкубирани со Формулација 1 во концентрациски опсег од 0,01 – 0,5 mg/mL покажаа вијабилност од 73,67 – 84,41%.

Кератиноцитите инкубирани со Формулација 2, во истиот концентрациски опсег покажаа вијабилност од 76,50 – 82,02%, додека при инкубација со Формулацијата 3, вијабилноста на кератиноцитите изнесуваше 78,58 – 89,61% (Сл. 13).



Слика 13. Процент на клеточна вијабилност на кератиноцити од HaCaT клеточна линија по 48 часовна инкубација со трите формулации на микрочестици со МС.

По инкубација на кератиноцитите со трите формулации на микрочестици со МС по 72 часа (Сл.14), беа третирани на ист начин како и со клетките инкубирани 42 часа, при што кератиноцитите инкубирани со Формулација 1 во концентрациски опсег од 0,01 – 0,5 mg/mL покажаа вијабилност од 71,21 – 89,44%; со Формулација 2 68,28 – 80,90% и со Формулација 3 од 70,73 – 76,45%.



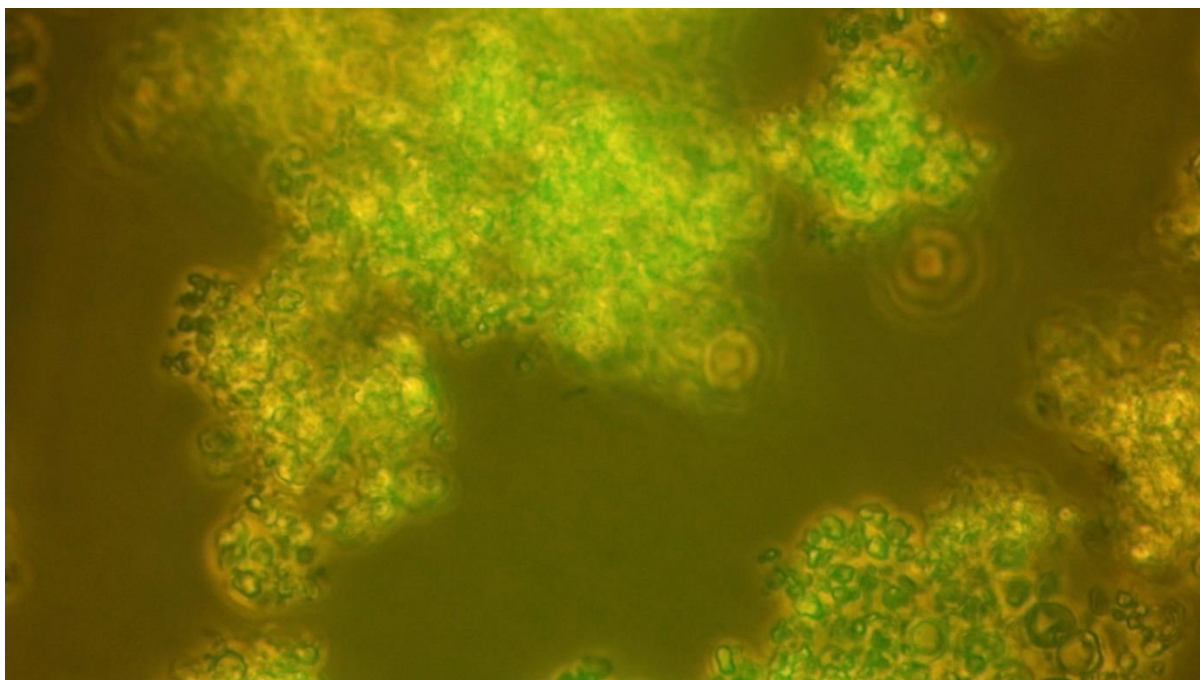
Слика 14. Процент на клеточна вијабилност на кератиноцити од HaCaT клеточна линија по 72 часовна инкубација со трите формулации на микрочестици со МС.

Според добиените резултатитоа, сите три формулации на микрочестици во концентрациски опсег од 0,01 – 0,5 mg/mL не покажува цитотоксичност по 48 и по 72 часовна изложеност.

Според водичот за определување на *in vitro* цитотоксичност на медицински производи (DIN EN ISO 10993-5:2009), дизајнираните формулации може да бидат опишани како не цитотоксични. Имено, кога вијабилноста на клетките е $\geq 70\%$ по изложеност (Catanzano et al. 2017; Moritz et al. 2014), испитуваните формулации не се токсични за клетките.

***In vitro* студии на биоатхезија**

Биоатхезивните својства на сите три формулации на микрочестички беа анализирани по нивна инкубација со клеточни линии на кератиноцити и фибробласти. Имено, најпрво соодветните клеточни линии беа засадени во плочи со 12 бунарчиња (50 000 клетки про бунарче во 1,5 mL соодветен клеточен медиум). Откако клетките постигнаа 80% конfluентност, клеточниот медиум беше отстранет и заменет со нов, а во него беа диспергирани формулациите на маркирани микрочестички со флуоресцентна боја во финални концентрации од 50 $\mu\text{g/mL}$. Беше направена инкубација на клетките со микрочестичките во периоди од 1 и 4 часа. По инкубацијата (на 37 °C, 5% CO₂), клетките беа промиени со фосфатен пуфер pH 7,4 и истите беа визуелизирани со микроскоп. Добиената флуоресценција потврди дека сите формулации успешно се интернализираат во кератиноцитите (Сл. 15), односно фибробластите.



Слика 15. Микрографски приказ на интернализирани микрочестички (Формулација 1) во кератиноцити по инкубација од 4 часа.

Утврдување на регенеративна активност (со примена на Scratch assay)

Регенеративното дејство на формулациите на микрочестички врз кератиноцитите и фибробластите беше утврдено со помош на т.н. Scratch assay. На плочи со 12 бунарчиња беа засадени по 50 000 клетки про бунарче во 1,5 mL соодветен клеточен медиум. Откако клетките постигнаа 80% конfluентност, клеточниот медиум беше отстранет и заменет со нов, а во него беа диспергирани формулациите на микрочестички во финални концентрации од 50 $\mu\text{g/mL}$. Потоа, бунарчињата со клетки беа рачно изгребани со врв од стерилна пипета (250 μL) (секоје бунарче со различна пипета, во асептични услови). По инкубација на секоја од формулациите со соодветната клеточна линија во времетраење од 48 часа, микроскопски беше утврдено дека и двете клеточни линии третираните со било која од трите формулации даваат поголем % на заздравување (затворање на предизвиканата рана) во однос на нетретираните бунарчиња (контрола, само клетки изгребани со врв од пипета, без микрочестички). Со ова се потврдува позитивниот ефект на формулациите врз миграцијата на клетките што следствено ја олеснува реепителизација на кожата при заздравувањето на хроничните рани.

Објавени резултати кои произлегуваат од проектот

- Teodora Tasevska, Marija Glavas Dodov, Dushko Shalabalija, Ljubica Mihailova, Radmil Polenakovic, Maja Simonoska Crcarevska (2022). Spray-dried snail mucus as raw material with potential for chronic wound treatment. Maced. Pharm. Bull. 68 (Suppl 1), 317-318. DOI: 10.33320/maced.pharm.bull.2022.68.03.153. <http://hdl.handle.net/20.500.12188/25236>
- Anastazija Cenova, Martina Nestorovska, Maja Simonoska Crcarevska, Ljubica Mihailova, Dushko Shalabalija, Marija Glavas Dodov (2022). Evaluation of antioxidant properties of herbal mixture and CBD oil for the treatment of chronic wound. Maced. Pharm. Bull. 68 (Suppl 1), 557-558. DOI: 10.33320/maced.pharm.bull.2022.68.03.266. <http://hdl.handle.net/20.500.12188/25247>
- Martina Nestorovska, Anastazija Cenova, Maja Simonoska Crcarevska, Dushko Shalabalija, Ljubica Mihailova, Marija Glavas Dodov (2022). Formulation and characterization of snail slime-chitosan microparticles with herbal extracts intended for treatment of chronic wounds. Maced. Pharm. Bull. 68 (Suppl 1), 559-560. DOI: 10.33320/maced.pharm.bull.2022.68.03.267. <http://hdl.handle.net/20.500.12188/25248>
- Teodora Tasevska. Spray-dried snail mucus as raw material with potential for chronic wound treatment. 7th Congress of Pharmacy in North Macedonia with international participation. Poster presentation. Ohrid, October, 2022.
- Anastazija Cenova. Evaluation of antioxidant properties of herbal mixture and CBD oil for the treatment of chronic wound. 7th Congress of Pharmacy in North Macedonia with international participation. Oral presentation. Ohrid, October, 2022.
- Martina Nestorovska. Formulation and characterization of snail slime-chitosan microparticles with herbal extracts intended for treatment of chronic wounds. 7th Congress of Pharmacy in North Macedonia with international participation. Oral presentation. Ohrid, October, 2022.
- Дипломски труд, Фармацевтски факултет, УКИМ-Скопје – „Развој на микро/наносистеми со активни супстанции од природно потекло и нивна примена во дерматологијата“, Теодора Тасевска, 2022.
- Дипломски труд, Фармацевтски факултет, УКИМ-Скопје – „Формулација и карактеризација на филмови со микрочестици кои содржат природни суровини за третман на хронични рани“. Мартина Несторовска (во процес на изработка).

1.5. Корисници на остварените резултати, начини на пренесување и примена

Добиените резултати се значајни за понатамошни истражувања во полето на интерес. Имено, стекнатите сознанија ќе бидат користени и во одобрените научно-истражувачки проекти:

- **Имплементација на иновациски модели во процесот на развој на нови производи за третман на рани во здравствениот сектор - билатерален проект од МОН, РС Македонија и ОеАД-Австриска агенција за едукација и интернализација, Австрија (2022-2024 год.)**
- **Иновативен биомиметички систем – носач на природни производи за третман на хронични рани, Проект одобрен од ННС на Фармацевтскиот факултет, УКИМ, Скопје, ноември 2022, во траење од 3 години.**