

mgr farm., inż. Dominik Żyro

Synteza, charakterystyka spektroskopowa i rentgenostrukturalna kompleksów srebra(I) z metronidazolem wykazujących aktywność przeciwbakteryjną i cytotoksyczną

Synthesis, spectroscopic and x-ray structure characteristics of silver (I) complexes with metronidazole showing antibacterial and cytotoxic activity

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Zakład Chemii Bionieorganicznej

Katedra Chemii Medycznej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Justyn Ochocki

Promotor pomocniczy: dr n.farm. Małgorzata Fabijańska

Łódź 2021

Środki na realizację części badań będących przedmiotem niniejszej
rozprawy doktorskiej zostały pozyskane
poprzez finansowanie z Narodowego Centrum Nauki
w ramach grantu OPUS nr 2014/15/B/NZ7/00944

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu promotorowi Panu Prof. dr. hab. n. farm. Justynowi Ochockiemu za cierpliwość i wyrozumiałość oraz nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie redagowania pracy doktorskiej i przygotowywania publikacji naukowych oraz wiele wspólnych dyskusji zachęcających do pogłębiania wiedzy, poszukiwań nowych rozwiązań na gruncie nauk chemicznych i farmaceutycznych.

Dziękuję dr n. farm. Małgorzacie Fabijańskiej za wszelką pomoc w redagowaniu rozprawy doktorskiej, wskazówki i zaangażowanie.

Dziękuję wszystkim pracownikom naukowym:

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,

Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach (Zakład Farmakologii i Toksykologii),

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny),

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (Wydział Farmaceutyczny),

Uniwersytetu Łódzkiego (Wydział Chemii),

Uniwersytetu Śląskiego (Wydział Fizyki),

bez współpracy których moja praca nie mogła by powstać, za ich poświęcony czas.

Szczególnie pragnę podziękować mojej Żonie inż. Magdalenie Andrzejewskiej-Żyro,

Przyjacielowi Adamowi Kubczyńskiemu, Mamie, Teściom, Przyjaciołom

i Współpracownikom za wsparcie, motywację i wiarę we mnie.

Specjalne podziękowania składam dr hab. n.med., Prof. uczelni Agnieszce Śliwińskiej i dr n.med. Arlecie Waszczykowskiej za to, że zawsze nadajemy na tych samych falach, a dzięki temu wszystko zawsze jest dużo prostsze.

Wykaz skrótów i wyrazów obcych:

Adeps lanae – lanolina (z łac.)

ang. – brzmienie w języku angielskim

aq. – *aquosa* (z łac.) – roztwór wodny

Ag-NPs – nanocząsteczki srebra

AgSD – sól srebrowa sulfadiazyny

ATC - klasyfikacja anatomiczno-terapeutyczno-chemiczna

A01AB17 – środki przeciwnieinfekcyjne i antyseptyczne do miejscowego leczenia jamy ustnej

A01A – preparaty stomatologiczne

D06BX01 – inne chemioterapeutyki

G01AF01 – środki przeciwwirusowe i antyseptyczne, z wyłączeniem połączeń z kortykosteroidami – pochodne imidazolu

J01XD01 – środki antybakteryjne – pochodne imidazolu

QJ01XD01 – weterynaryjne środki antybakteryjne – pochodne imidazolu

QP51AA01 – weterynaryjne leki przeciwpierwotniakowe

P01AB01 – środki przeciwko pelzakuwicy i innym chorobom pierwotniakowym – pochodne nitroimidazolu

ATCC – *American Type Culture Collection*

BCS – *Bovine Calf Serum* (z ang.) – serum bydlęco-cielęce

c.atom. – ciężar atomowy (dawn.), obecnie masa atomowa

c.cz. – ciężar cząsteczkowy (dawn.), obecnie masa cząsteczkowa, molowa

corrigens – substancje poprawiające smak i zapach (z łac.)

cz.(wag.) – części (wagowe)

DAB – *Deutsches Arzneibuch* (z niem.) – Niemiecka Farmakopea Narodowa

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium* – pożywka hodowlana

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

D₂O – ciężka woda, tlenek deuteru

D.S. – *da signa* (z łac.) – oznacz

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

Et₂O – eter dietylowy

EtOH – etanol

ex tempore – doraźnie, bezpośrednio przed użyciem (z łac.)

ext. – *externum* (z łac.) – do użytku zewnętrznego

FBS – *fetal bovine serum* (z ang.) – płodowa surowica bydlęca

FDA – *Food and Drug Administration* (z ang.) – Agencja Żywności i Leków

FP II (III, IX, XI, XII) – Farmakopea Polska, wydanie odpowiednio II, III, IX, XI, XII

fr. – brzmienie w języku francuskim

GMP – *Good Manufacturing Practice* (z ang.) – Dobra praktyka wytwarzania (produkcyjna)

¹H NMR – *Nuclear magnetic resonance* (z ang.) – Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

s – singlet, **q** – kwartet, **t** – tryplet, **m** – multiplet

HEC – hydroksyetyloceluloza

HIV-1 – Ludzki wirus-1 niedoboru odporności

i.v. – *iniectio intravenosa* (z łac.) – wstrzyknięcie dożylnie

JP XVII – Farmakopea Japońska, The Japanese Pharmacopoeia, Edycja XVII

K – kelwin, stopień temperatury równy °C + 273,15

L, mL, µL – litr, mililitr, mikrolitr

LDH – test oznaczania dehydrogenazy mleczanowej

LZ – lecznictwo zamknięte, szpitalne

łac. – brzmienie w języku łacińskim

M, mM, µM – mol, milimol, mikromol

MBC – *minimum bactericidal concentration* (z ang.) – minimalne stężenie bakteriobójcze

MCZ – mikonazol, przeciwgrzybiczy lek azolowy

m.cz. – masa cząsteczkowa, wyrażana w U (g/mol)

Me – metyl, rodnik metylowy, CH₃-

MeOH – metanol

M.f.gel. – *misce, fiat gel* (z łac.) – zmieszaj, niech powstanie żel

M.f.Gtt.opht. – *misce, fiat guttae ophthalmicae* (z łac.) – zmieszaj, niech powstaną krople oczne

M.f.ung. – *misce, fiat unguentum* (z łac.) – zmieszaj, niech powstanie maść

MIC – *minimum inhibitory concentration* (z ang.) – minimalne stężenie hamujące

min. – minuta, minuty

MHz – megaherc

mosmol/L – jednostka spoza układu SI oznaczająca miliosmole w 1 litrze; wartość wyrażona w mosmol/L pozwala na pomiar ciśnienia osmotycznego roztworu i określenie, w jaki sposób rozpuszczalnik będzie dyfundował przez półprzepuszczalną membranę

MTT – test kolorymetryczny dla oceny metabolicznej aktywności komórek

MTZ – metronidazol

niem. – brzmienie w języku niemieckim

nm – nanometr

NRU – *Neutral Red Uptake Assay* (z ang.) – test pochłaniania czerwieni obojętnej oceniający integralność błon lizosomów komórkowych

NR – Neutral Red (z ang.) – czerwień obojętna

OTC – *over-the-counter drugs* (z ang.) – lek wydawany z apteki bez recepty lekarskiej

o/w – emulsja typu olej w wodzie

p.topn. – punkt topnienia (dawn.), obecnie temperatura topnienia

Paraffinum liquidum – parafina ciekła (z łac.)

PET – polietylen (jako tworzywo sztuczne)

per se – jako taki (z łac.), w prostej postaci (w znaczeniu tej pracy)

PBS – roztwór buforowy zawierający jednozasadowy fosforan sodu, wodorofosforan sodu i chlorek sodu

Ph – fenyl, rodnik aromatyczny C₆H₅-

Ph.Eur. – Farmakopea Europejska (Edycja 9)

PHE – *Public Health England* (z ang.) – Zdrowie Publiczne Anglii – agencja wykonawcza pod auspicjami Departamentu Zdrowia i Opieki Społecznej Wielkiej Brytanii

PL – Polska

p.o. – *per os* (z łac.) – doustnie

PP – polipropylen (jako tworzywo sztuczne)

p.vag. – *per vaginum* (z łac.) – dopochwowo

p.r. – *per rectum* (z łac.) – doodbytniczo

Py – pirydyna, heterocykliczna azyna z 1 atomem azotu C₅H₅N

RNA – kwas rybonukleinowy

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium* – podłoże hodowlane

Rx – lek wydawany z apteki na podstawie recepty lekarskiej

SARS-CoV – Koronawirus zespołu oddechowego o ciężkim przebiegu

TPC – Test całkowitego barwienia białka komórkowego

Ung. – unguentum (z łac.) - maść

USL – Urzędowy Spis Leków

Vaselineum album – wazelina biała (z łac.)

w/o – emulsja typu woda w oleju

WET – weterynaryjny

1	Wstęp	10
2	Część teoretyczna	11
2.1	Azole i pochodne azoli	11
2.1.1	Antybiotyki nitroimidazolowe: metronidazol, tinidazol, nimorazol, ornidazol	13
2.1.2	Imidazolowe leki przeciwgrzybicze: ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, bifonazol, butokonazol, ekonazol, izokonazol	18
2.2	Srebro i jego sole	22
2.3	Zastosowanie srebra i jego soli w medycynie i farmacji	24
2.4	Związki koordynacyjne	32
2.5	Związki koordynacyjne srebra	35
2.6	Półstałe postaci leku	41
2.6.1	Maści	43
2.6.1.1	Podłoża maściowe	45
2.6.1.2	Liczba wodna, emulsje w/o i o/w	47
2.6.1.3	Aplikacja maści na skórę	49
2.6.2	Żele	50
2.6.2.1	Żele na bazie wody	51
2.6.2.2	Substancje żelujące	52
2.7	Jałowe postaci leku	60
2.7.1	Krople do oczu i maści oczne	61
2.7.2	Izohydria i izotonia kropli do oczu, substancje uzupełniające	62
2.7.3	Technika sporządzania kropli do oczu i maści ocznych	66
3	Część praktyczna	72
3.1	Założenia i cel pracy	72
3.2	Materiały i metody	73
3.2.1	Syntezy związków kompleksowych srebra(I)	73
3.2.1.1	Synteza $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$	73
3.2.1.2	Synteza $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	74
3.2.1.3	Charakterystyka spektroskopowa i analiza rentgenostrukturalna związku kompleksowego metronidazolu z siarczanem srebra(I) o wzorze: $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	76
3.2.2	Formulacje postaci leku	77
3.2.2.1	Formulacja maści do użytku zewnętrznego na skórę	77
3.2.2.2	Formulacja żelu do użytku zewnętrznego na skórę i błony śluzowe	78

3.2.2.3	Formulacja maści ocznej	80
3.2.2.4	Formulacja kropli do oczu	81
3.2.2.5	Izohydria i euhydria kropli do oczu	83
3.2.2.6	Zastosowanie recepturowych leków zawierających kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) w okulistyce	83
3.2.2.7	Zastosowanie recepturowych leków zawierających kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) w dermatologii	84
3.2.3	Trwałość kompleksów $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ i $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	84
3.2.4	Analiza mikrobiologiczna $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ i $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	85
3.2.5	Analiza cytotoksyczności	87
3.2.5.1	Linie komórkowe: Balb/c 3T3 oraz HepG2, Caco-2, PANC-1 i 1.2B4	87
3.2.5.2	Przygotowanie analizowanych substancji	88
3.2.5.3	Testy cytotoksyczności: MTT, NRU, TPC, LDH	89
3.2.5.4	Wykrywanie apoptozy metodą przyłączania aneksyny V	90
4	Wyniki badań	94
4.1	Związki koordynacyjne metronidazolu ze srebrem(I)	94
4.1.1	Synteza związku kompleksowego metronidazolu z azotanem srebra(I) o wzorze $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$	94
4.1.2	Synteza związku kompleksowego metronidazolu z siarczanem srebra(I) o wzorze $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	97
4.1.3	Charakterystyka spektroskopowa i analiza rentgenostrukturalna związku kompleksowego metronidazolu z siarczanem srebra(I) o wzorze $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100
4.2	Ocena postaci leku	103
4.2.1	Maść do użytku zewnętrznego	103
4.2.2	Maść do użytku okulistycznego	104
4.2.3	Żel do użytku zewnętrznego i na błony śluzowe	106
4.2.4	Krople do oczu	107
4.2.5	Wyniki badań zastosowania recepturowych leków zawierających kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) w okulistyce	109
4.2.6	Wyniki badań zastosowania recepturowych leków zawierających kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) w dermatologii	112
4.3	Ocena trwałości	116
4.4	Ocena aktywności mikrobiologicznej	119

4.5	Ocena aktywności cytotoksycznej	123
5	Dyskusja i wnioski	128
6	Streszczenie	138
7	Summary	140
8	Spis rysunków i schematów	142
9	Spis tabel	145
10	Piśmiennictwo	145
11	Wykaz publikacji, komunikatów zjazdowych i nagród oraz udział w projekcie badawczym	155
11.1	Publikacje bezpośrednio związane z tematem rozprawy doktorskiej	155
11.2	Komunikaty zjazdowe i materiały konferencyjne	156
11.3	Inne publikacje	157
11.4	Udział w konferencjach	157
11.5	Nagrody	158
11.6	Udział w projektach	158

1. Wstęp

Narastający problem oporności mikroorganizmów na antybiotyki i chemioterapeutyki jest wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Każdego roku, pomimo zaawansowanych metod leczenia, rosnącego poziomu ochrony zdrowia i rosnącej świadomości społecznej na temat farmakoterapii, wzrasta liczba zgonów spowodowanych przez szczepy bakterii opornych na antybiotyki [1]. Jest to niewątpliwie przyczyną poszukiwania nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym, a obszar badań związany z wykorzystaniem metali szlachetnych w medycynie jako alternatywy w walce z infekcjami, powraca. Badania nad takimi pierwiastkami jak: miedź, cynk, tytan, nikiel, magnez, złoto i srebro przynoszą nadzieję na skuteczne metody w walce z infekcjami [1-3]. Wśród wymienionych metali srebro jest szczególnie szeroko stosowanym w medycynie i posiadającym dobrze udokumentowane działanie przeciwbakteryjne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym, grzybom, pierwotniakom i wirusom [4]. Liczne badania wykazały, że zarówno jony metali, jak i ich kompleksy wykazują działanie antybakteryjne, cytotoksyczne i genotoksyczne. Właściwości te, zwłaszcza w odniesieniu do związków koordynacyjnych z dobrze znanymi ligandami, są nadal przedmiotem szeroko zakrojonych badań w poszukiwaniu skutecznych leków w leczeniu różnych chorób o etiologii bakteryjnej oraz nowotworów. Wiele zespołów naukowych, w tym Zespół Profesora Justyna Ochockiego przeprowadził liczne badania, w których zgłaszano cytotoksyczny i genotoksyczny potencjał jonów metali i ich kompleksów w kierunku prawidłowych i nowotworowych komórek. Wykazano również większą stabilność związków koordynacyjnych zawierających jony metali, w porównaniu z solami tych metali, wchodzącymi w strukturę związku, a wykazującymi niejednokrotnie również działanie biologiczne czynne [5-10]. Niezależnie od właściwości samej substancji czynnej jej działanie wynika od sposobu aplikacji u pacjenta, co odbywa się poprzez stworzenie właściwej postaci leku. Odpowiednie rozdrobnienie, dobrze dobrany rozpuszczalnik czy podłoże są fundamentalnymi parametrami, które decydują o pożądanym działaniu na patogen, z wykorzystaniem należytego wchłaniania, osiągnięcia odpowiedniego stężenia i wreszcie właściwej reakcji wynikającej z samego mechanizmu działania substancji leczniczej.

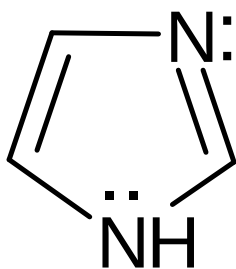
2. Część teoretyczna

2.1 Azole i ich pochodne

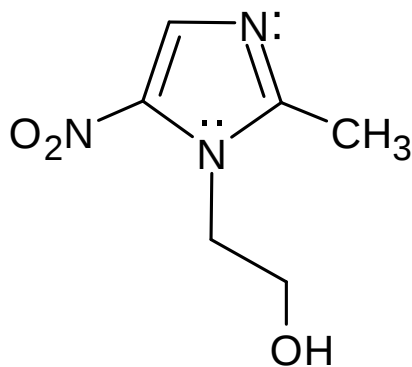
Mianem związków heterocyklicznych określa się związki organiczne, w skład których oprócz atomów węgla wchodzi jeden lub więcej atomów innych pierwiastków – heteroatomów. Przyroda jest bardzo bogata w związki heterocykliczne bowiem stanowią one podstawy strukturalne związków naturalnych takich jak: chlorofil, hemoglobina, alkaloidy, kwasy nukleinowe, enzymy i inne. Wiele z nich wyróżnia aktywność biologiczna, dlatego nie przypadkiem ponad połowa substancji stosowanych jako substancje czynne zawiera w swojej strukturze fragmenty heterocykliczne [11]. Pierścienie heterocykliczne mogą kondensować z różnej wielkości pierścieniami węglowymi albo też innymi heterocyklicznymi. Azole są grupą związków pięcioatomowych, w których przynajmniej jeden z atomów węgla został zastąpiony atomem azotu tworząc układ heterocykliczny. Jeśli obok azotu w skład heterocyklu wchodzi również inne pierwiastki np. siarka, tlen, selen, mówimy odpowiednio o tioazolach, oksazolach i selenoazolach [12].

Właściwości kwasowo-zasadowe związków heterocyklicznych typu azoli wynikają bezpośrednio ze struktury elektronowej heteroatomów. W przypadku pirolu (azolu) para elektronowa heteroatomu, która znajduje się na niechhybrydyzowanym orbitalu p bierze udział w tworzeniu π -elektronowego aromatycznego pierścienia. Pirolowy atom azotu nie jest zdolny do przyjęcia protonu i zachowuje charakter kwasowy. Pirydynowy atom azotu natomiast, w którym para elektronowa występuje na orbitalu o hybrydyzacji sp^2 nie bierze udziału w tworzeniu aromatycznego sektetu. Dzięki temu jest on zdolny do przyjęcia protonu, zatem zachowuje charakter zasadowy, podobnie jak cząsteczka np. amoniaku. Heterocykle jakie zawierają zarówno atomy azotu pirolowe, jak i pirydynowe, wykazują właściwości amfoteryczne.

Imidazol (1,3 – diazol) przedstawiony na **Rys.1** jest przykładem związku o opisanym charakterze. Pochodne imidazolu znalazły szerokie zastosowanie w lecznictwie [13]. Jego metylową, nitrowaną pochodną o zastosowaniu medycznym jest metronidazol (2-metylo-5-nitro-1*H*-imidazo-1-etanol, **Rys.2**). Pirolowy atom azotu został podstawiony 2-hydroksyetylem, natomiast atom azotu pirydynowy, posiadający właściwości zasadowe, jest zdolny do pełnienia funkcji donora w wiązaniu koordynacyjnym z metalami [11].



Rys.1 – Struktura imidazolu



Rys.2 – Struktura metronidazolu

Wśród pochodnych imidazolu dużą grupę leków stanowią związki chemiczne wykazujące właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Ze względu na budowę chemiczną można sklasyfikować je w dwu ważnych kategoriach, jako: antybiotyki nitroimidazolowe oraz imidazolowe leki przeciwgrzybicze, w których grupa nitrowa z reguły nie jest obecna. Podstawienie w imidazolu grupy nitrowej w pozycji 5 wyznacza kierunek działania leku i jest ściśle związana z jego mechanizmem [14,15]. Nitroimidazole są prolekami - aktywacja cząsteczki antybiotyku nitroimidazolowego następuje poprzez redukcję grupy nitrowej. W organizmach anareobowych i mikroaerofilnych zachodzą procesy red-oks związane z występującymi u nich enzymami klasy nitroreduktaz, które klasyfikuje się na 2 typy: niewrażliwe na tlen oraz wrażliwe na tlen. Występują one u bakterii zarówno Gram-dodatnich, jak i u Gram-ujemnych. Istnieją gatunki bakterii posiadające kilka różnych nitroreduktaz np. *Bacteroides fragilis*, która wytwarza cztery enzymy.

Hydrogenosomy to organella występujące w komórkach anaerobowych, które są odpowiednikami mitochondriów i odpowiedzialne są za funkcje energetyczne. Pirogronian i maleinian, obecne w hydrogenosomach, ulegają reakcji dekarboksylacji oksydacyjnej, w wyniku czego powstają elektrony. Dzięki enzymowi oksydoreduktazie pirogronian – ferredoksyna, z pirogronianu powstaje acetylo-CoA, z którego z kolei syntetyzowany jest adenozynotrójfosforan oraz CO₂. Ferredoksyna przenosi elektrony jako białko pełniące tę funkcję w organizmach beztlenowych i mikroaerofilnych. Grupa nitrowa ulega reakcji redukcji w wyniku przejścia elektronów od ferredoksyny. Alternatywnym przenośnikiem elektronów może być flawodoksyna. Cytotoksyczna, zredukowana forma leku jest odpowiedzialna za naruszenie spiralnej struktury drobnoustrojowego DNA, powoduje przerwanie łańcucha i w efekcie śmierć komórki. W rezultacie antybiotyki nitromidazolowe selektywnie działają na bakterie beztlenowe i pierwotniaki, ze względu na fakt, że tylko te organizmy są w stanie wewnątrzkomórkowo przywrócić grupę nitrową. [16,17].

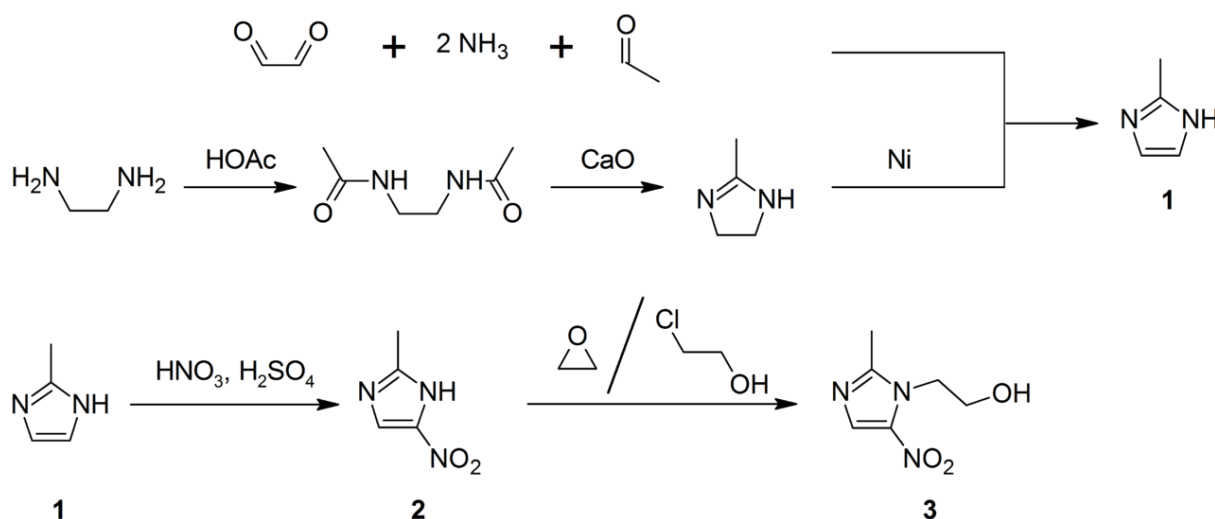
Mechanizm działania, zależny od budowy chemicznej drugiej grupy pochodnych imidazoli jest związany z zaburzeniem syntezy ergosterolu. Imidazolowe leki przeciwgrzybicze są inhibitorami 14a-demetylasy lanosterolu zależnej od cytochromu P450 (CYP450). Jest to bardzo ważny enzym niezbędny w syntezie ergosterolu (prowitamina D₂), która wchodzi w skład błony komórkowej grzybów [18,19] i pełni funkcję podobną do cholesterolu obecnego w komórkach zwierzęcych [20]. Hamowanie tego enzymu prowadzi do gromadzenia się pochodnych metylowanych w pozycji 14a, które nie wykazują budowy polarnej. Następuje zmiana struktury i zaburzenia funkcjonalności błony komórkowej oraz upośledzenie jej przepuszczalności i płynności [21,22]. W następstwie tego zmniejsza się aktywność enzymów błonowych oraz wyciekanie zawartości komórek [23,24]. Nieprawidłowa budowa błony ma negatywny wpływ także na ścianę komórkową grzyba z powodu zahamowania syntezy chityny, substancji stanowiącej główny jej budulec [25]. Ergosterol bezpośrednio stymuluje wzrost komórek grzyba działając jak hormon. Upośledzenie jego syntezy powoduje zahamowanie ogólnego wzrostu grzyba.

2.1.1. Antybiotyki nitroimidazolowe: metronidazol, tinidazol, nimorazol, ornidazol

Metronidazol

Aktywne pochodne imidazolu były poszukiwane i badane przez wiele lat. W 1950 roku metronidazol (MTZ, **Rys.2**) został zsyntetyzowany w Laboratoriach Rhône-Poulenc we Francji [26]. Należy do grup farmakologicznych A01AB17, J01XD01, G01AF01, D06BX01 i P01AB01. Synteza metronidazolu została przedstawiona na **Rys.3**. 2-metyloimidazol (**1**) jest syntetyzowany w reakcji Debus-Radziszewskiego [27] lub z etylenodiaminy i kwasu octowego, potraktowanych tlenkiem wapnia, a następnie niklem Raneya, który pełni funkcję katalizatora szkieletowego. 2-metyloimidazol jest poddawany nitrowaniu z uzyskaniem 2-metylo-5-nitroimidazolu (**2**), który z kolei zostaje zalkilowany za pomocą tlenku etylenu lub 2-chloroetanolu dając metronidazol (**3**) [28-29].

MTZ wykazuje największą aktywność przeciwko beztlenowym bakteriom Gram-ujemnym i nie działa przeciwko bakteriom tlenowym [30].



Rys.3 – Synteza metronidazolu z wykorzystaniem reakcji Debus-Radziszewskiego oraz za pomocą syntezy z etylenodiaminy

Jako środek chemioterapeutyczny jest stosowany w leczeniu zakażeń wywołanych przez większość bakterii beztlenowych i pierwotniaków, takich jak *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* czy *Giardia lamblia*. Znajduje zastosowanie w terapii rzęsiestkowicy układu moczowo-płciowego, pełzakowicy, lambliozy, leczeniu infekcji wywołanych przez *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Gardnerella vaginalis*. Jest szeroko używany również w profilaktyce zakażeń pooperacyjnych oraz leczniczo w stanach wywoływanych przez bakterie beztlenowe: posocznicy, zapaleniu płuc, ropieniach mózgu, zapaleniu otrzewnej, zapaleniu kości i szpiku, gorączce połogowej czy odleżyn i owrzodzeń kończyn dolnych [31]. W terapii skojarzonej z innymi lekami o działaniu przeciwbakteryjnym (amoksycylina, klarytromycyna, tetracyklina) wraz z inhibitorem pompy protonowej (IPP) i opcjonalnie solami bizmutu znalazł zastosowanie w eradykacji *Helicobacter pylori* [32]. Jak wcześniej wspomniałem, mechanizm działania metronidazolu polega na redukcji grupy nitrowej w środowisku o niskiej zawartości tlenu. Powstają wolne rodniki nitrowe, które uszkadzają łańcuch DNA, co prowadzi do zniszczenia komórki drobnoustroju. Produkty lecznicze zawierające MTZ mogą mieć działanie ogólne, poprzez wprowadzenie doustne lub pozajelitowe (dożylnie w postaci roztworów do iniekcji i infuzji) lub miejscowe na skórę, dopochwowe, doodbytnicze, w odpowiednich postaciach, takich jak: tabletki dopochwowe, czopki, krem, żel lub maść [33]. W infekcjach bakteriami beztlenowymi dzienne dawki zwykle stosowane u dorosłych i osób powyżej 12 r.ż. wynoszą od 750 do 1500 mg, podczas gdy dla dzieci w wieku od 8 tygodni do 12 roku życia dawkę ustala się stosownie do masy ciała i wynosi ona zwykle 20-30 mg/kg. Leku nie stosuje się w takich wskazaniach dłużej niż 7 dni. Po

podaniu doustnym po posiłku 250 mg, 500 mg lub 2 g, u zdrowych ochotników maksymalne stężenie w osoczu jest osiągane w czasie 1-3 godzin i wynosi odpowiednio 4,6-6,5 µg/ml, 11,5-13 µg/ml i 30-45 µg/ml. Szybkość wchłaniania i maksymalne stężenie metronidazolu w surowicy są zależne od posiłku. Około 20% metronidazolu wiąże się z białkami. MTZ jest intensywnie wchłaniany z przewodu pokarmowego. Rozprowadzany jest łatwo do wszystkich tkanek, w tym ośrodkowego układu nerwowego, kości, mleka matki i nasienia. Przenika również przez barierę łożyskową. U osób z prawidłową czynnością wątroby i nerek biologiczny okres półtrwania wynosi 6-8 godzin [32].

Głównym miejscem metabolizmu MTZ jest wątroba, gdzie ulega on sprzęganiu z kwasem glukuronowym, utlenieniu i hydroksylacji. W rezultacie powstaje 2-hydroksymetronidazol jako główny metabolit, który również wykazuje działanie przeciwbakteryjne. MTZ jest wydalany przez nerki w 60-80% i w 6-15% z kałem. Jego metabolity są łatwo rozpuszczalne w wodzie, są barwne, dlatego terapia może zmienić kolor moczu na czerwono-brązowy [32]. Lek często powoduje zaburzenia żołądkowe i jelitowe w postaci nudności, wymiotów, biegunki, metalicznego posmaku w jamie ustnej lub bólu brzucha. Do rzadkich skutków ubocznych należą: zaburzenia układu nerwowego (drgawki, encefalopatia, ataksja, bóle głowy) oraz zaburzenia hematologiczne (leukopenia, trombocytopenia, neutropenia, agranulocytoza i pancytopenia). Zdarzały się również rzadkie przypadki infekcji grzybiczych układu rozrodczego, bólu mięśni, zwiększonej aktywności enzymów wątrobowych, wysypki, świądu, zaczerwienienia i niewyraźnego widzenia. Po spożyciu alkoholu metronidazol może wywołać reakcję disulfiramową, charakteryzującą się nudnościami, wymiotami, przegrzaniem i przyspieszeniem akcji serca. Może też nasilać działanie leków przeciwzakrzepowych, np. warfaryny ze względu na hamowanie jej metabolizmu [34]. Leki oddziałujące na mikrosomalne enzymy wątroby mogą przyspieszać wydalanie metronidazolu, zmniejszając jego stężenie we krwi (fenytoina, fenobarbital) lub wydłużać jego okres półtrwania, np. cymetydyna, co w konsekwencji zwiększa ryzyko działań niepożądanych ze strony układu nerwowego. MTZ należy do klasy B zgodnie z klasyfikacją leków opracowaną przez FDA (Food and Drug Administration) pod względem bezpieczeństwa w ciąży, co oznacza, że badania na zwierzętach nie wykazały szkodliwego wpływu na płód, ale nie potwierdzono wpływu na ciążę u człowieka. Ze względu na przenikanie przez barierę łożyskową i potencjalne działanie mutagenne w badaniach na zwierzętach jest lekiem niewskazanym w I trymestrze ciąży, natomiast w kolejnych trymestrach może być stosowany tylko i wyłącznie wtedy, gdy ewentualne korzyści z jego przyjmowania przewyższają ryzyko wystąpienia działań niepożądanych i szkodliwego wpływu na płód [32, 35]. Produkty lecznicze

dopuszczone do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, zawierające MTZ jako pojedynczy składnik oraz jako składnik leków złożonych przedstawiono w **tabeli 1**.

Nazwa handlowa	Skład	Postać leku	Dawka, stężenie	Droga podania	ATC	Stosowanie i dostępność
Arilin Rapid ®	Metronidazolum	Globulki dopochwowe	1000 mg	p.vag.	G01FA01	Ludzie - Rx
Eradia ®	Metronidazolum	Zawiesina doustna	125 mg/ml	p.o.	QP51AA01	Pies – WET
Grinazole ®	Metronidazolum	Pasta dentystyczna	100 mg/ml	ext.	A01A	Ludzie – Gab.stom.
Metrobactin ®	Metronidazolum	Tabletki	250 mg lub 500 mg	p.o.	QP51AA01 QJ01XD01	Pies, kot – WET
Metrocare ®	Metronidazolum	Tabletki	250 mg lub 500 mg	p.o.	QP51AA01	Pies, kot – WET
Metronidazol 0,5% Fresenius ®	Metronidazolum	Roztwór do infuzji	5 mg/ml	i.v.	J01XD01	Ludzie - Rx
Metronidazol 0,5% Polpharma ®	Metronidazolum	Roztwór do wstrzykiwań i infuzji	5 mg/ml	i.v.	J01XD01	Ludzie - Rx
Metronidazol Chema	Metronidazolum	Maść	100 mg/g	ext.	A01AB17	Ludzie - Rx
Metronidazole B. Braun ®	Metronidazolum	Roztwór do infuzji	5 mg/ml	i.v.	J01XD01	Ludzie - Rx
Metronidazol Jelfa ®	Metronidazolum	Żel	10 mg/g	ext.	D06BX01	Ludzie - Rx
Metronidazol Polpharma ®	Metronidazolum	Tabletki	250 mg lub 500 mg	p.o.	J01XD01 P01AB01	Ludzie - Rx
Metronidazol Polpharma ®	Metronidazolum	Tabletki dopochwowe	500 mg	p.vag.	G01AF01	Ludzie - Rx
Metrovis ®	Metronidazolum	Tabletki	100 mg lub 250 mg	p.o.	QP51AA01	Pies, kot - WET
Metrovis ®	Metronidazolum	Tabletki	750 mg	p.o.	QP51AA01	Pies - WET
Rozex ®	Metronidazolum	Żel	7,5 mg/g	ext.	D06BX01	Ludzie - Rx
Rozex ®	Metronidazolum	Krem	7,5 mg/g	ext.	D06BX01	Ludzie - Rx
Rozex ®	Metronidazolum	Emulsja na skórę	7,5 mg/g	ext.	D06BX01	Ludzie - Rx
Gynalgin ®	Metronidazolum + Chlorquinaldolum	Tabletki dopochwowe	250 mg + 100 mg	p.vag.	G01AF20	Ludzie - Rx
Stomorgyl 20 ®	Metronidazolum + Spiramycinum	Tabletki powlekane	250 mg + 1 500 000 j.m	p.o.	QJ01RA04	Pies - WET

Tabela 1. Produkty lecznicze dopuszczone do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej z uwzględnieniem drogi podania, postaci leku, indeksu ATC i przeznaczenia

Obecne, XII wydanie Farmakopei Polskiej zawiera dwie monografie szczegółowe: metronidazolu i benzoesanu metronidazolu (**Tab.2**) [36].

Nazwa zgodna z monografią FP XII	Nazwa według definicji	Właściwości		Droga podania	Dawki w gramach			
		wygląd	rozpuszczalność		zwykle stosowane		maksymalne	
					jedn.	dobowa	jedn.	dobowa
Metronidazolum	2-(2-Metylo-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-ilo)etanol	Biały lub żółtawy, krystaliczny proszek	Substancja trudno rozpuszczalna w wodzie, w acetonie, w etanolu (96%) i w chlorku metylenu	p.vag.	0,5	1,0	1,0	1,5
				p.r.	1,0	1,0	1,0	2,0
				p.o.	0,5	1,0	1,0	2,0
				i.v.	0,5	1,0	1,0	4,0
				p.o.	0,4	1,6	-	2,0

Metronidazoli benzoas	2-(2-Metylo-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-ilo)etylu benzoesan	Biały lub jasnożółtawy, krystaliczny proszek lub płatki	Substancja praktycznie nierozpuszczalna w wodzie, łatwo rozpuszczalna w chloru metylenu, rozpuszczalna w acetonie, trudno rozpuszczalna w etanolu (96%)	p.r.	1,0	1,0	1,0	2,0
				i.v.	0,5	1,0	1,0	2,0

Tabela 2. Monografie metronidazolu i benzoesanu metronidazolu FP XII

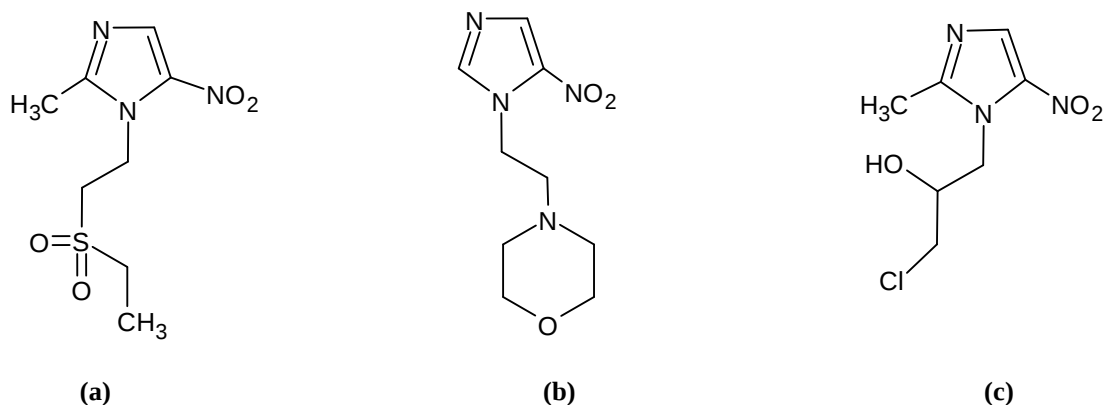
Tinidazol, nimorazol, ornidazol

Tinidazol (1-(2-etylosulfonyloetylo)-2-metylo-5-nitro-imidazol, **Rys.4a**) jest metyloowaną pochodną imidazolu zawierającą podstawnik 2-etylosulfonyloetylowy przy atomie azotu w położeniu 1. Wykazuje szerokie spektrum działania przeciwpierwotniakowego i przeciwbakteryjnego. Działa na *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* i *Giardia lamblia*. Wykazuje również działanie na *Helicobacter pylori*, *Gardnerella vaginalis* oraz działa bakteriobójczo na większość bakterii beztlenowych, takich jak: *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacterioides spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.* i *Veillonella spp.* Grupa farmakoterapeutyczna: leki przeciwbakteryjne do stosowania ogólnego, pochodne imidazolu, kod ATC: J01XD02 [37]. Tinidazol może być alternatywą terapeutyczną w przypadku nietolerancji metronidazolu.

Nimorazol (4-[2-(5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-etylo]-morpholina, **Rys.4b**) jest syntetycznym antybiotykiem i lekiem przeciwpierwotniakowym o szerokim spektrum działania. Jak inne pochodne nitroimidazolowe wykazuje działanie bakteriobójcze związane z zaburzeniami procesów replikacji DNA w komórkach bakterii i pierwotniaków. Rzęsistek pochwoy, ameba, lamblia i inne bakterie beztlenowe, w tym *Bacteroides spp.* są wrażliwe na działanie nimorazolu. Jest również wskazany w ostrym wrzodziejącym zapaleniu dziąseł i zapaleniu pochwy wywołanym przez *Gardnerella vaginalis*. W Polsce produkty lecznicze zawierające nimorazol nie są dostępne, podobnie jak w innych państwa Unii Europejskiej. Był produkowany przez firmę Pfizer na rynek europejski w postaci tabletek dopochwowych w dawce 500mg.

Ornidazol (1-chloro-3-(2-metylo-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-propan-2-ol, **Rys.4c**) jest antybiotykiem stosowanym w leczeniu zakażeń pierwotniakowych [38]. Ten syntetyczny nitroimidazol jest otrzymywany z 2-metylo-5-nitroimidazolu i epichlorohydryny w wyniku

reakcji katalizowanej kwasem [39]. Spektrum przeciwdrobnoustrojowe jest podobne do metronidazolu, ale lek jest dużo lepiej tolerowany [38], natomiast istnieją obawy o niższą względną skuteczność [40]. Po raz pierwszy został wprowadzony do leczenia rzęsistkowicy, zanim zostało poznane jego szerokie spektrum działania przeciwprzetrwotniakowego i przeciw bakteriom beztlenowym [41]. Badano go również pod kątem stosowania w chorobie Leśniowskiego-Crohna po resekcji jelit. Ornidazol jest lekiem niezarejestrowanym w Polsce, natomiast niezwykle popularnym w krajach wschodnich. Na Ukrainie stosuje się zarówno roztwór do wlewów dożylnych, jak i tabletki doustne [42,43]. Formy leków dopochwowych w kombinacjach z nystatyną, neomycyną i prednizolonem są zarejestrowane i stosowane w krajach byłego Związku Radzieckiego [44].

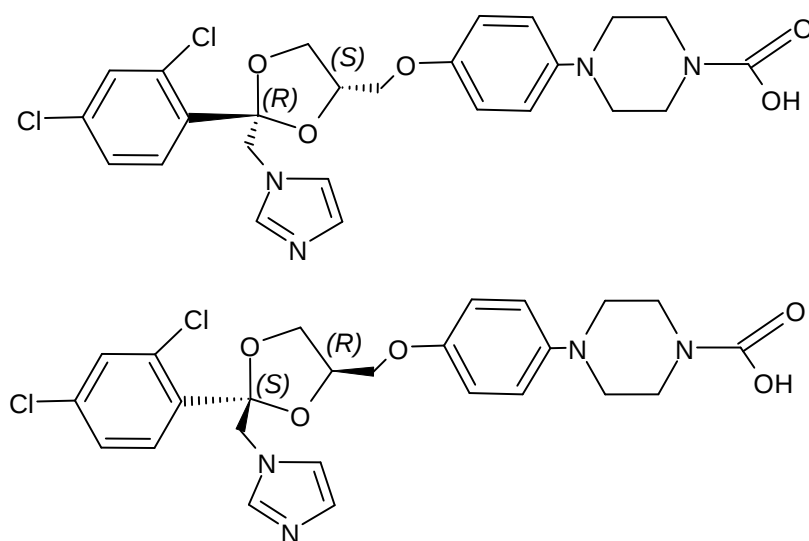


Rys.4 – Struktury nitrowanych pochodnych imidazolu N-podstawionych – tinidazolu (a), nimorazolu (b) i ornidazolu (c)

2.1.2 Imidazolowe leki przeciwgrzybicze: ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, bifonazol, butokonazol, ekonazol, izokonazol

Brak grupy nitrowej w pochodnych imidazolu oraz odpowiedni podstawnik, dość duży w porównaniu z pochodnymi nitroimidazolowymi, przy atomie azotu w pozycji 1, daje grupę leków imidazolowych wykazujących działanie przeciwgrzybicze, których mechanizm został wcześniej przedstawiony. Poniżej krótka charakterystyka substancji stosowanych w leczeniu, które klasyfikuje się w tej grupie.

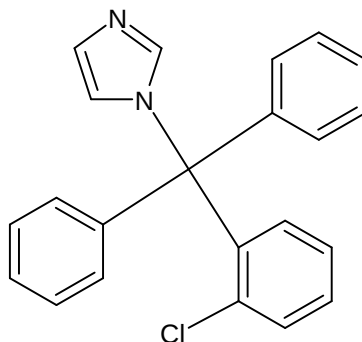
Ketokonazol, posiadający dwie enancjomeryczne formy (**Rys.5**), został po raz pierwszy zsyntetyzowany w 1976 roku w laboratorium belgijskiej firmy Janssen Pharmaceuticals, opatentowany w 1977 roku przez tę firmę, a wszedł do użytku medycznego w 1981 roku [45]. Jest dostępny na całym świecie w postaci leków generycznych i preparatów bez recepty, które są stosowane na skórę, przede wszystkim pod nazwą handlową Nizoral®. W 2017 roku był najczęściej przepisywanym lekiem w Stanach Zjednoczonych, z ponad dwoma milionami recept. Terapia doustna ketokonazolem została wycofana w Unii Europejskiej i Australii w 2013 roku, a w Chinach w 2015 zgodnie z zaleceniem Europejskiej Agencji Leków. Argumentem było stwierdzenie, iż korzyści ze stosowania doustnych leków zawierających ketokonazol nie przeważają nad ryzykiem uszkodzenia wątroby w leczeniu infekcji grzybiczych. Ketokonazol do stosowania miejscowego (np. kremy, maści, szampony) nadal może być stosowany, gdyż ilość wchłanianego ketokonazolu jest bardzo niewielka w przypadku tych postaci leku [46].



Rys.5 – Struktura enancjomerów ketokonazolu: (2*R*,4*S*)-(+) u góry, (2*S*,4*R*)-(-) u dołu

Klotrimazol (Rys.6) - jest syntetycznym lekiem przeciwgrzybiczym należącym do podgrupy imidazoli przeznaczonym wyłącznie do użytku zewnętrznego. Jest stosowany w praktyce medycznej od 1969 roku [47] i został stworzony w laboratorium niemieckiej firmy Bayer jako Canesten® [48]. W małych stężeniach wykazuje działanie grzybobójcze na dermatofity: *Epidermophyton spp.*, *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, drożdżaki: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia furfur* oraz *Aspergillus spp.* i pleśnie [49].

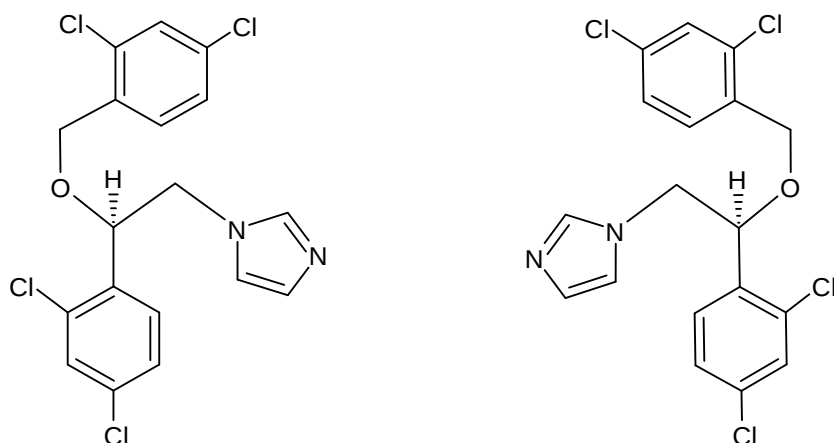
Działa również na grzyby dymorficzne: *Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis*, *Sporotrichum scheneckii*. Wywiera słabe działanie przeciwbakteryjne na: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium minutissimum* oraz przeciwgrzęstkowe na *Trichomonas vaginalis*.



Rys.6 – Struktura klorimazolu

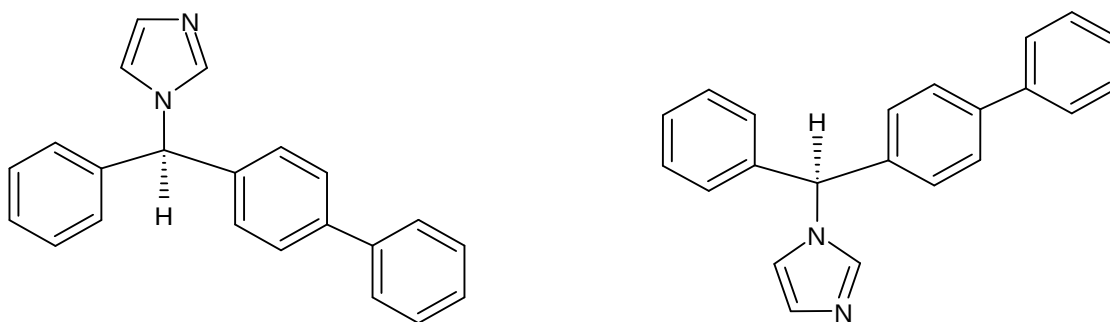
Mikonazol jest mieszaniną racemiczną enancjomerów przedstawionych na **Rys.7**. Został po raz pierwszy zsyntetyzowany w laboratorium belgijskiej firmy Janssen Pharmaceutica, opatentowany w 1968 r. i zatwierdzony do użytku medycznego w 1971 [50]. Znajduje się na liście podstawowych leków Światowej Organizacji Zdrowia [51]. Wrażliwe na działanie leku są: *Candida spp*, *Malassezia spp.*, *Trichophyton spp.*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus spp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporum spp.*, *Penicillium crustaceum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Petriellidium boidii*. Część bakterii Gram-pozytywnych również wykazuje wrażliwość na mikonazol. Lek stosowany w leczeniu grzybicy stóp, grzybicy woszczynowej, drożdżycy oraz czasami w zapaleniu kącików ust. Działanie przeciwdrobnoustrojowe i cytotoksyczne związków kompleksowych mikonazolu z solami srebra(I) zostało ocenione w pracach Stryjskiej i wsp. [52,53]. Mikonazol zarejestrowany jest w Polsce w postaci preparatów do użytku zewnętrznego oraz w postaci żelu doustnego pod nazwą Daktarin® [54].

Bifonazol (**Rys.8**) wykazuje działanie grzybobójcze, grzybostatyczne oraz przeciwbakteryjne. Stosowany jest przeciwko dermatofitom, drożdżom, pleśniom oraz innym grzybom, takim jak np. *Malassezia furfur*. Wykazuje także działanie przeciwko *Corynebacterium minutissimum*, które wywołują łupież rumieniowy.



Rys.7 – Struktura enancjomerów mikonazolu

Jest inhibitorem cytochromu P450 17A1 (CYP17A1), który katalizuje syntezę wszystkich ludzkich androgenów [55]. Hamuje syntezę ergosterolu na dwóch różnych poziomach, poprzez blokowanie demetylacji 24-metylenodihydrolanosterolu oraz przemianę 3-hydroksy-3-metylo-glutarylokoenzymu A (HMG-CoA). Wyróżnia się w ten sposób zarówno spośród pochodnych imidazolu, jak i innych leków przeciwgrzybiczych, które działają tylko na jednym poziomie. Hamowanie syntezy ergosterolu prowadzi do strukturalnej i funkcjonalnej niewydolności błony cytoplazmatycznej.



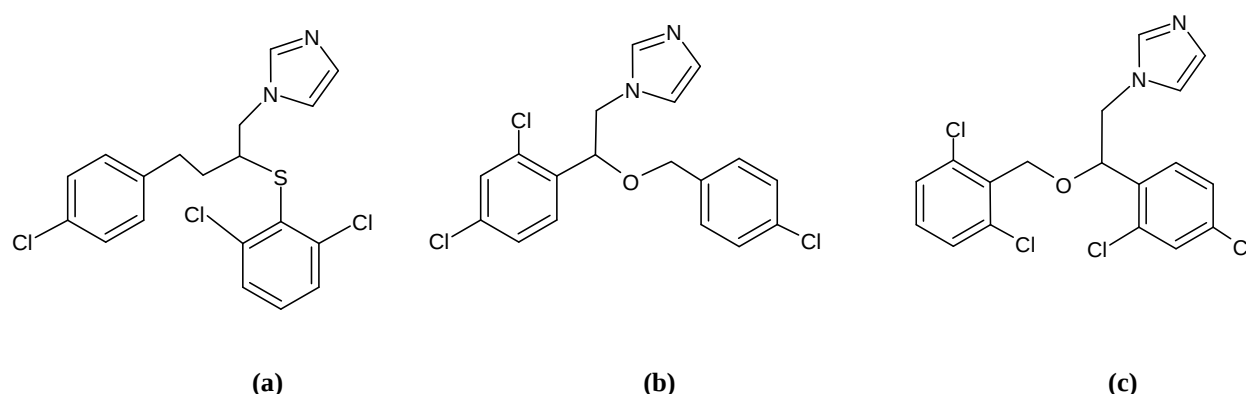
Rys.8 – Struktura stereoizomerów bifonazolu (*R*) z lewej, (*S*) z prawej

Butokonazol wykazuje działanie zarówno grzybobójcze, jak i grzybostatyczne w zależności od zastosowanego stężenia. Wrażliwe na działanie substancji są: *Candida spp.*, *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, *Epidermophyton spp.* Część bakterii Gram-pozytywnych wykazuje wrażliwość na działanie butokonazolu. Stosowany jest wyłącznie do użytku zewnętrznego w postaci kremu waginalnego [56,57].

Ekonazol został opatentowany w 1968 roku, a wprowadzony do lecznictwa w 1974 r. [50]. Jest sprzedawany pod nazwą Spectrazole® (USA) i Ecostatin® (Kanada), wchodzi wraz z trimcinolonem w skład preparatu Pevisone® i Ecoderm® dostępnych w Europie.

Izokonazol wykazuje aktywność w stosunku do: *Candida spp*, *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, *Epidermophyton spp.*, *Pityrosporum orbiculare*. Działaniu leku ulega również część bakterii Gram-pozytywnych : *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium minutissimus*. W leczeniu zakażeń grzybiczych stóp i w ginekologii wykazuje podobne działanie do klotrimazolu [58,59]. Azotan izokonazolu może być stosowany w połączeniach z difluorokortolonem w celu zwiększenia jego biodostępności [60]. Lek został opatentowany w 1968 roku, a w lecznictwie znajduje się od 1979 r. [50].

Struktury butokonazolu, ekonazolu i izokonazolu zostały przedstawione na **Rys.9**.



Rys.9 – Struktury N-podstawionych pochodnych imidazolu – butokonazolu (a), ekonazolu (b) i izokonazolu (c)

2.2 Srebro i jego sole

Srebro jest miękkim, kowalnym metalem o charakterystycznym srebrnym połysku. Nie reaguje z wodą i tlenem. Stopnie utlenienia srebra [61-63] przedstawia **tabela 3**.

stopień utlenienia	konfiguracja	przykłady związków
Ag ⁰	d ¹⁰ s ¹	Rzadki; Ag(CO) ₃ w 10 K
Ag ¹	d ¹⁰	Ag ₂ O, Ag(OH) ₂ ⁻ (aq.), Ag(H ₂ O) ₄ ⁺ , AgF, AgCl, sole Ag ⁺ np. AgNO ₃ , Ag ₂ SO ₄ , Ag ₂ S. Ag(CN) ₂ ⁻ i inne kompleksy

Ag ^{II}	d ⁹	AgF ₂ , [Ag(C ₅ H ₅ N) ₂] ⁺ , natomiast w AgO występuje Ag ^I i Ag ^{III} , a nie Ag ^{II} , AgSO ₄
Ag ^{III}	d ⁸	Rzadki; AgF ₄ ⁻ , AgF ₆ ³⁻

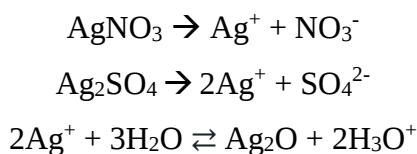
Tabela 3. Stopnie utlenienia srebra (pogrubiono i wyróżniono najistotniejszy)

Większość soli srebra(I), zarówno nieorganicznych, jak i organicznych, jest słabo rozpuszczalna w wodzie. Spośród nich jedynie nadchloran, azotan i fluorek wykazują bardzo dobrą rozpuszczalność, octan, nadmanganian i siarczan rozpuszczają się słabo (**Tab.4**) [64].

Sól srebra(I)	Wzór sumaryczny	Rozpuszczalność w temp. 25°C (g/100g H ₂ O)
Nadchloran	AgClO ₄	500,0
Azotan	AgNO ₃	257,0
Fluorek	AgF	100,0
Octan	CH ₃ COOAg	1,11
Nadmanganian	AgMnO ₄	0,9
Siarczan	Ag ₂ SO ₄	0,83
Azotyn	AgNO ₂	0,42
Bromian	AgBrO ₃	0,16
Salicylan	C ₆ H ₄ (OH)COOAg	0,095 (w temp. 23 °C)
Jodan	AgIO ₃	0,044
Dwuchromian	Ag ₂ Cr ₂ O ₇	0,0083 (w temp. 15 °C)
Chromian	Ag ₂ CrO ₄	0,0035
Węglan	Ag ₂ CO ₃	0,0033
Cytrynian	C ₆ H ₅ O ₇ Ag ₃	0,00284
Fosforan	Ag ₃ PO ₄	0,000644
Chlorek	AgCl	0,000193
Stearynian	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOAg	0,000065
Siarczek	Ag ₂ S	0,000014
Bromek	AgBr	0,0000135
Jodek	AgI	0,00000026
Cyjanek	AgCN	0,00000023

Tabela 4. Rozpuszczalność soli srebra(I) w wodzie

Woda, będąca najpopularniejszym, najbardziej dostępnym, najekonomicznym medium reakcyjnym, daje możliwość dysocjacji elektrolitycznej soli, szczególnie dobrze rozpuszczalnych w wodzie. Srebro jest metalem ciężkim, a jego dobrze rozpuszczalne sole takie jak azotan czy siarczan ulegają reakcji daleko posuniętej hydrolizy w środowisku wodnym zgodnie z równaniami reakcji:



Roztwory wodne dobrze rozpuszczalnych soli srebra(I) wykazują zatem odczyn kwasowy. Jest to szczególnie istotne w aspekcie formulacji postaci leku np. kropli do oczu, które stanowią roztwór rzeczywisty. Zbyt niskie pH może prowadzić do podrażnień spojówki, chociaż zgodnie z monografiąmi kropli ocznych pH kropli może wahać się od 3,5-8,5 [65, 66].

2.3 Zastosowanie srebra i jego soli w medycynie i farmacji

Wśród metali srebro jest szczególnie szeroko stosowane w medycynie i ma dobrze udokumentowane działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym, grzybom, pierwotniakom i wirusom [67]. W medycynie srebro i jego związki są stosowane jako leki od dawna [68]. Duże nadzieje naukowców nadal wiąże się z jonami srebra, chociaż jego preparaty są używane od czasów starożytnych do gojenia ran. Najbardziej powszechne to: azotan srebra(I) [36], sól srebrowa sulfadiazyny i sól srebrowa sulfatiazolu. Stosuje się ponadto preparaty srebra zawierające srebro koloidalne: kolargol, protargol oraz targezynę (**Tab.5**). Właściwości farmakologiczne preparatów srebra determinuje specyficzna aktywność biologiczna jonów srebra(I), które powstają w wyniku dysocjacji jego związków. Azotan srebra(I) *per se* lub w postaci stężonych (10-50%) roztworów wodnych jest używany do kauteryzacji tkanek lub do impregnacji zębiny. Wykazano również, że jony srebra(I) wywierają działanie cytotoksyczne i genotoksyczne na różne komórki ludzkie poprzez wytwarzanie stresu oksydacyjnego [69, 70].

skład	Nazwa - postać	stężenie	zastosowanie	Kategoria dostępności
Azotan srebra(I) z azotanem potasu	Lapis - sztyft	97%	Kauteryzacja tkanek	OTC
Azotan srebra(I)	Mova Nitrat Pipette ® - krople oczne	10mg/ml	Zabieg Credégo	LZ
Azotan srebra(I)	Substancja krystaliczna do receptury	-	Składnik leków recepturowych	Rx
Sól srebrowa(I) sulfadiazyny	Dermazin ® , Silvadene ®- krem	10mg/g	Oparzenia wszystkich stopni i rozmiarów	Brak rejestracji w PL
Sól srebrowa(I) sulfatiazolu	Argosulfan ® - krem	20mg/g	Oparzenia wszystkich stopni i rozmiarów	Rx

Silnie rozdrobnione srebro(0) z białkiem lub żelatyną	Kolargol, <i>Argentum colloidal</i> , <i>Collargolum</i> , <i>Corgolum</i> – substancja do receptury	-	Składnik leków recepturowych	Rx
Organiczny kompleks srebra(I) z białkiem	Protargol, <i>Argentum proteinicum</i> , <i>Protargolum</i> , <i>Prorgolum</i> – substancja do receptury	-	Składnik leków recepturowych	Rx
Diacetylotaninobiałczan srebra(I)	Targezyna <i>Targesinum</i> , <i>Argentum diacetylotannicum albuminatum</i> – substancja do receptury	-	Składnik leków recepturowych	Brak rejestracji w PL

Tabela 5. Preparaty srebra stosowane w medycynie

Na przestrzeni lat wyraźnie widać jak zmieniała się tendencja stosowania preparatów zawierających srebro. Farmakopee Polskie, począwszy od pierwszej powojennej jako edycja II, która jest przedrukiem z 1946 r. wydania przedwojennego, a zakończywszy na najnowszej, XII edycji, zawierają monografie preparatów srebra stosowanych w lecznictwie i używanych w recepturze aptecznej. Farmakopea Polska II zawiera największą ilość monografii preparatów srebra, które przedstawia **tabela 6** [71].

Nazwa według monografii FP II	Nazwa polska	Synonimy FP II	Opis (pisownia oryginalna)	Postać i własności (pisownia oryginalna)
Argentum colloidale	Srebro koloidalne	Corgol, Collargol	Srebro koloidalne powinno zawierać nie mniej niż 70% Ag (c.atom. 107,9), resztę stanowią: białko lub żelatyna oraz niewielka ilość chlorku srebrowego	Ciemnoszare płatki o metalicznym połysku, bez zapachu, o słabym, metalicznym smaku. Srebro koloidalne powoli rozpuszcza się w wodzie. Roztwór srebra koloidalnego w 50 cz. wody jest nieprzezroczysty, w świetle zaś odbitym – mętny; po rozcieńczeniu dużą ilością wody staje się przezroczysty, w świetle odbitym jest jednak nadal mętny.
Argentum gelatinosum	Żelatynian srebrowy	Argentum gelatosatum, Gelargin, Albargin, Gelatinian srebrowy	Żelatynian srebrowy powinien zawierać nie mniej niż 14,6% i nie więcej niż 15% Ag (c.atom. 107,9)	Żółtawy, mialki, połyskujący proszek bez zapachu, o słonawo-mdłym smaku. Żelatynian srebrowy łatwo rozpuszcza się w wodzie dający roztwory o odczynie obojętnym lub słabo kwaśnym.
Argentum nitricum	Azotan srebrowy	Argenti nitras, Argentum nitricum crystallisatum, Lapis infernalis, Lapis, Kamień piekielny	Preparat powinien zawierać nie mniej niż 99,6% AgNO ₃	Bezbarwne, bezwonne, przezroczyste tabliczki układu romboidalnego. Azotan srebrowy rozpuszcza się w 0,5 cz. wody, w 15 cz. spirytusu; bardzo trudno rozpuszcza się w eterze i glicerynie. P.topn. około 208°. Azotan srebrowy w temp. 208° ma postać żółtawej cieczy, która po zastygnięciu tworzy białą, krystaliczną masę; ogrzewany w temp. wyższej niż 208° stopniowo rozkłada się wydzielając brunatne dymy.

Argentum nitricum cum Kalio nitrico	Azotan srebowy z azotanem potasowym	Argenti nitras et Kalii nitras, Argentum nitricum fusum mitigatum, Lapis infernalis mitigatus	Azotan srebowy z azotanem potasowym powinien zawierać nie mniej 32,3% i nie więcej niż 33,5% AgNO_3 (c.c.z. 169,9); resztę stanowi azotan potasowy.	Białe lub szarawo-białe, bezwonne, twarde łaseczki o gładkim przełomie, bardzo łatwo rozpuszczalne w wodzie.
Argentum nitricum fusum	Topiony azotan srebowy	Argenti nitras fusus	Topiony azotan srebowy powinien zawierać nie mniej niż 94,5% i nie więcej niż 95,5% AgNO_3 (c.c.z. 169,9); resztę stanowi azotan potasowy.	Białe lub zaledwie szarawe, bezwonne łaseczki o krystalicznym przełomie. Topiony azotan srebowy bardzo łatwo rozpuszcza się w wodzie.
Argentum proteinicum	Proteinian srebowy	Argentum proteinatum, Prorgol, Protargol	Proteinian srebowy powinien zawierać nie mniej niż 8% i nie więcej niż 8,4% Ag (c.atom. 107,9).	Żółto-brunatne, błyszczące łuski lub żółto-brunatny, mączki proszek niemal bez zapachu, o smaku najpierw mdłym, po czym metalicznym. Proteinian srebowy łatwo rozpuszcza się w wodzie dając roztwory o słabo zasadowym odczynie.

Tabela 6. Monografie preparatów srebra FP II

FP III z 1954 roku nie zawiera już monografii Argentum colloidalne, Argentum gelatinosum i Argentum nitricum fusum [72]. Kolejne wydania farmakopei wprowadzają natomiast monografię Argentum colloidalne, substancji, która stosowana jest również w czasach obecnych. FP XII [36] przedstawia monografię srebra koloidalnego w taki sposób:

ARGENTUM COLLOIDALE AD USUM EXTERNUM

Srebro koloidalne do użytku zewnętrznego

Silver, colloidal, for external use; Argent colloïdal pour usage externe

DEFINICJA

Koloidalne, metaliczne srebro zawierające białko.

Zawartość: od 70,0% do 80,0% Ag (w przeliczeniu na wysuszoną substancję).

WŁAŚCIWOŚCI

Wygląd: zielone lub niebieskawoczarne, metalicznie połyskujące płatki lub proszek, higroskopijny.

Rozpuszczalność: substancja łatwo rozpuszczalna lub rozpuszczalna w wodzie, praktycznie nierozpuszczalna w etanolu (96%) i w chlorku metylenu.

W FP XII monografia azotanu srebra(I) nadal jest obecna pomimo upływu blisko 70 lat od wydania II edycji Farmakopei Polskiej. W farmakopeach innych państw można odszukać monografie także i innych preparatów srebra. Obok azotanu srebra i proteinianu srebra, JP XVII

zawiera ciekawą monografię roztworu proteinianu srebra, o zawartości od 0,22-0,26% srebra, w skład którego wchodzi również woda miętowa i gliceryna, które można uznać za *corrigens* [73]. Opisany, farmakopealny produkt leczniczy znajduje zastosowanie jako antyseptyczny płyn do odkażania jamy ustnej w przebiegu chorób związanych z zapaleniem gardła.

Preparatem srebra, którego monografia nigdy nie trafiła do żadnej z edycji FP, jest targezyna (Argentum diacetyltanninoalbuminum, koloidalny kompleks dwuacetylotanino-srebrowy). Informator Terapeutyczny do Urzędowego Spisu Leków (USL), oficjalnego dokumentu urzędowego PRL z 1959 r., podaje jednak opis preparatu [74]:

Substancja o działaniu bakteriobójczym i ściągającym, zarówno w podawaniu p.o., jak i w stosowaniu zewnętrznym. Stosuje się w nieżytach spojówek i błon śluzowych; w rzeżączce. Do wewnątrz w chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Zewnętrznie w roztworach, maściach 0,5-4%. Wewnętrznie 1-2% roztwór podawać łyżkami stołowymi.

Obok powyższego opisu Informator Terapeutyczny wylicza inne, będące w obrocie aptecznym, opisane w FP III u schyłku lat 50-tych XX wieku, preparaty srebra, które stosowane były zgodnie ze stanem ówczesnej wiedzy również doustnie. **Tabela 7** przedstawia informacje zawarte w przytoczonym opracowaniu (pisownia oryginalna).

Nazwa preparatu według USL	Skład i odpowiedniki	Działanie	Zastosowanie	Sposób użycia i dawkowanie
Argentum colloidalne subst.	Zawiera 70% srebra (Argentum) dającego koloidalne roztwory; srebro koloidalne; corgol; collargol	Lek wywiera działanie bakteriobójcze, a głównie wstrzymuje rozwój drobnoustrojów w stanach infekcyjnych, poprawia stan ogólny zakażeń, powoduje spadek temperatury.	Zewnętrznie stosuje się w stanach zapalnych błon śluzowych (pochodzenia bakteryjnego), worka spojówkowego – w postaci kropleń i maści oraz do przepłukiwań cewki moczowej i pęcherza moczowego w postaci roztworów. Wewnętrznie stosowany jest rzadko; w ogólnym zakażeniu i w zakaźnym zapaleniu wsierdza, w gorączce tyfoidalnej.	Używa się zewnętrznie do wkraplań do worka spojówkowego w postaci 0,5-1% roztworów, oraz w maściach 1-15%. Do przepłukiwań cewki moczowej i pęcherza moczowego używa się 0,2-1% roztworu. Zewnętrznie głównie w postaci wcierek (Ung. Credé), zastrzyków dożylnych i roztworów.
Argentum nitricum subst.	Lapis infernalis, Argenti nitras, azotan srebra, kamień piekielny	Wewnętrznie wywiera działanie ściągające i przeciwskurczowe. Zewnętrznie: silny środek bakteriobójczy, ściągający i żrący.	Zewnętrznie stosuje się do przyżegania tkanki chorobowo zmienionej. Lek stosowany również w stanach zapalnych błon śluzowych (worka spojówkowego, żołądek, pęcherz moczowy). Wewnętrznie stosowany jest w przewlekłych biegunkach, w chorobie wrzodowej, w miażdżycy, w porażeniu postępowym (rzadko).	Do wkraplania do worka spojówkowego używa się roztwory 0,25-0,5 % - po wkropleniu należy przepłukać solą fizjologiczną (0,9% roztwór wodny Natrium chloratum). Do płukania pęcherza moczowego używane są roztwory 1:1000-1:3000 – po płukaniu należy przepłukać solą fizjologiczną.

				Wewnętrznie: 0,01-0,1% roztwór 3 razy dziennie łyżkę stołową lub w pigułkach (0,01-0,1) na dobę.
Argentum proteinicum subst.	Zawiera 8% srebra (Argentum) organicznie związanego; Proteinian srebra; prorgol; protargol	Wywiera działanie bakteriobójcze i przeciwzapalne, przy zapaleniach błon śluzowych pochodzenia infekcyjnego.	Stosuje się w stanach zapalnych błon śluzowych, worka spojówkowego – w postaci wkraplań i maści oraz do przepłukiwań cewki moczowej i pęcherza moczowego w postaci roztworów. Nadto w owrzodzeniach, w zakaźnych stanach zapalnych błony śluzowej nosa. Wewnętrznie bardzo rzadko stosuje się w nieżycie jelit u dzieci.	Używa się zewnątrznie do wkraplań do worka spojówkowego w postaci 0,5-1% roztworów oraz w maściach 1-15%. Do przepłukiwań cewki moczowej i pęcherza moczowego – używa się 0,2-1%-2% roztworów. Wewnętrznie 0,1-0,3 dziennie.

Tabela 7. Preparaty srebra opisane w Informatorze Terapeutycznym do USL z roku 1959 r.

Obecne, nowe wydania farmakopei wraz z postępem nauk farmaceutycznych, rozwojem toksykologii, farmakokinezyki, farmakodynamiki i chemii leków, podają dawki lub stężenia substancji leczniczych zwykle stosowane i/lub maksymalne. Jest to o tyle ważne, że na przestrzeni lat preparaty srebra zostały przeniesione do wykazu A (środki bardzo silnie działające). FP XII dla preparatów srebra, których monografie zawiera, podaje niżej wymienione wartości przedstawione w **Tab.8:**

Nazwa według monografii FP XII	Nazwa polska	Nazwy w innych językach (zgodnie z Ph.Eur.)	Droga podania	Dawki, stężenia zwykle stosowane	
				jednorazowa	dobowa
Argenti nitras	Azotan srebra	Silver nitrate; Argent (nitrate d')	Zewnętrznie	Na skórę 1,0 – 2,0 % Do przepłukiwań 0,05 – 0,1 % Do worka spojówkowego 0,1 – 0,5 % Noworodkom 1,0 % 1 kropla do worka spojówkowego Do pędzlowania jamy ustnej 1,0 – 2,0 % W stomatologii 10,0 – 20,0 %	
Argentum colloidal ad usum externum	Srebro koloidalne do użytku zewnętrznego	Silver, colloidal, for external use; Argent colloidal pour usage externe	Zewnętrznie	Roztwór 0,2 -1,0 % Maść 1,0 -15,0 %	

Tabela 8. Dawki (stężenia) preparatów według FP XII

Jak doskonale widać odeszło się już od stosowania preparatów srebra wewnątrznie. Jest to związane z jednostką chorobową – argyrią (srebrzycą). Zespół objawów tej choroby wywołany jest niezamierzonym wchłanianiem związków srebra. Głównym symptomem jest zmiana koloru skóry na sino-szary lub lekko fioletowy, szczególnie w miejscach narażonych na działanie promieni słonecznych. Przebarwienia mogą obejmować niektóre obszary skóry lub całą jej powierzchnię. Stan taki może mieć charakter tymczasowy i ustąpić po ustaniu

wchłaniania lub zaprzestaniu przyjmowania srebra. Obecnie nie zaleca się zatem stosowania preparatów doustnie.

Pierwsza wzmianka o zastosowaniu srebra w medycynie pochodzi z czasów starożytnych. Prawdopodobnie już Hipokrates używał preparatów srebra do leczenia wrzodów i owrzodzeń w celu przyspieszenia gojenia się ran. Rozpuszczalne związki srebra(I), takie jak azotan srebra(I), były po raz pierwszy zastosowane empirycznie jako środek oczyszczający krew w latach 702–705 naszej ery [75]. Później, sole srebra(I) były używane jako środek przeciwbakteryjny do leczenia chorób zakaźnych, w tym kiły i rzeżączki, infekcji mózgu, epilepsji, chorób psychicznych, uzależnienia od nikotyny i zapalenia żołądka i jelit [68]. Najszerze zastosowanie srebra w medycynie miało miejsce w latach osiemdziesiątych XIX wieku. Wówczas pierwszą srebrną płytkę wszczepiono podczas plastyki czaszki, a następnie zastosowano krople do oczu ze srebrem. Roztwór azotanu został wprowadzony do lecznictwa, aby zapobiec ślepotie dziecięcej i zmniejszyć liczbę przypadków *ophthalmia neonatorum* [76]. Obowiązkowa profilaktyka okulistyczna u noworodków kroplami z azotanem srebra(I), podobnie jak w metodzie Credé’go, została przyjęta w wielu krajach na całym świecie do lat siedemdziesiątych XX wieku, a na niektórych obszarach stanowi rutynową część okresu okołoporodowego do dziś [77, 78]. Z biegiem lat pojawiło się kolejne zastosowanie preparatów srebra(I). Rozszerzono je w leczeniu owrzodzeń rogówki, śródmiąższowego zapalenia rogówki, zapalenia powiek i zapalenie pęcherza moczowego [79]. Inne preparaty srebra, które były stosowane w lecznictwie w ubiegłym wieku, rejestrowane były pod różnymi nazwami handlowymi. Stosowano w medycynie: Albargin® (żelatynian srebra), Choleval® (nazwa własna Merk and Co. in New York), Ammargen®, Argoflavin® (połączenie tripaflawiny z azotanem srebra, o synergistycznym działaniu dwu składników - bakteriobójczym, używanym do zastosowań miejscowych oraz do zastrzyków dożylnych), Poviargol® (protargol) [80-84].

Ostatnio dyskutuje się o działaniu przeciwnowotworowym azotanu srebra(I) związanym z indukcją apoptozy w komórkach H-ras 5RP7 [85]. Wyniki badań dowodzą również, że przeciwnowotworowe działanie związków srebra(I) nie dotyczy wyłącznie jego dobrze zdysocjowanych soli, ale także i związków kompleksowych srebra(I) [86]. Srebro, które jest metalem przejściowym, ma zdolność tworzenia związków koordynacyjnych. Jest to przedmiotem badań od wielu lat, bowiem wiele związków kompleksowych może stać się potencjalnymi środkami terapeutycznymi ze względu na wyjątkowe działanie biologiczne jonu srebra(I). Niezwykle pożądane jest, aby ligandy, jako strukturalne części połączenia koordynacyjnego srebra(I), wykazywały udowodnioną skuteczność kliniczną, taką jak na

przykład MTZ czy pochodne 4-hydroksymetylopirydyny. W wyniku działania jonu srebra(I) i liganda należy spodziewać się przynajmniej synergistycznego efektu, jednak prace wskazują, że występuje synergizm hiperaddycyjny [2, 87-88]. Kiedy srebro wchodzi w kontakt z mikroorganizmami, następuje natychmiastowe zniekształcenie ściany komórkowej, co w dalszym etapie prowadzi do śmierci tych organizmów. Udowodniono, że srebro wpływa na zachowanie metaboliczne bakterii, wirusów i mikroorganizmów eukariotycznych. Sugerowano, że jony srebra(I) modyfikują swoją patogenną aktywność poprzez interakcję z mikrobiologicznymi systemami transportu elektronów, błonami komórkowymi i mechanizmem wiązania DNA. Srebro wykazuje szerokie spektrum działania i mniejszą skłonność do wywoływania oporności drobnoustrojów niż konwencjonalne antybiotyki. Ponadto przeciwbakteryjne działanie srebra może być wzmacniane przez jego połączenie z innymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi, co należy bezwzględnie mieć na uwadze [89-91]. Metoda syntezy kompleksu srebra z 4-hydroksymetylopirydyną jest opublikowanym wynalazkiem opisanym w europejskim opisie patentowym [92,93].

W medycynie srebro jest wykorzystywane nie tylko jako dysocjujące sole, ale i nanocząsteczki (koloidalne) z chemicznego punktu widzenia [94]. Srebro swoje właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze zawdzięcza wyłącznie swojej jonowej formie Ag^+ , która jednak jest dość niestabilna i może być łatwo inaktywowana przez niewłaściwe kompleksowanie i wytrącanie osadów albo może ulegać przekształceniu się w metaliczną formę $\text{Ag}(0)$ bez właściwości leczniczych [95]. Czysty metal w sposób ciągły uwalnia niewielkie ilości jonów, które działają antybakteryjnie na powierzchni metalu [94]. Potencjał standardowy układu Ag^+/Ag wynosi +0,7992 V. Utlenianie do jonu Ag^+ jest procesem powolnym w normalnych warunkach i prowadzi do niskich efektywnych stężeń srebra. Dlatego w stopach, którymi powlekane są implanty lub szwy, stosuje się srebro metaliczne [96,97]. Sole srebra(I), zawierające jonową, mikrobiologicznie aktywną formę, sklasyfikowane wcześniej pod względem rozpuszczalności, są zdolne do generowania jonów w różnym stopniu. Wysoka rozpuszczalność soli srebra(I) prowadzi do wysokiego lokalnego stężenia srebra, a tym samym do wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej, ale i też wysokiej toksyczności. Rozpuszczalność i toksyczność soli srebra(I) zależą od wielu czynników środowiskowych, np. zmieniają się w zależności od pH. Stąd każdy produkt leczniczy zawierający sole srebra(I) wymaga dokładnych badań klinicznych oceniających rzeczywiste stężenie jonów srebra(I) [87].

Synteza srebra w postaci nanocząsteczkowej (koloidalnej) polega na redukcji rozpuszczalnej soli srebra(I) przez reduktor, taki jak cytrynian, glukoza, glikol etylenowy czy borowodorek sodu [98]. Decydującą rolę odgrywa dodatek związków stabilizujących, które

zapobiegają wzrostowi i agregacji powstałych nanocząstek srebra [87]. Powtarzalna synteza nanocząstek srebra w warunkach laboratoryjnych jest trudna i zależy m.in. od stężeń, odczynnika redukującego, temperatury oraz obecności dodatków. Ponadto morfologia tworzonych cząstek czasami nie jest stabilna w czasie. Często syntetyzowane nanocząsteczki srebra mają tendencję do agregacji po kilku godzinach lub dniach, jeśli stabilność koloidalna jest niewystarczająca [94,98].

Nanocząsteczki srebra (Ag-NP) można również alternatywnie syntetyzować biologicznie przy użyciu drobnoustrojów, takich jak *Bacillus subtilis* i *B. licheniformis* (bakterie Gram-dodatnie), *Escherichia coli* (bakterie Gram-ujemne), grzyby, drożdże i wirusy [95, 99]. Ponadto, ze względu na bogactwo alkaloidów, saponin, garbników, witamin, fenoli i terpenoidów w składnikach organicznych, w syntezie Ag-NPs wykorzystuje się rośliny, produkty roślinne i algi jako czynniki biologiczne o działaniu redukującym, zapewniając niedrogą, jednoetapową procedurę [100]. Nowatorskie nanocząsteczki srebra są atrakcyjne jako środki przeciwdrobnoustrojowe ze względu na ich możliwość funkcjonowania na powierzchni i zdolność do rozszczepiania wiązań dwusiarczkowych. Ag-NP oddziałują na bakterie, grzyby i wirusy w sposób zależny od kształtu. Wraz ze zmniejszaniem się wielkości cząstek zwiększa się procent atomów powierzchniowych, tworząc wiele nienasyconych wiązań z powodu braku sąsiednich atomów. W konsekwencji Ag-NP posiadają niestabilne atomy o wysokiej energii powierzchniowej. Ten typ struktury zapewnia wiele miejsc adsorpcji kontaktowej i punktów reakcji, które można dalej modyfikować [101].

Srebro metaliczne jest zazwyczaj obojętne, ale w obecności tkanek po wszczepieniu ulega zjonizowaniu pod wpływem tlenu, wilgoci i płynów ustrojowych, uwalniając biologicznie aktywne jony srebra (Ag^+), które wiążą się z grupami tiolowymi (-SH), anionowymi ligandami białek i błonami komórkowymi komórek bakteryjnych [102]. Podstawą przeciwdrobnoustrojowego działania srebra jest zdolność Ag^+ do penetracji ścian komórkowych bakterii poprzez pinocytozę, powodując wzrost komórkowego stresu oksydacyjnego u drobnoustrojów - denaturujących i inaktywujących białka, a także enzymów metabolicznych, co prowadzi do zahamowania wzrostu [102,103]. Srebro jonowe(I) ma również zdolność wiązania się z genomem drobnoustroju (DNA lub RNA) poprzez denaturację, co hamuje replikację i możliwość namnażania drobnoustrojów [104].

Najnowsze odkrycie Ag-NP jako biocydów wiąże się z ich skutecznością jako środków przeciwwirusowych skierowanym na choroby zakaźne, takie jak: SARS-CoV, grypa A / H5N1, grypa A / H1N1, wirus opryszczki pospolitej typu 1 i 2, ludzki wirus paragrypy typu 3, wirus dengi, HIV-1, wirus zapalenia wątroby typu B i nowe wirusy zapalenia mózgu. Dokładny

mechanizm działania Ag-NP jako leków przeciwwirusowych nie został jeszcze w pełni wyjaśniony [105]. Generalnie nanocząsteczki srebra są zdolne do zmniejszania zakaźności wirusa, prawdopodobnie poprzez blokowanie interakcji wirusa z komórką, co może zależeć od wielkości i potencjału zeta nanocząstek srebra [106]. Badania *in vitro* wykazały skuteczność nanocząsteczek srebra modyfikowanych oseltamiwirem w redukowaniu glikoprotein grypy i zapobieganiu fragmentacji DNA, kondensacji chromatyny i funkcji kaspazy-3 w skutecznym ograniczaniu infekcji H1N1 [106-108]. Najnowsze badania ujawniły supresję replikacji ludzkiej paragrypy 3 (HPIV-3), prawdopodobnie z powodu funkcji blokowania wirusa komórkowego poprzez wykorzystanie Ag-NP [109].

Działanie przeciwzapalne azotanu srebra(I) lub srebra nanokrystalicznego zostało potwierdzone doświadczalnie w leczeniu ran i leczeniu alergicznego kontaktowego zapalenia skóry i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego [110-112]. Badania eksperymentalne wykazały zmniejszenie stanu zapalnego po zastosowaniu nanokrystalicznego srebra, co było związane z apoptozą limfocytów, zmniejszoną ekspresją cytokin prozapalnych i zmniejszoną aktywnością żelatynazy [75].

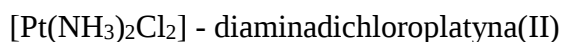
Badania nad zastosowaniem nowych preparatów srebra w połączeniu z innymi substancjami czynnymi rozwijają się dosyć prężnie również w okulistyce. Najszerze i najbardziej znane zastosowanie srebra w medycynie wiąże się z sulfadiazyną (AgSD), gdzie stała się ona miejscowym środkiem przeciwbakteryjnym do leczenia oparzeń [113] i grzybiczego zapalenia rogówki [114,115]. Działanie AgSD wykazuje również silny potencjał przeciwbakteryjny wobec *E.coli*, *Staph. aureus*, *Klebsiella spp.* i *Pseudomonas spp.* [116]. W niniejszej pracy sól srebrowa sulfadiazyny została zastosowana jako lek referencyjny w badaniach mikrobiologicznych.

2.4 Związki koordynacyjne

Alfred Werner podjął w 1893 r. pierwszą próbę wyjaśnienia budowy związków koordynacyjnych (kompleksowych). Metale we wszystkich swych związkach są otaczane przez grupy zwane ligandami. W roztworach wodnych soli następuje zjawisko tworzenia związku koordynacyjnego z kationu metalu i cząsteczek wody, w efekcie czego powstają akwakompleksy. Metal jest atomem centralnym, natomiast cząsteczki wody stanowią ligandy. Obecnie istnieją trzy teorie wiązania między metalem a ligandem w związku kompleksowym:

- teoria pola krystalicznego, która traktuje oddziaływanie między centralnym atomem metalu a ligandami jako czysto elektrostatyczne przyciąganie jonów dodatnich i ujemnych lub przyciąganie typu jon-dipol, jeśli ligand jest cząsteczką obojętną;
- teoria pola ligandów, która jest rozwinięciem ujęcia elektrostatycznego, ale uwzględnia pewne oddziaływanie kowalencyjne między orbitalami metalu i ligandu. Są to trzy możliwe typy oddziaływań: nakładanie się σ orbitali, nakładanie się π orbitali i wiązanie $d\pi-p\pi$ (wiązanie zwrotne) uwarunkowane nakładaniem się π zajętych orbitali d metalu i pustych orbitali liganda;
- teoria orbitali molekularnych, w której wiązania traktuje się jako głównie kowalencyjne.

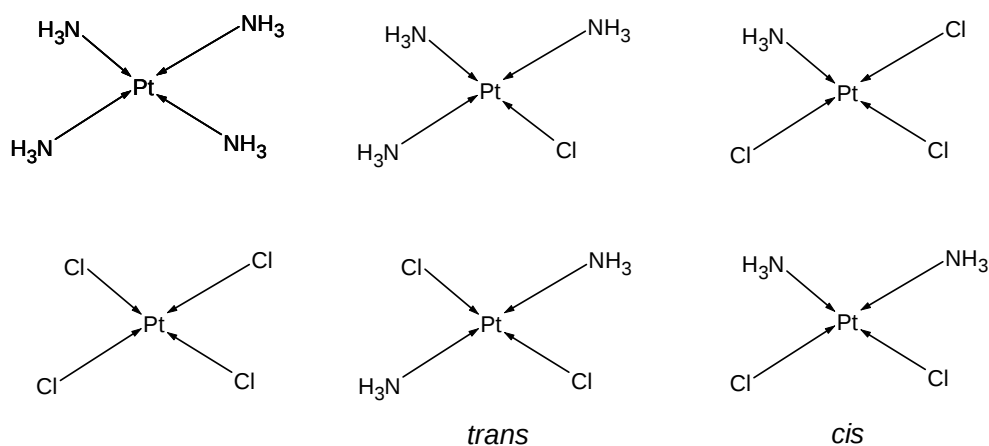
Ligandy dostarczają pary elektronowe, które zajmują wiążące, antywiązące, a niekiedy niewiązące molekularne orbitale σ i π w kompleksie. Wokół centralnego kationu M^{n+} można rozmieścić różnorodne ligandy L , L' , L'' , przy czym liczba możliwych kombinacji jest praktycznie nieograniczona. Ligandy mogą posiadać ładunek ujemny (anionowe, np. Cl^- , Br^- , F^- , NO_2^- , CH_3COO^- , $C_2O_4^{2-}$), dodatni (kationowe, np. Ag^+ , $C_7H_7^+$) lub obojętny (np. CO , H_2O , NH_3 , NO) [117]. Ligandami mogą być zatem cząsteczki pozbawione ładunku lub jony, zarówno nieorganiczne, jak i organiczne. Całkowity ładunek utworzonego kompleksu $[ML_xL'_yL''_z]$ wyznacza ładunek kationu M^{n+} oraz suma ładunków ligandów [118]. Platyna w postaci jonu Pt^{2+} jest zdolna do tworzenia dużej liczby związków koordynacyjnych (**Rys.10**) w zależności od stężeń różnych ligandów. Kompleksy w zależności od zmiany tych stężeń mogą również ulegać przemianom jednych w drugie:



Warunek występowania izomerii *cis-trans* spełnia $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, ponieważ występują tu po dwa ligandy, dwu rodzajów: NH_3 (obojętny) oraz Cl^- (anionowy) (**Rys.10**).

Klasyczne, podstawowe badania w dziedzinie chemii koordynacyjnej przeprowadził również duński chemik S.M.Jørgensen, który otrzymując tysiące nowych związków

poszukiwał prawidłowości i zależności, które przyniosłyby odpowiedzi na pytanie co umożliwia łączenie się trwałej soli metalu z grupami trwałych, niezależnie istniejących innych



Rys.10 – Związki kompleksowe platyny z ligandami NH_3 i Cl^-

cząsteczek. Werner uczestniczył w tych pracach i ostatecznie rozwinął koncepcję ligandów otaczających atom metalu. Za swą teorię, która poprzedziła elektronową teorię wartościowości został uhonorowany nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w 1913 r. jako pracownik Uniwersytetu w Zurychu [119].

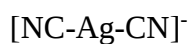
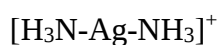
Pojęcie liczby koordynacyjnej, czyli określające ilość ligandów związanych z atomem centralnym, jest szeroko stosowane w chemii koordynacyjnej. W solach o budowie związku koordynacyjnego można wyróżnić dwa elementy: sferę zewnętrzną, którą stanowi przeciwjon, oraz wewnętrzną, która jest połączeniem kompleksowym np. $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]\text{SO}_4$. W przytoczonym przypadku jodem centralnym jest miedź(II), która koordynuje cztery cząsteczki amoniaku (L.K. wynosi 4), natomiast przeciwjon stanowi reszta kwasu siarkowego w postaci jonu siarczanowego [120]. Oprócz liczby ligandów otaczających metal bardzo istotna jest znajomość rozmieszczenia ligandów czyli geometrii cząsteczki. Istnieje określony związek między geometrią cząsteczki a liczbą koordynacyjną. W przypadku związków koordynacyjnych liczba elektronów d może istotnie wpływać na geometrię. Podstawowe liczby koordynacyjne to 4 i 6, ale występują również 2, 3, 5 oraz 7, 8 i 9 w przypadku niektórych większych kationów (**Tab.9**) [117].

L.K.	Struktura przestrzenna	Występowanie	Przykłady
2	liniowa	Kompleksy Cu^+ , Ag^+ , Hg^{2+}	$[\text{CuCl}_2]^-$ $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$

3	Płaska trójkątna	Kompleksy Cu^+ , Hg^{2+}	$[\text{HgI}_3]^-$
	Piramidalna	Kompleksy Sn^{2+}	$[\text{SnCl}_3]^-$
4	Tetraedryczna	Pospolita, zwłaszcza przy konfiguracji d^0 lub d^{10} i dla małych kationów	$[\text{Li}(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ $[\text{AlCl}_4]^-$ $[\text{MnO}_4]^-$ $[\text{Ni}(\text{CO})_4]$
	Płaska kwadratowa	Niekiedy jony o konfiguracji d^8	$[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{2-}$ $[\text{PtCl}_4]^{2-}$
5	Piramida kwadratowa lub bipiramida kwadratowa	Rzadko są trwałe, ale często są produktami pośrednimi w reakcjach	$[\text{Ni}(\text{CN})_5]^{3-}$ $[\text{Fe}(\text{CO})_5]$
6	Oktaedryczna	Najpospolitsza, wszystkie metale	$[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ $[\text{PtCl}_6]^{2-}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$
8	Sześcian lub antypryzmat	Niektóre jony metali 5 i 6 okresu	$[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$
7, 9 i więcej	Różne wielościany	Niektóre jony metali, zwłaszcza 5 i 6 okresu, o dużym promieniu	$[\text{TaF}_7]^{2-}$ $[\text{Nd}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$ $[\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_4)_3]^{4-}$

Tabela 9. Liczby koordynacyjne związków koordynacyjnych

Liczba koordynacyjna 2 występująca dość rzadko, głównie w przypadku kationów Cu^+ , Ag^+ , Au^+ oraz Hg^{2+} i daje liniowe struktury. Przykładami mogą być jony:



Kompleksy takie są zdolne do dalszego przyłączania ligandów np.:



2.5 Związki koordynacyjne srebra

Początkiem zainteresowań naukowców związkami kompleksowymi metali szlachetnych, które wykazują właściwości biologiczne po odpowiednim zaprojektowaniu cząsteczki, bezsprzecznie było wprowadzenie do leczenia *cis*-platyny. Historyczny moment miał miejsce ponad 40 lat temu. Cisplatyna została dopuszczona do stosowania w chemioterapii raka jąder i jajników przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków w dniu 19 grudnia

1978 r. [121-123] oraz w Wielkiej Brytanii (i kilku innych krajach europejskich) w 1979 r. [124].

Toksyczność srebra można ocenić jako niską, metal ten nie odgrywa żadnej roli biologicznej, ale jednak z drugiej strony wywołuje srebrzycę, prawdopodobnie na skutek przemiany do nietrwałego chlorku srebra [125-128]. Niska toksyczność dla organizmu człowieka jest niewątpliwie zaletą, zatem poszukiwania nowych związków kompleksowych srebra(I) nabiera rozpędu, włączając również poszukiwania alternatywy dla *cis*-platyny oraz jej analogów (karboplatyny, oksaliplatyny), które posiadałyby słabsze działania niepożądane oraz nie wykazywałyby oporności.

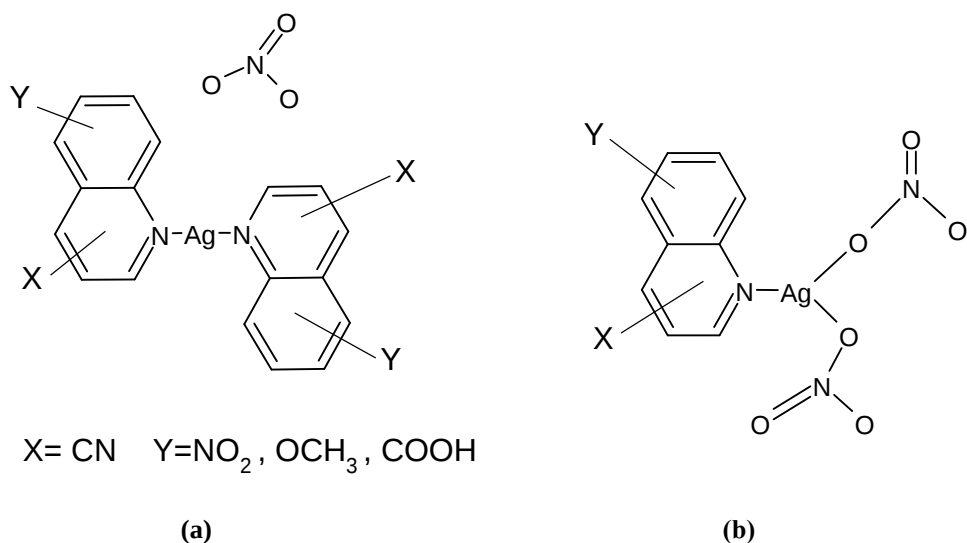
Wykazano w licznych pracach, że kompleksy srebra(I) obok działania na mikroorganizmy posiadają również właściwości przeciwnowotworowe [129-134]. Selektywna cytotoksyczność wobec różnych typów komórek jest zależna od rodzaju liganda związanego z jonami srebra(I), która z kolei pozostaje w ścisłym związku ze stabilnością kompleksów oraz właściwościami hydrofilowo-lipofilowymi kompleksów tworzonych przez ten ligand [130,135,136]. Celem wielu badań było ustalenie, czy toksyczność AgNO_3 w kompleksach jest redukowana przez synergiczne działanie wywołane obecnością cząsteczek liganda na przykład MTZ lub 4-hydroksymetylopirydyny [89,93].

Wiele zespołów światowych, w tym zespół Profesora Ochockiego, przeprowadziło liczne badania, które wykazały nie tylko cytotoksyczny i genotoksyczny potencjał jonów metali i ich kompleksów wobec komórek prawidłowych i nowotworowych, ale także większą stabilność kompleksów jonów metali w porównaniu z czystymi solami tych metali [5-10].

Związki heterocykliczne przynoszą dużą nadzieję w poszukiwaniach ze względu na występowanie w nich atomu azotu, siarki czy tlenu, które zdolne są do koordynowania jonów metali, jak podkreśliłem w rozdziale dotyczącym pochodnych azolowych. Ligandy N-heterocykliczne, zwłaszcza polipirydyny, zostały szeroko przebadane w połączeniu z wieloma metalami w poszukiwaniu obiecujących leków przeciwnowotworowych [137]. Najbardziej jednak istotne z punktu widzenia niniejszej pracy są połączenia $\text{N} \cdots \text{Ag} \cdots \text{N}$.

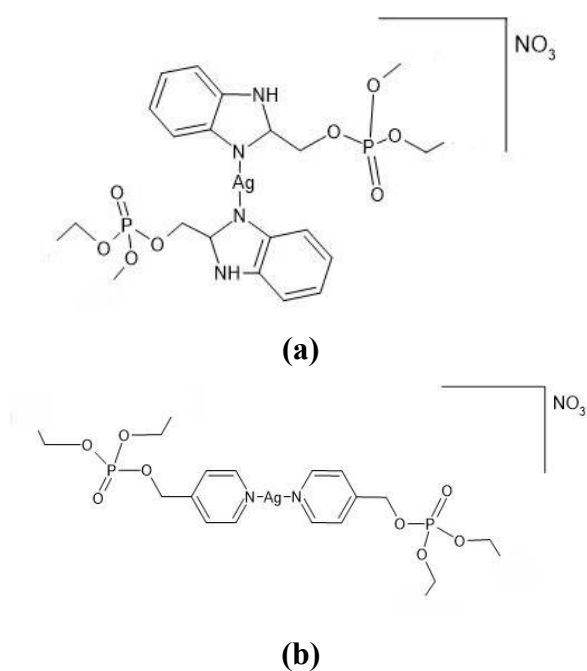
Pochodne chinoliny, które zostały opisane w literaturze, były przebadane pod kątem działania na 15 różnych wielolekoopornych szczepach bakterii izolowanych z owrzodzeń stopy cukrzycowej i porównywane z aktywnością przeciwdrobnoustrojową leku referencyjnego – AgSD. $[\text{Ag}(8\text{-nitrochinolina})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ była najbardziej aktywnym związkiem w tej serii, a jej skuteczność okazała się większa niż AgSD wobec wszystkich testowanych szczepów bakterii. Z kolei $[\text{Ag}(5\text{-nitrochinolina})_2]\text{NO}_3$ dała lepsze rezultaty bakteriobójcze niż AgNO_3 przeciwko standardowym nieopornym szczepom bakterii *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Proteus*

mirabilis i *Streptococcus pyogenes* [138]. Oba związki prezentuje **Rys.11 (a i b)**.



Rys.11 – Związki koordynacyjne pochodnych chinoliny ze srebrem(I)

Seria kompleksów Ag(I) z fosforanowymi pochodnymi benzimidazolu i pirydyny (**Rys.12a** i **12b**) wykazała ponadto aktywność przeciugrzybiczą przeciwko szczepom *C. albicans*. Wśród nich $[\text{Ag}(\text{2-bimOpe})_2]\text{NO}_3$ (2-bimOpe = 1H-benzimidazol-2-ilometyldietylofosforan) był wysoce skuteczny przeciwko *P. aeruginosa* i opornym na metycylinę *S. epidermidis*, natomiast wolne ligandy nie wykazywały aktywności [90].



Rys.12 – Związki koordynacyjne pochodnych fosforanowych benzimidazolu (**a**) i pirydyny (**b**)

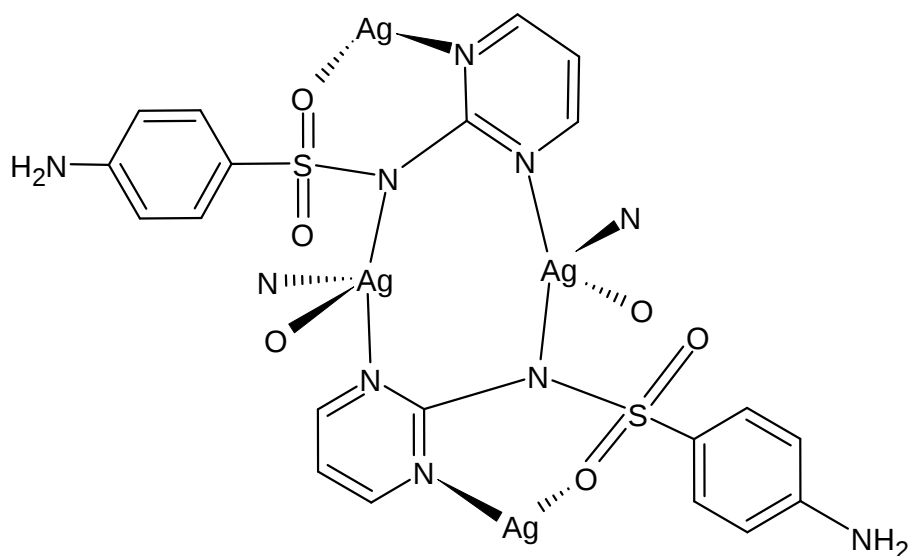
Badania aktywności antyproliferacyjnej z wykorzystaniem różnych typów komórek

nowotworowych były prowadzone również z kompleksem, którego ligandem stanowi jeden z estrów waliny. Kompleks o wzorze $[Ag(L)(PR_3)]^+$, gdzie L = ester N-(4-pyridynylokarbonylo)-metylowy waliny, $PR_3 = PPh_3, PPh_2Py$, w którym pirydynowy atom azotu koordynuje srebro(I), indukował śmierć badanych komórek na drodze apoptozy [139].

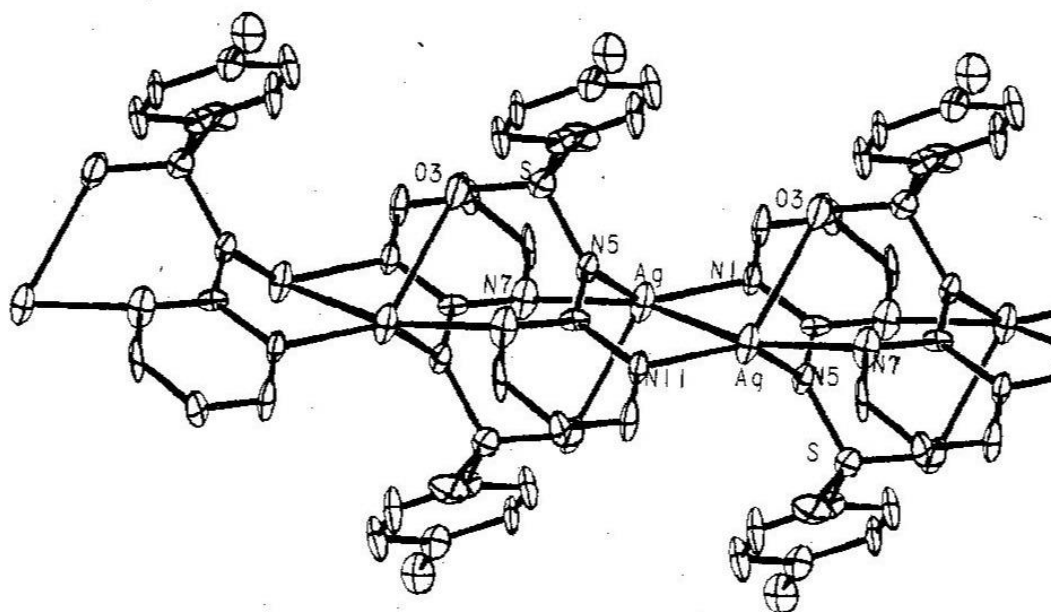
Projektowanie nowych cząsteczek, które mogą okazać się w przyszłości lekiem, polega między innymi na stąpaniu po gruncie chemii leków w taki sposób, by modyfikować inne, odkryte już cząsteczki, a następnie prowadzić badania w zakresie poprawy parametrów takich jak: działanie na określone szczepy bakteryjne, zwiększenie bądź zmniejszenie działania cytotoksycznego, wykazywanie nowego efektu, pozbawienie działań niepożądanych itd. Doskonałym, klasycznym przykładem może być tutaj grupa barbituranów, do której należy wiele przedstawicieli, a jednak o odmiennych właściwościach, bo wprowadzenie określonych podstawników zmienia zarówno ich charakter jako leku działającego na organizm ludzki, jak i kierunek czy siłę działania. Sięga się w pracach badawczych po cząsteczki, które posiadają ugruntowaną pozycję i są stosowane jako substancje lecznicze, ale też projektuje się nowe. Należy zatem dokładnie przedstawić najstarszy ze związków koordynacyjnych srebra(I) – sól srebrową sulfadiazyny (Ag-SD) oraz związek koordynacyjny srebra(I) z MTZ.

Sulfadiazyna (4-amino-N-pirydyn-2-ylo-benzenosulfonamid) należy do grupy leków przeciwbakteryjnych – sulfonamidów. Obecnie nie jest dopuszczona do obrotu na terytorium Polski, ale znajduje się na Liście Podstawowych Leków Światowej Organizacji Zdrowia [140]. Stosowana razem z pirymetaminą jest lekiem z wyboru w przypadku toksoplazmozy [141]. Jest również lekiem drugiego rzutu przyjmowanym doustnie w leczeniu zapalenia ucha środkowego, zapobieganiu gorączce reumatycznej, chlamydii i infekcjom *Haemophilus influenzae*. Sulfadiazyna została zatwierdzona do użytku medycznego w Stanach Zjednoczonych w 1941 roku. AgSD będąca solą srebrową sulfadiazyny z punktu widzenia chemii jest związkiem koordynacyjnym, którego struktura została przedstawiona na **rys.13**. Związek został poznany w latach 60-tych XX wieku i obecnie znajduje się na Liście Leków Podstawowych Światowej Organizacji Zdrowia, chociaż jest już rzadko stosowany. Przeprowadzone badania rentgenostrukturalne ponad 40 lat temu [142] pozwoliły na przedstawienie struktury, która została zaprezentowana na **rys.14**. Lek wykazuje działanie przeciwbakteryjne i jest przeznaczony do miejscowego leczenia powierzchownych ran, takich jak oparzenia. Zwykle jest aplikowany w maści lub 1% zawiesiny wodnej. Stosuje się go na rany w fazie gojenia lub po przeszczepach skóry. Zapobiega rozwojowi szerokiego spektrum bakterii i drożdży, a zastosowany na skórę wykazuje działanie zarówno sulfonamidu, jak i kationu srebra uwalnianego po aplikacji. AgSD nie jest rozpuszczalna w wodzie. Srebro wiąże

się z białkami wysięku rany, uwalniając sulfadiazynę, z której do 10% ulega wchłonięciu. Długotrwałe stosowanie może prowadzić do miejscowej argyrii biorąc pod uwagę zawartość srebra w tym leku.



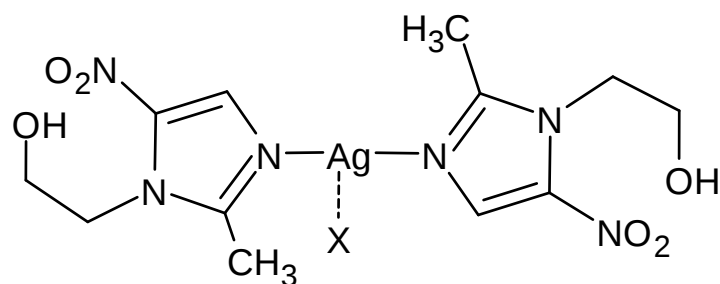
Rys.13 – Struktura soli srebrowej sulfadiazyny



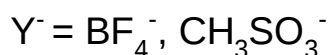
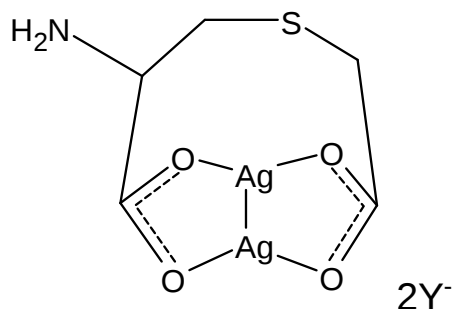
Rys.14 – Struktura rentgenowska soli srebrowej sulfadiazyny z uwzględnieniem kontaktów w łańcuchu dwuniciowym

Jak wcześniej podkreśliłem, MTZ dzięki obecności pirazolowego atomu azotu jest zdolny do tworzenia związków koordynacyjnych z metalami, w tym z kationem srebra. Wykorzystując te właściwości oraz fakt, że MTZ jest lekiem o ugruntowanej pozycji i udowodnionym działaniu, zsyntetyzowano rozpuszczalne w wodzie kompleksy

metronidazolu ze srebrem używając jako substratów kilku soli srebra [89]. Nowe związki koordynacyjne MTZ ze srebrem(I) zostały zsyntetyzowane w postaci monomerów o wzorze ogólnym $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]^+\text{X}^-$, gdzie $\text{X} = \text{NO}_3^-$, ClO_4^- , CF_3COO^- (**Rys.15a**) lub dimerów, $[\text{Ag}_2(\text{MTZ})_4]^{2+}2\text{Y}^-$, gdzie $\text{Y} = \text{BF}_4^-$ i CH_3SO_3^- (**Rys.15b**). Właściwości mikrobiologiczne soli zostały określone na szczepach bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*, *S. epidermidis*) i Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus hauseri*) oraz na drożdżach *C. albicans*. Każdy ze związków wykazywał znaczącą aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich, wyższą niż AgSD, jako lek referencyjny. Znaczenie przeciwojonu oceniano również w testach przeciwbakteryjnych. Najlepszym aktywnym kompleksem Ag-MTZ był zawierający przeciwojon metanosulfonianowy, który również hamował wzrost drożdży *C. albicans* w stężeniu 3-krotnie niższym niż wymagane dla AgSD. Ponadto kompleksy zawierające tetrafluoroboran i nadchloran jako przeciwojony zostały również scharakteryzowane jako skuteczne środki przeciwbakteryjne przeciwko badanym bakteriom Gram-ujemnym.



(a)



(b)

Rys.15 – Struktury związków kompleksowych MTZ ze srebrem(I) z przeciwojonami: azotanowym, nadchloranowym i trifluorooctanowym (**a**) oraz tetrafluoroboranowym i metanosulfonianowym (**b**)

Modyfikacja metody syntezy związku kompleksowego MTZ z azotanem srebra(I) do

jednoetapowej, bardzo szybkiej syntezy typu „one-step” z możliwością wykorzystywania jej w czynnościach recepturowych podczas wykonywania postaci leku otwierałaby drogę do opracowywania formułacji postaci leku. Idąc dalej, o ile wcześniej badano wpływ przeciwjonu w kompleksach metronidazolu z różnymi solami srebra, należało kontynuować tę pracę. Jej efektem jest synteza związku koordynacyjnego MTZ z siarczanem srebra(I), który jest przedmiotem niniejszej pracy.

2.6 Półstałe postaci leku

Specyfiki oferowane przez przemysł farmaceutyczny niejednokrotnie nie dają możliwości połączenia wszystkich niezbędnych do terapii pacjenta substancji czynnych w jednym preparacie, doboru optymalnych stężeń oraz użycia odpowiednio dobranego podłoża. Doskonałą alternatywą staje się wówczas lek recepturowy, sporządzany w aptece na podstawie recepty lekarskiej przez farmaceutę lub technika farmaceutycznego w ramach uprawnień zawodowych [143,144]. Każdy ze wspomnianych wcześniej elementów, a ponadto szansa zastosowania substancji czynnych, których brak w asortymencie leków gotowych czy utworzenie postaci leku pozbawionego środków konserwujących, dają szeroki wachlarz możliwości dla lekarza i aptekarza w trosce o poprawny dobór terapii dla pacjenta.

Preparaty srebra od lat stosuje się zewnętrznie, co ma duże znaczenie w takich dziedzinach medycyny jak dermatologia czy okulistyka. Przedmiotem niniejszej pracy są formułacje półstałych postaci leku (maści, żel) oraz postaci płynnej (krople do oczu), zatem wymagają one omówienia z gruntu ich zastosowania, funkcji, sposobu działania oraz technologii ich wytwarzania w warunkach pracy apteki ogólnodostępnej wykonującej leki recepturowe.

FP XII w rozdziale monografii ogólnych postaci leku zawiera monografię:

PRAEPARATIONES MOLLES AD USUM DERMICUM

Półstałe preparaty do stosowania na skórę

(Semi-solid preparations for cutaneous application; Préparations semi-solides pour application cutanée)

Zgodnie z definicją FP XII:

Półstałe preparaty do stosowania na skórę są przeznaczone do miejscowego lub przezskórnego podania substancji czynnych albo do uzyskania działania zmiękczającego lub ochronnego.

Ponadto ta postać leku może być stosowana również na błony śluzowe jamy ustnej, dróg rodnych i odbytu oraz nosa, ucha i oka. Ilość substancji czynnych w półstałych postaciach leku może wynosić od jednej do kilku, oczywiście z uwzględnieniem wszystkich właściwości fizycznych i chemicznych tych substancji oraz ich natury. Niedopuszczalne jest łączenie substancji czynnych i pomocniczych, które będą ulegać wobec siebie niezamierzonym interakcjom, którym towarzyszy inaktywacja czy rozkład. Pod względem układu fizycznego, półstałe postaci leku mogą być zarówno roztworami (np. maść kamforowa), zawiesinami (np. maść borna), jak i emulsjami, w których rozproszono jedną fazę w drugiej z utworzeniem emulsji w/o lub o/w (np. maść z roztworem kwasu borowego w podłożu o wysokiej liczbie wodnej). Niezależnie od formy leku powinny charakteryzować się jednorodnym wyglądem, odpowiednią lepkością, rozsmarowywalnością oraz przyczepnością w zależności od zastosowania, co stanowi o ich właściwym działaniu terapeutycznym po aplikacji.

Skóra ludzka jest szczególnym organem, który poddajemy aplikacji miejscowej leku, a jej elementy wykazują różną wrażliwość. Do najwrażliwszych obszarów skóry należą: twarz, owłosiona skóra głowy oraz moszna, a do najmniej wrażliwych natomiast - dłonie, podeszwy stóp oraz paznokcie, które są wytworem naskórka [145].

Podłoże półstałych postaci leku może składać się z substancji naturalnych lub syntetycznych i może być jedno- lub wielofazowe. Zależnie od charakteru podłoża, preparat może mieć właściwości hydrofilowe lub hydrofobowe; może zawierać odpowiednie substancje pomocnicze, takie jak środki konserwujące, przeciwutleniacze, stabilizujące, emulgatory, substancje zagęszczające oraz promotory przenikania. Zgodnie z monografią FP XII wyróżnia się kilka rodzajów preparatów do stosowania na skórę: maści, kremy, żele, pasty, kataplazmy, plastry lecznicze, plastry na skórę. Maści, kremy i żele, zgodnie ze swoją strukturą zasadniczo wykazują właściwości lepkosprężyste i przy wysokich szybkościach ścinania nieniuetonowski typ przepływu, np. przepływ plastyczny, pseudoplastyczny lub tiksotropowy.

Szczególnie istotny jest dobór podłoża w technologii wytwarzania maści oraz odpowiedni dobór substancji zwiększających lepkość podczas wytwarzania żeli, a wreszcie odpowiednia metoda i zachowanie standardów podczas ich sporządzania z uwzględnieniem wymagań stawianych przez farmakopeę (FP XI, XII) [36,65].

2.6.1 Maści

Maść jest postacią leku sporządzaną zarówno na skalę przemysłową, jak i jako lek recepturowy. Jak w każdej postaci leku, w jej skład wchodzi substancje czynne (*basis*) oraz podstawa maściowa będąca podłożem (*vehiculum*). Związkami czynnymi farmakologicznie w maściach mogą być substancje pochodzenia chemicznego (jako związki chemiczne), roślinnego albo zwierzęcego. Dwa ostatnie rodzaje mają małe znaczenie z punktu widzenia receptury aptecznej, najczęściej są one używane w medycynie ludowej (np. maść borowinowa, bursztynowa). Jako *basis* są wykorzystywane zatem najczęściej związki chemiczne, organiczne lub nieorganiczne, od właściwości których zależy nie tylko działanie gotowej postaci leku, ale i sposób przyrządzania. Na podstawie powyższego, substancje czynne należy podzielić na 3 grupy:

- rozpuszczalne w podstawach maściowych (w tłuszczach rozpuszczalne są np. kamfora, mentol, tymol, salol)
- rozpuszczalne w wodzie, których roztwory można wprowadzić do podłoża (np. ichtiol, etakrydyna, jodek potasowy, sole alkaloidów, protargol, chinozol, kwas borowy)
- nierozpuszczalne ani w podłożach, ani w wodzie (talk, tlenek cynku, hydrokortizon, klortrimazol, benzokaina, prednizolon, dermatol).

Wprowadzanie substancji czynnych do podłoża odbywa się w zależności od rodzaju substancji w różny sposób. Jeśli substancje czynne są rozpuszczalne w podłożu, po stopieniu podłoża, rozpuszcza się je w nim bezpośrednio. Jeśli substancje czynne rozpuszczają się w wodzie, można sporządzić roztwór substancji, który porcjami wprowadza się do podłoża. Warunkiem niezbędnym przy wprowadzaniu wodnych roztworów do podłoża, jest wysoka liczba wodna podłoża. W recepturze klasycznej rozpuszczanie, roztarcie lub zemulgowanie środka leczniczego w podstawie maściowej (*vehiculum*) odbywa się z wykorzystaniem utensyliów aptecznych (parownice, moździerze z pistlami, klisze celuloidowe) lub w nowoczesnej recepturze za pomocą urządzeń miksujących (unguator półautomatyczny lub automatyczny) zgodnie z procedurami podawanymi i aktualizowanymi przez samych producentów sprzętu, a także opracowywanymi i opisywanymi w literaturze.

Roztarcie środka leczniczego w podłożu maściowym wymaga odpowiedniego przygotowania samej substancji poprzez sproszkowanie i równomierne w nim rozprowadzenie.

Otrzymuje się w ten sposób właściwe rozproszenie środka leczniczego, które będzie gwarantować odpowiednie działanie postaci leku. Wielkość rozproszonych cząstek jest o tyle istotna, że nie może wywoływać mechanicznego podrażnienia skóry. Odpowiednie rozdrobnienie (zmikronizowanie) można osiągnąć poprzez mechaniczne roztarcie w moździerzu, albo przez ucieranie gotowej maści za pomocą odpowiednich przyrządów, albo też wykorzystując odpowiednie reakcje chemiczne np. precypitację. W zależności od substancji, mikronizacja może następować również poprzez rozcieranie z lotnymi rozpuszczalnikami (mentol z etanolem), albo poprzez dodatek np. niewielkiej ilości wody, glicerolu, parafiny ciekłej, stanowiących tzw. cieczy lewigujące, w zależności od natury substancji. W ten sposób możliwe jest uzyskanie cząstek o wielkości około 50 μm . Następnie porcjami wprowadza się podłoże.

Sposobem istotnym z punktu widzenia niniejszej pracy jest sporządzanie maści w postaci układu emulsyjnego. Środki lecznicze rozpuszcza się wówczas w wodzie i łączy z podstawą maściową i ewentualnym emulgatorem tworząc odpowiedni typ emulsji w/o lub o/w. Fazę olejową stanowi podłoże, do którego porcjami dodaje się fazy wodnej będącej roztworem środka leczniczego. Ilość fazy wodnej, jaka jest możliwa do wprowadzenia do fazy olejowej podłoża ściśle wiąże się z pojęciem liczby wodnej (LW) podłoża. LW podłoża określa ilość wody w gramach, którą może wchłonąć 100 g podłoża w temperaturze pokojowej [146]. Zwiększenie LW można osiągnąć poprzez dodatek do układu odpowiedniego emulgatora np.: dodatek 10% wosku do smalcu wieprzowego (*Adeps suillus*, *Axungia porci*) zwiększy LW do 26; dodatek 15% lanoliny do około 70; alkoholu cetylowego do 240, natomiast wprowadzenie 10% cholesterolu - do 220.

Maści emulgujące wodę mogą absorbować duże ilości wody i zależnie od rodzaju emulgatorów, po homogenizacji powstają emulsje odpowiedniego typu. W tym celu mogą być używane emulgatory w/o (alkohole sterolowe z lanoliny, estry sorbitanu, monoglicerydy i alkohole tłuszczowe) lub emulgatory o/w (siarczany alkoholi tłuszczowych, polisorbaty, ester cetostearylowy makrogolu albo estry kwasów tłuszczowych z makrogolami). Stosowane składniki podłoży są takie jak w maściach hydrofobowych. Maściami hydrofilowymi są preparaty zawierające podłoże mieszające się z wodą. Podłoża takie składają się z mieszaniny ciekłych i stałych makrogoli (glikole polietylenowe).

2.6.1.1 Podłoża maściowe

W kontekście niniejszej pracy najważniejszymi podłożami maściowymi, które stosuje się w praktyce aptecznej są: Euceryna I i II, lanolina bezwodna i wazelina biała. W rozdziale monografii narodowych FP XII zawiera monografię dwóch typów euceryny (I, II), różniących się znacząco składem [36]:

UNGUENTUM EUCERINI I

Maść eucerynowa I

Syn.: Lanae alcoholum unguentum, maść z alkoholami z lanoliny

DEFINICJA

Podłoże maściowe bezwodne, emulgujące wodę (absorpcyjne)

WŁAŚCIWOŚCI

Wygląd: biała lub żółtawobiała, przeświecająca, jednorodna, miękka masa

PRZYGOTOWANIE

Alcohol cetylicus et stearylicus 0,5 cz.

Alcholes adipis lanae 6,0 cz.

Vaselinum album 93,5 cz.

Składniki stopić i mieszać do zastygnięcia.

Wazelinę białą można częściowo (do 12,0 cz.) zastąpić parafiną ciekłą.

Temperatura krzepnięcia: od 38 °C do 56 °C.

Zdolność absorbowania wody: Preparat absorbuje nie mniej niż 30 g wody (na 10,0 g stopionego podłoża).

UNGUENTUM EUCERINI II

Maść eucerynowa II

Syn.: Cholesteroli et cetyli unguentum, maść cholesterolowo-cetylowa

DEFINICJA

Podłoże maściowe bezwodne, emulgujące wodę (absorpcyjne)

WŁAŚCIWOŚCI

Wygląd: biała lub żółtawobiała, przeświecająca, jednorodna, miękka masa.

PRZYGOTOWANIE

Alcohol cetylicus 3,0 cz.

Cholesterolum 2,0 cz.

Vaselinum album 95,0 cz.

Składniki stopić i mieszać do zastygnięcia.

Temperatura krzepnięcia: od 38 °C do 56 °C.

Zdolność absorbowania wody: Preparat absorbuje nie mniej niż 30 g wody (na 10,0 g stopionego podłoża).

Właściwości fizyczne obu euceryn, takie jak rozsmarowywalność i konsystencja oraz dość łatwa zmywalność wodą stanowią niewątpliwie zaletę tego podłoża. Ocenia się, że aż jedna trzecia maści przygotowywanych w aptekach polskich jest oparta na podłożu eucerynowym. Szczególne właściwości fizyczne pozwalają pacjentom na bardziej komfortowe stosowanie środka leczniczego związanego z tym podłożem, szczególnie w ciepłych porach roku. Maść eucerynowa I i II zostały wprowadzone pierwszy raz do FP IX w 2013 roku jako zalecane podłoża w recepturze maści. Do tego czasu dostępnych było wiele podłoży określanych mianem „Euceryna”. Różniły się one składem, wyglądem, zdolnością wiązania wody, konsystencją (np. Euceryna Lechia Poznań). Pierwszy skład (Euceryna I, maść z alkoholami lanoliny) odpowiada aktualnemu składowi surowca stosowanego w Niemczech, Wollwachsalkoholsalbe Unguentum Alcoholum Lanae, według narodowej, niemieckiej farmakopei (DAB 2017). Drugi skład (Euceryna II, maść cholesterolowo-cetylowa) jest tzw. polską euceryną, od wielu lat tradycyjnie używaną w krajowej preparatyce farmaceutycznej. Mimo pojawienia się dwóch standaryzowanych przepisów wykonania euceryny w FP IX, w Polsce nadal są dopuszczone i wprowadzane do obrotu aptecznego jako surowce farmaceutyczne podłoża o nazwie "Euceryna" z niefarmakopealnym składem, według własnych norm jakościowych producentów, np. Euceryna bezwodna S firmy Ziolołek, zawierająca alkohole lanolinowe, olej parafinowy, olej wazelinowy, parafinę stałą twardą i parafinę stałą miękką, odpowiednio po 8, 35, 35, 10 i 12 cz. [147]. W zależności od zarejestrowanego przez wytwórców składu, zamiast części wazeliny wprowadzono np. lanolinę [148]. Monografia euceryny w FP zawiera istotną uwagę dr Lucyny Wolniak i prof. Małgorzaty Sznitowskiej, dwóch doświadczonych farmaceutek:

Jeżeli euceryna jest składnikiem leku recepturowego, farmaceuta ma obowiązek użycia jednego z tych podłoży. Niewłaściwe jest użycie w takim przypadku podłoża, które nie zostało oznaczone przez producenta jako zgodne

z Farmakopeą Polską. Około połowa obecnych aktualnie na rynku podłoży o nazwie „euceryna” nie odpowiada maści eucerynowej I lub maści eucerynowej II, lecz takie podłoża można użyć tylko wtedy, gdy lekarz wyraźnie zaznaczy, że podłożem ma być „euceryna” wskazanego producenta [149].

Wazelina biała jest produktem otrzymywanym podczas rafinacji ropy naftowej i stanowi półstałą substancję o naturze węglowodorowej. Produkt jest znany od ponad 150 lat – odkrywcą był chemik Robert Augustus Chesebrough. Wazelinę stosuje się w maściach o charakterze lipofilowym lub jako składnik innych powszechnie używanych podłoży takich jak euceryna, maść cholesterolowa i Lekobaza. Niewątpliwą zaletą jest jej bezpieczeństwo pod względem praktycznego braku wywoływania podrażnień, uczuleń i reakcji kontaktowych ze skórą. Jedną z wad jest natomiast trudność ze zmywaniem w aspekcie stosowania w terapii u pacjentów. Podłoże wazelinowe charakteryzuje się dobrą trwałością, co niezwykle istotne w preparatach zawierających antybiotyki, oraz słabą tendencją do rozkładu. Wazelina żółta charakteryzuje się niższą klasą czystości i jest wykorzystywana szczególnie w przypadkach wprowadzania do postaci leku substancji leczniczych o charakterystycznej barwie np. ditranolu (kolor żółto-pomarańczowy).[145]

Lanolina bezwodna jest woskiem otrzymywanym z wełny owiec. Specyficzny zapach, kolor i lepkość ograniczają z jednej strony zastosowanie jej jako podłoża *per se*, a z drugiej, lepkość jest atutem przy zastosowaniach w leczeniu zmian w obrębie wałów paznokciowych ze względu na dobrą przyczepność i spoistość strukturalną. Wadą jest możliwość wywoływania kontaktowych uczuleń włącznie z kontaktowym zapaleniem skóry. Zwykle przepisywana jest w połączeniu z innymi podłożami, ze względu na swą wysoką liczbę wodną.

Do półstałych preparatów do oczu zaleca się stosowanie jako podłoża maści cholesterolowej lub eucerynowej, których składy podaje FP XII. Szeroko stosuje się również podłoże złożone z wazeliny z lanoliną bezwodną w stosunku wagowym 9:1 oraz podłoże adsorpcyjnego o składzie: parafina ciekła, lanolina bezwodna po 1 cz., wazelina biała 8 cz.

Maść prosta (*Unguentum simplex*) jest podłożem lipofilowym bezwodnym, która zawiera emulgator, dzięki czemu możliwe jest wiązanie znacznej ilości wody. Skład według FP XII [36] przedstawia się następująco: Adeps lanae 10,0 ; Vaselinum flavum 90,0.

2.6.1.2 Liczba wodna, emulsje w/o i o/w

Maść składa się z jednofazowego podłoża, w którym mogą być rozproszone cząstki stałe

lub ciecze, zgodnie z definicją FP XII. Farmakopea wymienia w monografii trzy typy maści:

- hydrofobowe – Hydrophobic ointments; Pommades hydrophobes;
- emulgujące wodę – Water-emulsifying ointments; Pommades absorbant l'eau;
- hydrofilowe – Hydrophilic ointments; Pommades hydrophiles.

Typ maści jest ściśle uzależniony od rodzaju podłoża oraz substancji pomocniczych. Maści hydrofobowe mogą absorbować tylko małe ilości wody. Typowymi podłożami używanymi do ich sporządzania są: parafina stała, parafina ciekła i parafina ciekła lekka, oleje roślinne, tłuszcze zwierzęce, syntetyczne glicerydy, woski i ciekłe polialkilosiloksany.

Najlepsze właściwości wiązania wody, co istotne w technologii sporządzania maści recepturowych typu w/o i o/w, posiadają: maść prosta, euceryny I i II oraz mieszanina wazeliny z lanoliną w równych częściach. Znajomość LW ułatwia przewidywanie możliwości wykonania i trwałości sporządzonej postaci leku. Maść podczas przechowywania nie może ulegać rozwarstwieniu i nie mogą być widoczne na jej powierzchni krople fazy wodnej (tzw. pocenie się maści). **Tabela 10** przedstawia doświadczalne dane dotyczące zdolności wiązania wody przez podłoża absorpcyjne:

Podłoże	Wymagania według FP XII	Sposób mieszania		Liczba wodna – receptura klasyczna – masa związanej wody w 100 g podłoża (w g)
		manualne – receptura klasyczna	Przy użyciu miksera recepturowego	
		Masa związanej wody w 10,0 g podłoża (w g)		
Cholesteroli unguentum ^a	Nie mniej niż 12,0	19,4	22,0	194
Unguentum album ^b	Nie mniej niż 4,0	2,1	4,0	21
Ung. Eucerini I	Nie mniej niż 30,0	41,5	52,9	415
Ung. Eucerini II	Nie mniej niż 30,0	31,4	47,1	314
Ung. Simplex	Nie mniej niż 7,0	7,7	17,0	77
Vaselinum album + Lanolinum 1:1	-	23,3	48,0	233

Tabela 10. Ocena zdolności absorbowania wody – dane doświadczalne [145]; a – skład według FP XII: Cholesterolum 3,0; Alcohol stearylicus 3,0; Cera alba 8,0; Vaselinum album 86,0; b – skład według FP XII: Cera alba 5,0; Vaselinum album 95,0

W procesie wytwarzania postaci leku dość istotne znaczenie ma nie tylko zdolność wiązania wody przez podłoże, ale i sama ilość roztworu jaką należy wprowadzić by uzyskać produkt leczniczy o odpowiednich cechach. Zawartość wody w podłożu może rzutować na cechy biofarmaceutyczne, a wytworzenie emulsji o/w może okazać się bardzo niepożądane. Co do zasady, stabilność układu o/w jest niższa niż w/o. Na trwałość substancji leczniczych duża zawartość wody może wywierać również wpływ niekorzystny, co jest związane z procesami hydrolizy, rozkładu, stworzeniem warunków do przebiegu procesów oksydo-redukcyjnych itp.

By podwyższyć trwałość leku recepturowego możliwe jest jednak zastosowanie środków konserwujących oraz przeciwutleniaczy. Większość wytwarzanych maści stanowi układ w/o. Po odpowiednim przygotowaniu podłoża roztwór substancji leczniczej dodawany jest do niego porcjami. Maści typu emulsji o/w można uzyskać z kolei tylko metodą na ciepło po stopieniu podłoża (w temp. najczęściej ok. 70°C). Faza wodna o podobnej temperaturze zostaje dodana do stopionego podłoża, mieszanie powinno być szczególnie intensywne, zwłaszcza w chwili zestalania. Odwrotne działanie z wykorzystaniem móździerza daje produkty o gorszym wyglądzie i gorszych cechach reologicznych [150].

2.6.1.3 Aplikacja maści na skórę

Substancje lecznicze zawarte w maściach po aplikacji na skórę ulegają procesowi uwolnienia z podłoża, a następnie przenikania przez warstwę rogową naskórka i żywe warstwy skóry. Lek dyfunduje przez hydrożel białkowy i może ulec dalszemu wchłanianiu do krwiobiegu lub chłonki. Szczególnie istotny jest zatem dobór podłoża w aspekcie wywierania działania leczniczego substancji czynnej. Podłoża węglowodorowe są dla skóry substancjami całkowicie obcymi, są hydrofobowe i po aplikacji utrudniają perspirację. Podłoża glicerydowe, do których należy smalec wieprzowy, wykazują duże powinowactwo do tłuszczu ludzkiego, zatem wnikają w głąb naskórka i ułatwiają wchłanianie substancji czynnej. Podłoża absorpcyjne stanowią obszerną, bardzo zróżnicowaną grupę ze względu na różnorodność środków powierzchniowo czynnych, jakie stosuje się do ich wytwarzania. Uwalnianie substancji z tego typu podłoży następuje powoli, ale ma to dość korzystny wpływ na sposób działania maści. Znacznie lepiej uwalniane są natomiast substancje lecznicze rozpuszczalne w lipidach. [150]. Absorpcja substancji leczniczej z postaci leku jest uwarunkowana budową warstwy rogowej naskórka, bogatej w struktury lipidowe, do których należą: ceramidy, cholesterol i wolne kwasy tłuszczowe. Korneocyty warstwy rogowej skóry zawierają natomiast

naturalne czynniki nawilżające, do których należą: aminokwasy, mocznik, pirolidynowy kwas karboksylowy, mleczany oraz Ca^{2+} i Mg^{2+} . Wymienione elementy w sposób dość oczywisty mają duży wpływ na wchłanianie substancji leczniczej, same wykazują właściwości lipo- lub hydrofilowe, podobnie jak substancje, które wchodzi w skład postaci leku. Zaburzenie jakiegokolwiek funkcji skóry, choćby związane z nadmiernym poceniem, również będzie decydować o wchłanianiu substancji. Istotnym czynnikiem jest pH powierzchni naskórka. Fizjologicznie pH skóry, określane w przedziale 5,4-5,9, może zostać zmienione przez proces pocenia, łojotok oraz metabolizm mikroorganizmów skolonizowanych na ludzkiej skórze. Odpowiedni proces złuszczenia naskórka, zaburzony u niektórych pacjentów, lub nadmierne rogowacenie także w duży sposób wywiera wpływ na przenikanie substancji farmaceutycznej [145]. Z punktu widzenia technologii postaci leku o wchłanianiu substancji z postaci leku decyduje również wielkość cząstek, stężenie substancji czynnej oraz stosowanie promotorów wchłaniania (np. DMSO, dodatek etanolu). Dobrym przykładem może być lek Cutivate®, który produkowany jest w postaci kremu oraz maści, ale w stężeniach odpowiednio 0,05% i 0,005% propionianu flutikazolu. Wskazania do stosowania kremu, jak i maści są takie same. Zastosowane 10-krotnie niższe stężenie w przypadku maści (podłoże tłuste) wiąże się z dużo szybszym i dużo lepszym uwalnianiem substancji po aplikacji na skórę.

2.6.2 Żele

Za definicją ujętą w monografii FP XII żele (ang. i fr. Gels) składają się z cieczy żelowanych odpowiednimi substancjami żelującymi. Żele lipofilowe, lipożele (ang. lipophilic gels, fr. gels lipophiles) są preparatami, których podłoża składają się z parafiny ciekłej w mieszaninie z polietylenem lub z olejów tłustych, żelowanych krzemionką koloidalną lub mydłami glinowymi, bądź cynkowymi. Żele hydrofilowe (ang. hydrophilic gels, fr. gels hydrophiles) są preparatami, których podłoża zwykle składają się z wody, glicerolu lub glikolu propylenowego i są żelowane odpowiednimi substancjami żelującymi, takimi jak poloksamery, skrobia, pochodne celulozy, karbomery i krzemiany magnezowo-glinowe [36]. Preparatem o bardzo dobrych właściwościach mukoadhezyjnych jest pasta Orabase o składzie przedstawionym w DAB, którą wykonuje się na bazie żelu lipofilowego składającego się z pektyny, soli sodowej karboksymetylocelulozy, polietylenu o m.cz. 32000 i parafiny ciekłej.

2.6.2.1 Żele na bazie wody

Żele stanowią układy fizyczne, w których faza rozproszona tworzy rodzaj dość luźno usieciowanej struktury wypełnionej za pomocą cieczy. Jeśli fazą rozpraszającą jest woda, układy takie to hydrożele. Są to wówczas zwykle układy jednofazowe, o ile nie ma określonej granicy faz między rozpuszczonymi makrocząsteczkami a cząsteczkami rozpuszczalnika (np. z pochodnymi celulozy). Dwufazowe hydrożele natomiast stanowią strukturę wytworzoną przez nierozpuszczalne w rozpuszczalniku makrocząsteczki rozproszone w nim (żel bentonitowy). Na bazie hydroksyetylocelulozy HEC 10000 wprowadzono jako surowiec do receptury produkt o nazwie Celugel ® w ostatnich latach [151].

W zależności o sposobu sporządzania w warunkach pracy apteki ogólnodostępnej można korzystać z metod klasycznych oraz przy użyciu miksera recepturowego, podobnie jak w preparatyce maści. W zależności od używanych substancji żelujących, metody można modyfikować i dobierać w odpowiedni sposób wykorzystując standardowe algorytmy postępowania. W metodach klasycznych, zwykle sporządza się roztwory substancji żelujących w odpowiednim rozpuszczalniku, dodaje się substancje czynne lub łączy się przygotowane roztwory w sposób mechaniczny. Można także sporządzać roztwory substancji leczniczych, które poddaje się bezpośrednio procesowi żelowania za pomocą odpowiednich suchych substancji. W metodach automatycznych lub półautomatycznych zwykle składniki umieszcza się w pojemniku i, z użyciem odpowiedniego programu miksera, dodaje środki żelujące na powierzchnię mieszaliny.

Ze względu na wodną bazę tej postaci leku niejednokrotnie żele wymagają użycia środka konserwującego, o ile substancja lecznicza sama w sobie nie stanowi konserwantu. Możliwe jest wówczas przechowywanie produktu przez dłuższy czas niż deklarowany dla półstałych postaci leków będących żelami wodnymi wynoszący zgodnie z zalecaniami do 14 dni w temp. 2-8 °C, o czym stanowi narodowa monografia informacyjna „Leki sporządzane w aptece” FP XII [36,145].

Żele polioksyetylenowe, przede wszystkim zawierające polimery o niskiej m.cz., wykazują silnie zaznaczone właściwości higroskopijne. Może być to podczas aplikacji u pacjenta powodem przesuszenia skóry w miejscu aplikacji. Z drugiej jednak strony rzadko wykazują działanie drażniące, toksyczne i zachowują się obojętnie w stosunku do skóry. Zdolność rozpuszczania niektórych substancji czynnych, które nie są rozpuszczalne w wodzie,

stanowi ich zaletę, tym bardziej, że wchłanianie leku zostaje wówczas ułatwione. Przed ustaleniem równowagi zawartości wody w skórze i w postaci leku dochodzi do odciągania wody z naskórka, co powoduje jego macerację, w związku z czym zaleca się aplikacje żeli polioksyetylenowych możliwie cienką warstwą. Wadą jest niezgodność recepturowa z jodem, jodkami oraz substancjami czynnymi o budowie fenolowej.

Żele organiczne, wytwarzane z substancji o charakterze żelującym takich jak pochodne metylocelulozy, kwasu poliakrylowego, alkoholu poliwinylowego czy nawet skrobi stanowią dobre podłoża do maści ocznych. Wadą jest szybki rozwój drobnoustrojów, szczególnie w żelach skrobiowych oraz wrażliwość na zmiany pH i związane z tym procesy rozkładu substancji żelującej.

Żele nieorganiczne, oparte głównie na bentonicie, wykazują cechy zbliżone do żeli organicznych, jednak posiadają wyraźne właściwości tiksotropowe. „Pamięć cieczy” i brak zmiany lepkości podczas wyjaławiania termicznego niewątpliwie stanowią zalety. Niepożądaną właściwością jest dość wysokie pH, żele mogą zatem powodować działanie wysuszające i ściągające na skórę. Uwalnianie wielu substancji, np. kwasu borowego czy pochodnych sulfonamidowych, jest wyraźnie lepsze niż z podłoży lipofilowych. Za pomocą emulgatorów żel bentonitowy można łączyć w kombinowane podłoża z parafiną ciekłą, woskiem, alkoholami tłuszczowymi [150].

2.6.2.2 Substancje żelujące

Dużą uwagę w preparatach żelowych, ze względu na ich miejsce podania, należy zwracać na ich przyczepność do błon śluzowych, co gwarantuje odpowiednie działanie substancji czynnej. Bioadhezja jest pojęciem ogólnym, w którym przynajmniej jedna z uczestniczących faz w miejscu podania, tzn. preparat leczniczy lub śluz, inicjuje ten proces. W zasadzie wszystkie procesy bioadhezji cechują się obecnością wody. Jest to o tyle istotne, że obecność wody lub wilgoci ułatwia ten proces, w przeciwieństwie do procesu adhezji (zlepiania), gdzie woda działa na niekorzyść. Proces bioadhezji można zatem tak samo intensyfikować, jak i osłabiać stosując odpowiednie rozwiązania. W celu ułatwienia procesów bioadhezyjnych w preparatach leczniczych stosuje się znane substancje pomocnicze, które zostały przedstawione poniżej [152].

Każda z przedstawionych, najczęściej stosowanych substancji jest wykorzystywana w preparatyce farmaceutycznej do wytworzenia postaci leku o wymaganej konsystencji i lepkości. Farmakopea Polska XII podaje monografie szczegółowe m.in.: makrogoli, karbomerów, alkoholu poliwinylowego, bentonitu, poloksamerów, hydroksymetyloetylocelulozy, metylocelulozy, etylocelulozy i innych, jako substancji zwiększających lepkość. Ich zestawienie zostało zaprezentowane jako **tabela 11**. W formulacjach hydrożeli stosowane są substancje żelujące 2 różnych typów: organiczne lub nieorganiczne. Wśród substancji pochodzenia organicznego należy wymienić: agar, tragakantę, alginiany, pektyny oraz dekstran (występujące naturalnie), półsyntetyczne pochodne celulozy (metyloceluloza, karmeloza sodowa, hydroksyetyloceluloza, hypromeloza, hydroksypropyloceluloza) oraz syntetyczne np. karbomer. Wśród substancji nieorganicznych największe znaczenie mają: bentonit i krzemionka koloidalna (Aerosil) [153].

Polioksyetylen (makrogol) stanowi dobry typ emulgatora i substancji żelującej w technice sporządzania kremów, żeli oraz emulsji ze względu na swoje właściwości przedstawione wcześniej. Chemicznie jest polieterem o ogólnym skrócie powszechnie stosowanym PEG i ogólnym wzorze $\text{H-O}[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}]_n\text{-H}$, gdzie n wynosi od 4 do 120. Może być cieczą lub ciałem stałym, w zależności od masy cząsteczkowej. Największe zastosowanie znajdują lepkie ciecze o m.c. od 200 do 600. Stosowany jest głównie w technologiach przemysłowych produkcji postaci leków [154].

Kwas poliakrylowy (karbomer, PAA) to syntetyczny polimer kwasu akrylowego o dużej masie cząsteczkowej. Istnieją zarówno homopolimery kwasu akrylowego lub karbomer usieciowany z wykorzystaniem alilowego eteru z pentaerytrytu, eteru alilowego sacharozy lub eteru alilowego z propylenem. W roztworze wodnym o pH obojętnym, PAA jest polimerem anionowym ponieważ wiele łańcuchów bocznych straci swoje protony i zyskuje ładunek ujemny. Polielektrolity PAA mają zdolność pochłaniania i zatrzymywania wody oraz wielokrotnego pęcznienia w stosunku do pierwotnej objętości. Suchy karbomer ma postać białego, puszystego proszku. Najczęściej jest stosowany jako substancja żelująca w kosmetykach i produktach do pielęgnacji ciała. Jego rolą jest zawieszanie ciała stałego w cieczy, zapobieganie rozwarstwianiu się emulsji oraz kontrolowanie konsystencji przepływu wytworzonego produktu. W wielu zastosowaniach PAA stosuje się w postaci soli metali alkalicznych lub soli amonowych, np. poliakrylan sodu. W postaci suchego proszku dodatnio naładowane jony sodu są związane z poliakrylanem, jednak w roztworach następuje jego

dysocjacja. Zamiast pełnego łańcucha polimerowego powstają jony, co prowadzi do spęczenia żelu, który może wchłonąć dużą ilość wody. Stopień jonizacji jest ściśle uzależniony od pH roztworu. W postaci niejonizowanej przy niskim pH karbomery mogą łączyć się z różnymi polimerami niejonowymi (tlenek polietylenu, poli-N-winylopirolidon, poliakrylamid i niektóre etery celulozy) i tworzyć kompleksy interpolimerowe z wiązaniami wodorowymi [155]. Wodne roztwory PAA mogą również tworzyć polikompleksy z przeciwnie naładowanymi polimerami, takimi jak chitozan, surfaktanty i cząsteczki leku (na przykład streptomycyna) [156].

Alkohol poliwinylowy (PVA, PVAL, PVOH) to polimer winylowy o wzorze $[-CH_2-CH(OH)-]_n$. Jest otrzymywany z poli(octanu winylu), ale systematycznie jest polimerem alkoholu winylowego. Obok zastosowań czysto technicznych (składnik klejów, lakierów, aparatur włókienniczych i chemicznych, stabilizator farb emulsyjnych, produkcja rękawic ochronnych, nici chirurgicznych, folii, płyt i rur), w medycynie stosowany jest jako zagęszczacz farmaceutyczny i bezpośrednio jako substancja czynna kropli do oczu (Lacrimonal®) o działaniu powlekającym i nawilżającym. PVA jest używany w różnych innych zastosowaniach medycznych ze względu na jego biokompatybilność, niską tendencję do adhezji białek i niską toksyczność. Konkretnie zastosowania obejmują wymianę chrząstki i produkcję soczewek kontaktowych [157].

Bentonit jest substancją pochodzenia naturalnego, występującą w postaci mialkiej glinki o barwie szaro-białawej. Jest substancją higroskopijną i nierozpuszczalną w wodzie ale w kontakcie z nią ulega pęcznieniu. Stosowany jest głównie jako modyfikator lepkości w postaciach leku przeznaczonych do stosowania miejscowego, tj. żelach i kremach (stężenia 2-10%).

Pochodne celulozy znalazły szerokie zastosowanie w sporządzaniu półstałych postaci leków w formie hydrożeli. Najważniejsze z nich zostały przedstawione poniżej.

Hydroksyetyloceluloza (HEC) jest pochodną celulozy, w której grupy hydroksylowe polimeru zostały zastąpione grupami hydroksyetylowymi. Stanowi wysoce hydrofilową substancję o właściwościach zagęszczających i żelujących. W zależności od długości łańcuchów polimerowych, HEC może być mniej lub bardziej rozpuszczalna w wodzie. Ciecze polarne, takie jak woda wraz z HEC tworzą żel, który jest podstawą do przygotowania kremów

i żeli jako farmaceutyczne postaci leku i kosmetyki. Jest składnikiem produktów stosowanych do nawilżania soczewek kontaktowych. W procesie utwardzania emulsji jest stosowana jako emulgator lub stabilizator. HEC, dzięki możliwości zwiększania lepkości roztworu, stosuje się także w przygotowywaniu kropli do oczu, których dawkowanie, poprzez wydłużony kontakt leku w miejscu podania, można zmodyfikować. Przykładem mogą być krople 10% Sulfacetamidum Polpharma®, które zgodnie ze wskazaniem podaje się co 1-3 h do worka spojówkowego, podczas gdy formę 10% Sulfacetamidum HEC® – co 3-4 h. Wpływa to na komfort stosowania przez pacjenta.

Hydroksypropyloceluloza (HPC) jest pochodną celulozy z dobrą rozpuszczalnością zarówno w wodzie, jak i w rozpuszczalnikach organicznych. HPC jest eterem celulozy, w których niektóre z grup hydroksylowych w merach glukozowych jednostek zostały hydroksypropylowane przy użyciu tlenku propylenu. Średnia liczba podstawionych grup hydroksylowych na jednostkę glukozy jest określana jako stopień podstawienia (DS). Całkowite podstawienie określa się jako $DS=3$. Ponieważ dodana grupa hydroksypropylowa zawiera grupę hydroksylową, można ją również eteryfikować podczas wytwarzania HPC. Gdy to nastąpi, liczba moli grup hydroksypropylowych na cząsteczkę glukozy (moli podstawienia, MS), może być wyższa niż 3. Ponieważ celuloza jest substancją krystaliczną, HPC musi mieć MS około 4, aby osiągnąć dobrą rozpuszczalność w wodzie. HPC zawiera kombinację grup hydrofobowych i hydrofilowych, dzięki czemu ma niższą krytyczną temperaturę roztworu (LCST) wynoszącą 45 °C. W temperaturach niższych HPC jest łatwo rozpuszczalna w wodzie; w wyższych od LCST, HPC nie ulega rozpuszczeniu. Roztwór HPC, produkowany przez Aton Pharma o nazwie Lacrisert®, to preparat stosowany jako farmaceutyk będący sztucznymi łzami. Wskazaniem do stosowania jest leczenie stanów chorobowych charakteryzujących się niewystarczającym nawilżeniem oka (suche zapalenie rogówki i spojówki, nawracające nadżerki rogówki, zmniejszona wrażliwość rogówki, ekspozycja i neuroparalityczne zapalenie rogówki) [158-160].

Metyloceluloza (MC) - pochodna celulozy, jest używana jako zagęszczacz i emulgator w różnych produktach farmaceutycznych, kosmetycznych i spożywczych, a także jako środek przeczyszczający *per se*. Podobnie jak celuloza nie podlega trawieniu przez człowieka, nie jest toksyczna i nie stanowi substancji alergizującej. Właściwości żelujące metylocelulozy są szczególnie korzystne w leczeniu zespołu suchego oka. [161]. Roztwory zawierające MC lub podobne pochodne celulozy są stosowane jako substytut łez lub śliny, jeśli naturalna produkcja

tych płynów jest zaburzona. Metyloceluloza jest również ważnym emulgatorem, uniemożliwiającym rozdzielanie się dwóch zmieszanych cieczy, ponieważ jest stabilizatorem układów emulsyjnych. MC w postaci żelu ma wyjątkową właściwość wiązania na gorąco i topnienia na zimno. Krytyczna temperatura roztworu (LCST) metylocelulozy zawiera się w przedziale 40 - 50 °C. W temperaturach niższych MC jest łatwo rozpuszczalna w wodzie; powyżej LCST nie jest rozpuszczalna, a paradoksalny efekt daje ogrzewanie nasyconego roztworu metylocelulozy, podczas którego zamienia się w ciało stałe, a MC ulega wówczas wytrąceniu. Temperatura, w której to następuje, zależy od wartości DS, przy czym wyższe wartości DS dają niższą rozpuszczalność i niższe temperatury strącania, ponieważ polarne grupy hydroksylowe ulegają maskowaniu. Przygotowanie roztworu MC z zimną wodą stanowi pewną trudność: substancja wchodzi w kontakt z wodą, wokół niej tworzy się warstwa żelu, radykalnie spowalniając dyfuzję wody do proszku, dlatego wewnątrz pozostaje suche. Lepszym sposobem jest wymieszanie proszku z gorącą wodą, tak aby cząstki MC były dobrze zdyspergowane (zwiększenie efektywnej powierzchni) w wodzie i schłodzenie układu podczas mieszania, co prowadzi do znacznego przyspieszenia procesu rozpuszczania.

Metylohydroksyetyloceluloza (MHEC) jest terminem określającym związki chemiczne wytwarzane przez eteryfikację celulozy. Część hydroksylowych grup celulozy jest połączona jako etery z rodnikiem metylowym i z grupami hydroksyetylowymi. Jest rozpuszczalna zarówno w wodzie, jak i w rozpuszczalnikach organicznych. W roztworach wodnych lepkość jest znacznie zwiększona. W przeciwieństwie do innych eterów celulozowych, takich jak HPC, w której rozpuszczalność zmniejsza się gwałtownie po podgrzaniu przez temperaturę roztworu krytycznego i może prowadzić do flokulacji, temperatura roztworu krytycznego w MHEC jest znacznie wyższa i wynosi około 110 °C [162]. W przemyśle farmaceutycznym MHEC stosuje się go jako substancję wiążącą i powlekającą do tabletek, a także substancję żelującą w zawiesinach i żelach [163].

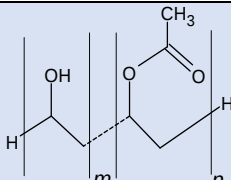
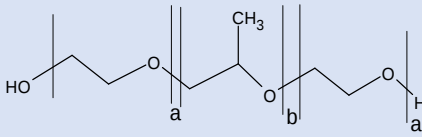
Poloksamery są niejonowymi kopolimerami trójblokowymi składającymi się z centralnego hydrofobowego łańcucha polioksypropylenu (poli(tlenku propylenu)) otoczonego dwoma hydrofilowymi łańcuchami polioksyetylenu (poli(tlenku etylenu)). Termin „poloksamer” został zaproponowany przez wynalazcę Irvinga Schmolkę, który otrzymał patent na te materiały w 1973 roku [164]. W preparatyce farmaceutycznej poloksamery są również znane pod nazwami handlowymi Kolliphor [165]. Ze względu na swą amfifilową strukturę polimery te mają właściwości powierzchniowo czynne, dzięki czemu są przydatne

w zastosowaniach farmaceutycznych i przemysłowych. Między innymi można je wykorzystać do zwiększenia rozpuszczalności w wodzie substancji hydrofobowych, oleistych lub w inny sposób zwiększyć mieszalność dwóch substancji o różnej hydrofobowości. Zostały one również ocenione pod kątem różnych zastosowań dystrybucji leków i wykazano, że uwrażliwiają odporne na leki nowotwory w chemioterapii. Po zmieszaniu z wodą stężone roztwory poloksamerów mogą tworzyć hydrożele. Ze względu na konsystencję, żele poloksamerowe można łatwo wytłaczać.

Guma tragakantowa to lepka, bezwonna, pozbawiona smaku, rozpuszczalna w wodzie mieszanina polisacharydów pozyskiwanych z soku spuszczonego z korzenia kilku gatunków roślin strączkowych z Bliskiego Wschodu z rodzaju *Astragalus*, w tym *A. adscendens*, *A. gummifer*, *A. brachycalyx*, [166,167] i *A. tragacantha*, który poddaje się wysuszeniu. Guma wycieka z rośliny w postaci skręconych wstążek lub płatków, które można sproszkować. Pochłania wodę, tworząc żel, który można mieszać w pastę. Główne frakcje gumy to tragakantyna, wysoce rozpuszczalna w wodzie jako koloid śluzowy, oraz chemicznie spokrewniona bassoryna, która jest znacznie mniej rozpuszczalna, ale również pęcznieje w wodzie, tworząc żel. Guma była historycznie używana jako ziołowy lek na takie stany jak kaszel i biegunka. Proszki na bazie tragakanty były czasami nazywane diatragakantem [168]. Jako śluz lub pasta była stosowana do miejscowego leczenia oparzeń. Jest stosowana obecnie w farmaceutykach i żywności jako emulgator, zagęszczacz, stabilizator i dodatek teksturujący.

Nazwa łacińska Nazwa polska Nazwy ang. i fr.	Definicja	Właściwości		
		Typ makro- golu	Wygląd	Rozpuszczalność
Macrogola Makrogole Macrogols	Mieszanina polimerów o wzorze ogólnym $H-[OCH_2-CH_2]_n-OH$, gdzie n oznacza średnią liczbę grup oksyetylenowych. Typ makrogołu jest określany liczbą, która wskazuje średnią względną masę cząsteczkową. Substancja może zawierać dodatek odpowiedniego stabilizatora.	300 400 600	Przezroczysta, lepka, bezbarwna lub prawie bezbarwna, higroskopijna ciecz	Substancja miesza się z wodą, bardzo łatwo rozpuszczalna w acetonie, w etanolu (96%) i w chlorku metylenu, praktycznie nierozpuszczalna w olejach tłustych i w olejach mineralnych
		1000	Biała lub prawie biała, higroskopijna substancja stała, o wyglądzie wosku lub parafiny	Substancja bardzo łatwo rozpuszczalna w wodzie, łatwo rozpuszczalna w etanolu (96%) i w chlorku metylenu,

				praktycznie nierozpuszczalna w olejach tłustych i w olejach mineralnych
		1500	Biała lub prawie biała substancja stała, o wyglądzie wosku lub parafiny	Substancja bardzo łatwo rozpuszczalna w wodzie i w chlorku metylenu, łatwo rozpuszczalna w etanolu (96%), praktycznie nierozpuszczalna w olejach tłustych i w olejach mineralnych
		3000 3350	Biała lub prawie biała substancja stała, o wyglądzie wosku lub parafiny	Substancja bardzo łatwo rozpuszczalna w wodzie i w chlorku metylenu, bardzo trudno rozpuszczalna w etanolu (96%), praktycznie nierozpuszczalna w olejach tłustych i w olejach mineralnych
		4000 6000 8000	Biała lub prawie biała substancja stała, o wyglądzie wosku lub parafiny	Substancja bardzo łatwo rozpuszczalna w wodzie i w chlorku metylenu, praktycznie nierozpuszczalna w etanolu (96%), w olejach tłustych i w olejach mineralnych
		20000 35000	Biała lub prawie biała substancja stała, o wyglądzie wosku lub parafiny	Substancja bardzo łatwo rozpuszczalna w wodzie, rozpuszczalna w chlorku metylenu, praktycznie nierozpuszczalna w etanolu (96%), w olejach tłustych i w olejach mineralnych
Carbomera Karbomery Carbomers Carbomères	Wielkocząsteczkowe polimery kwasu akrylowego usieciowane alkenylowymi eterami cukrów lub polialkoholi. Zawartość: od 56,0% do 68,0% grup kwasu karboksylowego (-CO ₂ H) (w przeliczeniu na suchą substancję).	Wygląd: biały lub prawie biały, puszysty, higroskopijny proszek. Rozpuszczalność: substancja pęcznieje w wodzie i w innych polarnych rozpuszczalnikach po rozproszeniu i zobojętnieniu roztworem wodorotlenku sodu.		
Poly(alcohol vinylicus) Alkohol poliwinylowy Poly(vinyl alcohol)	Alkohol poliwinylowy jest otrzymywany przez polimeryzację octanu winylu, poprzedzoną częściową lub prawie całkowitą hydrolizą octanu poliwinylowego w obecności katalitycznych ilości zasad lub kwasów nieorganicznych. Polimery alkoholu poliwinylowego spełniają zależność: $0 \leq n/m \leq 0,35$. Średnia względna masa cząsteczkowa znajduje się w zakresie od 20000 do 150000. Lepkość wynosi od 3 do 70 mPa.s. Liczba estrowa, która określa stopień hydrolizy jest nie większa niż 280.	Wygląd: żółtawobiały proszek lub półprzezroczyste granulki. Rozpuszczalność: substancja rozpuszczalna w wodzie, trudno rozpuszczalna w etanolu, praktycznie nierozpuszczalna w acetonie. Dostępne są różne odmiany alkoholu poliwinylowego. Różnią się one stopniem polimeryzacji i stopniem hydrolizy, które decydują		

Poly(alcool vinylique)		o właściwościach fizycznych poszczególnych odmian substancji. Są one charakteryzowane przez lepkość i liczbę estrową substancji.										
Bentonitum Bentonit Bentonite	Naturalna glina o wysokiej zawartości montmorylonitów, naturalnie uwodnionych krzemianów glinu, w których niektóre atomy glinu i krzemu mogą być zastąpione przez inne atomy takie jak magnez i żelazo.	Wygląd: bardzo mialki, jednorodny, szarawobiały proszek o bardziej lub mniej żółtawym albo różowawym odcieniu. Rozpuszczalność: substancja praktycznie nierozpuszczalna w wodzie i w roztworach wodnych. Substancja pęcznieje w małej ilości wody, tworząc plastyczną masę.										
Hydroxyethyl-cellulosum Hydroksyetyloceluloza Hydroxyethyl-cellulose Hydroxyéthyl-Cellulose	Częściowo O-(2-hydroksyetylowana) celuloza.	Wygląd: biały, żółtawobiały lub szarawobiały proszek lub granulki. Rozpuszczalność: substancja rozpuszczalna w gorącej i zimnej wodzie dając roztwór koloidalny, praktycznie nierozpuszczalna w acetonie, w etanolu (96%) i w toluenie.										
Hydroxypropyl-cellulosum Hydroksypropyloceluloza Hydroxypropyl-cellulose	Częściowo O-(2-hydroksypropylowana) celuloza. Zawartość: od 53,4% do 80,5% grup hydroksypropoksylowych (w przeliczeniu na wysuszoną substancję). Substancja może zawierać czynniki przeciwbrylające, takie jak krzemionka.	Wygląd: biały lub żółtawobiały proszek lub granulki, słabo higroskopijne. Rozpuszczalność: substancja rozpuszczalna w zimnej wodzie, w etanolu (96%) i w glikolu propylenowym, tworząc koloidalne roztwory, praktycznie nierozpuszczalna w gorącej wodzie.										
Methyl-cellulosum Metyloceluloza Methylcellulose Méthylcellulose	Celuloza częściowo O-metylowana. Eter metylowy celulozy. Zawartość: od 26,0% do 33,0% grup metoksylowych (-OCH ₃ , m.c.z. 31,03) (w przeliczeniu na wysuszoną substancję).	Wygląd: biały, żółtawobiały lub szarawobiały proszek lub granulki, higroskopijne po wysuszeniu. Rozpuszczalność: substancja praktycznie nierozpuszczalna w gorącej wodzie, w acetonie, w bezwodnym etanolu i w toluenie. Substancja rozpuszcza się w zimnej wodzie tworząc roztwór koloidalny.										
Methylhydroxy-ethylcellulosum Metylohydroksyetyloceluloza Methyl-hydroxyethyl-cellulose Méthyl-hydroxyéthyl-cellulose	Celuloza częściowo O-metylowana i O-(2-hydroksyetylowana)	Wygląd: biały, żółtawobiały lub szarawobiały proszek lub granulki, higroskopijny po suszeniu. Rozpuszczalność: substancja praktycznie nierozpuszczalna w gorącej wodzie, w acetonie, w bezwodnym etanolu i w toluenie. Substancja rozpuszcza się w zimnej wodzie tworząc roztwór koloidalny.										
Poloxamera Poloksamery Poloxamers Poloxamères	Poloksamery to syntetyczne kopolimery blokowe tlenku etylenu i tlenku propylenu o następującym wzorze ogólnym: 	Wygląd: - poloksamer 124: bezbarwna lub prawie bezbarwna ciecz; - poloksamery 188, 237, 338, 407: biały lub prawie biały, woskowaty proszek, mikrokulki lub płatki. Rozpuszczalność: - poloksamery 124, 237, 338, 407: substancja bardzo łatwo rozpuszczalna w wodzie i w etanolu (96%), praktycznie nierozpuszczalna w eterze naftowym (temperatura wrzenia:50-70 °C); -poloksamer 188: substancja rozpuszczalna w wodzie i w etanolu (96%). Temperatura topnienia : ok. 50 °C dla poloksamerów 188, 237, 338 i 407.										
	<table><tr><td>Typ poloksameru</td><td>Liczba jednostek tlenku etylenu (a)</td><td>Liczba jednostek tlenku propylenu (b)</td><td>Zawartość jednostek oksyetylenu (%)</td><td>Średnia względna masa cząsteczkowa</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	Typ poloksameru	Liczba jednostek tlenku etylenu (a)	Liczba jednostek tlenku propylenu (b)	Zawartość jednostek oksyetylenu (%)	Średnia względna masa cząsteczkowa						
Typ poloksameru	Liczba jednostek tlenku etylenu (a)	Liczba jednostek tlenku propylenu (b)	Zawartość jednostek oksyetylenu (%)	Średnia względna masa cząsteczkowa								

	124	10-15	18-23	44,8-48,6	2090-2360	
	188	75-85	25-30	79,9-83,7	7680-9510	
	237	60-68	35-40	70,5-74,3	6840-8830	
	338	137-146	42-47	81,4-84,9	12700-17400	
	407	95-105	54-60	71,5-74,9	9840-14600	
	Poloksamery mogą zawierać dodatek odpowiedniego przeciwutleniacza.					
Tragacantha	Twardniejąca na powietrzu lepka wydzielina, wypływająca w sposób naturalny lub po nacięciu pnia lub gałęzi <i>Astragalus gummifer</i> Labill. Oraz z niektórych innych gatunków rodzaju <i>Astragalus</i> z Azji zachodniej.					-
Tragakanta						
Tragacanth						
Gomme adragante						

Tabela 11. Najczęściej stosowane substancje żelujące w preparatyce farmaceutycznej (na podstawie monografii szczegółowych FP XII)

2.7 Jałowe postaci leku

FP XII wyróżnia dwie kategorie leków sporządzanych w aptekach: leki niejłowe oraz jałowe [36]. Zgodnie ze wskazówkami dotyczącymi dobrej praktyki sporządzania leków w aptece, wytwarzanie preparatów farmaceutycznych w warunkach aptecznych różni się od produkcji przemysłowej, w której obowiązują normy GMP. Nie oznacza to jednak, że w aptece nie powinien funkcjonować odpowiedni system zapewnienia jakości, bowiem osoba sporządzająca jest odpowiedzialna za przygotowanie preparatu odpowiedniej jakości, we właściwych warunkach, w odpowiednim opakowaniu wraz z właściwym jego oznakowaniem. Odpowiedzialność polega również m.in. na sporządzeniu leku zgodnie z receptą bądź zleceniem oraz intencjami przepisyującego i na wydaniu go zgodnie z wymogami ustalonymi przez odpowiednie regulacje zawodowe i prawne [36,143,144].

Leki jałowe należą do I klasy czystości mikrobiologicznej i są wykonywane w aptece w formie preparatów do podania pozajelitowego jako: leki do wstrzykiwań lub wlewów kroplowych (preparaty żywieniowe oraz cytostatyczne), leków do oczu (roztwory, zawiesiny, żełe, maści) oraz innych stosowanych na uszkodzoną powierzchnię skóry i rany. Na odpowiednią jakość sporządzonego w aptece preparatu wpływają zasady należytego postępowania na każdym z etapów wytwarzania jałowej postaci leku, na które składają się: miejsce sporządzania (boksy aseptyczne, łóże z nawiewem laminarnym), materiały i metody zapewniające jałowość (wykluczające zanieczyszczenie mechaniczne, fizyczne i biologiczne)

oraz czynniki ryzyka dotyczące poszczególnych składników oraz osoby sporządzającej lek. Ważny jest algorytm postępowania i sposób organizacji pracy, który musi uwzględniać kontrolę wszystkich etapów, które mogą stanowić potencjalne źródło zakażenia preparatu [145].

2.7.1 Krople do oczu i maści oczne

Za FP XII:

OPHTHALMICA

Preparaty do oczu

Eye preparations; Préparations ophtalmiques

DEFINICJA

Preparaty do oczu są jałowymi płynnymi, półstałymi lub stałymi preparatami przeznaczonymi do podania na gałkę oczną i/lub na spojówkę lub do umieszczania w worku spojówkowym. Tam, gdzie ma to zastosowanie, pojemniki na preparaty do oczu spełniają wymagania dla tworzyw stosowanych do produkcji pojemników (3.1 i podrozdziały) oraz pojemników (3.2 i podrozdziały)¹.

Wyróżnia się kilka rodzajów preparatów do oczu:

- krople do oczu;
- roztwory do oczu;
- proszki do sporządzania kropli lub roztworów do oczu;
- półstałe preparaty do oczu;
- wkładki do oczu [36].

Jak każda postać leku, leki oftalmologiczne muszą spełniać podstawowe wymagania w zakresie jakości określonej dla danej formy leku, skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania. Czas kontaktu z powierzchnią gałki ocznej, a tym samym czas działania leku jest bardzo istotnym czynnikiem, który decyduje o przygotowaniu preparatu w odpowiedniej

¹ rozdziały i podrozdziały FP XII [36]

formie. Ponadto przygotowanie maści ocznej obok kropli jest istotne z punktu widzenia aplikacji, bo o ile krople podaje się wyłącznie do worka spojówkowego, o tyle maść można aplikować także na brzegi powiek lub na zewnętrzną ich warstwę [145]. W aptecznej technologii sporządzania leków substancje takie jak: detreomycyna, pilokarpina, gentamycyna, tetrakaina czy siarczan cynkowy mogą być składnikami preparatów ocznych zarówno w postaci półstałej (maść oczna), jak i płynnej (krople). Również metronidazol i azotan srebra znajdują szerokie zastosowanie w oftalmologii. Ta pochodna azolowa wraz z siarczanem cynku wchodzi w skład maści stosowanej w zakażeniu nużeńcem, krople z azotanem srebra stosuje się natomiast w profilaktycznym zabiegu okołoporodowym, co sygnalizowałem w rozdziale 2.3. Kuszającym może być zestawienie obu substancji zarówno w postaci kropli ocznych, jak i maści do oczu, do czego można wykorzystać *ex tempore* metodę syntezy związku kompleksowego.

Z punktu widzenia niniejszej pracy najistotniejszymi postaciami leków ocznych, co również przekłada się na popularność samych form, są krople i półstałe postaci leków ocznych. Ze względu na właściwości fizyczne można dokonać odpowiedniej ich klasyfikacji. Krople do oczu sporządza się w formie: roztworów rzeczywistych (np. krople z siarczanem cynku, atropiną, pilokarpiną, jodkiem potasu), koloidalnych (np. roztwory zawierające srebro koloidalne) albo o zwiększonej lepkości (np. z pochodnymi celulozy) albo w formie układów rozproszonych – zawiesin lub emulsji (np. krople z prednizolonem). Półstałe postaci leków ocznych obejmują maści, żele oraz kremy.

2.7.2 Izohydria i izotonia kropli do oczu, substancje uzupełniające

Rogówka oka jest miejscem, z którego lek podany do worka spojówkowego ulega wchłonięciu. Właściwości fizykochemiczne przede wszystkim kropli ocznych mają fundamentalne znaczenie w procesie szybkości przenikania przez struktury narządu wzroku. Wśród nich należy wymienić obowiązkowo: wielkość cząsteczki, lipofilowość, wartość pK_a , odmiany polimorficzne, a ponadto: fizjologiczne mechanizmy obronne oka i bariery metaboliczne. Zmiany stężenia substancji leczniczej z zaaplikowanej postaci leku ulegają wahaniom ze względu na zjawisko tworzenia i parowania płynu łzowego, zaaplikowane krople są rozcieńczane przez płyn łzowy, może dochodzić również do reakcji leku ze składnikami łez np. w przypadku kationów srebra wchodzących w jego skład. Stopień wiązania substancji leczniczej z białkami i oddziaływanie enzymów zawartych we łzach ma również niebagatelne

znaczenie. Podwyższenie fizjologicznego pH płynu łzowego ma duży wpływ na rozwój procesu chorobowego i może powodować stan zapalny spojówek na tle bakteryjnym lub wirusowym. Czas obecności substancji leczniczej w części przedrogówkowej oka oraz dalsze etapy procesu wchłaniania są uzależnione w dużej mierze od wartości pH. Zgodnie z zapisem punktu 5-1 monografii narodowej FP XII „Leki sporządzane w aptece”, wartość pH kropli do oczu powinna zawierać się w przedziale 3,5 do 8,5. Zaleca się, aby krople do oczu były izotoniczne z płynem łzowym: wartość ciśnienia osmotycznego (poza przypadkami zamierzonymi) powinna zawierać się w przedziale 280-320 mosmol/L.

W zależności od wymaganego stężenia substancji czynnej i innych potrzeb terapeutycznych, krople do oczu mogą być hipertoniczne [36]. W celu utworzenia odpowiedniej jakości postaci leku, należy wypracować swoisty kompromis: uwzględnić fizjologię oka, cechy fizykochemiczne substancji czynnej oraz substancji pomocniczych, procesy chemiczne, które mogą zachodzić zarówno podczas sporządzania, jak i przechowywania postaci leku oraz po jego aplikacji, a jednocześnie kierować się zasadami dobrej sztuki aptekarskiej.

Krople do oczu mogą zatem zawierać substancje pomocnicze, np. regulujące ciśnienie osmotyczne lub lepkość preparatu, regulujące lub stabilizujące pH, zwiększające rozpuszczalność substancji czynnej oraz trwałość preparatu. Substancje te nie mogą niekorzystnie wpływać na zamierzone działanie lecznicze lub w zastosowanych stężeniach wywoływać nadmiernego działania drażniącego [36].

W celu osiągnięcia żądanego pH podczas sporządzania kropli ocznych stosuje się roztwory buforowe, zwłaszcza w przypadkach słabej rozpuszczalności substancji czynnej i/lub brak trwałości w roztworze izohydrycznym. Należy wówczas roztwór kropli doprowadzić do pH euhydrycznego, dzięki czemu zyskuje się na zwiększeniu trwałości i skuteczności terapeutycznej. Euhydria stanowi pewien kompromis pomiędzy pH fizjologicznym, a pH w którym substancja lecznicza jest trwała lub jest rozpuszczalna [169]. Składniki buforu muszą być zgodne ze składnikami postaci leku, nie może dochodzić do niezamierzonych reakcji pomiędzy nimi. Ciężko to osiągnąć dla kropli ocznych zawierających związki srebra. Roztwory buforowe stosowane w kroplach do oczu [36] przedstawia **tabela 12**.

Bufor	Symbol	pH	Skład	Masa, w g	Substancja czynna
Cytrynianowy	E	Ok. 7,7	Sodu cytrynian woda	3,0 do 100,0	Penicylina

Boranowy	F1	Ok. 7,2	Kwas borowy Boraks Sodu chlorek Woda	1,1 0,2 0,2 do 100,0	0,5% roztwór detreomycyny
	F2	Ok. 8,3	Kwas borowy Boraks Woda	1,5 3,0 do 100,0	≥ 1% roztwór detreomycyny
	F3	Ok. 9,0	Boraks Sodu chlorek Woda	0,8 0,4 do 100,0	1% roztwór chlorowodoru tetracykliny
	F4	Ok. 9,1	Boraks Woda	1,6 do 100,0	2% roztwór chlorowodoru tetracykliny
Fosforanowy	G	Ok. 6,5	Disodu fosforan bezwodny Sodu diwodorofosforan bezwodny Sodu chlorek woda	0,23 0,20 0,24 do 100,0	2% roztwór chlorowodoru pilokarpiny

Tabela 12. Roztwory buforujące stosowane w kroplach do oczu wraz z przykładami substancji czynnych, z którymi mogą być stosowane

W celu modyfikacji pH oprócz roztworów buforowych stosuje się również roztwory kwasów (solny i siarkowy) lub wodorotlenku sodu w odpowiednich proporcjach, dla zapewnienia stabilności kropli ocznych oraz zminimalizowania ryzyka podrażnienia oka lub uczucia dyskomfortu u pacjenta. Przykładami kropli wytwarzanych przemysłowo, w których stosuje się wymienione roztwory kwasów są: Sulfacetamidum Polpharma®, Vitreolent® (HCl), Cosopt®, Dexamethazon WZF®, Rozacom®, Trusopt®, Yellox® (NaOH), Tobradex® (H₂SO₄ i NaOH), Azopt®, Betoptic®, Ganfort®, Flucon®, Lotemax®, Maxitrol®, Travatan®, Opatanol®, Oftaquix®, Vigamox®, Floxal® (HCl i NaOH) [170].

Zastosowane wysokiego terapeutycznego stężenia substancji leczniczej powyżej 3% ogólnej masy może powodować duży wzrost osmolarności aplikowanej postaci leku. Hipertoniczne roztwory mogą być przyczyną podrażnienia gałki ocznej i destabilizować płyn łzowy poprzez hydratację mucyn, ale są na ogół dużo lepiej tolerowane niż roztwory hipotoniczne. Na skutek przepływu wody z powierzchni gałki ocznej do wnętrza oka może następować zwiększenie stężenia substancji czynnej w części przedrogowkowej w przypadku stosowania kropli hipotonicznych. Wiąże się to niejednokrotnie z wystąpieniem obrzęku rogowki i bardzo nieprzyjemnego odczucia dyskomfortu przez pacjenta. Do izotonizowania kropli do oczu zgodnie z zaleceniami FP XII stosuje się roztwory przedstawione w **tabeli 13**.

Oznaczenie roztworu	Skład	Stężenie
A	Sodu chlorek	9 g / L
B	Potasu azotan	16 g / L
C	Kwas borowy	19 g / L
D	Glukoza	50 g / L

Tabela 13. Roztwory izotonizujące zgodnie z zaleceniami FP XII

Opakowanie stanowi integralną część sporządzonej postaci leku i musi zapewniać odpowiednią jego jakość i trwałość podczas przechowywania i stosowania. Nie może mieć także żadnego wpływu na zmianę działania leku, co może następować w przypadku reakcji składników preparatu z opakowaniem. Produkty lecznicze, w których rozpuszczalnikiem jest woda, pakowane w pojemniki wielodawkowe (butelka PET lub PP z dozownikiem kropli) mogą zawierać odpowiedni środek konserwujący we właściwym stężeniu, o ile substancje czynne same w sobie nie wykazują działania przeciwdrobnoustrojowego. Podobnie jak inne substancje pomocnicze, konserwant musi być zgodny z pozostałymi składnikami leku, w tym z substancją czynną, przez cały okres przechowywania i stosowania kropli przez pacjenta.

Jeżeli niemożliwe jest zastosowanie środka konserwującego, FP XII zaleca umieszczanie kropli w pojemnikach jednodawkowych (tzw. minimsach, diminsach), które po otwarciu pacjent zużywa jako pojedynczą dawkę albo ewentualnie w pojemnikach wielodawkowych takiej konstrukcji, która nie pozwoli na zanieczyszczenie mikrobiologiczne preparatu (specjalny system dozujący). Zalecane przez Farmakopeę Polską środki konserwujące zostały przedstawione w **tabeli 14**.

Środek konserwujący i stężenie zalecane	Roztwór pomocniczy stężenie	Przykłady substancji czynnych zgodnych z konserwantem
Chlorek benzalkoniowy 0,01 – 0,02 %	1-2%	Atropiny siarczan, pilokarpiny chlorowodorek, neomycyny siarczan, gentamycyny siarczan, tetrazoliny chlorowodorek, tymololu maleinian, latanoprost, deksametazon, tobramycyna, ciprofloksacyna
Diocetan lub diglukonian chlorheksydyny 0,01%	1%	Potasu jodek, sodu jodek, homatropiny bromowodorek

Mieszanina Aseptyny* M (0,065%) i P (0,035%) łącznie 0,1%	-	Neomycyny siarczan, polmiksyna, deksametazon, pirenoksyna sodowa
--	---	---

Tabela 14. Zalecane substancje konserwujące stosowane w preparatyce kropli do oczu [36].

* Aseptina M (P) = Paraben, Nipagina, *p*-hydroksybenzoesan odpowiednio metylu lub propylu

Krople w postaci zawiesin stanowią układy rozproszonych cząstek, których 80% zgodnie ze wskazówkami farmakopealnymi nie powinno być większych niż 10µm, a pozostałe nie większych niż 50µm. Zawiesiny ulegają sedymentacji, ale po wstrząśnięciu rozproszenie musi pozostać jednolite i utrzymywać się na tyle długo, by możliwe było zaaplikowanie kropli do oka. Zwiększenie lepkości natomiast osiąga się poprzez stosowanie polimerów będących pochodnymi celulozy, których stężenia ustala się w zakresie od 0,2-2,5%. Obok roztworów rzeczywistych i wodnych zawiesin, farmakopealnymi rozpuszczalnikami są oleje roślinne (rycynowy, sezamowy, arachidowy) lub półsyntetyczne trójglicerydy nasyconych kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha [36].

2.7.3 Technika sporządzania kropli i maści ocznych

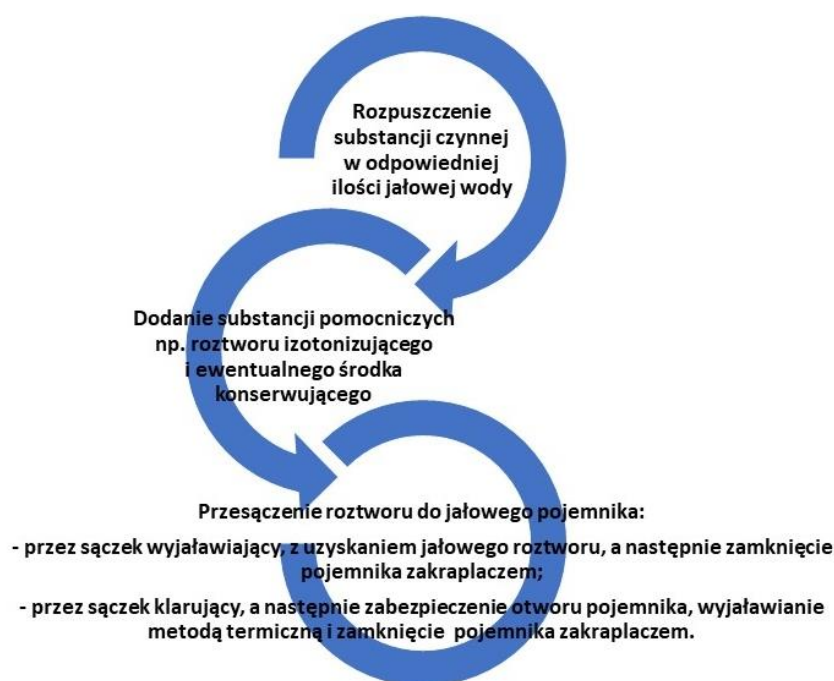
Monografia narodowa FP XII „Leki sporządzane w aptece”, zawierająca obecnie stosowane wytyczne, zasady postępowania, metody sporządzania i badania, wskazuje trzy metody sporządzania preparatów jałowych, wśród których klasyfikuje się krople i maści oczne. Można stosować:

- (1) metodę z zastosowaniem sączenia wyjaławiającego;
- (2) metodę, w której produkt końcowy jest poddawany wyjaławianiu w autoklawie w ostatnim etapie sporządzania i znajduje się w odpowiednim opakowaniu, które można temu poddać;
- (3) metodę sporządzania aseptycznego z jałowych składników.

O wyborze metody decyduje rodzaj substancji czynnej, z której sporządzany jest lek, rodzaj rozpuszczalnika bądź podłoża oraz rodzaj układu fizycznego, którym będzie przygotowywana postać leku. Punkt 5-1-2 monografii bezpośrednio wymienia metody sporządzania dla samych kropli do oczu, która zależy od ich fizycznej postaci i ma gwarantować otrzymanie jałowego preparatu. W metodzie (1) wyjaławianie przez sączenie przez filtry o nominalnej wielkości porów nie większej niż 0,22 µm stosuje się dla roztworów o niskiej lepkości, w szczególności zawierających substancje termolabilne. Roztwory rzeczywiste jak najbardziej spełniają to

kryterium, pod warunkiem, że nie zawierają substancji zwiększających lepkość. Metoda (2) stosowana jest dla roztworów rzeczywistych i koloidalnych, ale warunkiem jest termostabilność wszystkich składników kropli, by podczas wyjaławiania w autoklawie nie dochodziło do ich degradacji lub niezamierzonych reakcji między nimi. Metodę (3) stosuje się w procesie sporządzania kropli w postaci zawiesin, roztworów koloidalnych zawierających substancje termolabilne i roztworów olejowych o wysokiej lepkości. Użycie jałowych składników i łączenie ich w warunkach aseptycznych jest dość powszechną metodą, wyjaławianie części składników można przeprowadzić przed wykonaniem leku, o ile pozwalają na to właściwości substancji będącej surowcem.

Sole srebra są silnymi utleniaczami, ulegają dość łatwo rozkładowi do tlenku srebra, albo dalej, redukcji do metalicznego srebra. Temperatura, światło słoneczne i obecność reduktorów przyspiesza te procesy w znacznym stopniu. Dla kropli do oczu zawierających azotan srebra stosuje się metodę (1), która nie dopuszcza do degradacji składnika czynnego. Sporządzenie kropli do oczu w postaci roztworu rzeczywistego w zwyczajnym wielodawkowym pojemniku obejmuje zazwyczaj 3 etapy, które przedstawia **schemat 1**:



Schemat 1. Etapy sporządzania kropli do oczu w postaci roztworu rzeczywistego

W zależności od rodzaju substancji leczniczej, ilość wody jałowej zalecanej do uzyskania roztworu izotonicznego i roztworu substancji izotonizującej ulegają zmianom, a ich ilości przedstawia, dla najczęściej stosowanych substancji wraz z metodą wyjaławiania, **tabela 15**.

Substancja lecznicza w ilości 100mg	Ilość jałowej wody do rozpu- szczenia w g	Izotoniczny roztwór uzupełniający do 10,0 g	Metoda wyjaławiania	
			120 °C przez 20 min.	Sączenie wyjaławia- jące
Kwas borowy	5,2	0,9% roztwór chlorku sodu	Tak	Tak
Azotan srebra	3,6	1,6% roztwór azotanu potasu		Tak
Siarczan atropiny	1,3	0,9% roztwór chlorku sodu		Tak
		1,9% roztwór kwasu borowego		
Tetraboran sodu	3,8	0,9% roztwór chlorku sodu	Tak	Tak
Detreomycyna	1,2*	Bufor boranowy		Tak
Fluoresceina sodowa	2,9	0,9% roztwór chlorku sodu		Tak
Siarczan gentamycyny	0,9	Bufor fosforanowy		Tak
Jodek potasu	3,8	0,9% roztwór chlorku sodu		Tak
Chlorek sodu	1,0	Woda	Tak	Tak
Jodek sodu	4,2	0,9% roztwór chlorku sodu		Tak
Tiosiarczan sodu	3,4	0,9% roztwór chlorku sodu	Tak	Tak
Siarczan neomycyny	1,2	1,9% roztwór kwasu borowego		Tak
Chlorowodorek oksytetracykliny	1,4*	Bufor tetraboranowy		Tak
Penicylina krystaliczna	1,8*	3% roztwór cytrynianu sodu		Tak
Chlorowodorek pilocarpiny	2,4	1,9% roztwór kwasu borowego		Tak
		0,9% roztwór chlorku sodu		
		Bufor fosforanowy		
Siarczan streptomycyny	0,8*	0,9% roztwór chlorku sodu		Tak
Sulfacetamid sodowy	2,6	Woda		Tak
Chlorowodorek tetrakainy	1,6	0,9% roztwór chlorku sodu		Tak
Siarczan cynku	1,3	1,9% roztwór kwasu borowego		Tak

Tabela 15. Ilość wody i roztworu izotonizującego potrzebnych do sporządzenia kropli do oczu z najczęściej stosowanymi substancjami czynnymi. * Substancję rozpuszcza się bezpośrednio w roztworze buforującym

Oprócz powyżej wspomnianych metod stosuje się jeszcze dwie zasady:

- Jeżeli ilość wody niezbędna do uzyskania izotonicznego roztworu substancji leczniczej nie przekracza 20% łącznej masy kropli, substancję leczniczą rozpuszcza się bezpośrednio w roztworze izotonizującym;
- Jeżeli woda stanowi więcej niż 90% łącznej masy roztworu, substancję leczniczą rozpuszcza się bezpośrednio w wodzie.

Półstałe preparaty do oczu sporządza się w formie maści, kremów hydrofobowych i hydrożeli. Nadanie gotowej postaci leku odpowiednich cech reologicznych pozwala na stosowanie preparatu nie tylko do worka spojówkowego, ale i na brzeg powieki. Dzięki fizjologicznym procesom mrugania preparat zostaje rozprowadzony po powierzchni gałki ocznej, ale wadą po aplikacji jest ograniczenie widzenia przez kilkanaście minut. Co do zasady jeśli substancja lecznicza może być wprowadzana zarówno do maści, jak i sporządzana w postaci kropli ocznych, półstałe formy leku zwykle pacjent stosuje w godzinach wieczornych na noc, a postać płyną – krople, w ciągu dnia. Bezsporną zaletą półstałych postaci leku ocznego jest znaczne wydłużenie kontaktu leku z powierzchnią gałki ocznej.

Maści do oczu, zgodnie z monografią FP XII sporządza się w warunkach aseptycznych korzystając z jałowego podłoża. Podłoża hydrofilowe poddaje się wyjaławianiu nasyconą parą wodną, natomiast lipofilowe metodą sterylizacji suchym gorącym powietrzem. Zdecydowana większość substancji czynnych wykorzystywanych w preparatyce maści do oczu nie ulega rozpuszczeniu w lipofilowym podłożu, ale część z nich jest rozpuszczalna w wodzie. Przykładem mogą być glikokortykosteroidy (deksametazon, prednizolon, hydrokortizon), które wprowadza się do podłoża w postaci zmikronizowanej. Substancje rozpuszczalne w wodzie natomiast, rozpuszcza się w niewielkiej ilości jałowej wody, roztwory sączy się przez filtry wyjaławiające i następnie emulguje się do jałowego podłoża. Jeśli faza wodna stanowi niewielką ilość, sączenie zgodnie z zaleceniami FP XII, można pominąć ale pod warunkiem zastosowania środka konserwującego. Maści do oczu sporządza się zgodnie z zasadami sztuki aptekarskiej, na podstawie przepisu lekarza, ale o ile rodzaj podłoża nie zostanie określony, podstawowym podłożem absorpcyjnym jest mieszanina o składzie: Parafinum liquidum 10,0 cz.wag., Adeps lanae 10,0 cz.wag i Vaselinum album 80,0 cz.wag. Jako podłoże lipofilowe można stosować również wazelinę białą z dodatkiem parafiny ciekłej w stosunku wagowym 9:1, wazelinę białą z lanoliną bezwodną, maść cholesterolową oraz maści eucerynowe I i II, których skład został przedstawiony wcześniej. Pod wpływem płynu łzowego następuje emulgowanie podłoża, dzięki czemu zaaplikowana maść łatwiej jest rozprowadzana po

powierzchni gałki ocznej – czas ulega wydłużeniu, a powierzchnia kontaktu ulega wzrostowi, co wpływa na skuteczność działania.

Hydrożele do oczu sporządza się na podłożach otrzymanych z polimerów hydrofilowych w stężeniach zapewniających odpowiednią konsystencję preparatu. Muszą one zawierać dodatek środków konserwujących. Nie zaleca się stosowania podłoży makrogolowych oraz zawierających alkohole wielowodorotlenowe (gliceryna, glikol) ze względu na ich właściwości osmotyczne, które mogą wykazać działanie drażniące dla narządu wzroku. [36,145].

Pierwszoplanowymi wymaganiami dla powstałych postaci leku do oczu są:

- jałowość;
- brak zanieczyszczeń w formie nierozpuszczalnych cząstek oraz zanieczyszczeń mechanicznych;
- odpowiedni stopień mikronizacji substancji leczniczych;
- odpowiednie cechy reologiczne, które pozwalają na aplikację.

Sposób mikronizacji substancji leczniczej jest podobny do metod stosowanych do sporządzania zawiesin i sprowadza się do rozpuszczenia substancji leczniczej w niewielkiej ilości lotnego rozpuszczalnika organicznego (np. hydrokortizon w EtOH), a następnie całkowitym jego odparowaniu podczas procesu ucierania w jałowym moździerzu. Podobną metodą jest rozcieranie substancji z niewielką ilością jałowej parafiny ciekłej, która pozostanie składnikiem maści do oczu, przy uwadze, że jej ilość nie może stanowić więcej niż 30% ogólnej masy leku.

Zgodnie z punktem 5-4-2 FP XII w monografii narodowej „Leki sporządzane w aptece” [36], powstałe preparaty do oczu są pakowane w tuby z aplikatorem, zamykane nakrętką. Masa preparatu w tubie nie powinna być większa od 10 gramów. Stosuje się:

- tuby aluminiowe, nielakierowane lub powlekane lakierem;
- tuby z tworzywa sztucznego;
- tubostrzykawki.

Z punktu widzenia zarówno chemii nieorganicznej, jak i technologii postaci leku, dla preparatów srebra najwłaściwszym opakowaniem są tubostrzykawki lub tuby z tworzywa

sztucznego, najkorzystniej zapakowane dodatkowo w folię aluminiową, która nie pozostaje w bezpośrednim kontakcie z preparatem, a jedynie stanowi ochronę przed promieniami UV. Tuby aluminiowe, nawet lakierowane stanowią zbyt niebezpieczne opakowanie by nie mogło dojść do reakcji redukcji kationu srebra z utworzeniem wolnego srebra, co prowadziłoby do zahamowania działania leku, rozkładu substancji czynnej, a także zmiany barwy maści. Promieniowanie UV natomiast stanowi czynnik przyspieszający procesy rozkładu związków srebra, a zastosowana folia aluminiowa stanowi doskonałą nieprzepuszczalną ochronę fizyczną, która będzie temu przeciwdziałać.

3. Część praktyczna

3.1. Założenia i cel pracy

Przygotowywanie leków recepturowych jest procesem, który należy do zadań zawodowych farmaceuty zgodnie z Ustawą Prawo Farmaceutyczne [143,144]. Opracowanie formuacji postaci leku i wykorzystywanie jej do szybkiego, a jednocześnie dokładnego i zgodnego z zasadami sztuki aptekarskiej sporządzania recepturowych produktów leczniczych wpisuje się w ten zawód. Celem niniejszej pracy było:

- Udoskonalenie opracowanej w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej Katedry Chemii Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi metody syntezy związku kompleksowego znanej substancji leczniczej, będącej pochodną azolową – metronidazolu z azotanem srebra(I);
- Opracowanie metody syntezy związku kompleksowego metronidazolu z siarczanem srebra(I) wraz z charakterystyką spektroskopową i rentgenostrukturalną;
- Opracowanie formuacji czterech postaci leków: maści do użytku zewnętrznego, żelu do użytku zewnętrznego i na błony śluzowe, maści i kropli do stosowania w okulistyce;
- Zbadanie zachowania się zsyntetyzowanego kompleksu w różnych warunkach środowiska kwasowo-zasadowego z uwzględnieniem zasad sporządzania kropli ocznych i wymagań jakie są im stawiane;
- Zbadanie i określenie stabilności fotochemicznej zsyntetyzowanych związków koordynacyjnych;
- Analiza mikrobiologiczna związków kompleksowych srebra(I) z metronidazolem;
- Analiza właściwości cytotoksycznych otrzymanych związków na 5 liniach komórkowych z uwzględnieniem potencjalnego synergizmu działania zastosowanych substratów będących substancjami czynnymi.

Recepturowe preparaty farmaceutyczne na recepty lekarskie zgodnie z przepisami zawodu sporządza się *ex tempore*. Udoskonalenie metody syntezy do procesu „one-step” ma na celu przyspieszenie i ułatwienie metody sporządzania postaci leku do zastosowań w leczeniu.

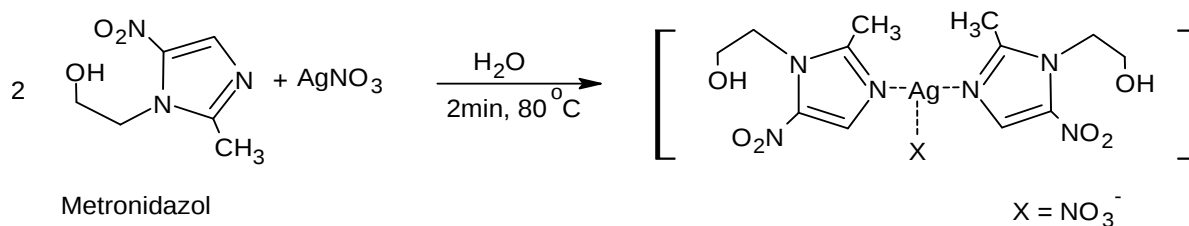
3.2. Materiały i metody

3.2.1. Syntezy związków kompleksowych srebra(I)

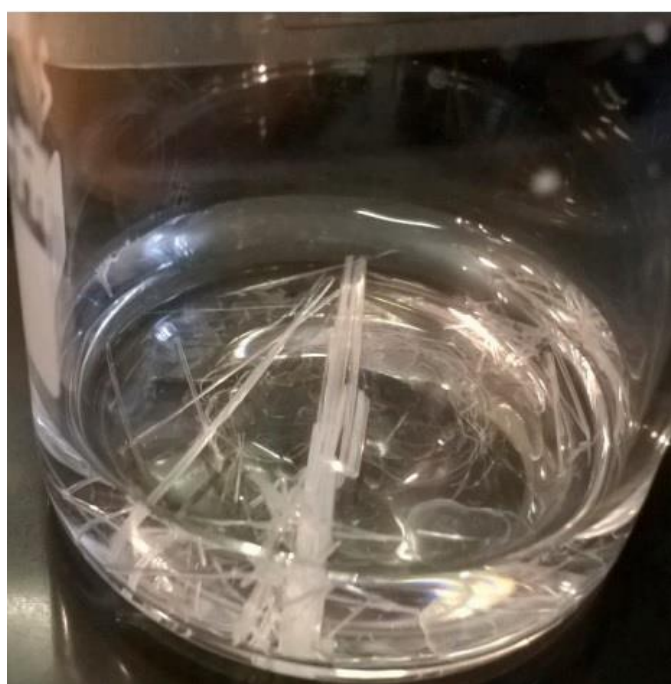
Kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) zsyntetyzowałem zgodnie z wcześniej opisaną procedurą ze zmianą rozpuszczalnika [89]. Metronidazol (CAS: 443-48-1; M.cz.: 171,5 g/mol), azotan srebra (CAS: 7761-88-8; M.cz.: 169 g/mol), siarczan srebra (CAS: 10294-26-5; M.cz.: 311.79 g/mol) zostały zakupione w Sigma-Aldrich (Poznań, Polska). Wszystkie inne odczynniki (eter dietylowy, metanol, etanol, DMSO, D₂O) zostały zakupione u dostawców komercyjnych i miały najwyższą dostępną czystość. Analizę pierwiastkową przeprowadzono przy użyciu analizatora CHNS/O Perkin Elmer serii II (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Temperatury topnienia zmierzyłem za pomocą aparatu Boethiusa (Franz Küstner Nachf. KG, HMK, Drezno, Niemcy) i pozostały nieskorygowane. Widma ¹H NMR rejestrowano na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego za pomocą spektrofotometru Bruker Advance III 600 MHz (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) w temperaturze pokojowej. Widma IR rejestrowano na Wydziale Farmaceutycznym UMED w Łodzi w zakresie 4000-400 cm⁻¹ na urządzeniu Bruker Alpha-T (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) przy użyciu bromku potasu.

3.2.1.1 Synteza związku kompleksowego metronidazolu z azotanem srebra(I) o wzorze [Ag(MTZ)₂NO₃]

Synteza związku została przeprowadzona wcześniej [89]. Dokonałem natomiast jej modyfikacji do metody syntezy typu „one-step”, polegającej na otrzymywaniu związku *ex tempore*, nawet podczas sporządzania postaci leku recepturowego. Istotną zmianą, dającą tę możliwość była zamiana rozpuszczalnika w syntezie kompleksu, a co za tym idzie skrócenie czasu reakcji syntezy do 2 minut. Do roztworu AgNO₃ (1,7 g, 10 mM) w wodzie (50 mL) dodałem 3,42 g (20 mM) metronidazolu. Mieszaninę reakcyjną mieszałem w temperaturze 80 °C przez 2 min. Po schłodzeniu do temperatury otoczenia, wytrącił się biały osad krystaliczny (igły) (**Rys.16**). Osad odsączyłem, przemyłem dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszyłem na powietrzu bez dostępu światła. Synteza przebiegała zgodnie z przedstawionym schematem (**Sch.2**). Struktura związku kompleksowego metronidazolu z azotanem srebra(I) została przedstawiona w literaturze wcześniej [171]. Zebrałem 4,19 g związku kompleksowego, wydajność reakcji wyniosła 81,80%. M.cz. 512,182 g/mol.



Schemat 2. Schemat syntezy jednoetapowej kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I)



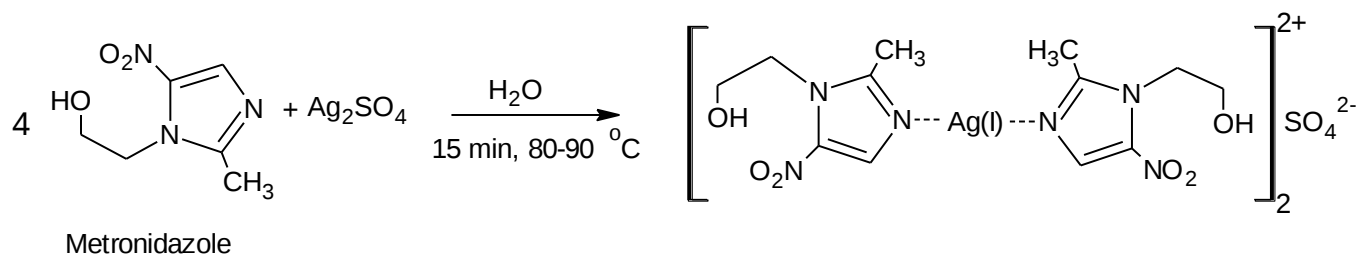
Rys.16 – Kryształy związku kompleksowego metronidazolu z azotanem srebra(I) uzyskanego w syntezie typu „one-step”

W analizie pierwiastkowej uzyskałem wyniki w % (obliczona): C 28,28 (28,14), H 3,09 (3,54), N 19,23 (19,14). Określiłem temperaturę topnienia: 150–152 °C.

3.2.1.2 Synteza związku kompleksowego metronidazolu z siarczanem srebra(I) o wzorze $[\text{Ag}_2(\text{MTZ})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

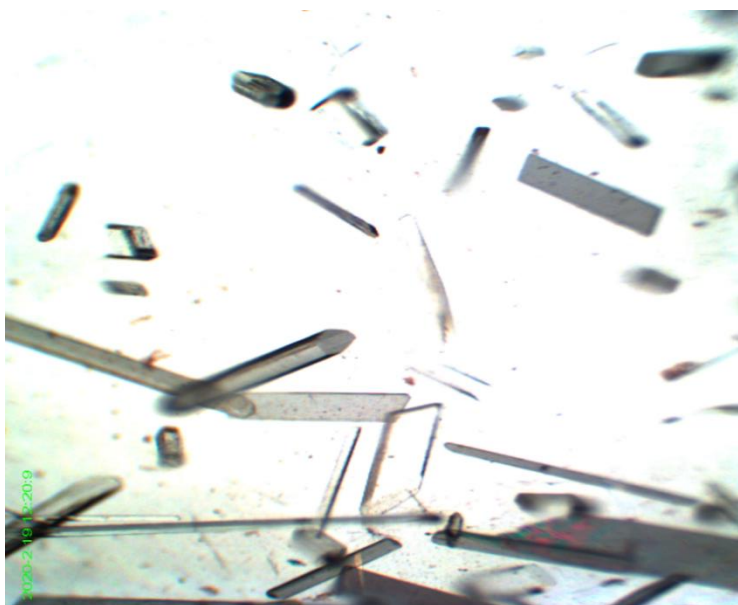
0,685 g (4 mM) metronidazolu dodałem do roztworu zawierającego Ag_2SO_4 (0,312 g, 1 mM) rozpuszczonego w 35 mL gorącej wody (80-90 °C). Następnie mieszaninę reakcyjną mieszałem przez 15 min. w 80-90 °C pod chłodnicą zwrotną. Roztwór pozostawiłem do krystalizacji.

Otrzymałem kryształy (**Rys.17a i 17b**), które zebrałem, przemyłem dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszyłem na powietrzu bez dostępu światła. Synteza przebiegała zgodnie ze **schematem 3**:

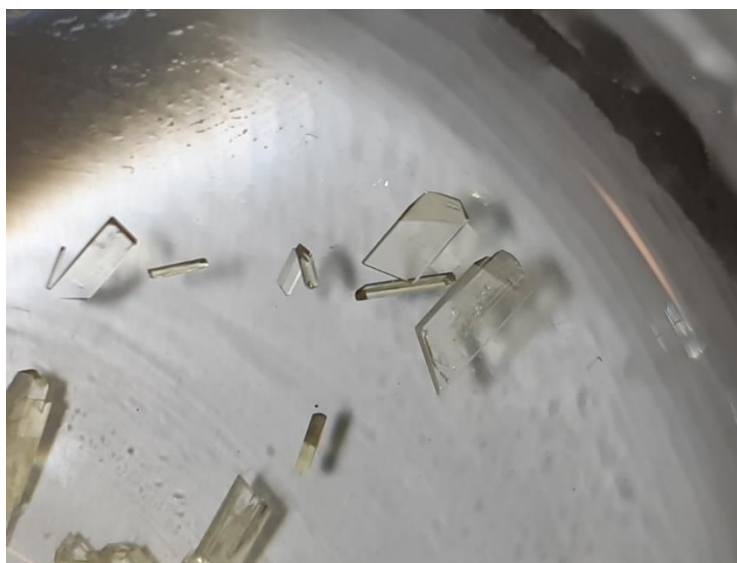


Schemat 3. Synteza jednoetapowa kompleksu metronidazolu z siarczanem srebra(I)

(a)



(b)



Rys.17 – Kryształy $[\text{Ag}_2(\text{MTZ})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ w obrazie mikroskopowym **(a)** oraz w obrazie rzeczywistym w powiększeniu **(b)**

Otrzymałem związek kompleksowy metronidazolu z siarczanem srebra(I) o m.cz. 1086,43 g/mol. Wydajność reakcji: 0,9 g uwodnionej soli kompleksu (82,84%). W analizie pierwiastkowej uzyskałem wyniki w % (obliczona): C 26,43 (26,52), H 4,00 (4,27), N 15,48 (15,47). Temperatura topnienia: 79-82 °C (utrata wody krystalizacyjnej), 168-171 °C (z rozkładem).

3.2.1.3 Charakterystyka spektroskopowa i analiza rentgenostrukturalna związku kompleksowego metronidazolu z siarczanem srebra(I) o wzorze $[\text{Ag}_2(\text{MTZ})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Dane rentgenowskie pojedynczego kryształu zebrano na dyfraktometrze SuperNova z detektorem Atlas stosując $\text{MoK}\alpha$ w 150K. Redukcję danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania CrysAlis PRO [172]. Strukturę rozwiązano za pomocą SHELXT [173] i udokładniono za pomocą SHELXL [174]. Atomy (C) -H zostały dodane w geometrycznie wyidealizowanych pozycjach i ograniczone do ich atomów macierzystych jako ciało sztywne. Atomy (O) -H w ligandach metronidazolu znaleziono na mapie różnicowej i udokładniono izotropowo. Struktura krystaliczna zawiera 5 cząsteczek wody (O100, O200, O300, O400 i O500), dla których wszystkie wymagane atomy H nie zostały uwzględnione w modelu, prawdopodobnie z powodu ich dużego nieuporządkowania. Analizę powierzchni według

Hirshfelda metalicznego środka Ag1 i Ag2 przeprowadzono za pomocą CrystalExplorera [175, 176].

Dane kryształów dla $[\text{Ag}(\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3)_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($M = 1086.53$ g/mol): trójskośna, grupa przestrzenna $P\bar{1}$ (nr 2), $a = 11.2281(3)$ Å, $b = 12.3371(5)$ Å, $c = 16.9502(7)$ Å, $\alpha = 97.762(3)^\circ$, $\beta = 108.111(3)^\circ$, $\gamma = 111.720(3)^\circ$, $V = 1988.31(14)$ Å³, $Z = 2$, $T = 150(2)$ K, $\mu(\text{MoK}\alpha) = 0.134$ mm⁻¹, $D_{\text{calc}} = 1.815$ g/cm³, 20765 zmierzonych odbić ($3.1^\circ \leq \Theta \leq 29.0^\circ$), 10523 unikalnych ($R_{\text{int}} = 0.026$), które zastosowano we wszystkich obliczeniach. Końcowe $R1$ wyniosło 0.039 [$I > 2\sigma(I)$], natomiast $wR2$ wyniosło 0.109 (wszystkie dane).

Dodatkowe dane krystalograficzne można znaleźć w Cambridge Crystallographic Data Center pod numerem depozytowym CCDC-2048084.

3.2.2. Formulacje postaci leku

3.2.2.1 Formulacja maści do użytku zewnętrznego na skórę

Maść do użytku zewnętrznego zawierającą dwie substancje wykonałem zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w warunkach funkcjonowania rzeczywistej apteki ogólnodostępnej. Substancje czynne i pomocnicze, które posiadają dopuszczenie do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, będące surowcami farmaceutycznymi do receptury zostały zakupione w hurtowniach farmaceutycznych, które są dystrybutorami produktów wytwarzanych przez producenta. Metronidazol (prod. Fagron Spółka z o.o., S. 197468, D.W. 2022.12.31, nr rej. PL IL-3928/AC), Azotan srebra(I) (Argentum nitricum, prod. Fagron Spółka z o.o., S. 197228, D.W. 2023.01.31, nr rej. PL 197228), Woda oczyszczona (Aqua pro usu officinale, prod. Fagron Spółka z o.o., S. 1910030627, D.W. 2022.10.31, nr rej. PL 13974) spełniały standardy czystości surowców do receptury zgodne z wymogami Farmakopei Polskiej XII. Euceryna bezwodna specjalna (Eucerinum anhydricum S, prod. Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne Ziółolek Spółka z o.o., S. 020120, D.W. 2022.01.31, nr rej. PL 13538) została użyta zgodnie z przepisem lekarza, była surowcem pozafarmakopealnym.

Maść według recepty:

Rp.
Argenti nitrici 1,0
Metronidazoli 2,0
Aquae destillatae q.s.
Eucerini S ad 100,0
M.f.Ung. D.S. zewnątrznie 2 x dziennie

wykonałem zgodnie z ogólnie przyjętymi normami stosowanymi w praktyce aptecznej [145,150]. Przepisaną ilość azotanu srebra(I) rozpuściłem w niewielkiej ilości wody oczyszczonej, ogrzałem do temperatury 80 °C, a następnie rozpuściłem w przygotowanym roztworze przepisaną ilość metronidazolu. Do odpowiedniej ilości podłoża małymi porcjami dodawałem przygotowany *ex tempore* roztwór substancji, który zgodnie z opisaną syntezą typu „one-step” zawierał związek kompleksowy metronidazolu z azotanem srebra(I). W wyniku procedury otrzymałem maść typu w/o w ilości odpowiadającej przepisanej na receptce (Rys.18).



Rys.18 – Gotowa postać maści do użytku zewnętrznego na skórę wykonana zgodnie z przedstawioną formułą

3.2.2.2 Formuła żelu do użytku zewnętrznego na skórę i błony śluzowe

Hydrożel ze związkiem kompleksowym metronidazolu z azotanem srebra(I) wykonałem w warunkach laboratoryjnych w oparciu o wcześniej opisane formuły tej postaci leku [177]. Metronidazol (prod. Fagron Spółka z o.o., S.197469, D.W. 2023.02.28, nr rej. PL IL-3928/AC), Azotan srebra(I) (Argentum nitricum, prod. Fagron Spółka z o.o., S. 2000049, D.W. 2023.05.31, nr rej. PL IL-4303/ChF), Woda oczyszczona (Aqua pro usu officinale, prod.

Fagron Spółka z o.o., S. 2012030622, D.W. 2023.12.31, nr rej. PL 13974), Etanol (alkohol etylowy 760g/l, 96 % v/v, prod. Fagron Spółka z o.o., S. 200699, D.W. 2023.04.09, nr rej. PL 11984) spełniały standardy czystości farmaceutycznej zgodne z wymogami Farmakopei Polskiej XII. Substancje czynne będące surowcami farmaceutycznymi do receptury i posiadające dopuszczenie do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, zostały zakupione w hurtowniach farmaceutycznych, które są dystrybutorami produktów wytwarzanych przez producenta. Substancje pomocnicze: Hydroksyetyloceluloza (CAS: 9004-62-0), glikol propylenowy (CAS: 57-55-6), 4-hydroksybenzoesan metylu (Paraben M, Nipagina M, CAS 99-76-3), 4-hydroksybenzoesan propylu (Paraben P, Nipagina P, CAS 94-13-3) zostały zakupione w Sigma-Aldrich, Poznań, Polska jako substancje w czystości farmaceutycznego standardu zgodnego z Farmakopeą Europejską.

Rp.

Argenti nitrici 0,1

Metronidazoli 0,2

Nipagini M 0,01

Nipagini P 0,01

Ethanoli 95° 1,0

Propyleni glycoli 1,0

HEC 0,2

Aquae destillatae ad 10,0

M.f.gell. D.S. zewnątrznie 2 x dziennie

W 7,48 mL wody oczyszczonej rozpuściłem 100 mg azotanu srebra(I) i ogrzałem do temperatury 80 °C. W tak przygotowanym roztworze rozpuściłem 200 mg metronidazolu otrzymując związek kompleksowy metronidazolu z azotanem srebra(I) z wykorzystaniem metody syntezy „one-step”. Po 10 mg parabenów M i P rozpuściłem w mieszaninie uzyskanej przez zmieszanie 1 g etanolu z 1 g glikolu propylenowego. Roztwór zawierający kompleks ochłodziłem do temperatury pokojowej i dodałem do niego sporządzony roztwór etanolowo-glikolowy środków konserwujących. 200 mg hydroksyetylocelulozy małymi porcjami dodałem do tak uzyskanej cieczy w taki sposób, by pozwolić na zwilżenie wszystkich cząstek środka żelującego. Zawartość naczynia mieszałem przez 2 minuty i pozostawiłem na około 2 godziny pod przykryciem do utworzenia hydrożelu (**Rys.19**).



Rys.19 – Gotowa postać żelu do użytku zewnętrznego na skórę i błony śluzowe wykonanego zgodnie z przedstawioną formułą

3.2.2.3 Formuła maści ocznej

Maść przygotowałem w warunkach laboratoryjnych oraz w warunkach funkcjonowania rzeczywistej apteki ogólnodostępnej. Substancje czynne i pomocnicze, które posiadają dopuszczenie do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, będące surowcami farmaceutycznymi zostały zakupione w hurtowniach farmaceutycznych, które są dystrybutorami produktów wytwarzanych przez producenta. Metronidazol (prod. Fagron Spółka z o.o., S. 197468, D.W. 2022.12.31, nr rej. PL IL-3928/AC), Azotan srebra(I) (Argentum nitricum, prod. Fagron Spółka z o.o., S. 197228, D.W. 2023.01.31, nr rej. PL 197228), lanolina bezwodna (prod. Fagron Spółka z o.o., S. 071397, D.W. 2021.07.31, nr rej. 13965), wazelina biała (prod. Fagron Spółka z o.o., S. 070491, D.W. 2022.08.31, nr rej. 13966), woda oczyszczona (Aqua pro usu officinale, prod. Fagron Spółka z o.o., S. 1910030627, D.W. 2022.10.31, nr rej. PL 13974) spełniały standardy czystości surowców do receptury zgodne z wymogami Farmakopei Polskiej XII.

Rp.

Argenti nitrici 0,1

Metronidazoli 0,2

Lanolini anh. 2,0

Vaselini albi ad 10,0

M.f.Ung. D.S. zewnątrznie 3 x dziennie na skórę powiek

wykonałem zgodnie ze standardami farmaceutycznymi. Azotan srebra ilości 100 mg rozpuściłem w niewielkiej ilości wody (*quantum satis*), a następnie w sporządzonym roztworze 200 mg metronidazolu. Wprowadzona ilość wody odbyła się kosztem zmiany ilości podłoża obojętnego (wazeliny białej w połączeniu z lanoliną bezwodną).

Podłoże maści ocznej przygotowałem z 2 części bezwodnej lanoliny bezwodnej i 8 części białej wazeliny. Bazę maści wyjałowiłem przez sterylizację suchym gorącym powietrzem zgodnie z normami farmaceutycznymi [36]. Przygotowany wcześniej roztwór wprowadziłem małymi porcjami do takiej ilości podłoża, by uzyskać maść w postaci emulsji typu woda w oleju w ilości przepisanej na receptce (**Rys.20**). Maść została zapakowana w sterylne tubostrzykawkę.



Rys.20 – Gotowa postać maści ocznej na skórę wykonanej zgodnie z przedstawioną formułą

3.2.2.4 Formulacja kropli do oczu

Krople do oczu przygotowałem zarówno w laboratorium, jak i w warunkach funkcjonowania rzeczywistej apteki z zachowaniem standardów farmaceutycznych. Kroplom ocznym stawiane są odpowiednie wymagania [36], a wśród nich znajduje się izotoniczność. Kwas borowy pełni ważną funkcję wpływając na izotoniczność roztworu oraz jego pH.

Kompleks srebra zsyntetyzowałem zgodnie z wcześniej opisaną procedurą [70,89], ale innowacją jest wytworzenie farmaceutycznej postaci leku. Zastosowano rozpuszczalniki

i substancje czynne czystości farmaceutycznej. Metronidazol (prod. Fagron Spółka z o.o., S. 197468, D.W. 2022.12.31, nr rej. PL IL-3928/AC), Azotan srebra(I) (Argentum nitricum, prod. Fagron Spółka z o.o., S. 197228, D.W. 2023.01.31, nr rej. PL 197228), kwas borowy (prod. Fagron Spółka z o.o., S. 192665, D.W. 2021.06.18, nr rej. IL-3434/ChF), woda oczyszczona (Aqua pro usu officinale, prod. Fagron Spółka z o.o., S. 1910030627, D.W. 2022.10.31, nr rej. PL 13974) spełniały standardy czystości surowców do receptury zgodne z wymogami Farmakopei Polskiej XII.

Rp.
Argenti nitrici 0,025
Metronidazoli 0,05
Acidi borici 0,2
Aquae destillatae ad 10,0
M.f.Gtt.opht. D.S. 3 x dziennie po 1 kropli do obu oczu

Porcję 200 mg kwasu borowego rozpuściłem w gorącej wodzie (80-90 °C), do roztworu dodałem porcję 25 mg AgNO_3 i na koniec rozpuściłem w nim 50 mg metronidazolu. Zastosowałem zasadę bezpośredniego rozpuszczenia substancji czynnych w wodzie ponieważ stanowi ona 97,25% przepisanej masy roztworu (> 90%) [145]. Dodatek środka konserwującego można pominąć ze względu na silne działanie konserwujące samego azotanu srebra(I).

Przygotowany roztwór sterylizowałem przez filtrację. W celu zapewnienia czystości mikrobiologicznej zastosowałem filtrację przez filtr o nominalnej wielkości porów 0,22 mikrona lub mniejszej. Podczas filtracji unikałem strat substancji rozpuszczonej w roztworze, adsorbując ją na filtrach. Filtrację wykonano do sterylnych butelek z dozownikiem kropli (**Rys. 21**).



Rys.21 – Gotowa postać kropli ocznych wykonanych zgodnie z przedstawioną formułą

3.2.2.5 Izohydria kropli do oczu

Ważną cechą kropli do oczu jest ich kompatybilność z pH płynu łzowego, które wynosi około 7,0–7,4. Aktualnie zalecane pH kropli do oczu mieści się w przedziale 3,5–8,5 [65,66]. Zbyt niskie pH, w wartościach odbiegających od fizjologicznego 7,0, powoduje dyskomfort dla pacjenta w postaci uczucia pieczenia lub klucia. pH 0,06 M wodnego roztworu kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) określiłem za pomocą pH-metru i wynosiło 4,9–5,1. Porównawcze roztwory wodne 0,06 M wykazały następujące wartości pH: 4,1–4,2 dla azotanu srebra(I) i 4,5–4,7 dla metronidazolu.

Żadaną kwasowość w farmaceutycznej preparatyce kropli do oczu można osiągnąć, dodając roztwory buforowe, których zadaniem jest utrzymanie wymaganego pH i odpowiedniej izotoniczności. W przypadku kropli zawierających jony srebra(I) brak jest możliwości użycia standardowych roztworów buforowych stosowanych w recepturze kropli ocznych. Żądany efekt można osiągnąć przez dodatek odpowiedniej ilości 0,1 M roztworu wodorotlenku sodu bez ryzyka wytrącenia trudno rozpuszczalnego tlenku srebra(I), którego cząstki, zbijane w większe agregaty, bez działania leczniczego, mogłyby podrażniać oko. Do kropli do oczu przygotowanych zgodnie z formułą przedstawioną wcześniej dodawałem po 5 kropli (0,25 mL) 0,1 M roztworu wodorotlenku sodowego i dokładnie mieszałem. W chwili dodawania substancji alkaliczującej widoczne było lekkie, lokalne brunatnienie roztworu zanikające natychmiast po zmieszaniu zawartości. Dodatek takiej ilości całkowicie zdysocjowanej zasady daje możliwość uzyskania kropli o pH ok. 6,9–7,1. Pomiary pH wykonałem za pomocą pH-metru Hanna Instruments HI 221 (Hanna Instruments SRL, Nagyfalú, Rumunia).

3.2.2.6 Zastosowanie recepturowych leków zawierających kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) w okulistyce

Badanie było eksperymentem terapeutycznym u 3 pacjentów, u których powikłania okulistyczne związane z trądzikiem różowatym nie zostały poddane konwencjonalnemu leczeniu. Wszystkim pacjentom przepisano metronidazol z dobrze rozpuszczalnym azotanem srebra(I) w postaci kropli i maści ocznej aplikowanych 3 x dziennie.

Badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami etycznymi określonymi w Deklaracji Helsińskiej z 1964 r. Uzyskano zgodę właściwej Komisji Bioetycznej (Uchwała Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN / 415/19 / KE). Każdy z pacjentów

podpisał świadomą zgodę na udział w badaniu oraz sfotografowanie i opublikowanie części twarzy.

Badanie trwało 3 miesiące i obejmowało łącznie cztery wizyty lekarskie: wizytę podstawową (dzień 0), dwie wizyty kontrolne (po 1 tygodniu, po 1 miesiącu) i wizytę kończącą badanie (po 3 miesiącach). Podczas każdej wizyty pacjenci byli poddawani pełnemu badaniu okulistycznemu z nieskorygowanym badaniem ostrości wzroku (UCVA), wykonywano zdjęcie oka, optyczną koherentną tomografię rogówki w wysokiej rozdzielczości (HD-OCT), pachymetrię i ocenę filmu łzowego. Testy subiektywne (uczucie ciała obcego, uczucie suchości oka, pieczenie, kłucie i światłowstręt - w skali od 0 do 3) oraz obiektywne objawy zespołu suchego oka oceniano za pomocą testu czasu zrywania filmu łzowego (test BUT), za pomocą fluoresceiny oceniano wybarwienie rogówki (według skali oksfordzkiej) oraz testem zieleni lizaminowej erozję spojówki (według skali van Bijstervelda). Niepożądane i nieoczekiwane działania uboczne zbierano podczas wszystkich wizyt lekarskich.

3.2.2.7 Zastosowanie recepturowych leków zawierających kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) w dermatologii

Nie prowadziłem badań w tym zakresie, jednak pacjenci, którym lekarz przepisał lek recepturowy zawierający w swoim składzie metronidazol oraz azotan srebra(I), a został przygotowany z wykorzystaniem opracowanej przeze mnie formułacji, dokonywali rejestracji postępu leczenia za pomocą obrazu cyfrowego. Przedstawione w rozdziale 4 zdjęcia uzyskały zgodę pacjentów na ich opublikowanie do celów naukowych bez podania danych personalnych, wieku i rasy.

3.2.3. Trwałość kompleksów $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ i $[\text{Ag}_2(\text{MTZ})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Fotostabilność związku kompleksowego $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ oraz azotanu srebra(I) i metronidazolu badałem w bezpośrednim świetle dziennym na powietrzu i w ciemności. Wszystkie substancje rozpuszczałem używając wody jako rozpuszczalnika. Stężenie każdego z roztworów wynosiło 0,06 M. Stężenie to odpowiada zwykle stosowanemu w postaciach leku używanych w medycynie, t.j. 1% azotanu srebra [178] i 2% metronidazolu. Próbkę roztworów metronidazolu oraz soli srebra(I), które zawierały po 3 μM związków stanowiły układ odniesienia. 50 μL przygotowanych roztworów zaaplikowałem na

różne podłoża: bibułę, papier, szkło i imitację skóry. Stabilność kompleksu, azotanu srebra(I) oraz MTZ monitorowałem wizualnie przez 108 godzin, wykonując dokumentację fotograficzną po 0, 1, 4, 18, 24, 40, 48, 52, 60, 84 i 108 godzinach. Oceeniłem również szybkość rozkładu kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) pod wpływem bezpośredniego promieniowania UV-A. Podłoże testowe stanowiła bibuła. Dla porównania zastosowałem także roztwory azotanu srebra(I) i liganda (MTZ). Panele z fotografiami zmian wizualnych w czasie od 0 do 1800 sekund po ekspozycji związków na promieniowanie UV-A (stężenie roztworu 0,06 M) zostały przedstawione w rozdziale 4 - Wyniki badań.

W kolejnym badaniu fotostabilność kompleksów $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ i $[\text{Ag}_2(\text{MTZ})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, a także soli srebra(I) badałem w normalnym świetle dziennym w atmosferze powietrza oraz w ciemności. Kompleksy i sole również rozpuszczałem w wodzie, a stężenie każdego z roztworów wynosiło 0,025 M i było niższe niż w pierwszym badaniu ze względu na ograniczoną rozpuszczalność siarczanu srebra(I) w wodzie. Dla celów porównawczych roztwory kompleksów i soli srebra(I) naniosłem na bibułę i papier w ilości 1,25 μM (50 μL roztworu). Stabilność w normalnym świetle dziennym i w ciemności monitorowałem wizualnie przez 48 godzin, wykonując dokumentację obrazu po 0, 10, 30, 60, 90, 120, 180 min. oraz po 24 i 48 godzinach. Stabilność po ekspozycji na bezpośrednie promieniowanie UV-A monitorowałem wizualnie przez 1 godzinę, wykonując dokumentację obrazu po 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 300, 600, 1800 i 3600 sekundach od aplikacji. Obrazy próbek przedstawiono w rozdziale 4 - Wyniki badań.

Do obu badań jako źródło promieni UV-A wykorzystałem lampę o długości fali 365 nm (Vilber Lourmat, Marne-la-Valée, Francja).

3.2.4. Analiza mikrobiologiczna $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ i $[\text{Ag}_2(\text{MTZ})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Związki kompleksowe srebra zostały przebadane pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej metodą mikrorozcieńczenia bulionu zgodnie z zaleceniami Komitetu ds. Badania Wrażliwości na Środki Przeciwdrobnoustrojowe - EUCAST (www.eucast.org) przy użyciu bulionu Mueller-Hinton i bulionu Mueller-Hinton z 5% zlizowaną krwią końską do wzrostu niewymagających i wybrednych bakterii. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) badanych kompleksów oceniono dla panelu referencyjnych mikroorganizmów tlenowych i beztlenowych z American Type Culture

Collection (ATCC), w tym: Gram-ujemne (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis* ATCC 12453), *Bacteroides fragilis* ATCC 10240, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Veillonella parvula* ATCC 10790 i Gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10876), *Actinomyces israeli* ATCC 10049, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Clostridium perfringens* ATCC 13124). Testy działania przeciwbakteryjnego związków przeprowadzono z wykorzystaniem metody wcześniej opisanej przez naukowców Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie w badaniach oceniających właściwości przeciwbakteryjne pochodnych 2-hydroksypirymidyny [179]. Referencyjnymi lekami w badaniu były: czysty ligand (MTZ), sole srebra(I) – azotan i siarczan oraz sól srebrowa sulfadiazyny. Każde doświadczenie powtórzono trzykrotnie i przedstawiono reprezentatywne dane.

Eradykacja biofilmu była badana w 96-studzienkowych płaskodennych płytkach polistyrenowych, do których dodano hodowlę inokulum bakteryjnego do końcowego stężenia 5×10^5 CFU/mL, z końcową objętością 100 μ L na studzienkę. Biofilmy *S. aureus* ATCC 25923 i *E. coli* ATCC 25922 hodowano na płytkach polistyrenowych przez 1 dzień. Kompleksy dwukrotnie rozcieńczano seryjnie w bulionie, a następnie po całonocnej inkubacji usuwano supernatant i do każdego dołka dodawano 100 μ L pożywki z dwukrotnymi seryjnymi rozcieńczeniami związków. Płytki inkubowano przez kolejne 24 godziny w 37 ° C. Kontrolnie hodowano bakterie bez związków.

Aby określić ilość biofilmu po inkubacji w związku kompleksowym, supernatant delikatnie usunięto, a utworzone biofilmy przemyto dwukrotnie 100 μ L roztworu soli fizjologicznej w celu usunięcia komórek planktonu. Pozostały biofilm był utrwalany w 100 μ L etanolu przez 15 min, a następnie wybarwiany 100 μ L fioletu krystalicznego (CV) o stężeniu 1% przez 10 min. Barwnik usunięto, studzienki przemyto dwukrotnie 200 μ L wody destylowanej i płytkę suszono w 37°C przez 30 min. Na koniec dodano 100 μ L 96% etanolu, próbki homogenizowano przez delikatne mieszanie i mierzono absorbancję w czytniku mikropłetek przy długości fali 570 nm. OD₅₇₀ roztworu alkoholowego barwnika w każdym dołku odczytano za pomocą czytnika mikropłetek (BioTek ELx800). Ślepe studzienki kontrolne, bez lub z dwukrotnym rozcieńczeniem badanych związków i środków odniesienia dodanych do tego samego bulionu, ale bez zawiesiny bakteryjnej, inkubowano w tych samych

warunkach. Odczytane w tych studzienkach wartości OD₅₇₀ były wartościami OD_c, stanowiącymi punkt odniesienia dla określenia wartości masy biofilmu.

Jakościowe określenie aktywności przeciwbiofilmowej wykonano za pomocą konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM). Do określenia właściwości przeciwbiofilmowych związków użyto zestawu do testów żywotności/cytotoksyczności dla żywych i martwych komórek bakterii (Biotium, Fremont, CA, USA). Zestaw ten składa się z dwóch barwników DNA – DMAO i EthD-III. DMAO ma zdolność barwienia zarówno żywych, jak i martwych bakterii, podczas gdy barwnik EthD-III barwi tylko DNA martwych komórek. Zastosowanie mieszaniny DMAO/EthD-III umożliwia odróżnienie żywych bakterii od martwych komórek. Bakterie z nienaruszonymi błonami komórkowymi wykazują czystą zieloną fluorescencję, podczas gdy komórki z uszkodzonymi błonami wykazują czerwoną lub żółtą (nakładanie się dwóch kolorów) fluorescencję. Po 24 godzinach ekspozycji bakterii na różne stężenia związków, biofilmy utworzone na studzienkach polistyrenowych delikatnie przepłukano solą fizjologiczną buforowaną fosforanem (PBS, Pan-Biotech, Aidenbach, Niemcy) w celu usunięcia bakterii planktonowych. Następnie próbki wybarwiono mieszaniną DMAO / EthD-III zgodnie z protokołem producenta. Biofilm bakteryjny obserwowano przy użyciu współogniskowego laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM, Olympus Fluoview wyposażony w FV1000, Olympus, Tokio, Japonia).

3.2.5. Analiza cytotoksyczności

3.2.5.1 Linie komórkowe: Balb/c 3T3 oraz HepG2, Caco-2, PANC-1 i 1.2B4

W ocenie cytotoksyczności wykorzystano linię komórek prawidłowych mysich fibroblastów Balb/c 3T3 (klon A31, **Rys.22**) oraz cztery linie ludzkich komórek nowotworowych:

- wątrobiaka HepG2 (ATCC HB-8065, **Rys.23**)
- gruczolaka jelita grubego Caco-2 (ATCC HTB-37, **Rys.24**)
- raka trzustki PANC-1 (ATCC CRL-1469, **Rys.25**)
- hybrydową linię komórkową, która powstała w wyniku fuzji pierwotnej hodowli ludzkich wysepek trzustki z ludzką linią komórkową raka trzustki 1.2B4 (ECACC HuP-T3, **Rys.26**).

Komórki Balb/c 3T3 uzyskano w ramach współpracy z Zakładem Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach. Linie HepG2, Caco-2 oraz PANC-1 zostały zakupione z American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Komórki 1.2.B4 zakupiono z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). Warunki hodowli zostały przedstawione w **tabeli 16**.

Linia komórkowa	Warunki hodowli	Podłoże	Pasaż kom.	gęstość
Balb/c 3T3	Pojemniki z tworzywa sztucznego do hodowli komórkowych ^a , powierzchnia 75 cm ² , w nawilżonym w 100% inkubatorze ^b , temperatura 37°C, atmosfera 5% CO ₂	DMEM ^c + 10% BCS oraz 1% L-glutamina i 1% roztwór antybiotyku	3-krotny ^f	5 x 10 ⁴ komórek/mL
HepG2		MEME ^d + 10% FBS oraz 1% L-glutamina i 1% roztwór antybiotyku		2 x 10 ⁵ komórek/mL
Caco-2		MEME ^d + 20% FBS oraz 1% L-glutamina i 1% roztwór antybiotyku		1 x 10 ⁵ komórek/mL
1.2B4		RPMI 1640 ^e + 10% roztwór płodowej surowicy cielęcej i 50 IU/ml roztwór penicyliny/streptomycyny	3-5-krotny ^f	1,5 x 10 ⁶ komórek/mL
PANC-1		DMEM ^c + 10% roztwór płodowej surowicy bydlęcej i 50 IU/ml roztwór penicyliny/streptomycyny		1,5 x 10 ⁶ komórek/mL

Tabela 16. Warunki hodowli poszczególnych linii komórkowych użytych w badaniu cytotoksyczności. Litery oznaczają kolejno: ^a Nunc, Roskilde, Dania, ^b NuAire, Plymouth, MN, USA, ^c zmodyfikowane podłoże Eagle'a Dulbecco, ATCC, ^d Minimum Essential Medium Eagle, ATCC, ^e Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, ^f pasażowanie co dwa lub trzy dni po osiągnięciu 70–80% konfluencji

Do zliczenia liczby żywych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanowym. Zawiesinę komórek przeniesiono na 96-dołkowe płytki (100 µL/dołek) i inkubowano przez 24 godziny przed ekspozycją na badane związki.

3.2.5.2 Przygotowanie analizowanych substancji

Do oceny cytotoksyczności związków kompleksowych metronidazolu: [Ag(MTZ)₂NO₃] i [Ag(MTZ)₂]₂SO₄, wolnego liganda (MTZ), soli: AgNO₃ i Ag₂SO₄ wykorzystano opisane poniżej metody. Cisplatynę wykorzystano jako lek referencyjny, a do przygotowania jej roztworu o stężeniach od 0,5 do 100 µM użyto 0,005 M (5000 µM) podstawowego roztworu wodnego. Zakresy stężeń badanych związków dobrano w zależności od rozpuszczalników, którymi były woda lub DMSO. Dla wszystkich linii komórkowych roztwory przygotowano poprzez rozcieńczanie roztworów podstawowych, które sporządzono

wcześniej w tym celu. Te same końcowe stężenia rozpuszczalnika i 1% roztworu Triton-X 100 zastosowano odpowiednio jako kontrolę negatywną i pozytywną w drugim badaniu [91,180]. Każdy z roztworów o przygotowanym stężeniu badano w sześciu powtórzeniach w trzech niezależnych doświadczeniach. Cytotoksyczność oceniano po 72 godzinach ekspozycji komórek na związki. Wszystkie roztwory związków były świeżo przygotowane i chronione przed światłem. Wykonano testy MTT, NRU, TPC i LDH.

3.2.5.3 Testy cytotoksyczności: MTT, NRU, TPC, LDH

Aktywność metaboliczną żywych komórek w testach **MTT** oceniano mierząc aktywność mitochondrialną dehydrogenaz [181]. Komórki żywe mają zdolność przekształcania MTT do formazanu. Po inkubacji komórek z badanym związkiem, do każdego dołka 96-dółkowych płytek dodano porcję 10 μ L roztworu MTT (5 mg/mL w PBS) i inkubowano. Po 3 godzinach roztwór MTT usunięto i wewnątrzkomórkowe kryształy formazanu rozpuszczono w 100 μ L DMSO.

Testy **NRU** oparte na barwieniu żywych komórek czerwienią obojętną przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez Borenfreunda i Puernera [182]. Po inkubacji pożywkę zawierającą związek usunięto i komórki przemyto PBS. Następnie dodano 100 μ L/dołek roztworu NR (50 μ g/mL) na 3 godziny. Po tym czasie komórki przemyto PBS. Barwnik z żywych komórek uwolniono przez ekstrakcję mieszaniną kwasu octowego, etanolu i wody (w stosunku objętościowym 1:50:49).

Testy **TPC** opierały się na barwieniu całkowitego białka komórkowego [183]. Po inkubacji pożywkę zawierającą związek usunięto i do każdego dołka dodano 100 μ L barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250. Płytkę wytrząsano przez 10 min. Następnie zabarwienie usunięto i komórki przepłukano dwukrotnie 100 μ L roztworu do przemywania (lodowaty kwas octowy/etanol/woda w stosunku objętościowym 5:10:85). Następnie dodano porcję 100 μ L roztworu desorbującego (1 M octanu potasu).

W testach **LDH**, integralność błony komórkowej oceniano za pomocą metody uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) [184], którą monitorowano za pomocą dostępnego na rynku komercyjnego zestawu LDH (Roche Diagnostics, Warszawa, Polska). Pożywkę (100 μ L/dołek) bez komórek przeniesiono do odpowiednich dołków optycznie przezroczystej 96-dółkowej płaskiej mikropłytki i do każdego dołka dodano 100 μ L mieszaniny reakcyjnej. Następnie płytki inkubowano przez 30 minut w temperaturze

pokojuowej w ciemności. Po tym czasie dodano 50 μ L/dołek 1 M HCl w celu zatrzymania reakcji.

W każdym z przeprowadzonych testów, po wykonaniu przedstawionych powyżej czynności, płytki przenoszono do czytnika mikropłytek (LabSystems Multiskan RC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; czytnik Synergy HTX BioTek® Instruments inc., Winooski, VT, USA – w zależności od aktualnej dostępności podczas badań). Absorbancje były mierzone przy długości fali: 570 nm (MTT), 540 nm (NRU), 595 nm (TPC) i 492 nm (LDH) z uwzględnieniem ślepej próby jako odniesienia. Cytotoksyczność wyrażono jako procent kontroli negatywnej [70].

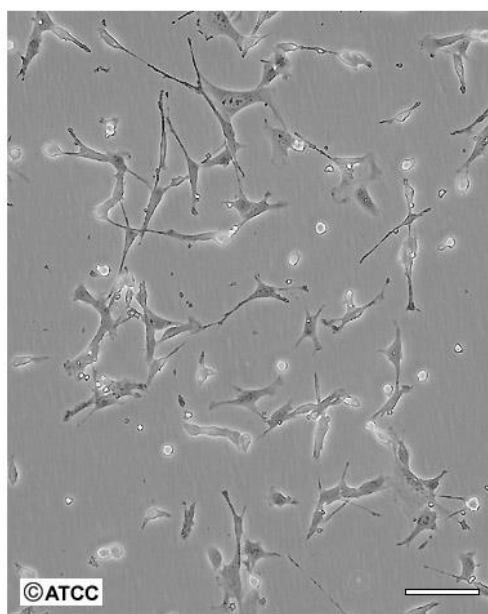
Eksperymenty wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach, a wyniki testów wyrażono jako średnią $\pm$ SD (odchylenie standardowe). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). Zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA), a następnie test post-hoc Dunnetta. 50% zahamowanie (cytotoksyczność) stężenia (IC_{50}) zostały wyprowadzone z krzywej dawka-odpowiedź wykreślono ze stężeniem związku (oś X) w korelacji procent żywotności komórek (oś Y). Wartości IC_{50} zostały obliczone za pomocą oprogramowania GraphPad Prism 5 (San Diego, Kalifornia, USA). Porównania statystyczne między wartościami IC_{50} przeprowadzono za pomocą analizy wariancji (ANOVA), a następnie za pomocą testu Tukey'a. Wartości $p \leq 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

3.2.5.4 Wykrywanie apoptozy metodą przyłączania aneksyny V

Wykrywanie apoptozy i oznaczanie ilościowe analizowano przy użyciu zestawu Annexin V-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), zgodnie z protokołem i instrukcjami producenta. Komórki PANC-1 i 1.2B4 poddano działaniu trypsyny i wysiano w gęstości $0,5 \times 10^6$ komórek w każdej studzience na 6-dołkowej płytce i inkubowano przez 24 godziny. Po osiągnięciu logarytmicznej fazy wzrostu, komórki przemyto PBS, po czym dodano świeżą pożywkę i roztwory: azotanu srebra(I), MTZ i związku kompleksowego MTZ z azotanem srebra(I) w 3 stężeniach (5, 10, 25 μ M). Jako kontrolę pozytywną zastosowano 10 μ M cisplatyny. Po 72 godzinach komórki trypsynizowano, dwukrotnie przemywano PBS po ekspozycji, zbierano przez wirowanie, a następnie ponownie zawieszano w buforze wiążącym cytometrii przepływowej. Ponadto 100 μ L zawiesiny komórek zawierającej 10^5 komórek pozostawiono w ciemności z 5 μ L odczynnika zestawu do wykrywania apoptozy (Annexin V-

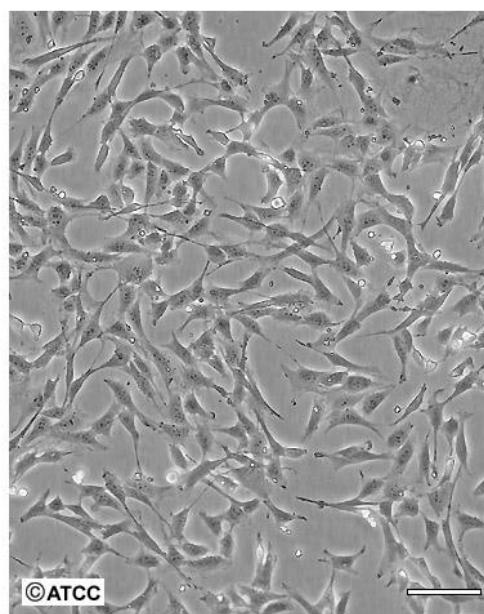
FITC) na 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie indukcję apoptozy określono za pomocą cytometru przepływowego (FACSCalibur, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Każdy materiał został przetestowany w trzech powtórzeniach i przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty.

ATCC Number: **CCL-163**
Designation: **BALB/3T3 clone A31**



Low Density

Scale Bar = 100µm

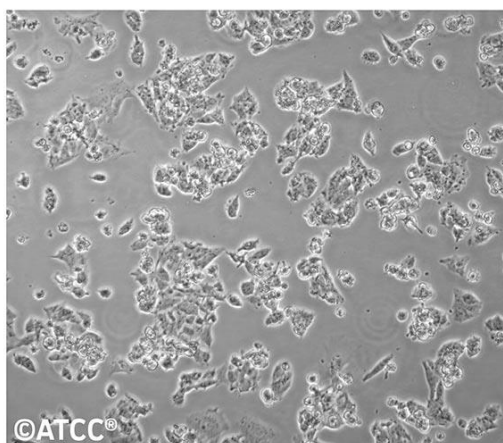


High Density

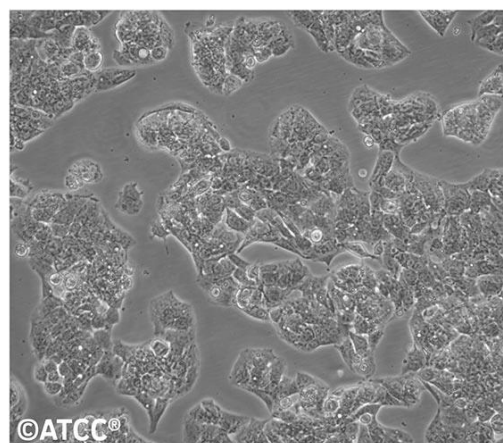
Scale Bar = 100µm

Rys.22 – Linia komórkowa Balb/c 3T3, fotografia z zasobów ATCC

ATCC Number: **HB-8065**
Designation: **Hep G2**



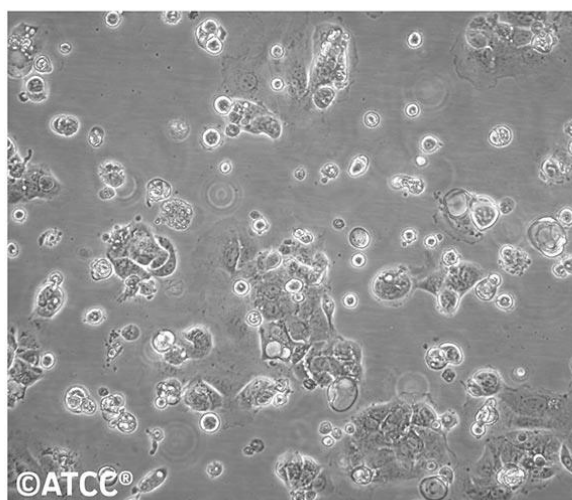
Low Density



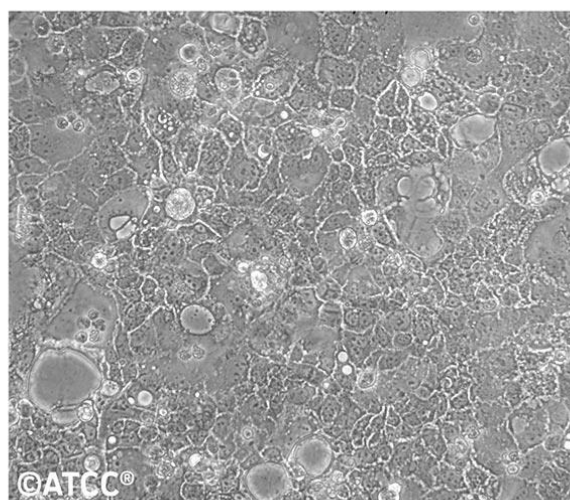
High Density

Rys.23 – Linia komórkowa Hep G2, fotografia z zasobów ATCC

ATCC Number: **HTB-37**
Designation: **Caco-2**



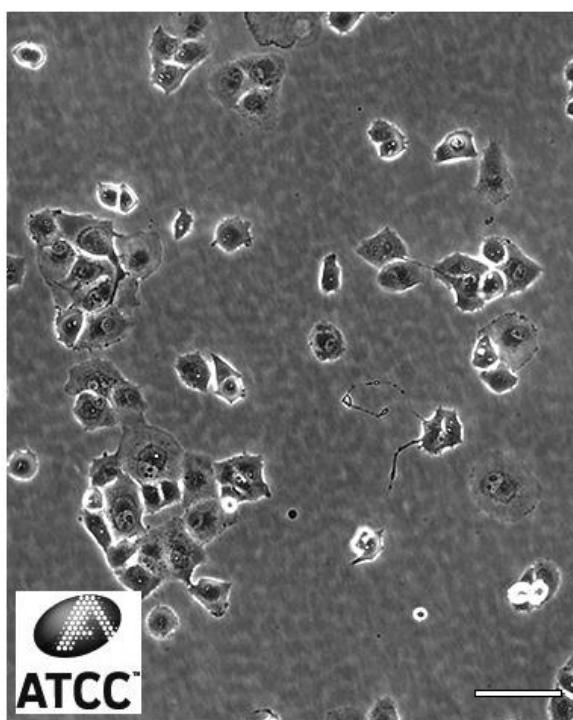
Low Density



High Density

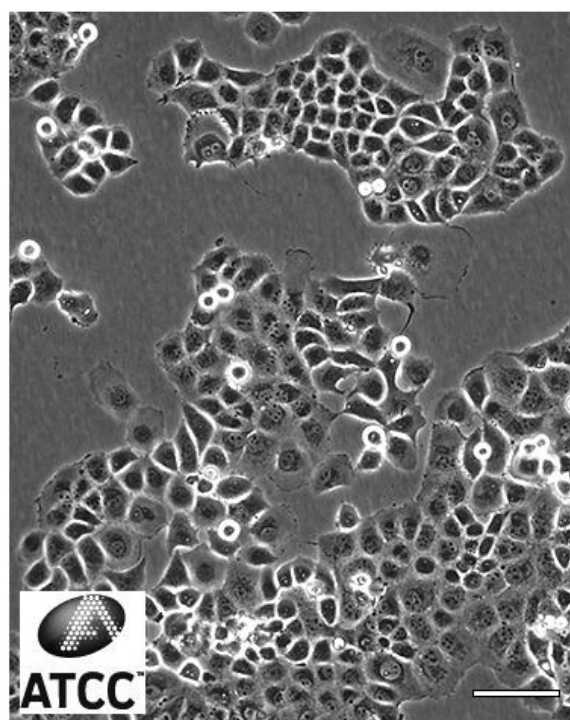
Rys.24 – Linia komórkowa Caco-2, fotografia z zasobów ATCC

ATCC Number: **CRL-1469**™
Designation: **PANC-1**



Low Density

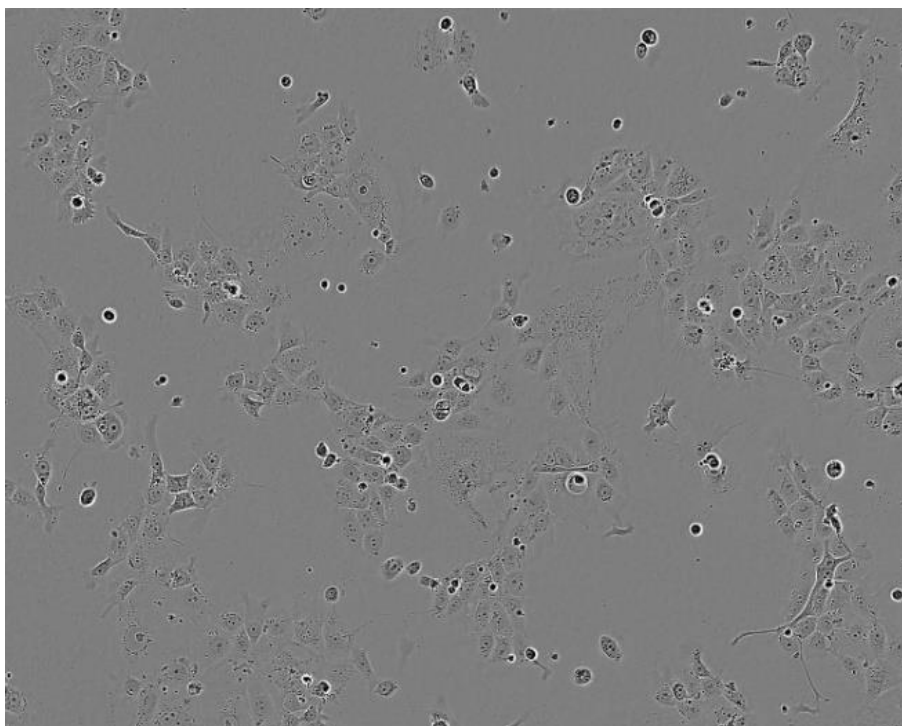
Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Rys.25 – Linia komórkowa PANC-1, fotografia z zasobów ATCC



Rys.26 – Linia komórkowa 1.2B4, fotografia z zasobów PHE

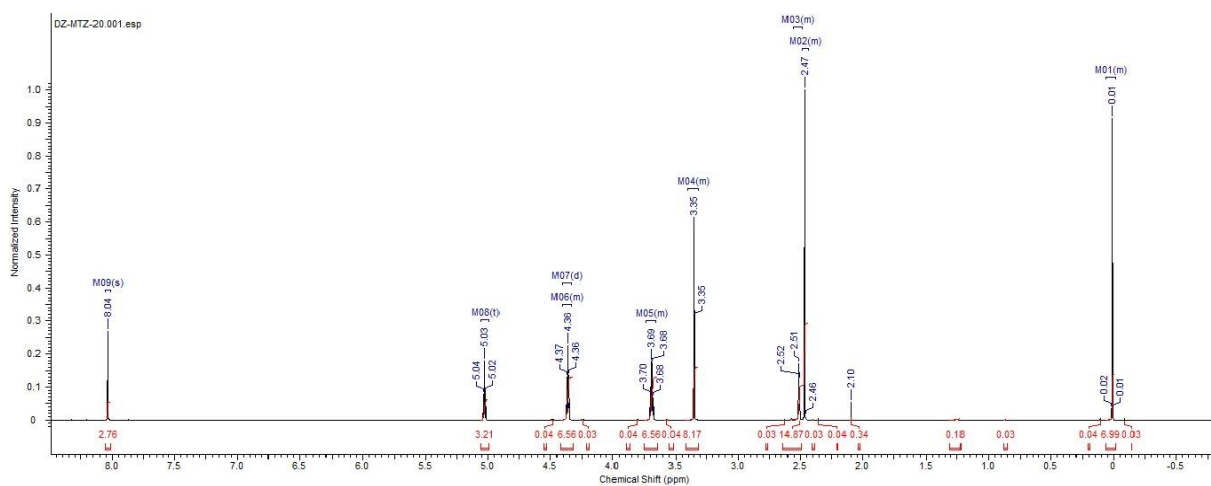
4. Wyniki badań

4.1. Związki koordynacyjne metronidazolu ze srebrem(I)

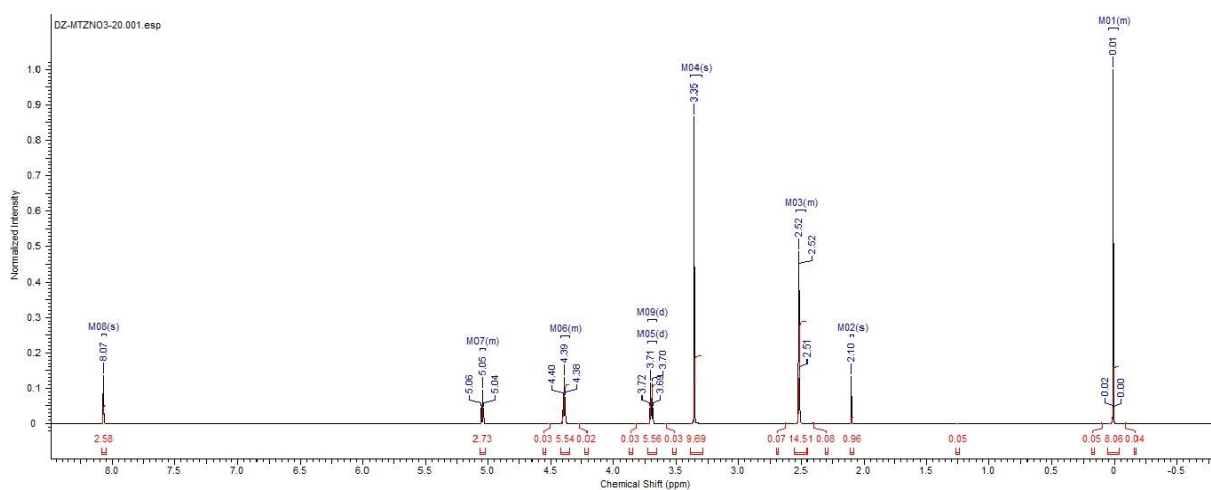
4.1.1 Synteza związku kompleksowego metronidazolu z azotanem srebra(I) o wzorze $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$

Otrzymany w jednoetapowej syntezie typu „one-step” związek kompleksowy metronidazolu z azotanem srebra(I) ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_7\text{O}_9\text{Ag}$) poddałem badaniom potwierdzającym jego tożsamość i czystość. Analiza magnetycznego rezonansu jądrowego pozwoliła na następujące ustalenia: w widmie sygnał w postaci singletu o przesunięciu 2,51 ppm odpowiada sześciu protonom grup metylowych, sygnał kwartetu o przesunięciu 3,71 ppm przedstawia 4 protony grupy metylenowej związanej z tlenem, tercet o przesunięciu 4,39 ppm natomiast 4 protony grupy metylenowej związanej z azotem. Sygnał w postaci tercetu o przesunięciu 5,05 ppm wskazuje dwa protony grupy hydroksylowej, natomiast singlet o przesunięciu 8,07 ppm przedstawia 4 protony z ugrupowania CH-N. Kolejną, przygotowaną próbkę do badania ^1H NMR wytrząsałem z wodą ciężką. Otrzymałem podobne widmo, z tą różnicą, że brak w nim sygnału o przesunięciu 5,05 ppm pochodzącego od 2 protonów grupy hydroksylowej. Jednoznacznie potwierdziłem fakt, że grupy -OH są obecne w strukturze kompleksu i zostały wymienione podczas wytrząsania z wodą deuterową na atomy deuteru (**Rys.27, 28**). Korzystając z analizy metodą podczerwieni uzyskałem następujące wyniki: liczby falowe 1467, 1385, 1341 wskazują na występowanie grupy nitrowej, liczby 1385, 1341, 800 potwierdzają obecność anionu azotanowego (**Rys.29**).

(a)



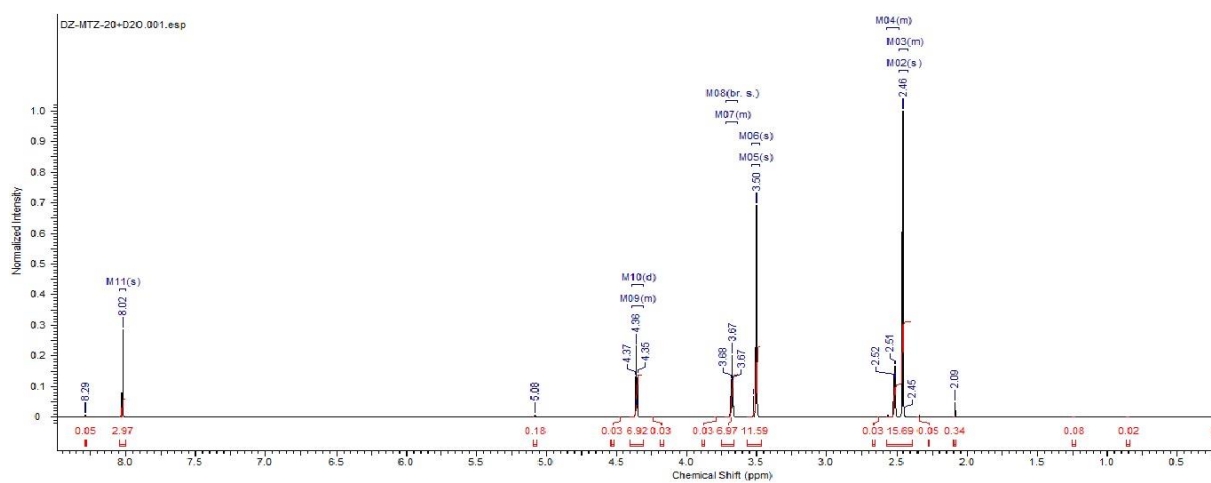
(b)



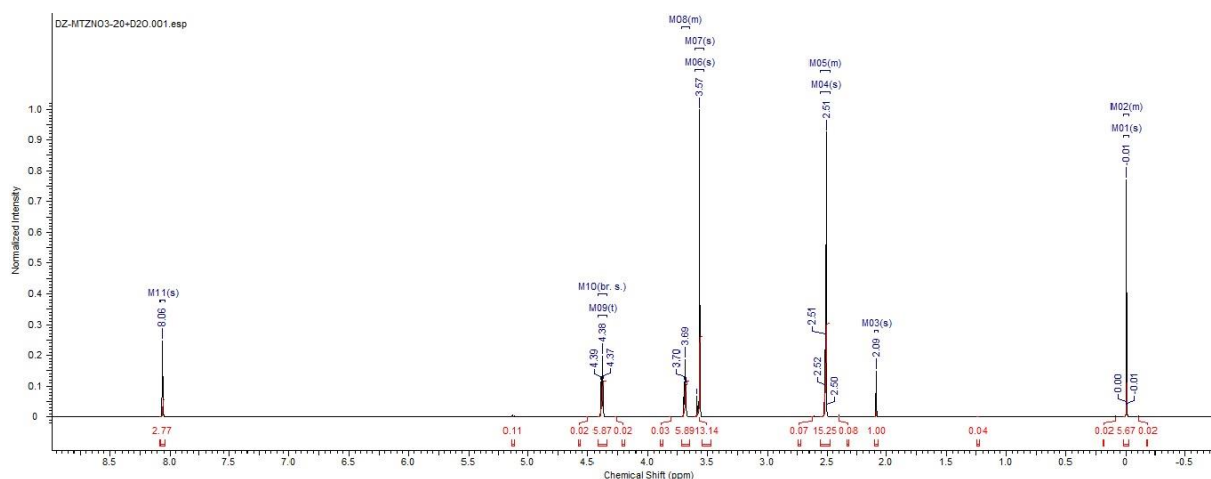
Rys.27 – Widma ^1H NMR metronidazolu (a) i kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) (b)

^1H NMR dla kompleksu (600MHz, DMSO) : δ = 2.51 ppm (s, 6H, 2 x CH_3), 3.71 (q, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-O}$, J = 5.5Hz), 4.39 (t, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-N}$), 5.05 (t, 2H, 2 x -OH , J = 5.5 Hz), 8.07 (s, 2H, 2 x CH-N).

(c)



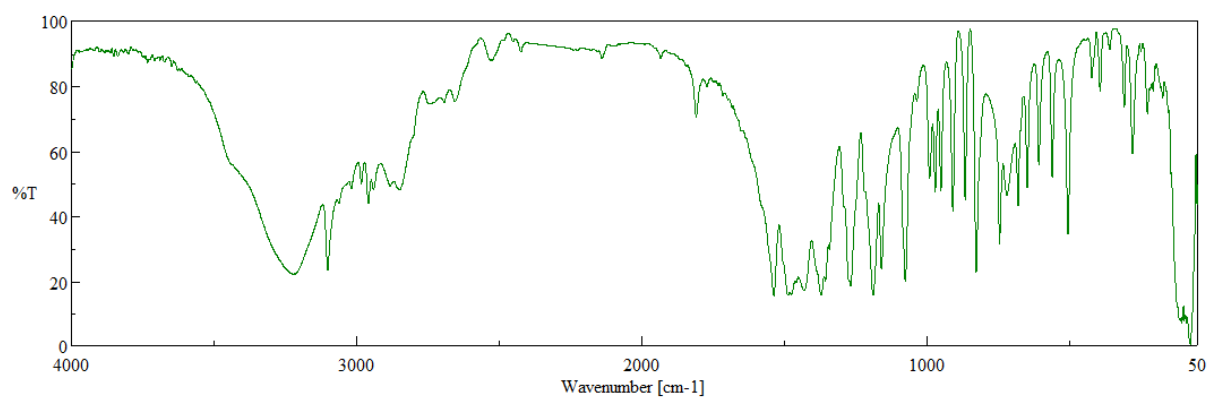
(d)



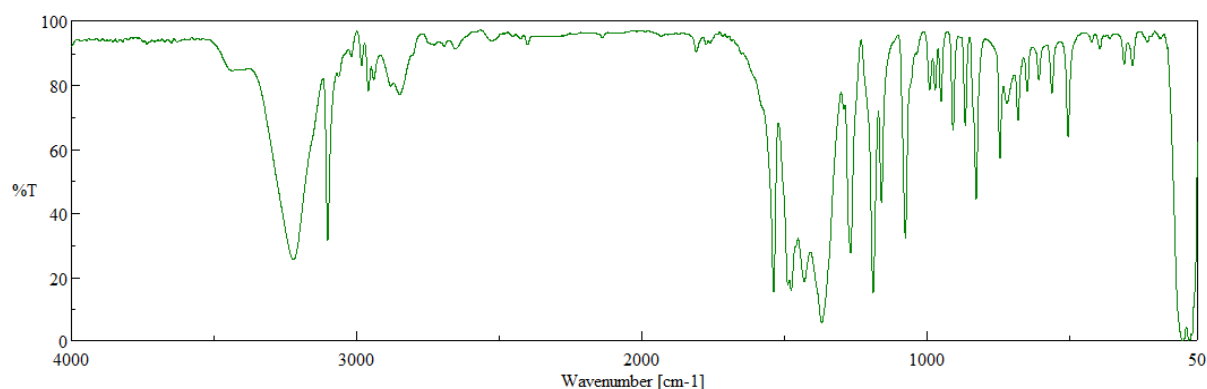
Rys.28 – Widma ^1H NMR metronidazolu (c) i kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) (d) z D_2O

^1H NMR dla kompleksu (600MHz, $\text{DMSO}+\text{D}_2\text{O}$) : $\delta = 2.51$ ppm (s, 6H, 2 x CH_3), 3.69 (t, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-O}$, $J = 5.5$ Hz), 4.38 (t, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-N}$), 8.06 (s, 2H, 2 x CH-N)

(a)



(b)

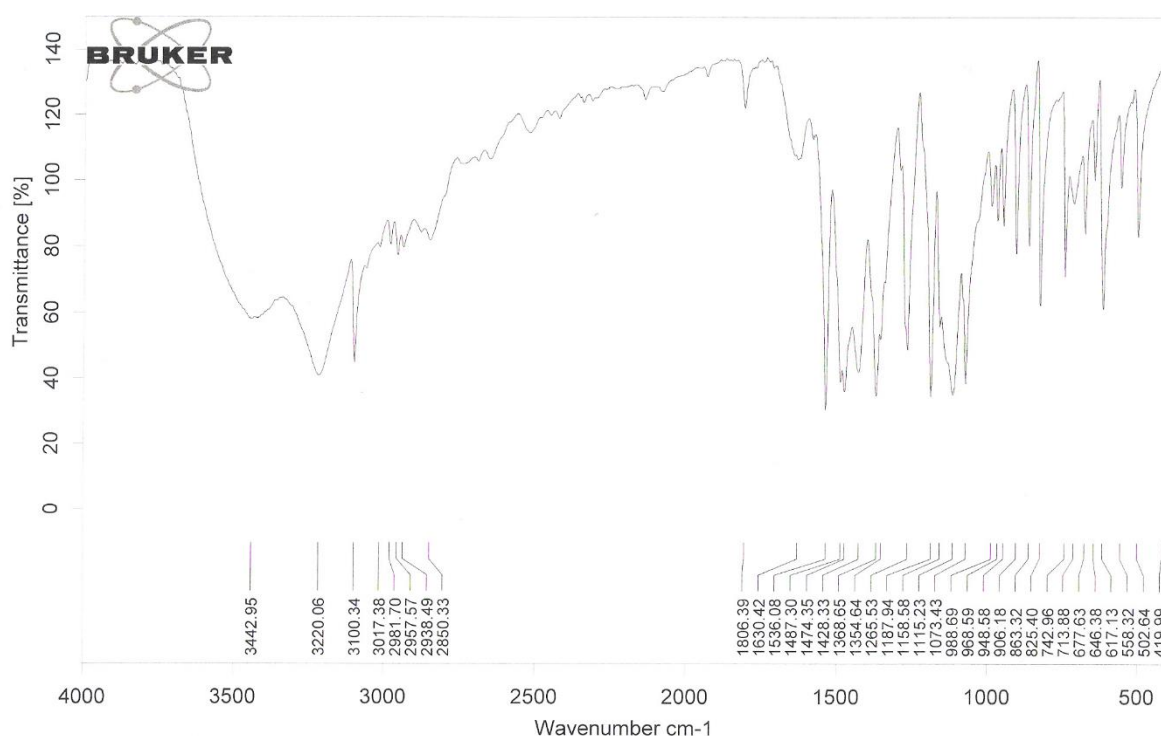


Rys.29 – Widma IR metronidazolu (a) oraz kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) (b)

Dla kompleksu IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): (O-H, C-H) 3214, 3101, 3061, 3018, 2930, 2870; (C=N, C=C) 1555; (NO_2 , C-H) 1467, (NO_3 , NO_2 , C-H) 1385, 1341 ; (C-O) 1080 ; (NO_3) 800

4.1.2 Synteza związku kompleksowego metronidazolu z siarczanem srebra(I) o wzorze $[\text{Ag}_2(\text{MTZ})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Otrzymany w jednoetapowej syntezie typu „one-step” związek kompleksowy metronidazolu z siarczanem srebra(I) ($\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_{12}\text{O}_{21}\text{Ag}_2\text{S}$) poddałem badaniom potwierdzającym jego tożsamość i czystość. Korzystając z analizy metodą podczerwieni przyporządkowałem liczby falowe: 1487, 1368, 1353 grupie nitrowej, zaś liczbę 1115 grupie siarczanowej (**Rys.30**).



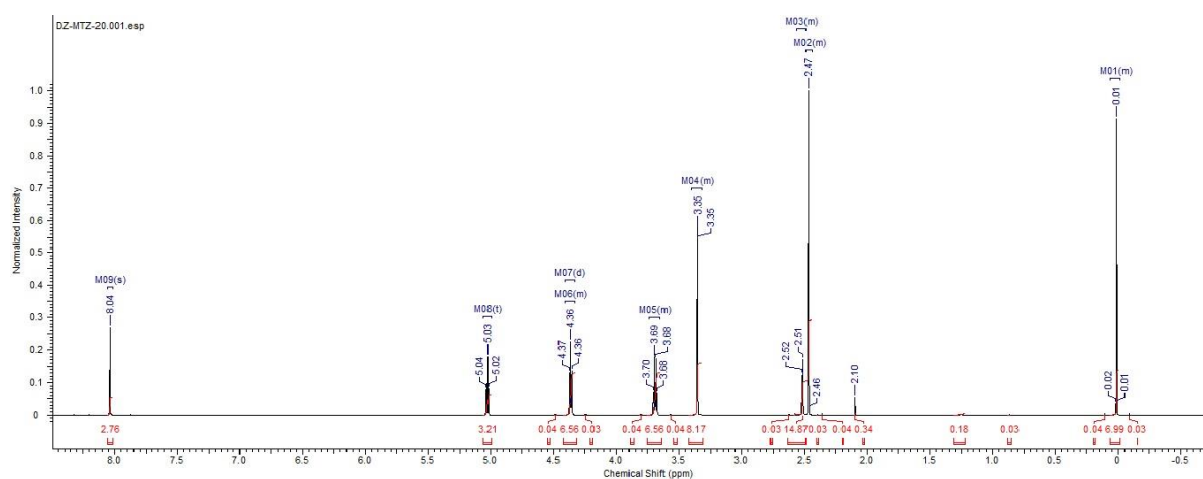
Rys.30 – Widmo IR kompleksu metronidazolu z siarczanem srebra(I)

Dla kompleksu IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): (O-H, C-H) 3220, 3100, 3017, 2981, 2957, 2850; (C=N, C=C) 1536; (NO_2 , C-H) 1487, (NO_2 , C-H) 1368, 1354; (C-O) 1073; (SO_4) 1115.

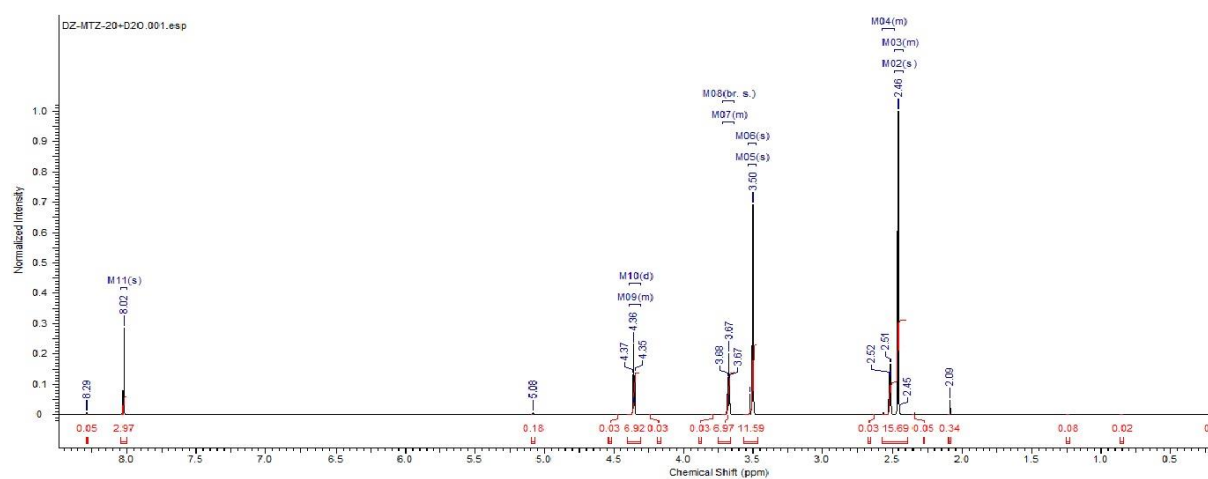
Analiza magnetycznego rezonansu jądrowego pozwoliła na następujące ustalenia: w widmie sygnał w postaci singletu o przesunięciu 2,47 ppm odpowiada dwunastu protonom grup metylowych, sygnał kwartetu o przesunięciu 3,69 ppm przedstawia 8 protonów grupy metylenowej związanej z tlenem, tercet o przesunięciu 4,36 ppm natomiast 8 protonów grupy metylenowej związanej z azotem. Sygnał w postaci tercetu o przesunięciu 5,03 ppm wskazuje

4 protony grupy hydroksylowej, natomiast singlet o przesunięciu 8,04 ppm przedstawia 8 protonów z ugrupowania CH-N. Analiza ^1H NMR pokazuje, że proton z grupy -OH ($\delta = 5,03$ ppm) metronidazolu pozostaje w strukturze kompleksu. Proton jest wymieniany po wytrząsaniu z wodą deuterową. Zarejestrowane widma ^1H NMR zostały przedstawione na **rys.31, 32**.

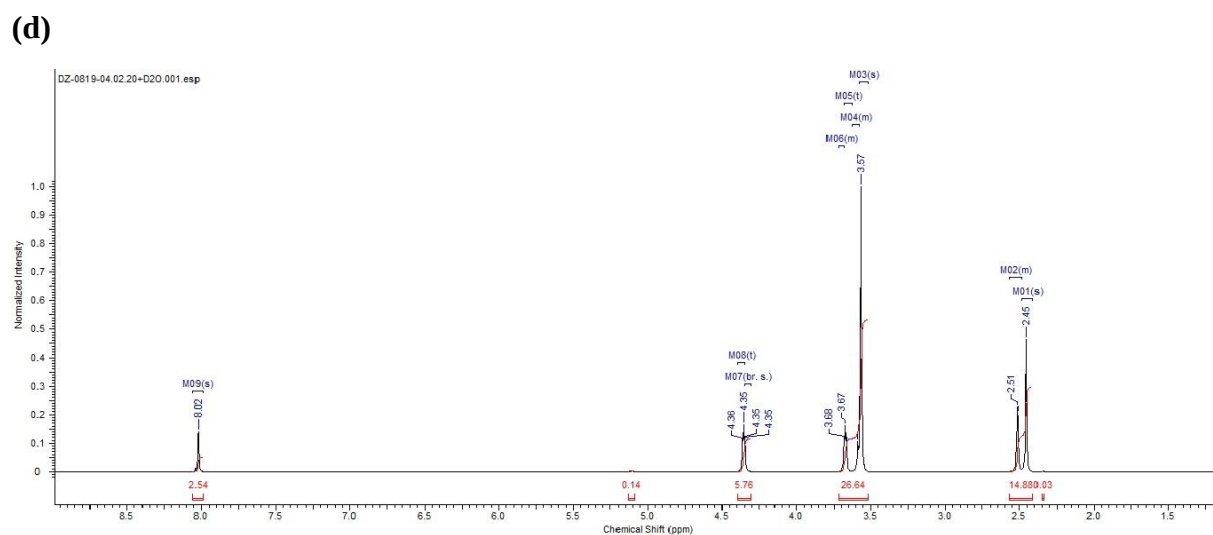
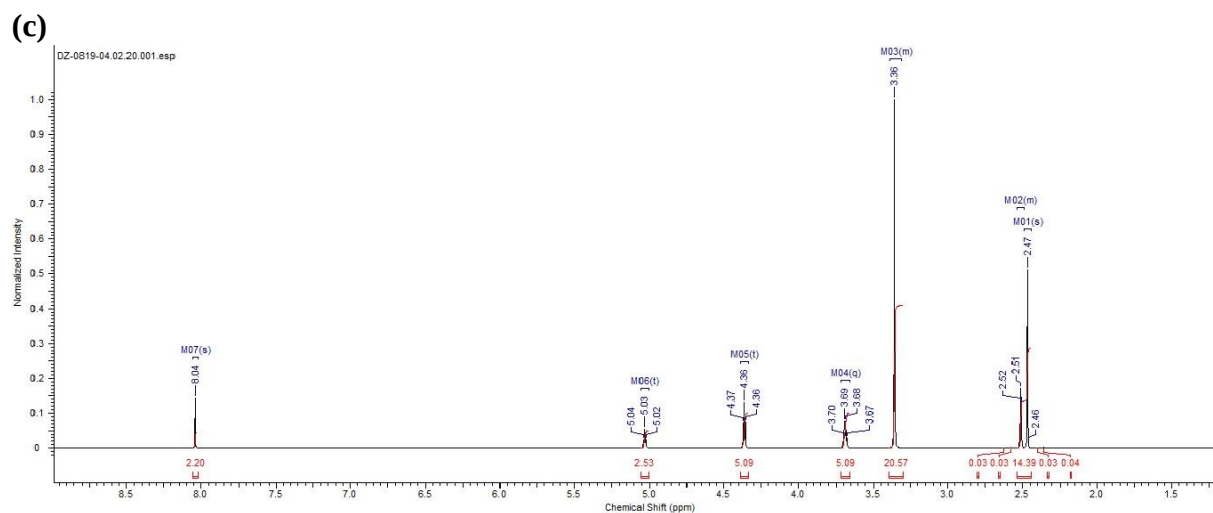
(a)



(b)



Rys.31 – Widma ^1H NMR metronidazolu (a) i metronidazolu z D_2O (b)



Rys.32 – Widma ^1H NMR kompleksu metronidazolu z siarczanem srebra(I) **(c)** i z D_2O **(d)**

^1H NMR kompleks (600MHz, DMSO) : δ = 2.47 ppm (s, 12H, 4 x CH_3), 3.69 (q, 8H, 4 x $\text{CH}_2\text{-O}$, J = 5.09Hz), 4.36 (t, 8H, 4 x $\text{CH}_2\text{-N}$), 5.03 (t, 4H, 4 x -OH , J = 2.5 Hz), 8.04 (s, 8H, 8 x CH-N).

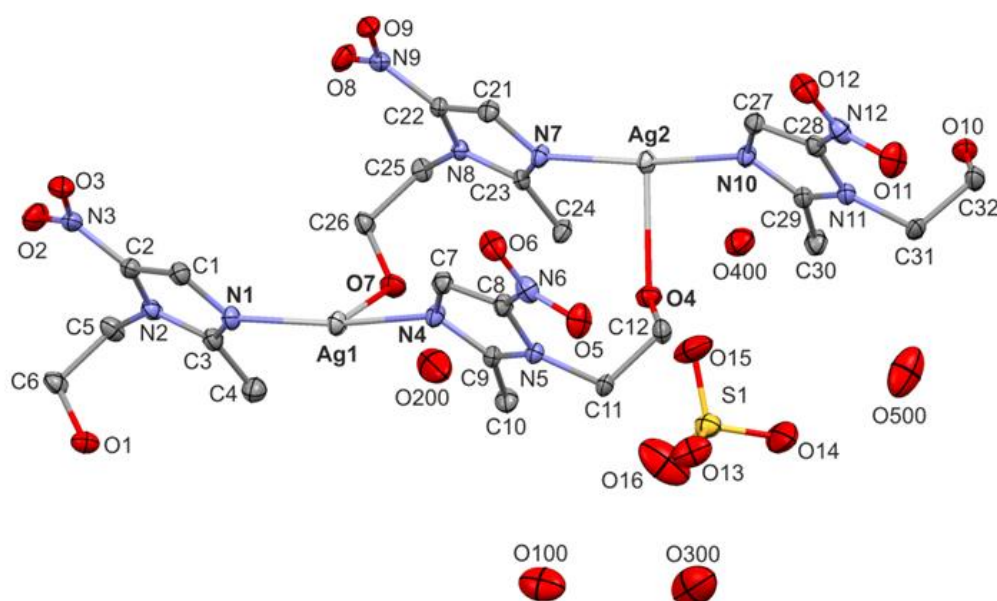
^1H NMR kompleks (600MHz, DMSO+ D_2O) : δ = 2.45 ppm (s, 12H, 4 x CH_3), 3.67 (m, 8H, 4 x $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.35 (t, 8H, 4 x $\text{CH}_2\text{-N}$, J = 5.7Hz), 8.02 (s, 8H, 8 x CH-N)

4.1.3. Charakterystyka spektroskopowa i analiza rentgenostrukturalna związku kompleksowego metronidazolu z siarczanem srebra(I) o wzorze $[Ag_2(MTZ)_4]SO_4 \cdot 5H_2O$

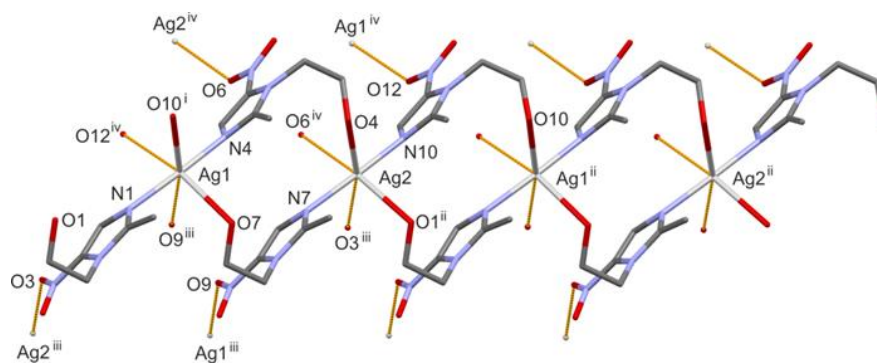
Zsyntetyzowany związek kompleksowy krystalizuje w układzie trójskośnym, w grupie przestrzennej $P\bar{1}$, $Z = 2$. Jednostka asymetryczna przedstawiona na **rysunku 33** składa się z dwóch jonów srebra, czterech ligandów metronidazolowych, jednego przeciwjonu siarczanowego i 5 cząsteczek wody. Oba kationy srebra przyjmują geometrię o czterech współrzędnych piłokształtnych z dwoma wiązaniami Ag-N (2,2 Å, **Tabela 17**) i dwoma stosunkowo krótkimi wiązaniami Ag-O o długości 2,6 Å. Podobny schemat koordynacyjny centrum metalu opisano dla kompleksów srebra(I) z 1,3,5-tris(4-cyjanobenzoilo)-benzenem zawierających przeciwjony OTf i PF₆ [185]. Dodatkowo, obserwuje się dwa znacznie słabsze oddziaływania Ag...O o długości 2,9 Å (wcześniej krótsze niż suma promieni van der Waalsa Ag i O wynosząca 3,24 Å), uzupełniając koordynację wokół kationów srebra do oktaedru. Tego typu słabe kontakty Ag...O są rzadko omawiane w literaturze, jednak można je łatwo znaleźć po bliższym przyjrzeniu się strukturom kryształu. Schemat koordynacji Ag jest przedstawiony na **rysunku 34** i potwierdzony przez powierzchnię Hirshfelda metalicznego środka Ag1 i Ag2 (**Rys.35**). Osiowe miejsca każdego oktaedru zajmują atomy azotu, podczas gdy płaszczyzna podstawowa jest utworzona przez cztery atomy tlenu. Znormalizowana odległość kontaktu (d_{norm}) zakodowana na powierzchni Hirshfelda wskazuje na siłę oddziaływania (bliskie kontakty są pokazane jako obszary czerwone, słabsze jako białe, a brak kontaktów jako niebieskie) [186]. Wyraźnie widać, że dłuższe interakcje są nadal widoczne na powierzchni Hirshfelda każdego centrum Ag, jednak są one znacznie słabsze niż inne, zgodnie z oczekiwaniami.

Dwa jony srebra, ułożone naprzemiennie, tworzą łańcuch polimeru 1D biegnący w kierunku [-1-10]. Sąsiednie łańcuchy są połączone w warstwę polimeru 2D przez najslabsze kontakty Ag...O, co pokazano na **rysunku 36**. Istnieje przestrzeń wypełniona nieskoordynowanymi przeciwjonami siarczanowymi i cząsteczkami wody między warstwami zbudowanymi z kationów srebra(I) i ligandami metronidazolu. Na podstawie obliczeń w PLATON [187] taka pusta przestrzeń dostępna dla rozpuszczalnika zajmuje 22% całkowitej objętości kryształów. W **tabeli 18** przedstawiono geometrię wiązań wodorowych O-H...O utworzonych między grupą hydroksylową ligandów metronidazolowych a atomami tlenu

z cząsteczek wody lub anionów siarczanowych. Pełna analiza oddziaływań wiązań wodorowych nie jest możliwa ze względu na pominięcie atomów wodoru w cząsteczkach wody w udokładnianiu.



Rys.33 – Reprezentacja Mercury [188] asymetrycznej jednostki $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Elipsoidy przemieszczenia są rysowane z prawdopodobieństwem 50%. Dla przejrzystości pominięto atomy wodoru

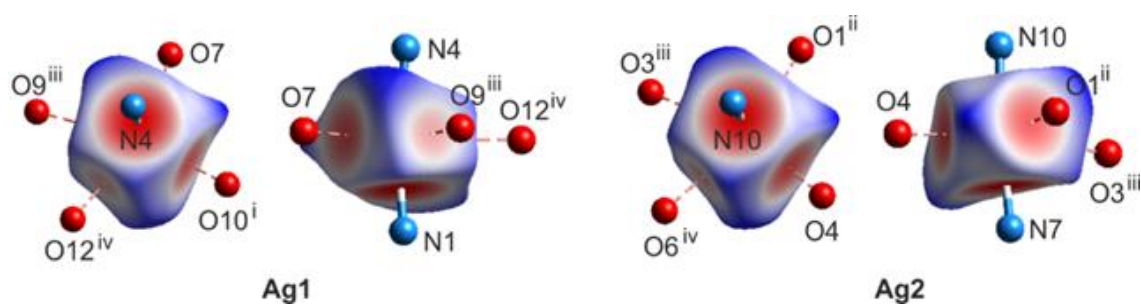


Rys.34 – Schemat oddziaływań na kationy srebra(I). Żółte przerywane linie oznaczają słabe punkty kontaktów $\text{Ag} \cdots \text{O}$. Kody symetrii: (i) $x-1, y-1, z$; (ii) $x+1, y+1, z$; (iii) $1-x, 1-y, 2-z$; (iv) $2-x, 1-y, 2-z$

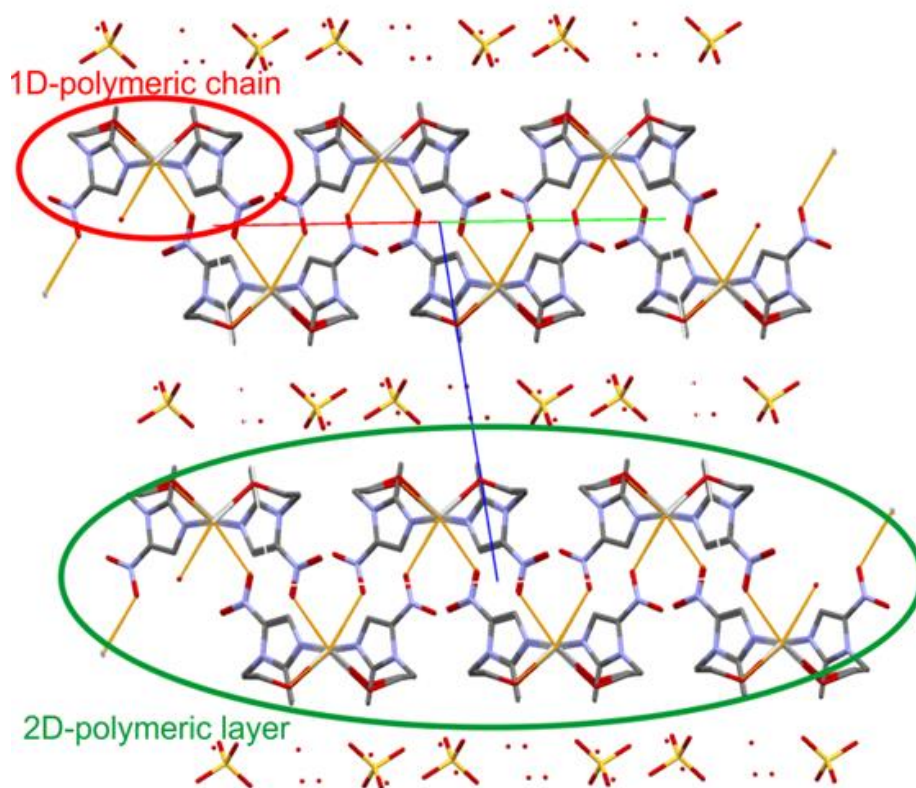
Ag-oddziaływanie	odległość	Ag-oddziaływanie	odległość
Ag1–N1	2.186(3)	Ag2–N7	2.197(2)
Ag1–N4	2.182(3)	Ag2–N10	2.197(2)
Ag1–O7	2.591(2)	Ag2–O4	2.554(2)
Ag1–O10 ⁱ	2.635(3)	Ag2–O1 ⁱⁱ	2.613(2)
Ag1 $\cdots$ O9 ⁱⁱⁱ	2.944(2)	Ag2 $\cdots$ O3 ⁱⁱⁱ	2.928(3)
Ag1 $\cdots$ O12 ^{iv}	2.995(3)	Ag2 $\cdots$ O6 ^{iv}	2.954(2)

Kody symetrii: (i) $x-1, y-1, z$; (ii) $x+1, y+1, z$; (iii) $1-x, 1-y, 2-z$; (iv) $2-x, 1-y, 2-z$.

Tabela 17. Odległości oddziaływań Ag [Å]



Rys.35 – Dwie różne orientacje powierzchni Hirshfelda metalicznego centrum Ag1 i Ag2 ze znormalizowaną funkcją kontaktu (d_{norm}) zmapowane na nim. Kody symetrii: (i) $x-1, y-1, z$; (ii) $x+1, y+1, z$; (iii) $1-x, 1-y, 2-z$; (iv) $2-x, 1-y, 2-z$



Rys.36 – Upakowanie kryształu kompleksu $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Wiązanie wodorowe	D–H	H $\cdots$ A	D $\cdots$ A	$\angle$ D–H $\cdots$ A
O1–H1D $\cdots$ O400	0.82(2)	1.95(2)	2.756(3)	168(4)
O4–H4D $\cdots$ O15	0.81(2)	1.93(2)	2.689(4)	155(4)
O7–H7D $\cdots$ O200	0.83(2)	1.88(2)	2.700(4)	172(5)
O10–H10D $\cdots$ O300	0.83(2)	1.94(2)	2.768(5)	174(4)

Tabela 18. Geometria wiązań wodorowych [$\text{\AA},^\circ$]

4.2 Ocena postaci leku

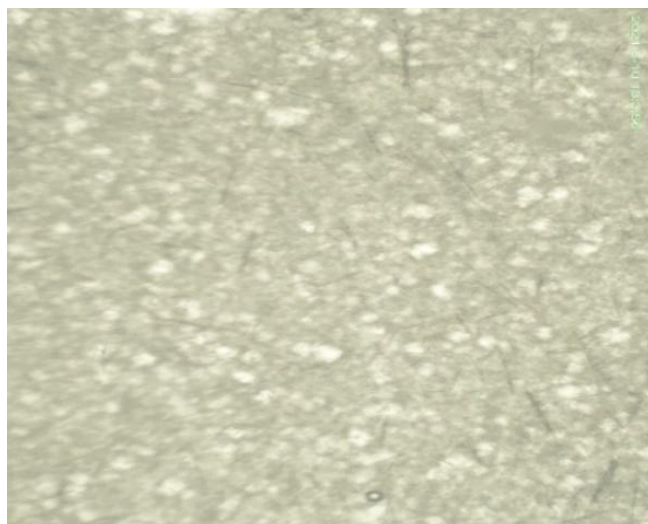
4.2.1 Maść do użytku zewnętrznego

Maść barwy białej, którą otrzymałem w wyniku opracowanej formuacji poddałem ocenie pod kątem widocznych gołym okiem zanieczyszczeń, których nie stwierdziłem. Masa wykonanego preparatu nie odbiegała od norm przyjętych w Farmakopei Polskiej XII ($\pm 3\%$ dla 51,0-200,0 g ogólnej masy leku) [36].

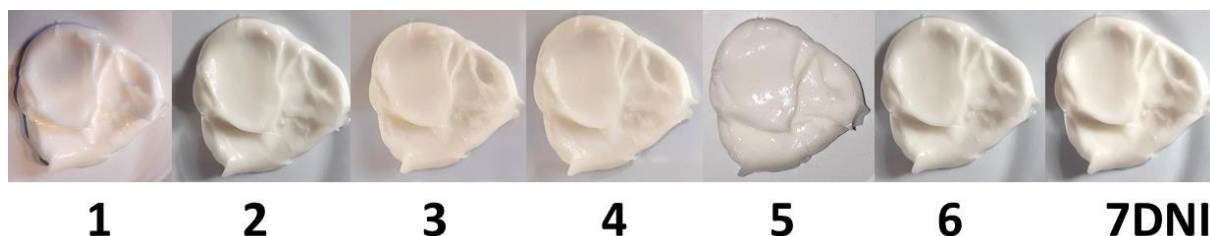
Produkt zapakowałem w pudełko PP i oznakowałem zgodnie z ogólnie przyjętymi w praktyce aptekarskiej zasadami: sygnatura koloru pomarańczowego, do użytku zewnętrznego, przechowywać w chłodnym miejscu, chronić od światła. Maść nie zmieniła wyglądu podczas przechowywania w temperaturze 2-8 °C przez okres 4 tygodni, podczas którego wykonywałem dokumentację zdjęciową (**Rys.37**). Po miesiącu przechowywania nie stwierdziłem rozwarstwień, co świadczy o stabilności układu wykonanej postaci leku. Próbkę maści w postaci cienkiej warstwy poddałem również ocenie wizualnej za pomocą powiększenia uzyskanego w obrazie mikroskopowym (**Rys.38**). Dodatkową próbkę przechowywałem bez przykrycia w temperaturze pokojowej w zwyczajnym świetle dziennym. Zarejestrowane obrazy zmiany wyglądu przedstawia **rysunek 39**. Delikatne ciemnienie świadczy o rozkładzie związku kompleksowego wchodzącego w skład maści, który jest spowodowany czynnikami zewnętrznymi działającymi na lek podczas niewłaściwego przechowywania.



Rys.37 – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana co tydzień w okresie od 0-28 dnia od momentu wykonania maści do użytku zewnętrznego, przechowywanej w odpowiednich warunkach



Rys.38 – Wygląd maści do użytku zewnętrznego w obrazie mikroskopowym po 30 dniach od momentu wykonania



Rys.39 – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana codziennie w okresie od 1-7 dnia od momentu wykonania maści do użytku zewnętrznego, przechowywanej w atmosferze powietrza, narażonej na działanie światła dziennego

4.2.2 Maść do użytku okulistycznego

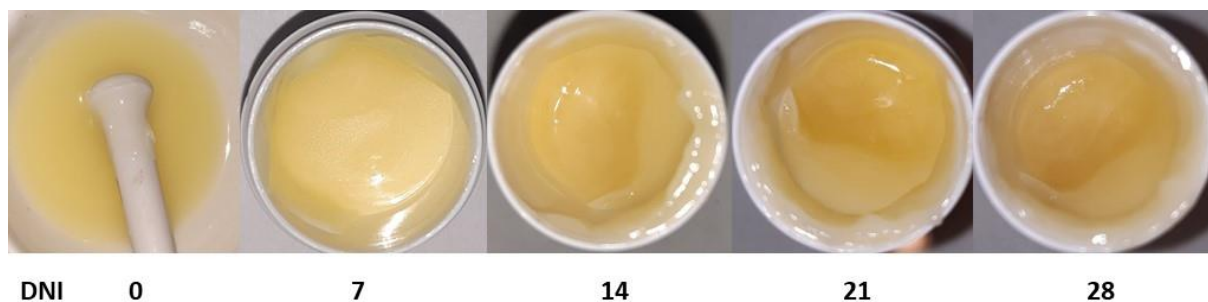
Maść barwy żółtej, którą otrzymałem w wyniku opracowanej formułacji oceniłem pod kątem widocznych gołym okiem zanieczyszczeń, których nie stwierdziłem. Masa wykonanego preparatu nie odbiegała od norm przyjętych w Farmakopei Polskiej XII ($\pm 8\%$ dla 10,0-20,0 g ogólnej masy leku) [36]. Produkt zapakowałem w sterylną tubostrzykawkę (**Rys.40**), która zapewnia podczas stosowania i wyciskania niewielkich ilości maści odpowiednie zabezpieczenie przed zanieczyszczeniem mikrobiologicznym [36].

Oznakowałem zgodnie z ogólnie przyjętymi w praktyce aptekarskiej zasadami: sygnatura koloru pomarańczowego, do użytku zewnętrznego, przechowywać w chłodnym miejscu, chronić od światła. Maść nie zmieniła wyglądu podczas przechowywania w temperaturze 2-8 °C przez okres 4 tygodni, podczas którego wykonywałem dokumentację zdjęciową (**Rys.41**). Po miesiącu przechowywania nie stwierdziłem rozwarstwień, co świadczy o stabilności układu wykonanej postaci leku. Próbkę maści w postaci cienkiej warstwy

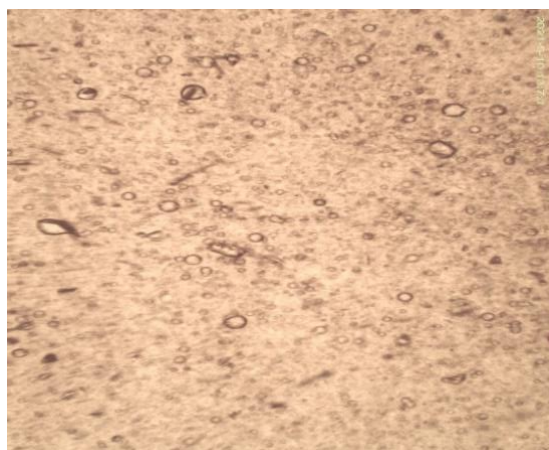
poddąłem również ocenie wizualnej za pomocą powiększenia uzyskanego w obrazie mikroskopowym (**Rys.42**). Dodatkową próbkę przechowywałem bez przykrycia w temperaturze pokojowej w zwyczajnym świetle dziennym. Zarejestrowane obrazy zmiany wyglądu przedstawia **rysunek 43**. Ciemnienie świadczy o rozkładzie związku kompleksowego wchodzącego w skład maści, który jest spowodowany czynnikami zewnętrznymi działającymi podczas niewłaściwego przechowywania.



Rys.40 – Tubostrzykawka będąca opakowaniem wykonanej postaci leku



Rys.41- Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana co tydzień w okresie od 0-28 dnia od momentu wykonania maści do użytku okulistycznego, przechowywanej w odpowiednich warunkach



Rys.42 – Wygląd maści do użytku okulistycznego w obrazie mikroskopowym po 30 dniach od momentu wykonania

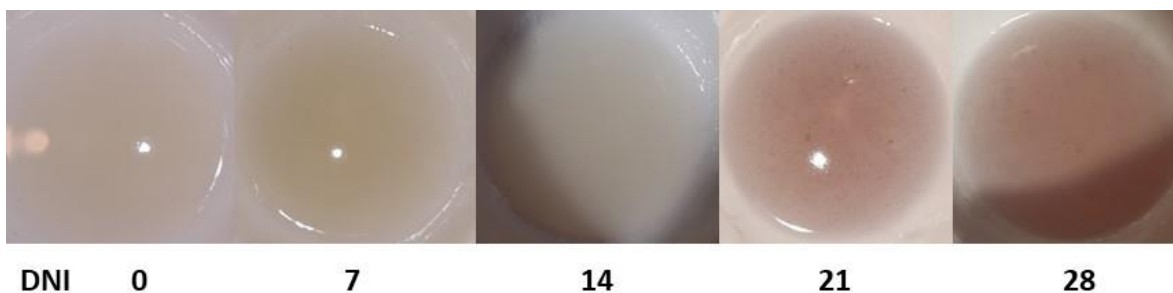


Rys.43 – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana codziennie w okresie od 1-7 dnia od momentu wykonania maści do użytku okulistycznego, przechowywanej w atmosferze powietrza, narażonej na działanie światła dziennego

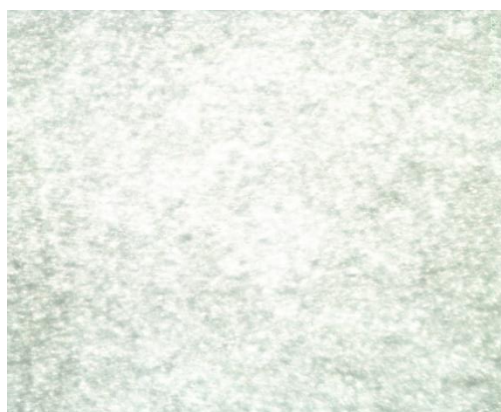
4.2.3 Żel do użytku zewnętrznego i na błony śluzowe

Żel na bazie wody, barwy lekko żółtawej, który otrzymałem w wyniku opracowanej formuacji oceniłem pod kątem widocznych gołym okiem zanieczyszczeń, których nie stwierdziłem. Masa wykonanego preparatu nie odbiegała od norm przyjętych w Farmakopei Polskiej XII ($\pm 8\%$ dla 10,0-20,0 g ogólnej masy leku) [36].

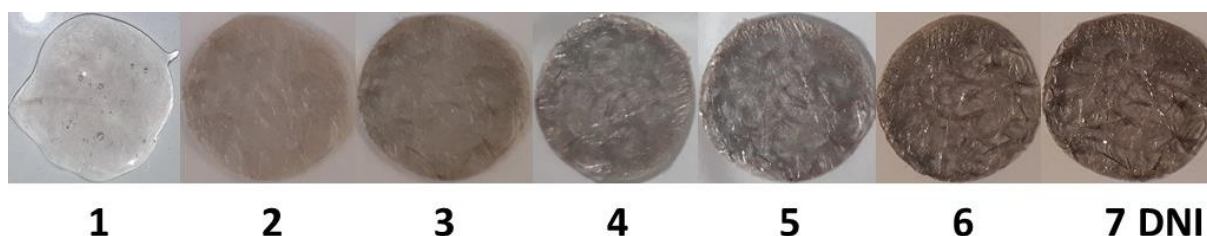
Produkt zapakowałem w pudełko PP. Oznakowałem zgodnie z ogólnie przyjętymi w praktyce aptekarskiej zasadami: sygnatura koloru pomarańczowego, do użytku zewnętrznego, przechowywać w chłodnym miejscu, chronić od światła. Żel lekko zmienił wygląd (barwa) podczas przechowywania w temperaturze 2-8 °C przez okres 4 tygodni, podczas którego wykonywałem dokumentację zdjęciową (**Rys.44**). Po miesiącu przechowywania nie stwierdziłem jednak rozwarstwień i krystalizacji związku kompleksowego, co świadczy o stabilności układu wykonanej postaci leku. Próbkę żelu w postaci cienkiej warstwy poddałem również ocenie wizualnej za pomocą powiększenia uzyskanego w obrazie mikroskopowym (**Rys.45**). Dodatkową próbkę przechowywałem bez przykrycia w temperaturze pokojowej w zwyczajnym świetle dziennym. Zarejestrowane obrazy zmiany wyglądu przedstawia **rysunek 46**. Silne ciemnienie świadczy o rozkładzie związku kompleksowego wchodzącego w skład żelu, który jest spowodowany czynnikami zewnętrznymi działającymi podczas niewłaściwego przechowywania, w tym parowaniem rozpuszczalnika, będącego *vehiculum*.



Rys.44 – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana co tydzień w okresie od 0-28 dnia od momentu wykonania żelu do użytku zewnętrznego i na błony śluzowe, przechowywanego w odpowiednich warunkach



Rys.45 – Wygląd żelu do użytku zewnętrznego i na błony śluzowe w obrazie mikroskopowym po 30 dniach od momentu wykonania



Rys.46 – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana codziennie w okresie od 1-7 dnia od momentu wykonania żelu do użytku zewnętrznego i na błony śluzowe, przechowywanego w atmosferze powietrza, narażonej na działanie światła dziennego

4.2.4 Krople do oczu

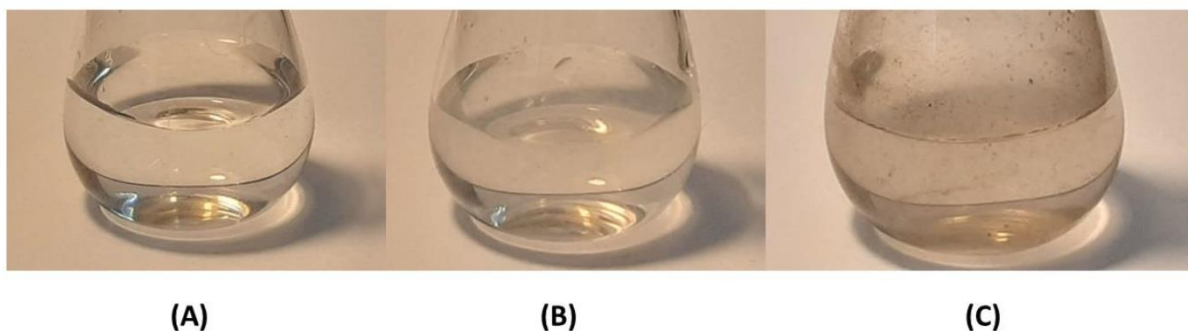
Krople otrzymane zgodnie z opracowaną formułą poddałem ocenie pod kątem widocznych gołym okiem zanieczyszczeń, których nie stwierdziłem. Masa wykonanego preparatu nie odbiegała od norm przyjętych w Farmakopei Polskiej XII ($\pm 8\%$ dla 10,0-20,0 g ogólnej masy leku) [36]. Produkt sączyłem bezpośrednio do jałowej butelki z PP, do której

dołączany jest zakraplacz jako system dozujący, a jednocześnie chroniący przed przedostaniem się zanieczyszczeń do jej wnętrza (**Rys.47**).

Oznakowałem zgodnie z ogólnie przyjętymi w praktyce aptekarskiej zasadami: sygnatura koloru pomarańczowego, do użytku zewnętrznego, przechowywać w chłodnym miejscu, chronić od światła. Krople nie zmieniły wyglądu podczas przechowywania w temperaturze 2-8 °C przez okres 1 miesiąca. Dodatkowe próbki kropli poddane zalkalizowaniu za pomocą wodorotlenku sodu do pH o wartości 7,1, przechowywałem również w temperaturze pokojowej przez 6 miesięcy w normalnym świetle dziennym szczelnie zamknięte oraz w lodówce w temperaturze od 2-8 °C. Zarejestrowane obrazy zmiany wyglądu przedstawia **rysunek 48**. Delikatne ciemnienie świadczy o rozkładzie związku kompleksowego wchodzącego w skład kropli, który jest spowodowany czynnikami zewnętrznymi działającymi podczas niewłaściwego przechowywania. Oceniałem również tę postać leku pod kątem zmiany pH, klarowności i przezroczystości w ciągu 2 miesięcy. Podczas przechowywania pH nie zmieniło się znacząco, jego wartość podczas przechowywania osiągnęło minimalną wartość 6,9 (**Rys. 49**).



Rys.47 – Jałowa butelka polipropylenowa z systemem dozującym krople

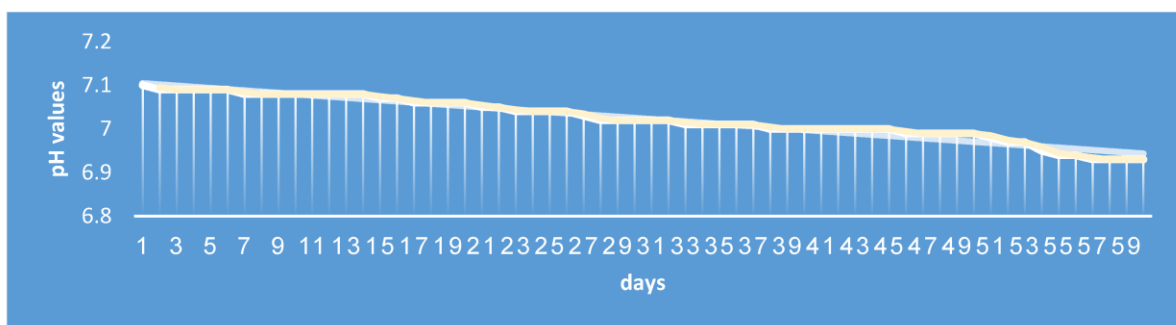


(A)

(B)

(C)

Rys.48 – Roztwór kropli do oczu w dniu wykonania (A) i 6 miesięcy po przygotowaniu - przechowywane w lodówce (B) i w temperaturze pokojowej (C)



Rys.49 – Zmiana wartości pH kropli w okresie przechowywania do 2 miesięcy

4.2.5 Wyniki badań zastosowania recepturowych leków zawierających kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) w okulistyce

Podczas badań pacjentki 1 wykonanych w trakcie wizyty kwalifikacyjnej ostrość wzroku prawego i lewego oka wynosiła 0,05. W badaniu oka prawego stwierdzono zapalenie powiek z zaschniętą ropą w obrębie rzęs, zapalenie spojówek z wydzieliną śluzowo-ropną w worku spojówkowym, perforację rogówki, brak komory przedniej oraz zaćmę jądrową. Badanie oka lewego wykazało zapalenie powiek z zaschniętą ropą w obrębie rzęs, przekrwienie spojówek, nieregularną, zmętniałą powierzchnię rogówki, zwiększoną ilość resztek w filmie przedrogówkowym, owrzodzenie neutroficzne w centrum przeszczepionego płatka. Po siedmiu dniach leczenia uzyskano poprawę stanu miejscowego przedniego odcinka obu oczu oraz istotną poprawę ostrości wzroku: 0,08 w prawym oku i 0,2 w lewym. Perforacja rogówki zagoiła się, a komora przednia została częściowo przywrócona. W związku z tym zrezygnowano z planowego przeszczepu rogówki i wypisano do domu z zaleceniem kontynuowania stosowania kropli do oczu i maści trzy razy dziennie. Podczas wizyty kontrolnej, 1 miesiąc po wypisie, odnotowano stabilizację parametrów odcinka przedniego obu oczu oraz dalszą poprawę ostrości wzroku (prawe oko: do 0,05, lewe oko 0,4). Ponieważ nie stwierdzono działań niepożądanych rozpuszczalnego w wodzie kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I), pacjentce zalecono stałe stosowanie kropli do oczu i maści. Podczas kolejnej wizyty kontrolnej, po 3 miesiącach, stwierdzono wzmożone zaczerwienienie powiek i nawrót zaschniętej ropy u podstawy rzęs. Parametry filmu przedrogówkowego były stabilne,

podobnie jak 3 miesiące wcześniej. Pacjentka przyznała się do zaniedbania higieny brzegów powiek przez ostatnie 2 tygodnie oraz do odstawienia kropli do oczu i maści (**Rys.50**).

U pacjenta 2 w badaniu kwalifikacyjnym oka prawego stwierdzono ropną wydzielinę z rzęs i worka spojówkowego, silny skurecz powiek, przekrwienie spojówek, atoniczne rozszerzenie źrenicy i brak percepcji koloru w osi czerwono-zielonej. Przeszczepiony płat rogówki był przezroczysty, bez cech odrzucenia, komora przednia głęboka, ciecz wodnista bez cech tyndalizacyjnych. Badanie ujawniło również stulejkę tylnej torebki i błyszczącą się torebkę. Badanie oka lewego wykazało mniej nasilony skurecz powiek, cechy zapalenia powiek, w tym ropną wydzielinę w obrębie rzęs, przekrwienie spojówek, przezroczystą, gładką rogówkę i zaćmę korowo-jądrzastą (**Rys.51**). Badanie dna oka było znacznie utrudnione. W oku prawym badanie ujawniło jaskrową neuropatię nerwu wzrokowego oraz dwukrotnie większe znamię naczyńiówkowe od tarczy nerwu wzrokowego, zlokalizowane w łuku skroniowym górnym na poziomie siatkówki. W oku lewym badanie wykazało znamienne mniejsze uszkodzenie nerwu wzrokowego wywołane jaskrą, małe znamię w okolicy górnego naczynia skroniowego oraz smugi naczynioruchowe.

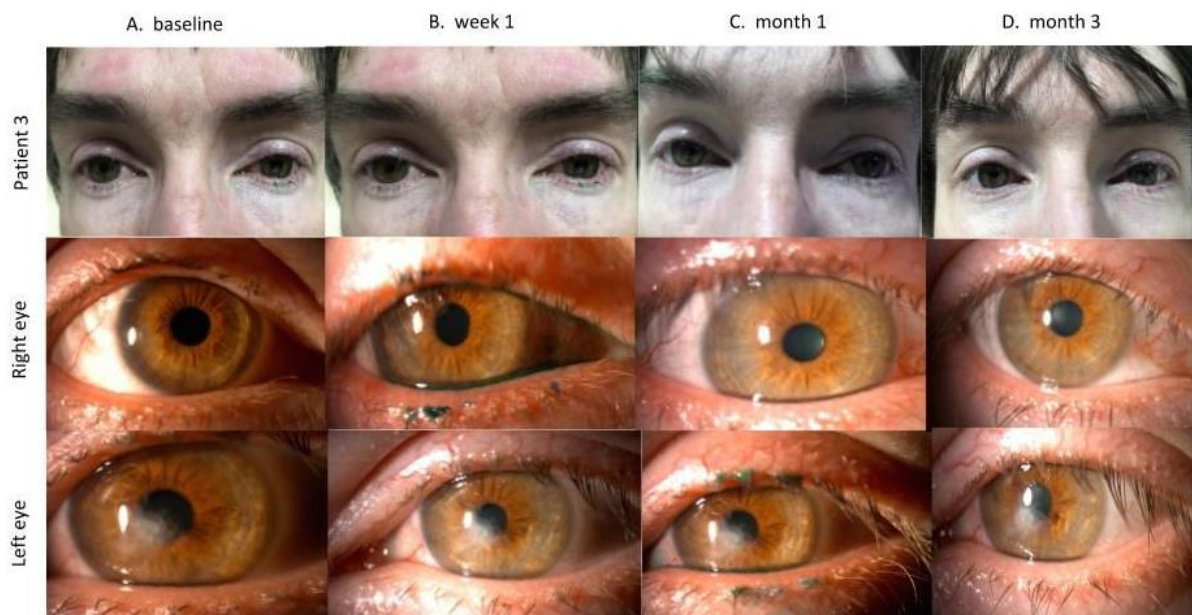


Rys.50 – Panel 12 cyfrowych zdjęć pacjentki w wieku 73 lat, u której zdiagnozowano trądzik różowaty. Zdjęcia przedstawiają fragment twarzy pacjentki oraz przednią powierzchnię prawego i lewego oka podczas wizyt lekarskich: wizyta kwalifikacyjna, po 1 tygodniu, po 1 miesiącu i po 3 miesiącach



Rys.51 – Panel 12 cyfrowych zdjęć pacjenta w wieku 81 lat, u którego zdiagnozowano trądzik różowaty. Zdjęcia przedstawiają fragment twarzy pacjenta oraz przednią powierzchnię prawego i lewego oka podczas wizyt lekarskich: wizyta kwalifikacyjna, po 1 tygodniu, po 1 miesiącu i po 3 miesiącach

Wyjściowe badanie okulistyczne u pacjenta 3 wykazało przekrwienie i obrzęk brzegów powiek, poszerzenie skórnych żyłaków powiek oraz obustronną dysfunkcję gruczołu Meiboma. Stwierdzono umiarkowane przekrwienie spojówek. W prawym oku rogówka była gładka i błyszcząca, soczewka była przezroczysta, a komora przednia miała regularną głębokość. W oku lewym stwierdzono bliznę po przeszczepie allogenicznego płatka rogówki z unaczynieniem w okolicy okołocentrycznej na pozycji godziny 6. Badanie dna oka nie wykazało żadnych nieprawidłowości (**Rys.52**).



Rys.52 – Panel 12 cyfrowych zdjęć pacjenta w wieku 40 lat, u którego zdiagnozowano trądzik różowaty. Zdjęcia przedstawiają fragment twarzy pacjenta oraz przednią powierzchnię prawego i lewego oka podczas wizyt lekarskich: wizyta kwalifikacyjna, po 1 tygodniu, po 1 miesiącu i po 3 miesiącach

W obiektywnych badaniach nie stwierdzono żadnych powikłań zastosowanej terapii. Jedynymi niepożądanymi zdarzeniami były subiektywne skargi pacjentów na uczucie pieczenia bezpośrednio po nałożeniu kropli lub maści, które ustępowało po około 5 minutach. Dodatkowo na skórze powiek po zastosowaniu kropli wytrącił się łatwo zmywalny biały osad, na skutek reakcji jonów chlorkowych obecnych w filmie łzowym z kationami srebra.

4.2.6 Wyniki badań zastosowania recepturowych leków zawierających kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) w dermatologii

Skuteczność działania maści do użytku zewnętrznego została potwierdzona w sposób spontaniczny poprzez dobrowolne przekazywanie przez pacjentów dokumentacji zdjęciowej przedstawiającej proces leczenia. Każdemu z chorych przepisano receptę lekarską na lek recepturowy zawierający w składzie azotan srebra(I) oraz metronidazol w postaci maści, w wykonaniu której posłużyłem się opracowaną przez siebie formułą. Wszyscy pacjenci wyrazili zgodę na opublikowanie wykonanych przez siebie fotografii, które zebrałem

w 4 panelach, odpowiadających każdemu z pacjentów. Leczenie polegało na stosowaniu wyłącznie przepisanego leku bez żadnych dodatkowych produktów leczniczych do użytku wewnętrznego oraz wyrobów medycznych i leków stosowanych zewnętrznie.

Pacjent 1 – uraz palca wskazującego polegający na ścięciu opuszka za pomocą tarczy „flex”. Stosowano 2 razy dziennie przygotowaną maść o składzie przedstawionym w opracowanej formulacji. Leczenie trwało 2 miesiące. Zmiany, jakie następowały podczas terapii przedstawiam na **rysunku 53**.



Rys.53 – Udokumentowany fotografiami proces leczenia zranienia ze ścięciem opuszka palca wskazującego. Dwie ostatnie fotografie stan obecny – rok po zakończeniu leczenia

Pacjent 2 – poparzenie kończyn dolnych (oba uda) od strony zewnętrznej zawartością pękniętego szklanego naczynia o pojemności około 1 litra i temperaturze cieczy ok. 90 °C. Maść stosowano pod opatrunkiem okluzyjnym zmienianym co 2 dni bez żadnych dodatkowych zabiegów. Terapia trwała 1,5 miesiąca. Postęp terapii przedstawiam na **rysunku 54**.



Rys.54 – Udokumentowany fotografiami proces leczenia zmian poparzeniowych.
Ostatnia fotografia stan obecny – miesiąc po zakończeniu leczenia

Pacjent 3 – początkowe zmiany o charakterze owrzodzenia podudzi. Przerwanie ciągłości skóry w dwu miejscach: okolice kostki (**Rys.55a**) oraz podudzie (**Rys.55b**) dało początek namnożeniu *S.aureus* oraz *P.aeruginosa*, które znacznie zainfekowały ranę. Maść była stosowana regularnie przez okres 2 miesięcy 2 razy dziennie i delikatnie zabezpieczana opatrunkiem. Nastąpiło cofnięcie procesu wysiękowego z rany, zasklepienie i powrót ciągłości powłok skórnych. Postęp terapii przedstawiam na **rysunkach 55a, b**.

(a)



(b)



Rys.55 – Udokumentowany fotografiami proces leczenia zmian w obrębie kostki (a) i podudzia (b)

Pacjent 4 – początkowe zmiany o charakterze owrzodzenia podudzi. Przerwanie ciągłości powłok skórnych, drobne otwierające się rany, a w efekcie powstanie z nich jednej rozległej, były następstwem prawdopodobnie cukrzycy – diagnozy jednoznacznej nie postawiono. Miejscowo zmiany skórne są leczone z użyciem maści 2 razy dziennie przez okres 1 miesiąca. Stan skóry uległ poprawie. Leczenie trwa nadal – **Rys.56**.



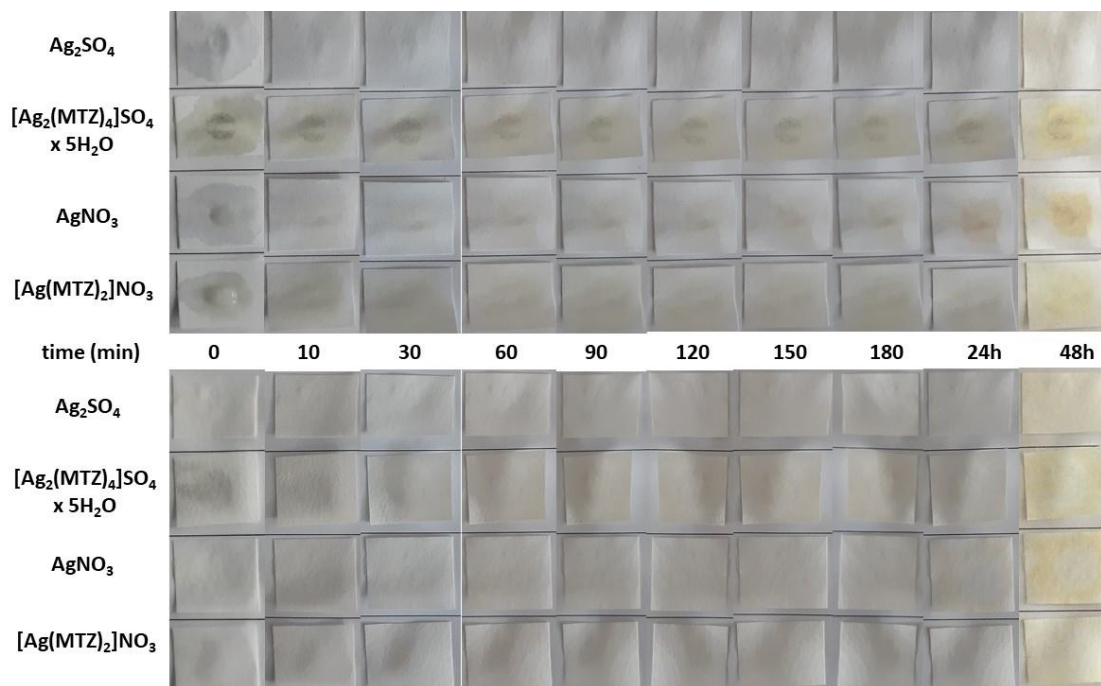
Rys.56 – Udokumentowany fotografiami proces leczenia zmian o charakterze owrzodzenia podudzi. Ostatnia fotografia stan obecny – leczenie trwa

4.3 Ocena trwałości

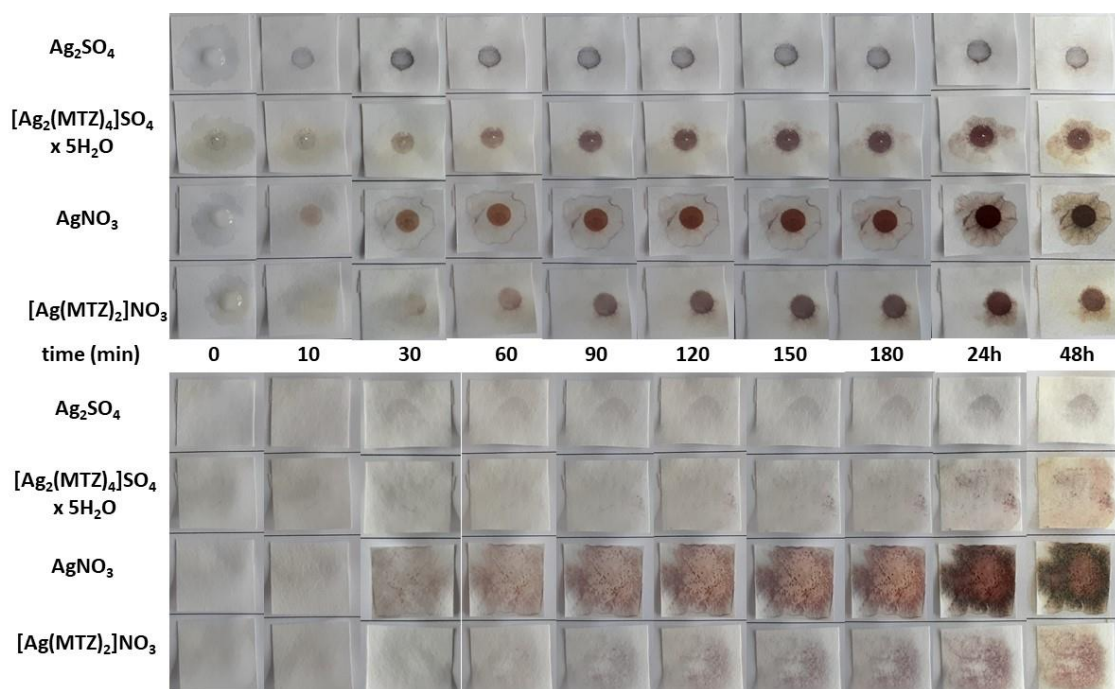
Czyste sole (Ag_2SO_4 i AgNO_3) zaczęły ciemnieć po 10 minutach ekspozycji na papierze i po 30 minutach na bibule. Po 24 godzinach na obu podłożach doszło do całkowitego ściemnienia. Proces rozkładu kompleksów przebiegał dużo wolniej, ciemniały po około 2 dniach, najszybciej rozkładając się na papierze. Kompleksy z siarczanem i azotanem zaczęły ciemnieć po 30 minutach na papierze i po 60 minutach na bibule. (**Rys.57** w ciemności, **Rys.58** w świetle). Działanie promieni UV-A w znacznym stopniu przyspiesza proces rozkładu kompleksów srebra (I); praktycznie całkowity rozpad następuje po 5 min. (**Rys.59**). Czyste sole ulegały jednak rozkładowi już po 2 minutach pod wpływem promieni UV-A.

Kompleksy metronidazolu z azotanem srebra(I) i siarczanem srebra(I) wykazują lepszą stabilność i odporność na promieniowanie UV-A, natomiast czyste sole są podatniejsze na działanie promieniowania UV-A. Dla porównania, działanie światła i promieniowania UV-A wpływa tylko na substancje nakładane na powierzchnie, w głąb których mogą przenikać,

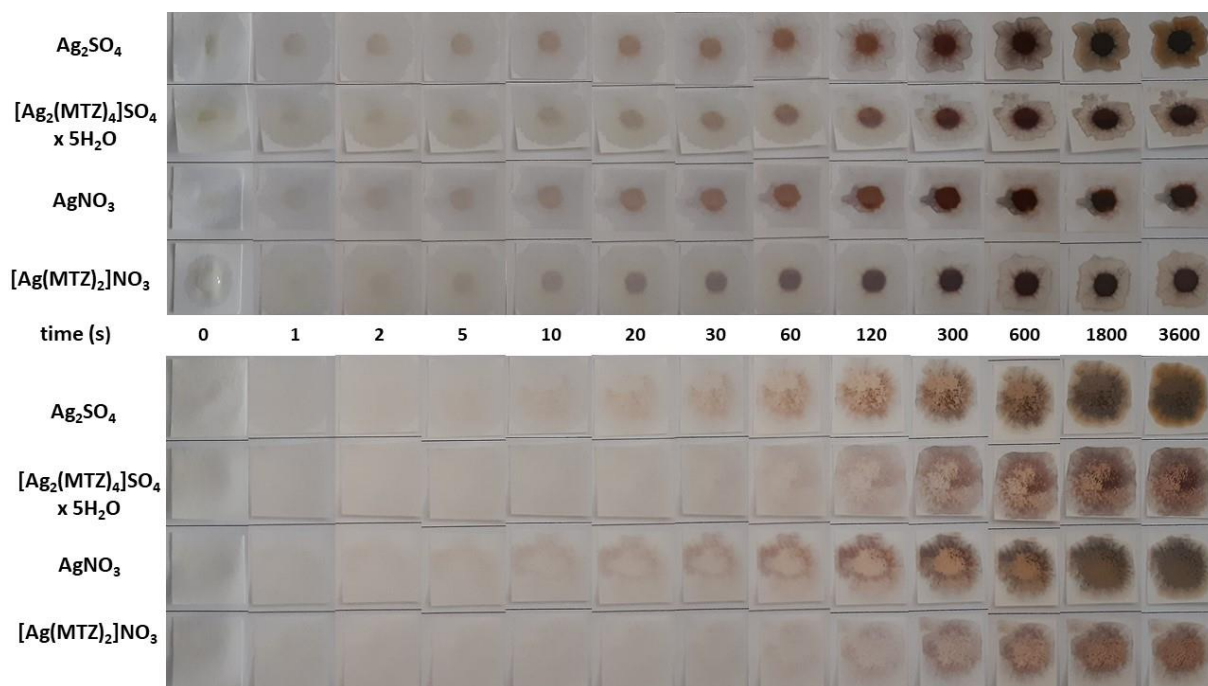
podczas gdy roztwory wodne są dość stabilne, a zmiany zachodzą dopiero po naturalnym odparowaniu rozpuszczalnika. Jest to szczególnie widoczne po ekspozycji wytworzonych przeze mnie postaci leków. W żelu – zawierającym największą ilość wody, kompleksy ulegały najszybszej degradacji, w maści ocznej natomiast silne ciemnienie było spowodowane szybkim odparowaniem rozpuszczalnika fazy wodnej.



Rys.57 – Papier (część górna) i bibuła (część dolna) z zaaplikowanymi roztworami pozostawione w ciemności i fotografowane po wskazanym czasie



Rys.58 – Papier (część górna) i bibuła (część dolna) z zaaplikowanymi roztworami pozostawione w świetle dziennym i fotografowane po wskazanym czasie



Rys.59 – Papier (część górna) i bibuła (część dolna) z zaaplikowanymi roztworami pozostawione w świetle UV-A i fotografowane po wskazanym czasie

4.4 Ocena aktywności mikrobiologicznej

Wyniki działania przeciwbakteryjnego przedstawiono w **tabeli 19**. Jako standardowe leki zastosowano metonidazol i sól srebrową sulfadiazyny. Badane związki kompleksowe wykazywały aktywność przeciwbakteryjną porównywalną z solą srebrową sulfadiazyny. Warto zauważyć, że kompleksy wykazywały zwiększoną aktywność biologiczną wobec bakterii tlenowych i fakultatywnie beztlenowych, Gram-dodatnich i Gram-ujemnych w porównaniu z metronidazolem. $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ i $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ wykazywały podobną aktywność biologiczną wobec większości badanych szczepów bakterii z minimalnym stężeniem hamującym (MIC) w zakresie 0,24-250 mg/L. Wartości MIC dla bakterii referencyjnych wskazywały na bardzo silną (MIC <10 mg/L) lub silną (MIC 10–25 mg/L) aktywność badanych związków przeciw gronkowcom (*S. aureus*, *S. epidermidis*), przeciw mikrokokom (*M. luteus*) i przeciw sporogennym pałeczkom (*B. subtilis*) [189]. Zsyntetyzowane związki kompleksowe metronidazolu wykazują również bardzo silną aktywność biologiczną w stosunku do wszystkich badanych bezwzględnie beztlenowych bakterii Gram-dodatnich (*A. israeli*, *C. perfringens*) i Gram-ujemnych (*B. fragilis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *V. parvula*). Silną bioaktywność zaobserwowano dla bakterii tlenowych Gram-ujemnych i fakultatywnie beztlenowych bakterii dla obu związków. Stwierdzono dobrą aktywność biologiczną (MIC 26-125 mg/L) badanych kompleksów wobec enterokoków, prątków sporogennych *B. cereus* i bezwzględnie beztlenowych *Propionibacterium acnes*. Najmniej wrażliwy był szczep *Campylobacter jejunii* z MIC 126-500 mg/L dla $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ wykazujący umiarkowane działanie przeciwbakteryjne. Niskie wartości stosunku MBC/MIC (1:4) dla kompleksów sugerowały ich działanie bakteriobójcze wobec wszystkich badanych szczepów referencyjnych.

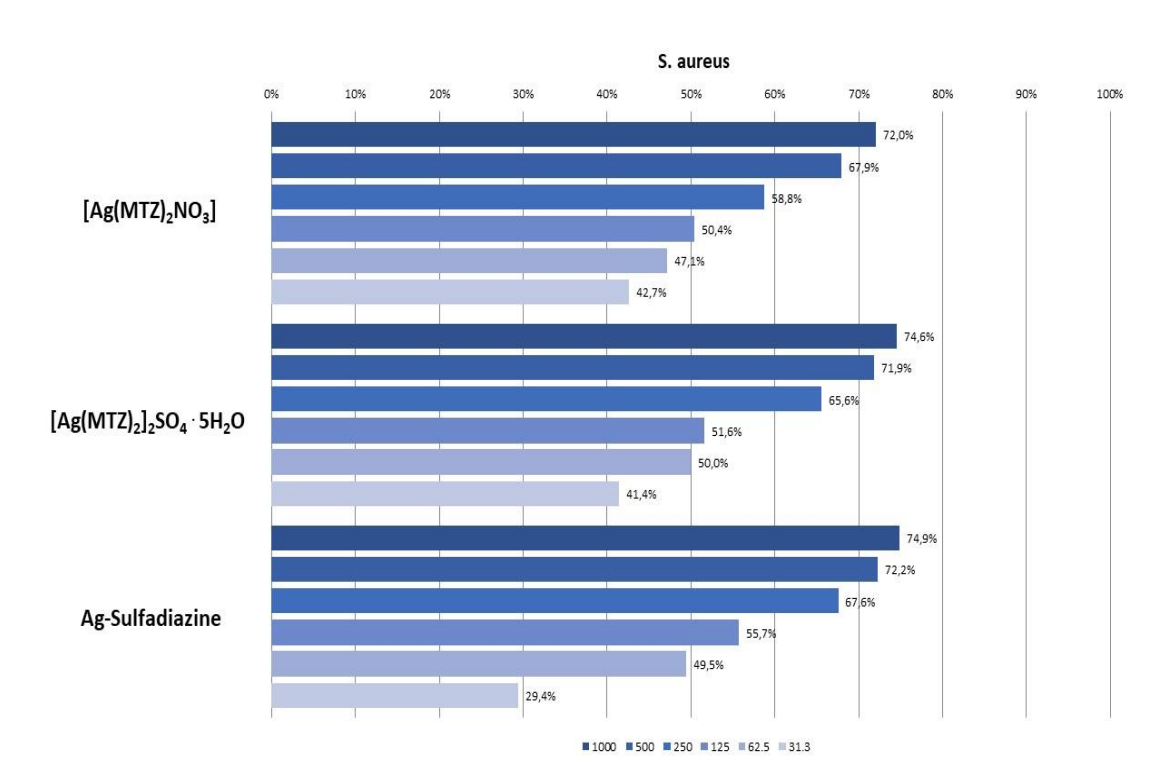
Badany związek		MTZ		[Ag(MTZ) ₂] ₂ SO ₄ · 5H ₂ O		Ag ₂ SO ₄		[Ag(MTZ) ₂ NO ₃]		AgNO ₃		Ag-SD	
in mg/L (μM/ml)		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Mikroorganizm													
Bakterie Gram-dodatnie	Tlenowe	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>1000 (>5.85)	>1000 (>5.85)	15.6 (0.014)	15.6 (0.014)	15.6 (0.05)	31.3 (0.1)	15.6 (0.049)	62.5 (0.2)	7.8 (0.049)	31.3 (0.185)	15.6 (0.022)
		<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	500 (2.93)	500 (2.93)	7.8 (0.007)	15.6 (0.014)	15.6 (0.05)	31.3 (0.1)	7.8 (0.025)	62.5 (0.2)	3.9 (0.025)	15.6 (0.09)	15.6 (0.044)
		<i>M. luteus</i> ATCC 10240	1000 (5.85)	>1000 (>5.85)	7.8 (0.007)	125 (0.12)	15.6 (0.05)	125 (0.4)	7.8 (0.025)	62.5 (0.2)	3.9 (0.025)	31.3 (0.185)	3.9 (0.011)
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	125 (0.73)	250 (1.46)	15.6 (0.014)	15.6 (0.014)	31.3 (0.1)	31.3 (0.1)	15.6 (0.049)	15.6 (0.049)	15.6 (0.09)	15.6 (0.09)	3.9 (0.011)
		<i>B. cereus</i> ATCC 10876	500 (2.93)	>1000 (>5.85)	62.5 (0.06)	125 (0.12)	31.3 (0.1)	500 (1.6)	62.5 (0.2)	125 (0.4)	31.3 (0.185)	62.5 (0.37)	15.6 (0.044)
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>1000 (>5.85)	>1000 (>5.85)	31.3 (0.03)	62.5 (0.06)	31.3 (0.1)	125 (0.4)	31.3 (0.1)	62.5 (0.2)	15.6 (0.09)	31.3 (0.185)	31.3 (0.088)
		<i>A. israeli</i> ATCC 10049	>1000 (>5.85)	>1000 (>5.85)	7.8 (0.007)	15.6 (0.014)	0.98 (0.003)	15.6 (0.05)	0.49 (0.0015)	3.9 (0.012)	0.49 (0.003)	0.49 (0.003)	62.5 (0.176)
	Anaerobowe	<i>P. acnes</i> ATCC 11827	>1000 (>5.85)	>1000 (>5.85)	125 (0.12)	500 (0.46)	125 (0.4)	500 (1.6)	125 (0.4)	125 (0.4)	62.5 (0.37)	62.5 (0.37)	125 (0.352)
		<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	1.95 (0.01)	1.95 (0.01)	1.95 (0.002)	3.9 (0.004)	250 (0.8)	250 (0.8)	1.95 (0.006)	1.95 (0.006)	62.5 (0.37)	62.5 (0.37)	31.3 (0.088)
		<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	500 (2.93)	>1000 (>5.85)	250 (0.23)	500 (0.46)	1000 (3.2)	>1000 (>3.2)	31.3 (0.1)	125 (0.4)	62.5 (0.37)	125 (0.74)	62.5 (0.176)
Bakterie Gram-ujemne	Mikroaerofilne/Tlenowe	<i>H. pylori</i> ATCC 43504	15.6 (0.09)	15.6 (0.09)	7.8 (0.008)	31.3 (0.03)	15.6 (0.05)	15.6 (0.05)	15.6 (0.049)	15.6 (0.049)	15.6 (0.09)	15.6 (0.09)	31.3 (0.088)
		<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	>1000 (>5.85)	>1000 (>5.85)	15.6 (0.014)	62.5 (0.06)	31.3 (0.1)	250 (0.8)	15.6 (0.049)	31.3 (0.1)	15.6 (0.09)	15.6 (0.09)	31.3 (0.044)
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1000 (>5.85)	>1000 (>5.85)	15.6 (0.014)	31.3 (0.03)	62.5 (0.2)	62.5 (0.2)	15.6 (0.049)	31.3 (0.1)	7.8 (0.049)	15.6 (0.09)	31.3 (0.044)
		<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	>1000 (>5.85)	>1000 (>5.85)	15.6 (0.014)	15.6 (0.014)	31.3 (0.1)	31.3 (0.1)	15.6 (0.049)	31.3 (0.1)	7.8 (0.049)	15.6 (0.09)	7.8 (0.022)
		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	1000 (5.85)	1000 (5.85)	15.6 (0.014)	31.3 (0.03)	31.3 (0.1)	31.3 (0.1)	15.6 (0.049)	31.3 (0.1)	7.8 (0.049)	7.8 (0.049)	15.6 (0.044)
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	>1000 (>5.85)	>1000 (>5.85)	7.8 (0.008)	15.6 (0.014)	62.5 (0.2)	125 (0.4)	7.8 (0.025)	15.6 (0.049)	3.9 (0.025)	3.9 (0.025)	7.8 (0.022)
		<i>B. fragilis</i> ATCC 10240	0.49 (0.003)	0.49 (0.003)	0.24 (0.0002)	0.98 (0.0009)	250 (0.8)	1000 (3.2)	0.98 (0.003)	0.98 (0.003)	15.6 (0.09)	62.5 (0.37)	15.6 (0.044)
	Anaerobowe	<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	1000 (5.85)	>1000 (>5.85)	0.98 (0.0009)	15.6 (0.014)	7.8 (0.025)	7.8 (0.025)	0.98 (0.003)	0.98 (0.003)	0.49 (0.003)	0.49 (0.003)	3.9 (0.011)
		<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	1.95 (0.01)	1.95 (0.01)	0.49 (0.0004)	0.49 (0.0004)	31.3 (0.1)	31.3 (0.1)	0.49 (0.0015)	0.98 (0.003)	0.49 (0.003)	0.98 (0.006)	3.9 (0.011)
		<i>V. parvula</i> ATCC 10790	1.95 (0.01)	1.95 (0.01)	3.9 (0.004)	3.9 (0.004)	62.5 (0.2)	62.5 (0.2)	1.95 (0.006)	1.95 (0.006)	7.8 (0.049)	15.6 (0.09)	3.9 (0.011)

Tabela 19. Wartości MIC i MBC dla przedstawionych kultur bakterii badanych związków kompleksowych

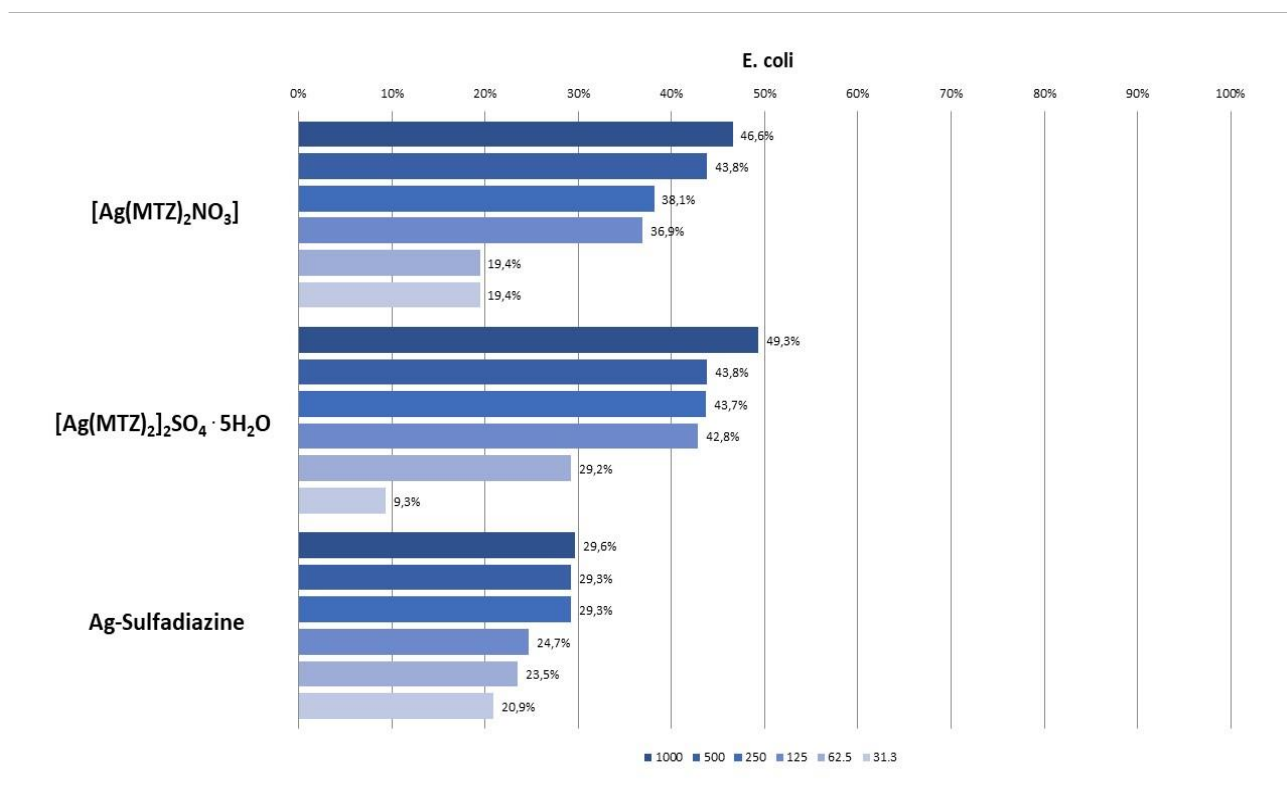
W jakościowym określeniu aktywności antybiofilmowej testowane związki wykazywały zdolność do hamowania tworzenia biofilmu tylko przy wyższych badanych stężeniach (równych lub powyżej 125 mg/L). Ponadto lepszą skuteczność zaobserwowano dla bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*) w porównaniu z Gram-ujemnymi (*E. coli*), co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w ilościowym teście fioletu krystalicznego (**Rys. 60**). W wynikach metody fioletu krystalicznego eradykacja biofilmu w 50% była obserwowana dla obu badanych kompleksów metronidazolu z jonami srebra(I) w stężeniu 125 mg/L wobec biofilmu *S. aureus*. Biofilm *E. coli* okazał się mniej wrażliwy, a 1000 mg/L usuwał biofilm tylko na poziomie zbliżonym do 50%. W metodzie CLSM oba badane kompleksy ([Ag (MTZ)₂]₂SO₄ · 5H₂O i [Ag(MTZ)₂NO₃]) w stężeniu 125 mg/L tylko nieznacznie zahamowały wzrost biofilmu *S. aureus* (**Rys.61a**). Struktura i gęstość biofilmu były porównywalne z kontrolą, jednak zaobserwowano zauważalnie więcej martwych komórek, co skutkuje bardziej żółtawym kolorem biofilmu. Oba związki zastosowane w stężeniu 500 mg/L znacznie zmniejszyły gęstość biofilmu. Co ważne, uzyskany efekt był zbliżony do efektu, jaki daje 500 μg/mL leku referencyjnego – soli srebrowej sulfadiazyny. Niemniej jednak, w przeciwieństwie do

testowanych kompleksów, sól srebrowa sulfadiazyny w stężeniu 125 mg/L miała zdolność znaczącego hamowania wzrostu biofilmu *S. aureus*.

Co ciekawe, kontrolny biofilm tworzony przez *E. coli* miał niezwykle gęstą matrycę egzopolimerową, która utrudniała penetrację sond DNA, uniemożliwiając barwienie struktury biofilmu. W związku z tym kontrast Nomarskiego zastosowano dodatkowo do wizualizacji kontrolnego biofilmu *E. coli* (**Rys.61b**). Ważnym jest, że im wyższe stężenie badanych związków, tym lepsze barwienie biofilmu, co wskazuje, że kompleksy mają zdolność zaburzania struktury biofilmu, umożliwiając penetrację sond DNA i barwienie fluorescencyjne. Niskie stężenia badanych związków (<125 mg/L) były nieskuteczne lub tylko nieznacznie naruszały strukturę biofilmu. Wyższe stężenia (125 mg/L i 500 mg/L) kompleksów miały lepszą skuteczność niż sól srebrowa sulfadiazyny, ponieważ biofilm zawierał więcej martwych komórek i wykazywał bardziej żółtawy kolor. Obserwacja ta potwierdziła wyniki uzyskane za pomocą testu fioletu krystalicznego, które wykazały wyższą aktywność przeciwbiofilmową nowych związków w porównaniu z lekiem referencyjnym.

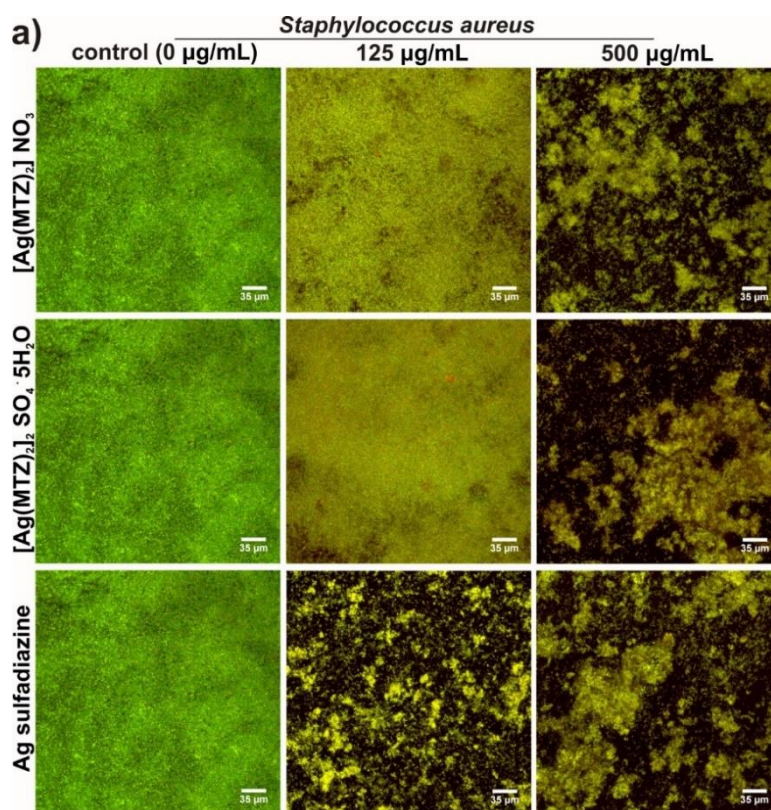


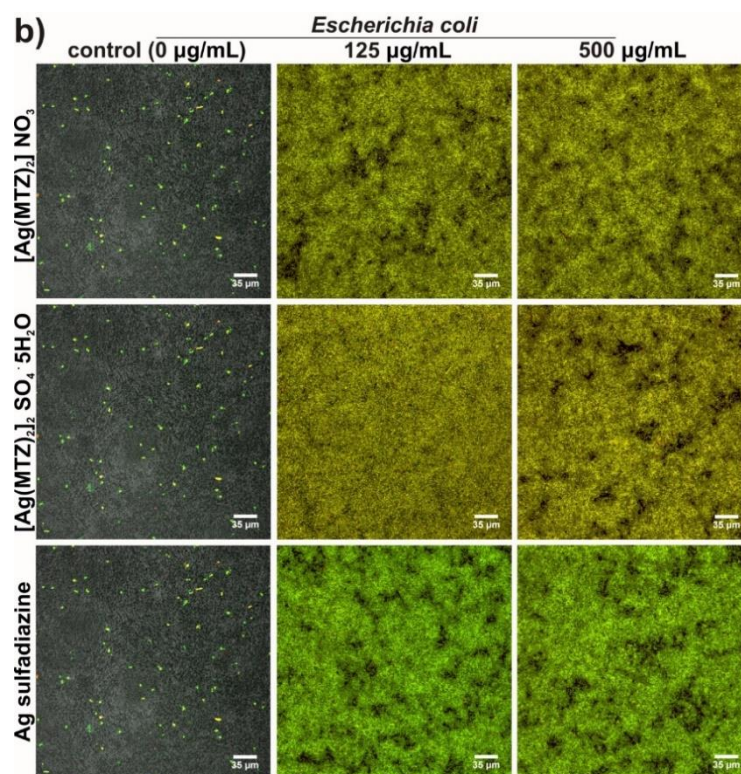
(A)



(B)

Rys.60 – Eliminacja biofilmu (%) przez różne stężenia testowanych kompleksów metronidazolu z jonami srebra(I) wobec szczepów referencyjnych *S. aureus* (A) i *E. coli* (B)

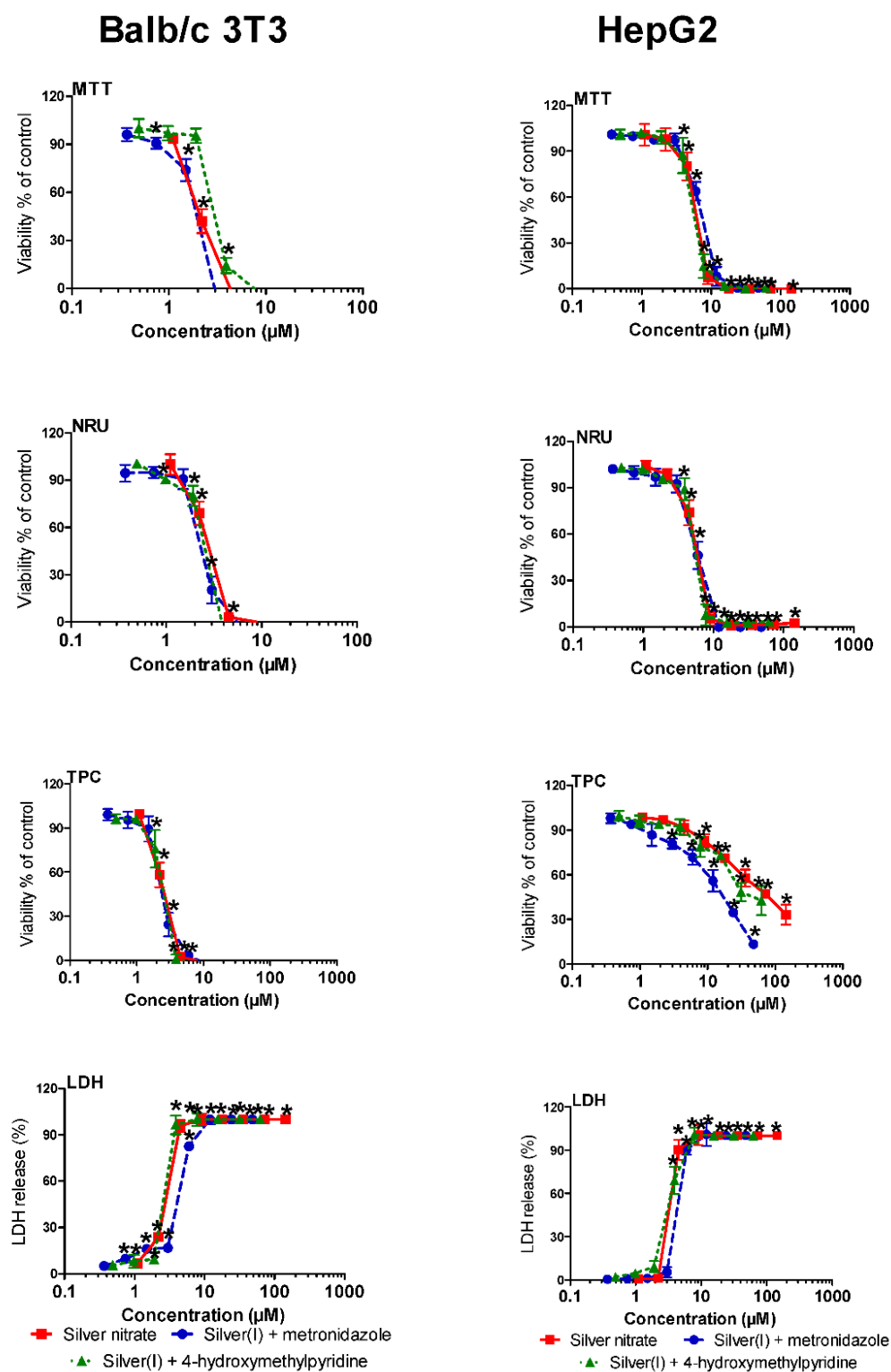




Rys.61 – Jakościowe określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych związków przy użyciu konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej: **(a)** biofilm *S. aureus* i **(b)** biofilm *E. coli* (jasnozielona fluorescencja – żywe bakterie z nienaruszonymi błonami komórkowymi, czerwona i żółta fluorescencja – martwe bakterie; kontrolny biofilm *E. coli* został zwizualizowany za pomocą kontrastu Nomarskiego jako egzopolimeryczna matryca, która utrudniała penetrację sond DNA

4.5 Analiza cytotoksyczności

Dane uzyskane z pomiaru gęstości optycznej w testach zostały przekształcone w wartości procentowe w odniesieniu do grupy kontrolnej, uznanej za 100% dla testów MTT, NRU i TPC oraz 0% dla testu LDH (**Rys.62**).



Rys.62 – Krzywe odpowiedzi zależnej od stężenia dla badanych związków ocenianych w testach MTT, NRU, TPC, LDH na komórkach Balb / c 3T3 i HepG2. Wyniki wyrażono jako średnią $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów. * $p \leq 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną (0,1% DMSO)

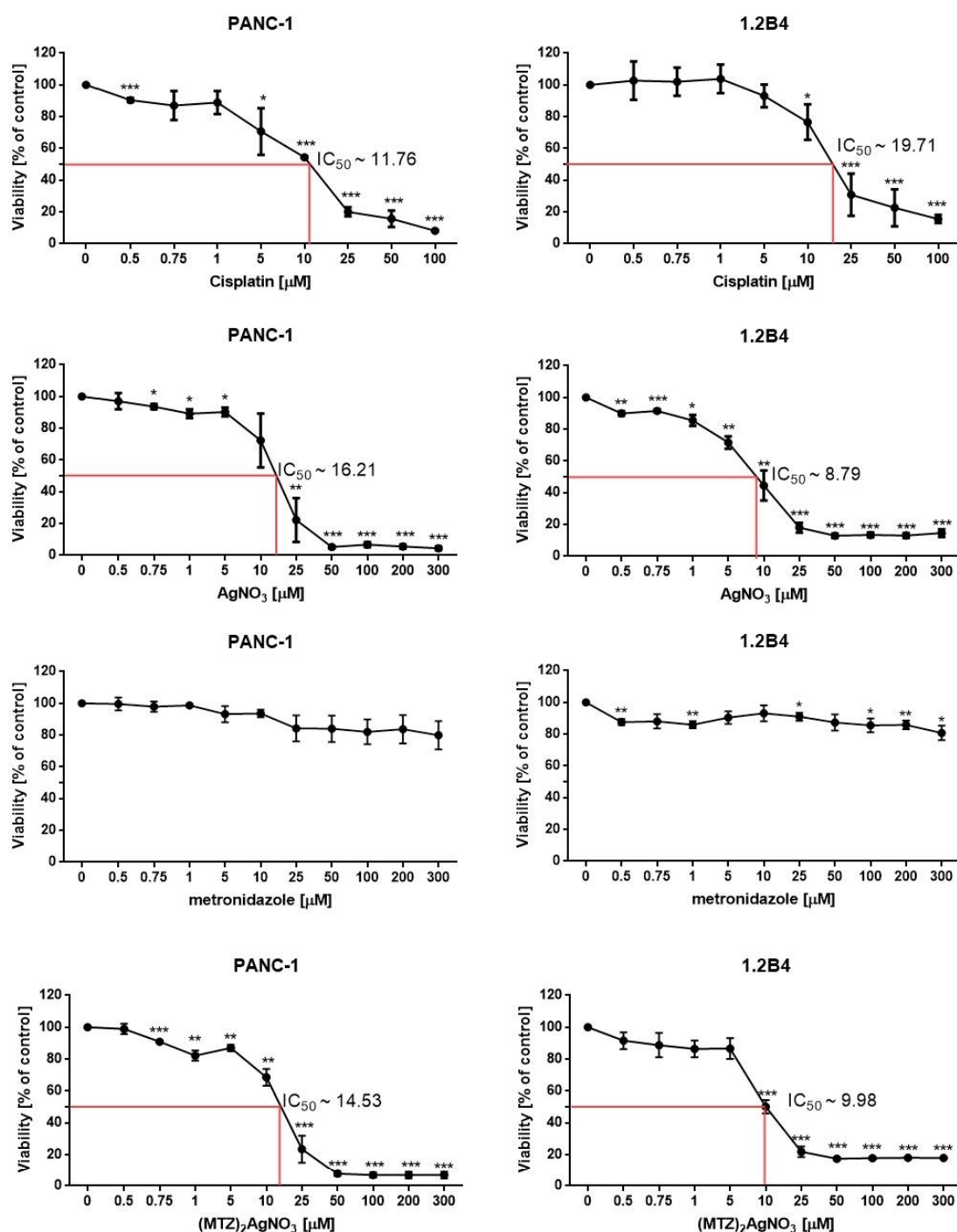
Hamujące wartości zdefiniowano jako stężenie związku zmniejszające o 50% absorbancję wartości kontrolnych. Stężenia cytotoksyczności (IC_{50}) są przedstawione w **tabeli 20**. Wartości zależały od stężenia związku, testu i użytej linii komórkowej.

	Balb / c 3T3				HepG2			
	MTT	NRU	TPC	LDH	MTT	NRU	TPC	LDH
Kompleks MTZ z $AgNO_3$	$2,19 \pm 0,29^a$	$2,17 \pm 0,57^a$	$2,13 \pm 0,51^a$	$4,59 \pm 0,08^a$	$7,61 \pm 1,07^a$	$5,92 \pm 1,13^{ac}$	$15,2 \pm 2,4^b$	$4,61 \pm 0,1^c$
$AgNO_3$	$2,13 \pm 0,88^a$	$2,94 \pm 1,06^{ab}$	$2,59 \pm 1,30^{ab}$	$3,12 \pm 0,06^b$	$6,48 \pm 1,60^a$	$6,18 \pm 1,41^a$	$60,3 \pm 8,1^b$	$3,47 \pm 0,24^c$
MTZ	> 146	> 146	> 146	> 146	> 146	> 146	> 146	> 146

Tabela 20. Stężenia hamujące (IC_{50} , μM) określone się na liniach Balb / c 3T3 i HepG2 przez wykonanie testów MTT NRU TPC i testach LDH po 72 h ekspozycji na badane związki; dane przedstawione jako średnia ($n = 3$) $\pm$ SEM (średnia błędu standardowego). Różne indeksy górne (a, b, c) w jednej linii wskazują na istotne różnice między zastosowanym testem ($p \leq 0,05$)

Komórki Balb/c 3T3 (nie metabolizujące leku) były bardziej wrażliwe niż komórki HepG2 (metabolizujące lek) na działanie kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I). Hamował on istotnie ($p \leq 0,05$) aktywność mitochondrialną i dezintegrację błony komórkowej komórek Balb / c 3T3 począwszy od stężenia $0,74 \mu M$ (**Rys.62**, Balb/c 3T3: MTT, LDH). Przy stężeniu $3,0 \mu M$ obserwowano zahamowaną aktywność lizosomalną i zmniejszoną całkowitą zawartość białka w hodowli komórkowej (**Rys.62**, Balb / c 3T3: NRU, TPC). W przypadku komórek HepG2 to samo stężenie ($3,0 \mu M$) zmniejszało również całkowitą zawartość białka w hodowlach komórkowych (**Rys.62**, HepG2: TPC). Przy wyższym stężeniu $6,0 \mu M$ odnotowano znaczące ($p \leq 0,05$) efekty w innych użytych punktach końcowych (**Rys.62**, HepG2: MTT, NRU, LDH).

Porównując potencjał cytotoksyczny kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) dla komórek PANC-1, stwierdziliśmy wraz z zespołem, że $[Ag(MTZ)_2NO_3]$ wykazywał nieco wyższą aktywność cytotoksyczną niż azotan srebra(I) ($IC_{50}=14,53$; $IC_{50}=13,14$ vs. $IC_{50}=16,21$). W przypadku linii 1.2B4 jon srebra(I), zarówno w postaci azotanu srebra(I) ($IC_{50}=8,79$), jak i $[Ag(MTZ)_2NO_3]$ ($IC_{50}=9,98$) wykazywał podobny potencjał cytotoksyczny. Wyniki mogą sugerować, że metronidazol nie zwiększał potencjału cytotoksycznego jonu srebra(I) w komórkach 1.2B4. Należy również zauważyć, że indywidualne wartości IC_{50} dla azotanu srebra(I) i jego kompleksu były niższe dla komórek 1.2B4 niż dla komórek PANC-1, co sugeruje, że komórki 1.2B4 były bardziej wrażliwe na jony srebra(I). Dane uzyskane dla kontroli pozytywnej ujawniły, że potencjał cytotoksyczny cisplatyny był wyższy w stosunku do komórek PANC-1 ($IC_{50}=11,76$) w porównaniu z komórkami 1.2B4 ($IC_{50}=19,71$) (**Rys.63**).



Rys.63 – Cytotoksyczna aktywność azotanu srebra(I) (AgNO_3), metronidazolu, i $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ wobec komórek PANC-1 i 1.2B4. Komórki traktowano badanymi związkami w zakresie stężeń 0–300 μM , a jako kontrolę pozytywną zastosowano cisplatynę (0–100 μM). Po 72 godzinach inkubacji cytotoksyczność określono za pomocą testu MTT. Dane wyrażono jako średnie $\pm$ SD z trzech do pięciu niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu z komórkami nietraktowanymi (kontrola negatywna)

Wyniki wskazują, że ludzkie komórki raka (HepG2 i Caco-2) były bardziej wrażliwe na nowy związek kompleksowy $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$ niż nienowotworowe fibroblasty Balb / c 3T3 (**Tab.21**). Uzyskane wartości stężeń cytotoksycznych (IC_{50}) wykazały, że badany kompleks $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$ (2,63-4,63 μM) jest dwukrotnie bardziej toksyczny dla komórek rakowych niż $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ (4,12-> 10 μM) (**Tab.21**). Wartości te były niższe w porównaniu z wartościami IC_{50} dla cisplatyny (<0,1-5,20 μM) na badanych komórkach. Warto zauważyć, że wartości IC_{50} dla $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$ były niższe w teście MTT, NRU i TPC w komórkach HepG2 oraz we wszystkich testach w komórkach Caco-2 w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla Ag_2SO_4 (3.13-> 10 μM). Jednak odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku nienowotworowych komórek Balb/c 3T3. Ag_2SO_4 był dwukrotnie bardziej toksyczny (1,92-2,57 μM) niż związek $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$ (4,06-4,53 μM). Wyniki zestawiono w **tabeli 21**. Litery (a, b, c) w liniach komórkowych wskazują na istotne różnice ($p \leq 0,05$) między kulturami komórkowymi dla odpowiedniego testu; <0,01 - wartość IC_{50} była poniżej 0,01 μM (najniższe badane stężenie); > 10 - Wartość IC_{50} wynosiła ponad 10 μM (najwyższe badane stężenie).

	HepG2				Caco-2				Balb/c 3T3			
	MTT	NRU	TPC	LDH	MTT	NRU	TPC	LDH	MTT	NRU	TPC	LDH
$[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$	2.88 ^a ±0.28	2.93 ^a ±0.29	3.13 ^a ±0.12	3.02 ^a ±0.07	2.73 ^a ±0.33	2.63 ^a ±0.40	3.05 ^a ±0.14	2.61 ^a ±0.57	4.17 ^b ±0.13	4.06 ^b ±0.14	4.29 ^b ±0.30	4.53 ^b ±0.20
$[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]\text{NO}_3$	8.03 ^a ±0.50	8.24 ^a ±0.29	>10	4.45 ^a ±0.29	7.32 ^a ±0.38	6.96 ^a ±0.43	8.62 ^a ±0.50	4.42 ^a ±0.42	2.42 ^b ±0.63	2.17 ^b ±0.22	2.04 ^b ±0.44	4.21 ^a ±0.49
Ag_2SO_4	>10	>10	>10	3.13 ^a ±0.23	9.01 ^a ±0.53	7.23 ^a ±0.20	8.23 ^a ±0.46	7.42 ^b ±0.03	1.92 ^b ±0.19	2.57 ^b ±0.26	2.39 ^b ±0.36	2.56 ^c ±0.17
AgNO_3	5.50 ^a ±0.33	5.06 ^a ±0.24	>10	3.06 ^a ±0.27	5.40 ^a ±0.55	3.85 ^a ±0.43	5.49 ^a ±0.50	3.20 ^a ±0.20	2.72 ^b ±0.23	2.82 ^b ±0.28	2.92 ^b ±0.04	3.60 ^a ±0.26
MTZ	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Cisplatin	3.6 ^a ±1.3	5.20 ^a ±0.4	2.00 ^a ±0.8	<0.1	9.12 ^b ±0.8	3.30 ^b ±0.2	5.30 ^b ±0.5	>10	>10	>10	>10	>10

Tabela 21. IC_{50} (μM) badanych związków określone za pomocą testów MTT, NRU, TPC i LDH po 72 h ekspozycji komórek HepG2, Caco-2 i Balb/c 3T3. Dane przedstawiono jako średnią ± SD, n = 3

5. Dyskusja i wnioski

Naukowcy wciąż poszukują nowych związków chemicznych o pożądanych właściwościach biologicznych, modyfikując strukturę znanych od dawna cząsteczek lub tworząc nowe addukty z substancji o dobrze udokumentowanym działaniu. W wielu dotychczasowych badaniach określono właściwości chemiczne i biologiczne związków koordynacyjnych pochodnych imidazolu oraz metali przejściowych, w tym srebra [87]. Większość badań dotyczy właściwości chemicznych i biologicznych znanego już kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) o wzorze $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$. Jednak $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$ nie został wcześniej zsyntetyzowany i zbadany być może ze względu na fakt, że Ag_2SO_4 jest solą słabo rozpuszczalną w wodzie i innych rozpuszczalnikach. Postanowiłem zsyntetyzować i określić właściwości chemiczne i fizyczne nowego kompleksu, w tym jego rozpuszczalność. $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$ jest lepiej rozpuszczalny w wodzie w porównaniu z Ag_2SO_4 , podnosi również rozpuszczalność MTZ na skutek formowania adduktu, co było wyraźnie widoczne podczas reakcji syntezy.

Ważną cechą potencjalnych związków biologicznie czynnych jest ich stabilność. Moja praca wykazała, że badane kompleksy $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ i $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$ wykazują względem siebie podobną fotostabilność zarówno w świetle dziennym, jak i UV-A, ale dużo wyższą niż czyste sole srebra(I). Każdy z nich jest rozpuszczalny w wodzie, co stanowi ich zaletę w kontekście opracowywania formulacji postaci leku jako roztwory lub maści typu emulsji. Badania zostały rozszerzone i wraz z zespołem Profesor Starek, którego byłem członkiem, oceniliśmy wpływ różnych warunków środowiska (temperatura, pH, obecność środka utleniającego) na poszczególne substancje tj. wolny ligand oraz oba związki kompleksowe. Udało się ponownie potwierdzić, że kompleksy wykazywały wyższą stabilność niż czyste sole [190].

Zmodyfikowana, szybka i wygodna droga syntezy związku koordynacyjnego azotanu srebra(I) z metronidazolem dała możliwości zastosowania jej w pracy farmaceuty-praktyka podczas wykonywania zadań zawodowych w warunkach funkcjonowania rzeczywistej apteki z możliwością wykorzystania do stworzenia czterech postaci leków zgodnie z przepisem lekarza na receptach. Jest to interesujące ze względu na medyczne znaczenie eksperymentu, który okazuje się obiecującym, ponieważ dostarcza dowodów na praktyczne zastosowanie. Również opracowany przeze mnie po raz pierwszy jednoetapowy proces syntezy $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$ jest szybki, łatwy i zapewnia wysoką jakość produktu. Prace dotyczące

nowego związku koordynacyjnego wymagają kontynuacji zarówno na polu nauk chemicznych, farmaceutycznych, jak i biologicznych. Uzyskanie kompleksu, badania rentgenostrukturalne i określenie podstawowych cech fizykochemicznych pozwoliły na ich rozpoczęcie i w pierwszej kolejności ocenę właściwości biologicznych, a mianowicie cytotoksyczności wobec ludzkich linii komórek nowotworowych i prawidłowych fibroblastów myszy oraz aktywności mikrobiologicznej. Celem badań było również porównanie właściwości chemicznych, cytotoksycznych i mikrobiologicznych obu kompleksów metronidazolu: z azotanem srebra(I) i z siarczanem srebra(I) oraz metronidazolem i czystymi solami srebra(I).

Analizy cytotoksyczności są podstawowym etapem badań przedklinicznych substancji, które w przyszłości mogą stać się substancjami biologicznie czynnymi [180,191,192] i dostarczają podstawowych informacji o mechanizmie działania badanego związku jako potencjalnego leku. [181,184,193,194]. Do wstępnej oceny potencjału przeciwnowotworowego badanych kompleksów wraz z zespołem wykorzystałem normalne komórki myszy (Balb/c 3T3) oraz ludzkie linie komórek nowotworowych (HepG2, Caco-2). Linia komórkowa HepG2 jest szeroko stosowana jako parametr do przewidywania toksyczności [195]. W badaniu wprowadziliśmy również linię komórkową Caco-2, której komórki dzielą się spontanicznie w hodowli, tworząc monowarstwy dojrzałych enterocytów jelitowych [196]. Używane są one jako model bariery jelitowej w badaniach toksykologicznych *in vitro*. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że połączenie metronidazolu z Ag_2SO_4 wykazuje wyższą cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych niż połączenie metronidazolu z AgNO_3 . I odwrotnie, $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ indukował śmierć normalnych komórek skuteczniej niż $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$. Obserwacje te mogą sugerować, że na różnice w potencjale cytotoksycznym badanych kompleksów mogą wpływać różne przeciwjony. Z drugiej strony odnotowaliśmy wyższą cytotoksyczność AgNO_3 niż Ag_2SO_4 w przypadku komórek nowotworowych i porównywalną w przypadku fibroblastów. Obserwacje, że azotan srebra wywiera działanie cytotoksyczne na różne komórki nowotworowe, są zgodne z wynikami innych autorów. Wykazano w nich, że wartość IC_{50} po 72 h ekspozycji na azotan srebra wynosiła 5 μM dla komórek raka piersi, 6,6 μM dla komórek raka wątroby, 13,5 μM dla komórek raka płuc, 35 μM dla komórek raka jajników, 50 μM dla linii komórkowych raka szyjki macicy [69,197-199]. Według najlepszej wiedzy całego zespołu i mojej własnej nie ma badania porównującego cytotoksyczność kompleksów srebra(I) zawierających MTZ jako ligand i różne przeciwjony. Można odnieść się jednak do badań wykonanych przez Stryjską i współautorów, w których porównano potencjał cytotoksyczny dla komórek HepG2 i fibroblastów z użyciem kompleksów srebra(I) zawierających mikonazol (MCZ) jako ligand oraz AgNO_3 i AgClO_4 . Wyniki testów

MTT, NRU, LDH i TPC wykazały, że cytotoksyczność dla obu kompleksów nie różniła się istotnie, co sugeruje, że różne przeciwciała nie miały wpływu na cytotoksyczność w tym badaniu. Z kolei skuteczność indukowania śmierci komórek HepG2 i fibroblastów była różna dla kompleksów z tą samą solą srebra(I) (AgNO_3), ale różnymi ligandami. $[\text{Ag}(\text{MCZ})_2\text{NO}_3]$ wykazał lepszą skuteczność eliminacji komórek rakowych HepG2 i niższą toksyczność wobec fibroblastów Balb/c 3T3 w porównaniu do kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$. Ponadto kompleksy MCZ z AgNO_3 i MTZ z AgNO_3 były bardziej cytotoksyczne dla komórek nowotworowych HepG2 w porównaniu z wolnymi ligandami [53].

Jedno z naszych poprzednich badań dowiodło, że komórki HepG2 wykazywały podobną wrażliwość na $[\text{Ag}(4\text{-OHMePy})_2]\text{NO}_3$ i $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$, podczas gdy fibroblasty myszy były ogólnie bardziej wrażliwe na $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$. Co ciekawe, dla ludzkich komórek raka trzustki, PANC-1 i 1.2B4, udowodniłem wraz z zespołem Profesor Śliwińskiej, że $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ i $[\text{Ag}(4\text{-OHMePy})_2]\text{NO}_3$ mają podobny potencjał cytotoksyczny. Z drugiej strony wyniki te mogą sugerować, że włączenie tej samej soli srebra(I) do różnych ligandów nie różnicowało aktywności cytotoksycznej [70].

Zakażenia wywołane przez bakterie beztlenowe mogą być poważne i często zagrażać życiu. Beztlenowce kolonizują skórę i są głównym składnikiem mikrobiomu błon śluzowych, mają więc charakter endogenny [200]. Leczenie infekcji beztlenowych jest skomplikowane ze względu na ich wielodrobnoustrojowy charakter. Na ogół izoluje się je zmieszane z tlenowcami, wtedy wybrany środek przeciwdrobnoustrojowy powinien obejmować spektrum działania wobec obu grup patogenów. Najskuteczniejszymi środkami przeciw anaerobom są: metronidazol, karbapenemy, chloramfenikol, połączenia penicyliny i beta-laktamazy, tygecyklina, cefoksytyna i klindamycyna [200]. Jednak powszechne stosowanie, nadużywanie i niewłaściwe stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych w ciągu ostatnich 80 lat było związane z ekspansją oporności na wymienione leki [201]. Natychmiast potrzebne są strategie przeciwdrobnoustrojowe zdolne do przezwyciężenia rozwoju oporności oraz innowacyjne nowe podejścia. Szeroki zakres działania kompleksów metronidazolu udało się wykazać łącząc go z solami srebra. Kompleksy testowane w moich badaniach wraz z zespołem Profesor Korony-Główniak potencjalnie oferują dodatkowe możliwości leczenia zakażeń wywołanych mieszanymi patogenami Gram-dodatnimi, Gram-ujemnymi, tlenowymi i beztlenowymi lub opornymi na konwencjonalną antybiotykoterapię.

Wyższe aktywności cytotoksyczne i przeciwdrobnoustrojowe badanych kompleksów srebra(I) w porównaniu z czystą solą srebra(I) lub wolnym ligandem mogą być związane z ich właściwościami chemicznymi. Liczne badania wykazały, że kompleksy srebra(I) oraz złota(I)

charakteryzują się wyższą biodostępnością i przedłużonym uwalnianiem jonów odpowiednio srebra Ag^+ lub złota Au^+ [202-208]. Powstawanie nowych wiązań chemicznych między Ag–N-heterocykli spowalnia uwalnianie metalu w zależności od procesów degradacji i/lub redoks kompleksu. W efekcie znacznie wzrasta stabilność i okres półtrwania kompleksów srebra(I) z ligandami N-heterocyklicznymi [209]. W konsekwencji następuje stopniowe i dłuższe uwalnianie aktywnych jonów Ag(I) z kompleksów, wzmacniając oddziaływanie z komórkami eukariotycznymi, bakteryjnymi i mitochondriami, enzymami i kwasami nukleinowymi DNA lub RNA [87]. Takie działania wykazują poprawę skuteczności kompleksów Ag(I) zwiększając cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych i prawidłowych oraz aktywność przeciwbakteryjną. Ponadto stwierdzono, że kompleksy Ag(I) zyskują nowe właściwości biologiczne, a mianowicie działanie przeciwwgrzybicze, gdyż ani sole srebra(I), ani niektóre ligandy nie mają tej właściwości [89,210].

W jednej z prac Zespołu Profesora Ochockiego badaliśmy właściwości przeciwbakteryjne i przeciwwgrzybicze kompleksów metronidazolu z solami srebra(I) zawierającymi różne przeciwjony. Stwierdziliśmy, że kompleksy srebra(I) z metronidazolem wykazywały oprócz działania przeciwbakteryjnego działanie przeciwwgrzybicze. Co więcej, rodzaj przeciwjonu miał istotny wpływ na skuteczność działania przeciwdrobnoustrojowego [89]. Ponadto same pochodne azolowe są bardzo interesującymi związkami ze względu na ich właściwości cytotoksyczne *in vitro* [180,211-213]. Ich właściwości można regulować poprzez łączenie z różnymi ligandami [53,70,91,192], co daje szeroki horyzont do dalszych poszukiwań i badań z tym związanych.

Lek recepturowy sporządzany w aptece na podstawie recepty lekarskiej z określonym składem, stanowił jeszcze niedawno podstawowy arsenał terapeutyczny w dermatologii. Przemysł farmaceutyczny oferujący obecnie szeroką gamę preparatów gotowych nie jest jednak w stanie zaspokoić wszystkich potrzeb pacjentów włączając czynniki współlistniejące podczas choroby takie jak: atopie, dermatozy, reakcje alergiczne aż po zwyczajnie złą odpowiedź na leczenie lekiem wytwarzanym seryjnie przez zakłady produkcyjne. Receptura i opracowanie właściwych formułacji postaci leku wciąż zatem daje unikalną szansę indywidualizacji leczenia, które jest dedykowane konkretnemu pacjentowi ze schorzeniem niepoddającym się żadnemu z przepisanych wcześniej leków i trudno wyobrazić sobie dermatologa czy okulisty, który nie korzysta z dobrodziejstw receptury aptecznej. Nie można zapominać, że pewne połączenia substancji czynnych, odpowiednie dopasowanie podłoża oraz niezwykle niska cena, wynosząca w chwili redagowania tej pracy, po refundacji tylko 14 zł

[214], są wciąż wyznacznikami receptury jako unikalnego oręża w ręku doświadczonego lekarza specjalisty.

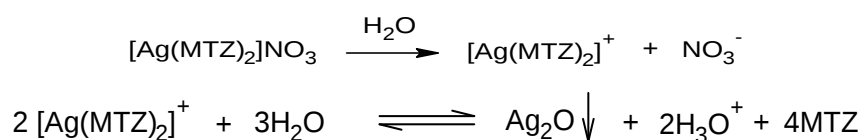
Trądzik różowaty jest powszechną przewlekłą dermatozą twarzy o różnych postaciach w czterech podtypach, które różnią się znacznie w odpowiedziach na strategie terapeutyczne. Aż 60% pacjentów ze skórny trądzikiem różowatym cierpi na trądzik różowaty oczny. Często nie ma korelacji między stopniem trądziku różowatego ocznego i skórniego, a trądzik różowaty oczny (podtyp 4) może występować samodzielnie [215]. Łagodne formy trądziku różowatego łatwo reagują na miejscowe leki i higienę powiek, podczas gdy cięższe formy reagują znacząco dopiero na doustne antybiotyki. Do miejscowego leczenia trądziku różowatego zatwierdzono brymonidynę, metronidazol, kwas azelainowy, iwermektynę, nadtlenek benzoilu, klindamycynę i erytromycynę. Obecnie coraz częściej jako leczenie pierwszego wyboru stosuje się ogólnoustrojową niską dawkę doksycykliny (40 mg/dobę). W przypadku oporności na tę terapię, przeciwwskazań lub skutków ubocznych, dostępne są różne alternatywne, nierejestrowane terapie. Miejscowe preparaty metronidazolu stosowane są od 1980 roku w postaci maści w leczeniu infekcji powiek w przebiegu trądziku różowatego. Zalecane stężenie preparatu waha się w granicach 0,75-1% i stosuje się przez 3 miesiące raz dziennie [215,216]. Wysoka skuteczność i niska toksyczność stabilnego 1% żelu wodnego z metronidazolem w leczeniu trądziku różowatego została już wcześniej udowodniona. Liczba działań niepożądanych była mniejsza niż powszechnie stosowanego 15% kwasu azelainowego. Działania niepożądane terapii metronidazolem obejmują swędzenie, podrażnienie i suchość skóry. Ponadto uważa się, że miejscowy metronidazol może być tak samo skuteczny jak doustna tetracyklina [216] lub 5% nadtlenek benzoilu w połączeniu z 3% żelem z erytromycyny [217]. Z punktu widzenia farmakokinetyki, farmakodynamiki oraz metabolizmu leków, szczególnie u pacjentów starszych z wielochorobowością i wielolekowością, szalenie ważne jest ograniczenie przyjmowania kolejnych doustnych postaci leków. Daje to możliwość uniknięcia wielu interakcji lekowych oraz tzw. kaskad przepisywania [218-221].

Według wiedzy zespołu Profesora Jurowskiego, wraz z którym prowadziłem badania, nie ma w piśmiennictwie doniesień dotyczących leczenia powikłań okulistycznych trądziku różowatego kroplami z metronidazolem. Dotychczas opisano stosowanie kropli do oczu z metronidazolem u ludzi w leczeniu pełzakowego zapalenia rogówki [222]. Innowacją przeprowadzonych i przedstawionych przeze mnie wraz z zespołem badań jest również to, że jako pierwsi na świecie zbadaliśmy kliniczne zastosowanie kropli metronidazolu w połączeniu z jonami srebra(I) dzięki wykorzystaniu metody „one-step” podczas formulacji tej postaci leku. Prace innych autorów wykazały, że krople z metronidazolem, ze względu na jego powolne

przenikanie przez błony lipofilowe i hydrofilowe oraz brak zdolności do penetracji rogówki zwierzęcej, wydają się być szczególnie przydatne w leczeniu zewnętrznych infekcji przedniej powierzchni oka [223]. Badania eksperymentalne nie wykazały żadnej toksyczności metronidazolu ani opóźnionego gojenia ran rogówki przy stężeniu leku 2,0 mg/ml lub mniejszym [224]. Wykazano również, że miejscowe podawanie metronidazolu zmniejsza neowaskularyzację rogówki [225].

Związki srebra w okulistyce są stosowane od 1881 roku w celu zapobiegania gonokokowemu zapaleniu spojówek jako metoda Credé'go [78,226]. W opracowanej przeze mnie formulacji kropli do oczu zastosowaliśmy czterokrotnie niższe stężenie roztworu azotanu srebra(I) niż w procedurze Credé'go, co znacząco mogło przyczynić się do zmniejszenia występujących powikłań w postaci zapalenia spojówek wywołanego czynnikami chemicznymi [78]. W ciągu 3 miesięcy trwającego badania nie wykryliśmy przypadków zaostrzenia objawów choroby ani niepożądanych skutków terapii. Umiarkowane objawy dyskomfortu zgłaszane przez pacjentów po zastosowaniu leku ustępowały po kilku minutach. Białe osady na powiekach był dla nas przewidywalny, ponieważ pochodził z reakcji chemicznej wytrącania chlorku srebra(I) po kontakcie z filmem łzowym. U wszystkich pacjentów zaobserwowaliśmy poprawę ostrości wzroku i znaczne zmniejszenie subiektywnych objawów zapalenia. Obiektywna ocena filmu łzowego również ulegała poprawie w każdym kolejnym badaniu kontrolnym. Po 3 miesiącach terapii objawy zapalenia powierzchni oka nadal były obserwowane, jednak były one istotnie niższe od początkowych. Pozytywnym efektem jest również odroczenie przeszczepu rogówki, zmniejszenie kurczu powiek oraz eliminacja ogólnej antybiotykoterapii.

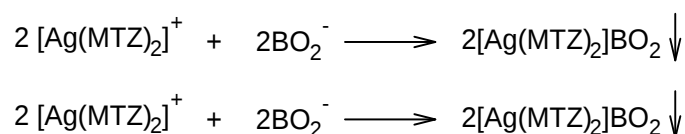
Azotan srebra(I) jest solą mocnego kwasu i ulega hydrolizie w roztworach wodnych. Produktami hydrolizy są protony obniżające pH roztworu. Podobnie kompleks metronidazolu ze srebrem (I) w postaci soli azotanowej ulega hydrolizie w czasie (**Schemat 4**).



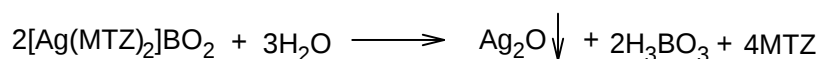
Schemat 4. Dysocjacja kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) oraz hydroliza kationu kompleksowego

Ważną cechą kropli do oczu jest ich zgodność z pH płynu łzowego, zbyt niskie pH powoduje dyskomfort dla pacjenta poprzez wywoływanie uczucia pieczenia lub klucia. Pożądane pH w kroplach do oczu osiąga się poprzez dodanie roztworu buforowego, które ponadto zapewniają odpowiednie właściwości izotoniczne, jak przedstawiłem wcześniej w części

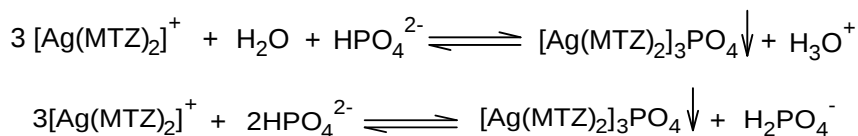
teoretycznej. Farmakopea Polska XII zaleca stosowanie izotonicznych buforów fosforanowych do uzyskania pH w zakresie 6,0-8,0 oraz buforów boranowych do uzyskania pH 5,0-10,6, ale nie jest to możliwe w przypadku soli i kompleksów srebra. Dochodzi wówczas do reakcji polegających na wytrącaniu bardzo trudno rozpuszczalnych soli srebra(I), takich jak borany (**Schematy 5 i 6**) lub fosforany (**Schemat 7**), które nie mają właściwości terapeutycznych, powodują, że roztwór staje się zawiesiną z cząstkami, które mogą podrażnić oko.



Schemat 5. Reakcja strącania słabo rozpuszczalnego kompleksu w postaci soli metaboranowej



Schemat 6. Rozkład kompleksu metronidazolu z metaboranem srebra(I).



Schemat 7. Reakcja strącania słabo rozpuszczalnego kompleksu w postaci soli ortofosforanowej

Odpowiednie pH osiągnąłem bez ryzyka wytrącenia tlenku srebra(I) przez dodanie wodorotlenku sodu, co jest praktyką stosowaną w przemysłowej produkcji kropli do oczu. Dostateczna ilość wodorotlenku sodu wiąże nadmiar protonów w kropli i umożliwia podniesienie pH do pożądanego poziomu. Nadmiar jonów H_3O^+ został związany przez aniony OH^- , które powstają w wyniku całkowitej dysocjacji wodorotlenku sodu. Stan równowagi ustala się przy pH = 6,9–7,1. Roztwór pozostaje bezbarwny i przejrzysty, a jony $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]^+$ są obecne w nim obecne. Okres użytkowania wytworzonego produktu dla poszczególnych pacjentów wynosi 1 miesiąc od momentu otwarcia butelki, co jest ogólnie przyjętą zasadą dla kropli do oczu i standardów farmaceutycznych na całym świecie. Dopiero po 6 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej w przygotowanej postaci leku zaczął pojawiać się tlenek srebra(I). Podczas prowadzenia badań i podczas redagowania pracy nie udało mi się

natknąć na żadną publikację czy opracowanie, które wykorzystywałoby podobną metodę modyfikacji pH w kroplach do oczu zawierających srebro(I). FP XII podaje jedynie roztwór azotanu potasu jako izotonizujący, z którym azotan srebra(I) jest zgodny w fazie farmaceutycznej [36].

Pod względem biologicznym badania *in vitro* oraz *in vivo* nad nabłonkiem barwnikowym siatkówki z zapaleniem wnętrza gałki ocznej na modelach myszy i królika potwierdzają biokompatybilność komórkową i działanie przeciwbakteryjne nanomateriałów kompleksu srebra. Dodanie nanocząstek Ag-NP do AuAgCu₂O-bromfenak sodu do terapii fotodynamicznej pozwala na wzmocnienie działania przeciwbakteryjnego przeciwko *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i metycylinoopornemu *S. aureus* w synergicznym leczeniu pooperacyjnego zapalenia wnętrza gałki ocznej po operacji zaćmy [227,228]. Ag-NPs sprzężone z kwasem oleinowym lub wildagliptyną wykazują działanie p/akantamebiczne, które można zastosować terapeutycznie przeciwko *Acanthamoeba castellanii*, patogenowi oportunistycznemu, który jest związany z zapaleniem rogówki oka uszkadzającym wzrok i rzadkim, ale śmiertelnym zakażeniem ośrodkowego układu nerwowego [229,230]. Być może zsyntetyzowany przeze mnie nowy kompleks metronidazolu z siarczanem srebra(I) w przyszłości stanie się dobrym materiałem do badań zastosowania go w okulistycznych postaciach leku, podobnie jak kompleks z azotanem srebra(I).

Właściwości fizykochemiczne substancji czynnej oraz grubość warstwy naskórka są podstawowymi parametrami określającymi penetrację leku do skóry [231]. Zastosowane podłoże, rozpuszczalnik czy tenzydy mogą wpływać na przenikanie substancji leczniczej, a parametrami określającymi ten proces są bez wątpienia: współczynnik podziału skóra/podłoże (powinowactwo do substancji leczniczej, przenikanie rozpuszczalnika) oraz współczynnik dyfuzji (właściwości osmotyczne). Lipidy warstwy rogowej naskórka są tworzone przez co najmniej 6 różnych rodzajów ceramidów, kwasy tłuszczowe i cholesterol [232]. Lipidy tworzą podwójne uporządkowane warstwy laminarne, których budowa i stan ma bardzo istotne znaczenie dla procesów przenikania [233]. Równocześnie z wszelkimi badaniami dotyczącymi struktury naskórka poszukuje się wciąż promotorów wchłaniania, które będąc składnikami postaci leku obok substancji czynnej ułatwiają jej penetrację i/lub przenikanie [234]. Wśród nich można wymienić np.: DMSO, jedno- i wielowodorotlenowe alkohole, alkany, kwasy tłuszczowe, estry, aminy i amidy, terpeny, cyklodekstryny i tenzydy [237-238], nad którymi pracowano w latach 90. XX wieku. Tenzydy, często stosowane w preparatach farmaceutycznych oraz kosmetycznych, również mogą mieć wpływ na przenikanie substancji biologicznie czynnej poprzez wiązanie z proteinami występującymi

w warstwie rogowej naskórka. Zarówno anionowe, jak i kationowe, więc jonowe tenzydy, mogą jednak powodować miejscowe podrażnienia skóry. Tween jest tenzydem niejonowym, nie dochodzi podczas jego stosowania do podrażnień. W opracowanej przeze mnie formulacji żelu do użytku zewnętrznego zastosowałem glikol oraz etanol jako substancje pomocnicze. Każdy z nich może wpływać na polepszenie wchłaniania kompleksu metronidazolu z azotanem srebra, który jest *remedium cardinale* tej postaci leku.

W celu uzyskania poprawy wchłaniania w maści do użytku zewnętrznego kuszącym było zastosowanie DMSO jako rozpuszczalnika, a jednocześnie substancji pełniącej rolę promotora wchłaniania. Dimetylosulfotlenek (DMSO) może być jednak ligandem sulfoksydowym podobnie jak BEZE (1,2-bis(etylosulfinylo)-etan) i TMSO (tetraetylenosulfoksyd), które koordynując wraz z metronidazolem dają kompleksy, np. o wzorze $\text{RuCl}_2(\text{BEZE})(\text{MTZ})_2$ [239]. Rozpoczęte przeze mnie badania w zakresie opracowania formulacji postaci leków zawierających kompleks metronidazolu z azotanem srebra(I) są wstępem i zamierzam je kontynuować w przyszłości. Wówczas możliwym będzie odpowiedź na pytanie czy zsyntetyzowany kompleks jest na tyle stabilny i trwały, aby nie dochodziło do wymiany liganda podczas użycia DMSO jako promotora wchłaniania.

Podsumowując, w pracy zaprezentowałem badania, które pozwalają na **sformułowanie następujących wniosków:**

- uproszczona synteza kompleksu MTZ z azotanem srebra(I) i opracowanie jej ze zmianą rozpuszczalnika jako metody „one-step” pozwala na wykorzystanie jej w przygotowywanych *ex tempore* postaciach leku;
- właściwości przeciwbakteryjne i cytotoksyczne kompleksu MTZ z azotanem srebra(I) ulegają rozszerzeniu w stosunku do spektrum działania liganda (MTZ) i czystej soli srebra (AgNO_3). Można mówić na podstawie przedstawionych wyników nie tyle o synergistycznym działaniu, a o synergizmie hiperaddycyjnym wraz z modyfikacją kierunków działania;
- synteza nowego kompleksu MTZ z siarczanem srebra(I) daje produkt wykazujący podobne właściwości do kompleksu z azotanem srebra(I), ale przeciwjon może mieć istotny wpływ na siłę i spektrum jego działania;
- kompleksy MTZ z azotanem i siarczanem srebra(I) względem siebie wykazują odmienną budowę. W kompleksie MTZ z azotanem jon NO_3^- należy do strefy

koordynacyjnej, natomiast w kompleksie z siarczanem, zgodnie z zaproponowaną strukturą, jon SO_4^{2-} znajduje się poza strefą. Dodatkowo nowy kompleks krystalizuje w postaci pięciowodnego hydratu, który podczas ogrzewania traci wodę krystalizacyjną;

- możliwe jest otrzymanie i praktyczne zastosowanie czterech postaci leku zawierających kompleks MTZ z azotanem srebra(I), które są trwałe podczas ich przechowywania;
- stabilizowanie pH kropli do oczu ze zsyntetyzowanym związkiem z wykorzystaniem innych roztworów buforujących niż zalecane przez FP XII w recepturowej preparatyce kropli do oczu, daje pożądaný rezultat. Dokonano również oceny trwałości kropli do oczu w okresie pół roku od momentu sporządzenia;
- następuje wzrost rozpuszczalności MTZ w wodzie w obecności soli srebra(I);
- stabilność zsyntetyzowanych kompleksów srebra jest wyższa niż soli srebrowych, z których zostały utworzone;
- zastosowanie HEC ze względu na jej właściwości fizyczne, które związane są z rozpuszczalnością w temperaturze powyżej 60 °C, w odróżnieniu od innych pochodnych celulozy, których polimery w wyższych temperaturach stają się nierozpuszczalne, daje lek recepturowy o dobrych cechach reologicznych.

Przedstawione badania zostały zaprojektowane i przeprowadzone zarówno z wykorzystaniem metod wcześniej opracowanych w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej, jak i dzięki mojej własnej inwencji. W oparciu o spektroskopię w podczerwieni, ^1H NMR, analizę pierwiastkową i badania rentgenostrukturalne zaproponowałem wzór sumaryczny i strukturę nowego związku kompleksowego. W widmach kompleksu obecne są pasma, których brak w widmie wolnego liganda, charakterystyczne dla połączeń kompleksowych. Badania potwierdziły utworzenie wiązań koordynacyjnych między jonami srebra z odpowiednich soli a pirydynowym atomem azotu pierścienia imidazolowego zawartego w strukturze metronidazolu.

Opracowanie formulacji postaci leku, ocena ich w obrazie mikroskopowym oraz ocena zachowania podczas przechowywania i zastosowanie u pacjentów z dobrymi wynikami, przebadanie zsyntetyzowanych substancji pod kątem ich cytotoksyczności i działania mikrobiologicznego, jest zachęceniem do dalszych badań chemicznych, biologicznych i farmaceutycznych, jako związków mających wysoki potencjał terapeutyczny.

6. Streszczenie

Srebro w czystej postaci występuje bardzo rzadko i prawdopodobnie ze względu na ten fakt poznane zostało przez ludzi starożytnych znacznie później niż złoto. Jego odkrycie w około 1300 r. p.n.e przypisywane jest Ajakosowi, zgodnie z Kronikami Greckimi. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe srebra zostały potwierdzone eksperymentalnie dopiero w XIX wieku, ale obecnie metal ten i jego związki są szeroko stosowane w wielu dziedzinach życia człowieka, w tym i w medycynie. Już Hipokrates zaobserwował, że ten niezwykle metal ma właściwości biologiczne w leczeniu chorób i ich profilaktyce. Fenicjanie przechowywali wodę, wino i ocet w srebrnych naczyniach, aby zapobiec ich zepsuciu. Przyczyna bakteriobójczych właściwości srebra wciąż nie jest do końca jasna, chociaż istnieją pewne teorie. Podczas I wojny światowej związki srebra były używane do zapobiegania infekcjom, kiedy antybiotyki nie były jeszcze znane. Wzorcowym roztworem był azotan srebra, który następnie został zastąpiony maścią sulfadiazynową. Wraz z odkryciem antybiotyków i sulfonamidów zainteresowanie lekami zawierającymi srebro nieco spadło, ale obecnie nabiera nowego rozmachu. Kation srebra(I) wykazuje działanie bakteriobójcze, antyseptyczne, przeciwzapalne, ściągające i jest naturalnym metalem bakteriobójczym, który jest skuteczny wobec 650 gatunków bakterii, a szalenie istotną jego cechą jest słaba oporność bakterii na jego związki, w przeciwieństwie do prawie wszystkich antybiotyków, wobec których coraz więcej szczepów bakteryjnych nie jest wrażliwych.

Ze względu na wspomnianą oporność bakterii na najnowocześniejsze środki przeciwdrobnoustrojowe wracamy do rozwiązań, które mogłyby naprawić problemy wywołane przez niewłaściwe preskrypcje, nadużywanie czy niewłaściwe stosowanie antybiotyków, co jest ogólnoswiatowym nieszczęściem. Chemiczy, farmaceuci, biolodzy, lekarze, łącząc swe siły z inżynierami, fizykami, biotechnologami i wszystkimi Naukowcami innych specjalności, których nie sposób wymienić, wciąż poszukują nowych związków chemicznych o pożądanych właściwościach biologicznych poprzez modyfikacje struktur znanych od dawna cząsteczek lub tworzenie nowych adduktów z substancji o dobrze udokumentowanym działaniu. W wielu dotychczasowych badaniach określono właściwości chemiczne i biologiczne związków koordynacyjnych - pochodnych imidazolu oraz metali przejściowych, w tym srebra.

Niniejsza praca skupia się na syntezie nowego związku koordynacyjnego srebra(I) o wzorze $[Ag(MTZ)_2]_2SO_4$ oraz modyfikacji syntezy kompleksu o wzorze $[Ag(MTZ)_2NO_3]$.

Oba związki poddano badaniom potwierdzającym ich skład (analiza pierwiastkowa, ^1H NMR, IR), trwałość w różnych warunkach przechowywania (światło dzienne, ciemnia, promieniowanie UV-A), właściwości cytotoksyczne (określone z użyciem 5 linii komórkowych) i przeciwbakteryjne (wykonane dla kilkunastu rodzajów bakterii, zarówno Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich). Określiłem również podstawowe właściwości fizykochemiczne takie jak temperatury topnienia, rozpuszczalność w wodzie, uwzględniając możliwości praktycznego zastosowania w preparatyce farmaceutycznej. Dla nowosyntetyzowanego kompleksu przedstawiono jego wzór strukturalny w oparciu o badania rentgenostrukturalne.

Zaprezentowana, nowa, uproszczona droga syntezy $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ pozwoliła na opracowanie formuacji 4 postaci leków: maści do użytku zewnętrznego, żelu do użytku zewnętrznego, maści ocznej i kropli do oczu. Ostatnia z postaci leku została poddana również procesowi udoskonalenia, co pozwoliło poprawić komfort stosowania u pacjenta. Wykonane w warunkach funkcjonowania rzeczywistej apteki recepturowe produkty lecznicze, które stanowią indywidualne podejście w terapii pacjenta, zostały przebadane po kątem działania farmakologicznego u kilku pacjentów. Każda z postaci leków została poddana przeze mnie również ocenie zachowania podczas odpowiedniego przechowywania, przechowywania niewłaściwego (w warunkach sprzyjających rozkładowi) wraz z uwzględnieniem standardów farmaceutycznych, które zaleca Farmakopea Polska. Efektem tych prac są przedstawione w mojej rozprawie wyniki, które niosą duże nadzieje m.in. dla dermatologii i okulistyki. Rozpoczęte przeze mnie badania są zapewne wstępem, który należy rozwijać.

7. Summary

Pure silver is very rare in the natural environment and probably due to this fact it got known by ancient people much later than gold. According to the Greek Chronicles, its discovery around 1300 BC is attributed to Ajakos. The antimicrobial properties of silver were experimentally confirmed only in the 19th century, but nowadays this metal and its compounds are widely used in many areas of human life, including medicine. It was Hippocrates who had already observed that this remarkable metal has biological properties in the treatment and prevention of diseases. The Phoenicians kept water, wine, and vinegar in silver pots to prevent them from spoilage. Why silver has bactericidal properties is still not entirely clear, although there are some theories. During World War I, silver compounds were used to prevent infection as antibiotics were not known then. The standard solution was silver nitrate which was later replaced with sulfadiazine ointment. With the discovery of antibiotics and sulfonamides, the interest in silver-containing drugs has decreased, but is now gaining new momentum. The silver (I) cation has a bactericidal, antiseptic, anti-inflammatory and astringent effect, it is a natural bactericidal metal that is effective against 650 species of bacteria, and its extremely important feature is the low resistance of bacteria to its compounds, contrary to almost all antibiotics to which more and more bacterial strains are not sensitive.

Because of the aforementioned resistance of bacteria to the most modern antimicrobial agents, we are returning to solutions that could remedy problems caused by inappropriate prescription, abuse or inappropriate use of antibiotics, which is a worldwide misfortune. Chemists, pharmacists, biologists and physicians, joining forces with engineers, physicists, biotechnologists and other scientists whose areas of expertise it is not feasible to mention here, are still looking for new chemical compounds with desired biological properties by modifying the structures of molecules known for a long time or creating new adducts from substances with well-documented performance. A lot of past studies have determined the chemical and biological properties of coordination compounds - imidazole derivatives and transition metals, including silver.

This work focuses on the synthesis of a new silver (I) coordination compound of the formula $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4$ and the modification of the synthesis of the complex of the formula $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$. Both compounds were tested to confirm their composition (elemental analysis, ^1H NMR, IR), stability under various storage conditions (daylight, darkness, UV-A radiation), cytotoxic properties (determined with the use of 5 cell lines) and antibacterial

properties (conducted for a dozen or so types of bacteria, both gram-negative and gram-positive). I also determined the basic physicochemical properties, such as melting points, water solubility, taking into account the possibilities of practical application in pharmaceutical preparation. For the novel synthesized complex, its structural formula was presented based on X-ray structure studies.

The presented new simplified route of $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ synthesis allowed for developing a formulation of 4 drug forms: external ointment, external gel, eye ointment and eye drops. The last form of the drug has also undergone a process of refinement, which made it possible to improve the comfort of use for the patient. Prescription medicinal products made in the operating conditions of a real pharmacy, constituting an individual approach in patient therapy, have been tested for pharmacological effects in several patients. Each of the drug forms was also subjected to an assessment of behavior during both appropriate storage and improper storage (in conditions conducive to decomposition), taking into account the pharmaceutical standards recommended by Polish Pharmacopoeia. My dissertation presents the results I obtained, which bring high hopes, among others, for dermatology and ophthalmology. Undoubtedly, the research I have started should be developed further.

8. Spis rysunków i schematów

Rys.1 – Struktura imidazolu

Rys.2 – Struktura metronidazolu

Rys.3 – Synteza metronidazolu z wykorzystaniem reakcji Debus-Radziszewskiego oraz za pomocą syntezy z etylenodiaminy

Rys.4 – Struktury nitrowanych pochodnych imidazolu N-podstawionych – tinidazolu (**a**), nimorazolu (**b**) i ornidazolu (**c**)

Rys.5 – Struktura enancjomerów ketokonazolu: (2*R*,4*S*)-(+)*u góry*, (2*S*,4*R*)-(-)*u dołu*

Rys.6 – Struktura klorimazolu

Rys.7 – Struktura enancjomerów mikonazolu

Rys.8 – Struktura stereoizomerów bifonazolu (*R*) z lewej, (*S*) z prawej

Rys.9 – Struktury N-podstawionych pochodnych imidazolu – butokonazolu (**a**), ekonazolu (**b**) i izokonazolu (**c**)

Rys.10 – Związki kompleksowe platyny z ligandami NH₃ i Cl⁻

Rys.11 – Związki koordynacyjne pochodnych chinoliny ze srebrem(I)

Rys.12 – Związki koordynacyjne pochodnych fosforanowych benzimidazolu (**a**) i pirydyny (**b**)

Rys.13 – Struktura soli srebrowej sulfadiazyny

Rys.14 – Struktura rentgenowska soli srebrowej sulfadiazyny z uwzględnieniem kontaktów w łańcuchu dwuniciowym

Rys.15 – Struktury związków kompleksowych MTZ ze srebrem(I) z przeciwjonami: azotanowym, nadchloranowym i trifluorooctanowym (**a**) oraz tetrafluoroboranowym i metanosulfonianowym (**b**)

Rys.16 – Kryształy związku kompleksowego metronidazolu z azotanem srebra(I) uzyskanego w syntezie typu „one-step”

Rys.17 – Kryształy [Ag₂(MTZ)₄]SO₄·5H₂O w obrazie mikroskopowym (**a**) oraz w obrazie rzeczywistym w powiększeniu (**b**)

Rys.18 – Gotowa postać maści do użytku zewnętrznego na skórę wykonana zgodnie z przedstawioną formulacją

Rys.19 – Gotowa postać żelu do użytku zewnętrznego na skórę i błony śluzowe wykonanego zgodnie z przedstawioną formulacją

Rys.20 – Gotowa postać maści ocznej na skórę wykonanej zgodnie z przedstawioną formulacją

Rys.21 – Gotowa postać kropli ocznych wykonanych zgodnie z przedstawioną formulacją

Rys.22 – Linia komórkowa Balb/c 3T3, fotografia z zasobów ATCC

Rys.23 – Linia komórkowa Hep G2, fotografia z zasobów ATCC

Rys.24 – Linia komórkowa Caco-2, fotografia z zasobów ATCC

Rys.25 – Linia komórkowa PANC-1, fotografia z zasobów ATCC

Rys.26 – Linia komórkowa 1.2B4, fotografia z zasobów PHE

Rys.27 – Widma ¹H NMR metronidazolu (**a**) i kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) (**b**)

- Rys.28** – Widma ^1H NMR metronidazolu (**c**) i kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) (**d**) z D_2O
- Rys.29** – Widma IR metronidazolu (**a**) oraz kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) (**b**)
- Rys.30** – Widmo IR kompleksu metronidazolu z siarczanem srebra(I)
- Rys.31** – Widma ^1H NMR metronidazolu (**a**) i metronidazolu z D_2O (**b**)
- Rys.32** – Widma ^1H NMR kompleksu metronidazolu z siarczanem srebra(I) (**c**) i z D_2O (**d**)
- Rys.33** – Reprezentacja Mercury [188] asymetrycznej jednostki $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Elipsoidy przemieszczenia są rysowane z prawdopodobieństwem 50%. Dla przejrzystości pominięto atomy wodoru
- Rys.34** – Schemat oddziaływań na kationy srebra(I). Żółte przerywane linie oznaczają słabe punkty kontaktów $\text{Ag} \cdots \text{O}$. Kody symetrii: (i) $x-1, y-1, z$; (ii) $x+1, y+1, z$; (iii) $1-x, 1-y, 2-z$; (iv) $2-x, 1-y, 2-z$
- Rys.35** – Dwie różne orientacje powierzchni Hirshfelda metalicznego centrum Ag1 i Ag2 ze znormalizowaną funkcją kontaktu (d_{norm}) zmapowane na nim. Kody symetrii: (i) $x-1, y-1, z$; (ii) $x+1, y+1, z$; (iii) $1-x, 1-y, 2-z$; (iv) $2-x, 1-y, 2-z$
- Rys.36** – Upakowanie kryształu kompleksu $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2]_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Rys.37** – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana co tydzień w okresie od 0-28 dnia od momentu wykonania maści do użytku zewnętrznego, przechowywanej w odpowiednich warunkach
- Rys.38** – Wygląd maści do użytku zewnętrznego w obrazie mikroskopowym po 30 dniach od momentu wykonania
- Rys.39** – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana codziennie w okresie od 1-7 dnia od momentu wykonania maści do użytku zewnętrznego, przechowywanej w atmosferze powietrza, narażonej na działanie światła dziennego
- Rys.40** – Tubostrykawka będąca opakowaniem wykonanej postaci leku
- Rys.41** – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana co tydzień w okresie od 0-28 dnia od momentu wykonania maści do użytku okulistycznego, przechowywanej w odpowiednich warunkach
- Rys.42** – Wygląd maści do użytku okulistycznego w obrazie mikroskopowym po 30 dniach od momentu wykonania
- Rys.43** – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana codziennie w okresie od 1-7 dnia od momentu wykonania maści do użytku okulistycznego, przechowywanej w atmosferze powietrza, narażonej na działanie światła dziennego
- Rys.44** – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana co tydzień w okresie od 0-28 dnia od momentu wykonania żelu do użytku zewnętrznego i na błony śluzowe, przechowywanego w odpowiednich warunkach
- Rys.45** – Wygląd żelu do użytku zewnętrznego i na błony śluzowe w obrazie mikroskopowym po 30 dniach od momentu wykonania
- Rys.46** – Dokumentacja fotograficzna zarejestrowana codziennie w okresie od 1-7 dnia od momentu wykonania żelu do użytku zewnętrznego i na błony śluzowe, przechowywanego w atmosferze powietrza, narażonej na działanie światła dziennego
- Rys.47** – Jałowa butelka polipropylenowa z systemem dozującym krople
- Rys.48** – Roztwór kropli do oczu w dniu wykonania (**A**) i 6 miesięcy po przygotowaniu - przechowywane w lodówce (**B**) i w temperaturze pokojowej (**C**)
- Rys.49** – Zmiana wartości pH kropli w okresie przechowywania do 2 miesięcy
- Rys.50** – Panel 12 cyfrowych zdjęć pacjentki w wieku 73 lat, u której zdiagnozowano trądzik różowaty. Zdjęcia przedstawiają fragment twarzy pacjentki oraz przednią powierzchnię prawego i lewego oka podczas wizyt lekarskich: wizyta kwalifikacyjna, po 1 tygodniu, po 1 miesiącu i po 3 miesiącach

Rys.51 – Panel 12 cyfrowych zdjęć pacjenta w wieku 81 lat, u którego zdiagnozowano trądzik różowaty. Zdjęcia przedstawiają fragment twarzy pacjenta oraz przednią powierzchnię prawego i lewego oka podczas wizyt lekarskich: wizyta kwalifikacyjna, po 1 tygodniu, po 1 miesiącu i po 3 miesiącach

Rys.52 – Panel 12 cyfrowych zdjęć pacjenta w wieku 40 lat, u którego zdiagnozowano trądzik różowaty. Zdjęcia przedstawiają fragment twarzy pacjenta oraz przednią powierzchnię prawego i lewego oka podczas wizyt lekarskich: wizyta kwalifikacyjna, po 1 tygodniu, po 1 miesiącu i po 3 miesiącach

Rys.53 – Udokumentowany fotografiami proces leczenia zranienia ze ścięciem opuszka palca wskazującego. Dwie ostatnie fotografie stan obecny – rok po zakończeniu leczenia

Rys.54 – Udokumentowany fotografiami proces leczenia zmian pooparzeniowych. Ostatnia fotografia stan obecny – miesiąc po zakończeniu leczenia

Rys.55 – Udokumentowany fotografiami proces leczenia zmian w obrębie kostki **(a)** i podudzia **(b)**

Rys.56 – Udokumentowany fotografiami proces leczenia zmian o charakterze owrzodzenia podudzi. Ostatnia fotografia stan obecny – leczenie trwa

Rys.57 – Papier (część górna) i bibuła (część dolna) z zaaplikowanymi roztworami pozostawione w ciemności i fotografowane po wskazanym czasie

Rys.58 – Papier (część górna) i bibuła (część dolna) z zaaplikowanymi roztworami pozostawione w świetle dziennym i fotografowane po wskazanym czasie

Rys.59 – Papier (część górna) i bibuła (część dolna) z zaaplikowanymi roztworami pozostawione w świetle UV-A i fotografowane po wskazanym czasie

Rys.60 – Eliminacja biofilmu (%) przez różne stężenia testowanych kompleksów metronidazolu z jonami srebra(I) wobec szczepów referencyjnych *S. aureus* **(A)** i *E. coli* **(B)**

Rys.61 – Jakościowe określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych związków przy użyciu konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej: **(a)** biofilm *S. aureus* i **(b)** biofilm *E. coli* (jasnozielona fluorescencja – żywe bakterie z nienaruszonymi błonami komórkowymi, czerwona i żółta fluorescencja – martwe bakterie; kontrolny biofilm *E. coli* został zwizualizowany za pomocą kontrastu Nomarskiego jako egzopolimeryczna matryca, która utrudniała penetrację sond DNA

Rys.62 – Krzywe odpowiedzi zależnej od stężenia dla badanych związków ocenianych w testach MTT, NRU, TPC, LDH na komórkach Balb / c 3T3 i HepG2. Wyniki wyrażono jako średnią $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów. * $p \leq 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną (0,1% DMSO)

Rys.63 – Cytotoksyczna aktywność azotanu srebra(I) (AgNO_3), metronidazolu, i $[\text{Ag}(\text{MTZ})_2\text{NO}_3]$ wobec komórek PANC-1 i 1.2B4. Komórki traktowano badanymi związkami w zakresie stężeń 0–300 μM , a jako kontrolę pozytywną zastosowano cisplatynę (0–100 μM). Po 72 godzinach inkubacji cytotoksyczność określono za pomocą testu MTT. Dane wyrażono jako średnie $\pm$ SD z trzech do pięciu niezależnych eksperymentów. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu z komórkami nietraktowanymi (kontrola negatywna)

Schemat 1. Etapy sporządzania kropli do oczu w postaci roztworu rzeczywistego

Schemat 2. Schemat syntezy jednoetapowej kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I)

Schemat 3. Synteza jednoetapowa kompleksu metronidazolu z siarczanem srebra(I)

Schemat 4. Dysocjacja kompleksu metronidazolu z azotanem srebra(I) oraz hydroliza kationu kompleksowego

Schemat 5. Reakcja strącania słabo rozpuszczalnego kompleksu w postaci soli metaboranowej

Schemat 6. Rozkład kompleksu metronidazolu z metaboranem srebra(I)

Schemat 7. Reakcja strącania słabo rozpuszczalnego kompleksu w postaci soli ortofosforanowej

9. Spis tabel

Tabela 1. Produkty lecznicze dopuszczone do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej z uwzględnieniem drogi podania, postaci leku, indeksu ATC i przeznaczenia

Tabela 2. Monografie metronidazolu i benzoesanu metronidazolu FP XII

Tabela 3. Stopnie utlenienia srebra (pogrubiono i wyróżniono najistotniejszy)

Tabela 4. Rozpuszczalność soli srebra w wodzie

Tabela 5. Preparaty srebra stosowane w medycynie

Tabela 6. Monografie preparatów srebra FP II

Tabela 7. Preparaty srebra opisane w Informatorze Terapeutycznym do USL z roku 1959 r.

Tabela 8. Dawki (stężenia) preparatów według FP XII

Tabela 9. Liczby koordynacyjne związków koordynacyjnych

Tabela 10. Ocena zdolności absorbowania wody – dane doświadczalne [145] a – skład według FP XII: Cholesterolum 3,0; Alcohol stearylicus 3,0; Cera alba 8,0; Vaselinum album 86,0; b – skład według FP XII: Cera alba 5,0; Vaselinum album 95,0

Tabela 11. Najczęściej stosowane substancje żelujące w preparatyce farmaceutycznej (na podstawie monografii szczegółowych FP XII)

Tabela 12. Roztwory buforujące stosowane w kroplach do oczu wraz z przykładami substancji czynnych, z którymi mogą być stosowane

Tabela 13. Roztwory izotonizujące zgodnie z zaleceniami FP XII

Tabela 14. Zalecane substancje konserwujące stosowane w preparatyce kropli do oczu. [36]. * Aseptina M (P) = Paraben, Nipagina, *p*-hydroksybenzoesan odpowiednio metylu lub propylu

Tabela 15. Ilość wody i roztworu izotonizującego potrzebnych do sporządzenia kropli do oczu z najczęściej stosowanymi substancjami czynnymi. * Substancję rozpuszcza się bezpośrednio w roztworze buforującym

Tabela 16. Warunki hodowli poszczególnych linii komórkowych użytych w badaniu cytotoksyczności. Litery oznaczają kolejno: ^a Nunc, Roskilde, Dania, ^b NuAire, Plymouth, MN, USA, ^c zmodyfikowane podłoże Eagle'a Dulbecco, ATCC, ^d Minimum Essential Medium Eagle, ATCC, ^e Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, ^f pasażowanie co dwa lub trzy dni po osiągnięciu 70–80% konfluencji

Tabela 17. Odległości oddziaływań Ag [Å]

Tabela 18. Geometria wiązań wodorowych [Å,°]

Tabela 19. Wartości MIC i MBC dla przedstawionych kultur bakterii badanych związków kompleksowych

Tabela 20. Stężenia hamujące (IC₅₀, μM) określone się na liniach Balb / c 3T3 i HepG2 przez wykonanie testów MTT NRU TPC i testach LDH po 72 h ekspozycji na badane związki; dane przedstawione jako średnia ($n = 3$) ± SEM (średnia błędu standardowego). Różne indeksy górne (a, b, c) w jednej linii wskazują na istotne różnice między zastosowanym testem ($p \leq 0,05$)

Tabela 21. IC₅₀ (μM) badanych związków określone za pomocą testów MTT, NRU, TPC i LDH po 72 h ekspozycji komórek HepG2, Caco-2 i Balb/c 3T3. Dane przedstawiono jako średnią ± SD, $n = 3$

10. Piśmiennictwo

- [1] Charkhian, H.; Bodaqlouie, A.; Soleimannezhadbari, E.; Lotfollahi, L.; Shaykh-Baygloo, N.; Hosseinzadeh, R.; Yousefi, N.; Khodayar, M. Comparing the Bacteriostatic Effects of Different Metal Nanoparticles Against *Proteus vulgaris*. *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 2674–268.
- [2] Da Silva Martins, L.H.; Rai, M.; Neto, J.M.; Gomes, P.W.P.; da Silva Martins, J.H. Silver: Biomedical Applications and Adverse Effects. *Biomed. Appl. Met.* **2018**, 113–127.
- [3] Frei, A. Metal Complexes, an Untapped Source of Antibiotic Potential? *Antibiotics* **2020**, *9*, 90.
- [4] Balazs, D.J.; Triandafillu, K.; Wood, P.; Chevolot, Y.; van Delden, C.; Harms, H.; Hollenstein, C.; Mathieu, H.J. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2139–2151.
- [5] Kosmider, B.; Zyner, E.; Osiecka, R.; Ochocki, J. Genotoxicity of cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP in A549 cells evaluated by comet assay. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2004**, *82*, 353–358.
- [6] Ciesielska, E.; Szulawska, A.; Studzian, K.; Ochocki, J.; Malinowska, K.; Kik, K.; Szmigiero, L. Comparative studies on the mechanism of cytotoxic action of novel platinum II complexes with pyrazole ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1579–1585.
- [7] Kontek, R.; Matlawska-Wasowska, K.; Kalinowska-Lis, U.; Kontek, B.; Ochocki, J. Evaluation of cytotoxicity of new trans-palladium(II) complex in human cells in vitro. *Acta Pol. Pharm.* **2011**, *68*, 127–136.
- [8] Kasprzak, M.; Fabijanska, M.; Chęcinska, L.; Studzian, K.; Markowicz-Piasecka, M.; Sikora, J.; Mikiciuk-Olasik, E.; Ochocki, J. Small differences in structure, large difference in activity-Comparison of the new Ru (II) -3-hydroxyiminoflavanone complex with analogous Ru (II) compounds. *Inorg. Chim. Acta* **2017**, *457*, 69–80.
- [9] Antonarakis, E.S.; Emadi, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: Are they ready for prime time? *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *66*, 1–9.
- [10] Morais, T.S.; Valente, A.; Tomaz, A.I.; Marques, F.; Garcia, M.H. Tracking antitumor metallodrugs: Promising agents with the Ru(II)- and Fe(II)-cyclopentadienyl scaffolds. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 527–544.
- [11] Черних, В.П.; Гриценко, І.С.; Єлисеєва, Н.М.; За ред. Черних, В.П. Органічна хімія : Підручник для студентів ВНЗ, Харків, Вид-во НФаУ, : Оригінал, **2004** – 464 с. 3000 пр. – На укр. яз. ISBN 966-615-235-5 : 46.50.
- [12] Mastalerz, P. *Chemia organiczna*, Wydawnictwo chemiczne, Wrocław, **2000**, s.682.
- [13] Mills K.; Joule J.A. *Heterocyclic Chemistry*, 5th Edition, A John Wiley&Sons, Ltd, Publication, West Sussex, UK, **2010**.
- [14] Mital, A. Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activities and Mutagenicity Relationships. *Sci. Pharm.* **2009**, *77*, 497-520.
- [15] Edwards, D.I. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1993**, *Volume 31*, *Issue 1*, 9–20.
- [16] Dingsdag, S.A.; Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. *J. Antimicrob Chemother.* **2018**, *73*, 265–279.
- [17] Graves, K.J.; Novak, J.; Secor, W.E.; Kissinger, P.J.; Schwebke, J.R.; Muzny, C.A. A Systematic Review of the Literature on Mechanisms of 5– Nitroimidazole Resistance in *Trichomonas vaginalis*, *Parasitology*, **2020**, *147(13)*, 1383–1391.
- [18] Ellepola, A.N.; Samaranyake, L.P. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.*, **2000**, *t. 11*, *nr 2*, 172–198.
- [19] Murray, P.R.; Rosenthal K.S.; Pfaller, M.A. *Mikrobiologia*, **2011**, Wrocław: Edra Urban & Partner.
- [20] Sheehan, D.J.; Hitchcock, C.A.; Sibley, C.M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1999**, *t. 12*, *nr 1*, 40–79.
- [21] Janiec W. *Kompendium Farmakologii*, **2015**, 4. wyd., 1 t. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- [22] Heczko P.B.; Pietrzyk A.; Wróblewska M. *Mikrobiologia lekarska*. **2014**, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- [23] Crowley, P.D.; Gallagher, H.C. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *t. 117*, *nr 3*, 611–617.
- [24] Gupta, A.; Kar, H.K. Solid State Compatibility Studies of Miconazole Using Thermal and Spectroscopic Methods. *Adv. Anal. Chem.* **2015**, *t. 5*, *nr 3*, 51–55,
- [25] Zejc, A.; Gorczyca, M.; Byrtus H. *Chemia leków. Podręcznik dla studentów farmacji i farmaceutów*, **2008**, 3. wyd., 1 t. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- [26] Quirke, V. Targeting the American market for medicines, ca. 1950s-1970s: ICI and Rhône-Poulenc compared". *Bulletin of the History of Medicine*. **2014**, *88 (4)*, 654–696.
- [27] Ebel, K.; Koehler, H.; Gamer, A.O.; Jäckh, R. Imidazole and Derivatives. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, **2002** Wiley-VCH.

- [28] Actor, P.; Chow, A.W.; Dutko, F.J.; McKinlay, M.A. Chemotherapeutics. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. **2002**, Weinheim: Wiley-VCH.
- [29] Kraft, M.Y.; Kochergin, P.M.; Tsyganova, A.M.; Shlikhunova, V.S. Synthesis of metronidazole from ethylenediamine. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. **1989**, *23* (10), 861–863.
- [30] Thomas, G. Medicinal Chemistry, Wiley, New Jersey, US, **2008**.
- [31] Dingsdag, S.A.; Hunter, N. Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 265–279.
- [32] Karta Charakterystyki Produktu Leczniczego Metronidazol Polpharma 250 mg tabletki, Zakłady Farmaceutyczne POLPHARMA S.A. **2016**, URPL w Warszawie.
- [33] Buczko, W.; Danysz, A. Kompendium farmakologii i farmakoterapii Wyd. Edra Urban & Partner, Wrocław, **2016**.
- [34] Kostka-Trąbka, E.; Woron, J. Interakcje leków w praktyce klinicznej, PZWL, **2016**.
- [35] Dingsdag, S.A.; Hunter, N. Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 265–279.
- [36] Farmakopea Polska, Wydanie XII, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa, **2020**.
- [37] Karta Charakterystyki Produktu Leczniczego Tinidazolum Polpharma 500 mg tabletki, Zakłady Farmaceutyczne POLPHARMA S.A. **2013**, URPL w Warszawie.
- [38] Kuhlmann, F.M.; Fleckenstein, J.M.; Cohen, J.; Powderly, W.G.; Opal, S.M. (editors), 157 - Antiparasitic Agents, *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, **2017**, Elsevier, 1345–1372.e2, ISBN 978-0-7020-6285-8.
- [39] Sharma, S.; Anand, N.; Sharma, S.; Anand, N. (editors), Chapter 17 - Nitroheterocycles, *Pharmacochemistry Library, Approaches to Design and Synthesis of Antiparasitic Drugs*, Elsevier, **25**, **1997**, 428.
- [40] Nagel, J.L.; Aronoff, D.M.; Bennett, J.E.; Dolin, R.; Blaser, M.J. (editors), 28 - Metronidazole, *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, **2015**, 356, ISBN 978-1-4557-4801-3.
- [41] Wilcox, M.H.; Cohen, J.; Powderly, W.G.; Opal, S.M. (editors), 147 - Nitroimidazoles, Metronidazole, Ornidazole and Tinidazole; and Fidaxomicin, *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, Elsevier, **2017**, 1261–1263.e1, ISBN 978-0-7020-6285-8.
- [42] <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=27997>, dostęp **2021-04-25**
- [43] <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=27421>, dostęp **2021-04-25**
- [44] https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1266.htm, dostęp **2021-04-25**
- [45] Fischer, J.; Ganellin, C.R. *Analogue-based Drug Discovery*, John Wiley & Sons, **2006**, 503. ISBN 9783527607495.
- [46] <http://www.urpl.gov.pl/pl/europejska-agencja-lek%C3%B3w-zaleca-zawieszenie-pozwolen-na-dopuszczanie-do-obrotu-dla-doustnych-lek%C3%B3w>, dostęp **2021-04-25**
- [47] Walker, S. R. Trends and Changes in Drug Research and Development (en). Springer Science & Business Media, **2012**, 109. ISBN 9789400926592.
- [48] <https://register.dpma.de/DPMAREgister/marke/register/830991/DE>, dostęp **2021-04-25**
- [49] Członkowski, A. (red.) Leki współczesnej terapii, wyd. XX, t. 1, Warszawa: Medical Tribune Polska Sp. z o.o., **2010**, 451, ISBN 978-83-60135-94-5.
- [50] Fischer, J.; Ganellin, C.R. *Analogue-based Drug Discovery*, John Wiley & Sons, **2006**, 502. ISBN 9783527607495.
- [51] World Health Organization. World Health Organization model list of essential medicines: 21st list **2019**. Geneva: World Health Organization. hdl:10665/325771.
- [52] Stryjska, K.; Korona-Główniak, I.; Chęcińska, L.; Kusz, J.; Ochocki, J. Synthesis, Spectroscopy, Single-Crystal Structure Analysis and Antibacterial Activity of Two Novel Complexes of Silver(I) with Miconazole Drug. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1510.
- [53] Stryjska, K.; Radko, L.; Chęcińska, L.; Kusz, J.; Posyniak, A.; Ochocki, J. Synthesis, Spectroscopy, Light Stability, Single-Crystal Analysis, and In Vitro Cytotoxic Activity on HepG2 Liver Cancer of Two Novel Silver(I) Complexes of Miconazole. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3629.
- [54] Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Charakterystyka produktu leczniczego Daktarin żel do stosowania w jamie ustnej 20mg/g, dostęp **2021-04-25**
- [55] Porubek, D. CYP17A1: A Biochemistry, Chemistry, and Clinical Review, Current Topics in Medicinal Chemistry, **2013**, *13*(12), 1364–1384.

- [56] Seidman, L.S.; Skokos, C.K. An evaluation of butoconazole nitrate 2% site release vaginal cream (Gynazole-1) compared to fluconazole 150 mg tablets (Diflucan) in the time to relief of symptoms in patients with vulvovaginal candidiasis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, **2005**, *13* (4), 197–206.
- [57] <https://www.drugs.com/monograph/butoconazole.html>, dostęp **2021-04-25**
- [58] Oyeka, C.A.; Gugnani, H.C. Isoconazole nitrate versus clotrimazole in foot and nail infections due to *Hendersonula toruloidea*, *Scytalidium hyalinum* and dermatophytes. *Mycoses*, **1992**, *35*(11–12), 357–361.
- [59] Cohen, L. Single dose treatment of vaginal candidosis: comparison of clotrimazole and isoconazole. *The British Journal of Venereal Diseases*, **1984**, *60* (1), 42–44.
- [60] Veraldi, S. Isoconazole nitrate: a unique broad-spectrum antimicrobial azole effective in the treatment of dermatomycoses, both as monotherapy and in combination with corticosteroids. *Mycoses*, **2013**, *56* (Suppl 1), 3–15.
- [61] Emsley, J. Chemia. Przewodnik po pierwiastkach, Wydawnictwa Naukowe PWN, **1997**
- [62] Daintith, J. (red.). A Concise Dictionary of Chemistry, Oxford University Press, **1991**
- [63] Malinowski, P.; Derzsi, M.; Mazej, Z.; Jagličić, Z.; Gawel, B.; Łasocha, W.; Grochala, W. Ag^{II}SO₄: A Genuine Sulfate of Divalent Silver with Anomalously Strong One-Dimensional Antiferromagnetic Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, **2010**, *49*, 1683–1686.
- [64] http://saltlakemetals.com/solubility_of_silver_compounds/, online, dostęp **2021-05-23**
- [65] Farmakopea Polska, Wydanie XI, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa, **2017**.
- [66] The International Pharmacopoeia - Ninth Edition. **2019**. Available online: <https://apps.who.int/phint/pdf/b/6.2.1.3.Ophthalmic-preparations.pdf>, dostęp **2021-05-23**
- [67] Balazs, D.J.; Triandafillu, K.; Wood, P.; Chevolot, Y.; van Delden, C.; Harms, H.; Hollenstein, C.; Mathieu, H.J. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. *Biomaterials*, **2004**, *25*, 2139–2151.
- [68] Alexander, J.W. History of the medical use of silver. *Surg. Infect. (Larchmt)*, **2009**, *10*, 289–292.
- [69] Li, Y.; Qin, T.; Ingle, T.; Yan, J.; He, W.; Yin, J.J.; Chen, T. Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 509–519.
- [70] Radko, L.; Stypuła-Trębas, S.; Posyniak, A.; Żyro, D.; Ochocki, J. Silver(I) Complexes of the Pharmaceutical Agents Metronidazole and 4-Hydroxymethylpyridine: Comparison of Cytotoxic Profile for Potential Clinical Application. *Molecules*, **2019**, *24*, 1949.
- [71] Farmakopea Polska II, Farmaceutyczny Instytut Wydawniczy Naczelnej Izby Aptekarskiej im.Prof. Bronisława Kojkowskiego, przedruk w r. **1946**, Warszawa, za zgodą Towarzystwa Przyjaciół Wydziałów i Oddziałów Farmaceutycznych przy Uniwersytetach w Polsce
- [72] Muszyński J. (red.), Farmakopea Polska III, PZWL, Warszawa, **1954**
- [73] Farmakopea Japońska, The Japanese Pharmacopoeia, Edycja XVII, English Version, THE MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, **2016**, https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/JP17_REV_1.pdf, dostęp **2021-05-25**
- [74] Bober, S.; Gobiec, K.; Kempisty, J.; Konieczny, Z.; Podlewski, J.; Wellenger, A. Informator Terapeutyczny do USL, **1959**, PZWL, Warszawa
- [75] Hill, W.R.; Pillsbury, D.M. *Argyria - The Pharmacology of Silver*. Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, **1939**.
- [76] Rollings, N.B. Georgia Arbuckle Fix: Silver dollar surgeon. *Am. Hist. Illus.* **1985**, *20*, 20–21.
- [77] Moore, D.L.; MacDonald, N.E. Canadian Paediatric Society, Infectious Diseases and Immunization Committee. Preventing ophthalmia neonatorum. *Paediatr. Child Health*, **2015**, *20*, 93–96.
- [78] Silva, L.R.; Gurgel, R.Q.; Lima, D.R.; Cuevas, L.E. Current usefulness of Credé's method of preventing neonatal ophthalmia. *Ann. Trop. Paediatr.* **2008**, *28*, 45–48.
- [79] Roe, A.L. Collosol argentum and its ophthalmic uses. *Br. Med. J.*, **1915**, *16*, 104.
- [80] Bernd, N.; Krug, H.F.; Height, M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, *45*(4), 1177–1183.
- [81] Щербakov, A.Б.; Корчак, Г.И.; Сурмашева, Е.В.; Скороход, И.М. Препараты серебра: вчера, сегодня, завтра. *Фармацевтический журнал*, **2006**, № 5, 45–57.
- [82] Родионов, П.П.; Третьяков, В.В. Колларгол и протаргол. Свойства. Коллоидное серебро. Физико-химические свойства. Применение в медицине. Новосибирск: Институт катализа им. Г. К. Борескова, СО РАН., **1992**, 1–14.

- [83] Костылева, Р.Н.; Бурмистров, В.А.; Полунина, О.А. Сравнительное изучение бактерицидной активности препаратов коллоидного серебра. 462 Серебро и висмут в медицине: материалы науч.-практ. конф., Новосибирск, **2005**, 312.
- [84] Polova, Ž.M. Дослідження антимікробної активності цитратів срібла та міді з метою розробки фармацевтичних препаратів, Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики, **2016**, №1(20), 71-74
- [85] Kaplan, A.; Akalin Ciftci, G.; Kutlu, H.M. Cytotoxic, anti-proliferative and apoptotic effects of silver nitrate against H-ras transformed 5RP7. *Cytotechnology*, **2016**, 68, 1727–1735.
- [86] Sahin-Bolukbasi, S.; Sahin, N.; Tahir, M.N.; Arici, C.; Cevik, E.; Gurbuz, N.; Cummings, B.S. Novel N-heterocyclic carbene silver(I) complexes: Synthesis, structural characterization, and anticancer activity. *Inorg. Chim. Acta*, **2018**, 486, 711–718.
- [87] Medici, S.; Peana, M.; Crisponi, G.; Nurchi, V.M.; Lachowicz, J.I.; Remelli, M.; Zoroddu, M.A. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 327, 349–359.
- [88] Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V.M.; Zoroddu, M.A. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 5923–5943.
- [89] Kalinowska-Lis, U.; Felczak, A.; Chęcińska, L.; Zawadzka, K.; Patyna, E.; Lisowska, K.; Ochocki, J. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of water-soluble silver(I) complexes of metronidazole drug and selected counter-ions. *Dalton Trans.* **2015**, 44, 8178–8189.
- [90] Kalinowska-Lis, U.; Szewczyk, E.M.; Chęcińska, L.; Wojciechowski, J.M.; Wolf, W.M.; Ochocki, J. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of silver(I) and copper(II) complexes of phosphate derivatives of pyridine and benzimidazole. *Chem. Med. Chem.* **2014**, 9, 169–176.
- [91] Kalinowska-Lis, U.; Felczak, A.; Chęcińska, L.; Szablowska-Gadomska, I.; Patyna, E.; Malecki, M.; Lisowska, K.; Ochocki, J. Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Silver(I) Complexes of Pyridine and (Benz)Imidazole Derivatives. X-ray Crystal Structure of $[\text{Ag}(\text{2,6-di}(\text{CH}_2\text{OH})\text{py})_2]\text{NO}_3$. *Molecules* **2016**, 28, 87.
- [92] Ochocki, J.; Kalinowska-Lis, U. EP 2848608B1, Silver complex compounds, method for their production and their use. European Patent Specification. Bulletin 2017/51. online: <https://register.epo.org/application?number=EP14174623> (dostęp 2019-05-18).
- [93] Kalinowska-Lis, U.; Felczak, A.; Chęcińska, L.; Lisowska, K.; Ochocki, J. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of silver(I) complexes of hydroxymethyl derivatives of pyridine and benzimidazole. *J. Organomet. Chem.* **2014**, 749, 394–399.
- [94] Chernousova, S.; Eppele, M. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 52, 1636–1653.
- [95] Kalishwaralal, K.; BarathManiKanth, S.; Pandian, S.R.K.; Deepak, V.; Gurunathan, S. Silver nano - A trove for retinal therapies. *J. Control. Release* **2010**, 145, 76–90.
- [96] Harges, J.; Von Eiff, C.; Streitwieser, A.; Balke, M.; Budny, T.; Henrichs, M.P.; Hauschild, G.; Ahrens, H. Reduction of periprosthetic infection with silver-coated mega-protheses in patients with bone sarcoma. *J. Surg. Oncol.* **2010**, 101, 389–395.
- [97] Butany, J.; Leask, R.L.; Desai, N.D.; Jegatheeswaran, A.; Silversides, C.; Scully, H.E.; Feindel, C. Pathologic analysis of 19 heart valves with silver-coated sewing rings. *J. Cardiovasc. Surg.* **2006**, 21, 530–538.
- [98] Rodrigues, T.S.; Zhao, M.; Yang, T.H.; Gilroy, K.D.; da Silva, A.G.M.; Camargo, P.H.C.; Xia, Y. Synthesis of Colloidal Metal Nanocrystals: A Comprehensive Review on the Reductants. *Chemistry* **2019**, 25, 11791.
- [99] Gurunathan, S.; Han, J.W.; Kwon, D.N.; Kim, J.H. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, 9, 373.
- [100] Jha, A.K.; Prasad, K.; Prasad, K.; Kulkarni, A.R. Plant system: Nature's nanofactory. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2009**, 73, 219–223.
- [101] Reina, G.; Peng, S.; Jacquemin, L.; Andrade, A.F.; Bianco, A. Hard Nanomaterials in Time of Viral Pandemics. *ACS Nano* **2020**, 14, 9364–9388.
- [102] Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, 275, 177–182.
- [103] Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J.; Lee, H.J.; Kim, S.H.; Park, Y.K.; Park, Y.H.; Hwang, C.Y.; et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* **2007**, 3, 95–101.
- [104] Rai, M.K.; Deshmukh, S.D.; Ingle, A.P.; Gade, A.K. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, 112, 841–852.
- [105] Akter, M.; Sikder, M.T.; Rahman, M.M.; Ullah, A.K.M.A.; Hossain, K.F.B.; Banik, S.; Hosokawa, T.; Saito, T.; Kurasaki, M. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J. Adv. Res.* **2017**, 9, 1–16.
- [106] Gaikwad, S.; Ingle, A.; Gade, A.; Rai, M.; Falanga, A.; Incoronato, N.; Russo, L.; Galdiero, S.; Galdiero, M. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *Int. J. Nanomed.* **2013**, 8, 4303–4314.

- [107] Sivasankarapillai, V.S.; Pillai, A.M.; Rahdar, A.; Sobha, A.P.; Das, S.S.; Mitropoulos, A.C.; Mokarrar, M.H.; Kyzas, G.Z. On Facing the SARS-CoV-2 (COVID-19) with Combination of Nanomaterials and Medicine: Possible Strategies and First Challenges. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 852.
- [108] Li, Y.; Lin, Z.; Zhao, M.; Xu, T.; Wang, C.; Hua, L.; Wang, H.; Xia, H.; Zhu, B. Silver Nanoparticle Based Codelivery of Oseltamivir to Inhibit the Activity of the H₁N₁ Influenza Virus through ROS-Mediated Signaling Pathways. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 24385–24393.
- [109] Lee, Y.-T.; Ko, E.-J.; Hwang, H.S.; Lee, J.S.; Kim, K.-H.; Kwon, Y.-M.; Kang, S.-M. Respiratory syncytial virus-like nanoparticle vaccination induces long-term protection without pulmonary disease by modulating cytokines and T-cells partially through alveolar macrophages. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 4491–4505.
- [110] Nadworny, P.L.; Wang, J.; Tredget, E.E.; Burrell, R.E. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine* **2008**, *4*, 241–251.
- [111] Bhol, K.C.; Schechter, P.J. Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **2005**, *152*, 1235–1242.
- [112] Bhol, K.C.; Schechter, P.J. Effects of nanocrystalline silver (NPI 32101) in a rat model of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* **2007**, *52*, 2732–2742.
- [113] Modak, S.M.; Sampath, L.; Fox, C.L.J. Combined topical use of silver sulfadiazine and antibiotics as a possible solution to bacterial resistance in burn wounds. *J. Burn Care Rehabil.* **1988**, *9*, 359–363.
- [114] FlorCruz, N.V.; Evans, J.R. Medical interventions for fungal keratitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, *9*, CD004241.
- [115] Mohan, M.; Gupta, S.K.; Kalra, V.K.; Vajpayee, R.B.; Sachdev, M.S. Topical silver sulphadiazine - A new drug for ocular keratomycosis. *Br. J. Ophthalmol.* **1988**, *72*, 192–195.
- [116] Rai, M.K.; Deshmukh, S.D.; Ingle, A.P.; Gade, A.K. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 841–852.
- [117] Mizerski, W. Tablice chemiczne, Wydawnictwo Adamantan, Warszawa, **2004**
- [118] Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; Gaus, P.L. Chemia nieorganiczna. Podstawy. Wydawnictwo Naukowe PWN, **1998**
- [119] Lee, J.D. Związła chemia nieorganiczna. Wydawnictwa Naukowe PWN, **1999**
- [120] Buryńska, N.M. Zahalna khimia. Tlumachnyi slovník-dovidnik. Wydawnictwo Perun, Kijów, **2010**
- [121] Trzaska, S. Cisplatin. *Chemical & Engineering News*, **2005**, *83*(25), 52.
- [122] Carpenter, D.P. *Reputation and power: organizational image and pharmaceutical regulation at the FDA*. Princeton, NJ: Princeton University Press, **2010**, ISBN 978-0-691-14180-0.
- [123] Approval Summary for cisplatin for Metastatic ovarian tumors. *FDA Oncology Tools*. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 1978, online: <https://web.archive.org/web/20080208232952/http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/summary.cfm?ID=73>, dostęp **2021-05-29**
- [124] Wiltshaw, E. Cisplatin in the treatment of cancer. *Platinum Metals Review*, **1979**, *23*(3), 90–98.
- [125] Drasch, G.; Gath, H.J.; Heissler, E.; Schupp, I.; Roeder, G. Silver Concentrations in Human Tissues. Their Dependence on Dental Amalgam and Other Factors, *Trace Elem. Med. Biol.*, **1995**, *9*, 82–87.
- [126] Goyer, R.A.; Clarkson, T.W. Klaassen, C.D. (Ed.). Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, fifth ed., McGraw-Hill Health Professions Division, **1996**, ISBN 71054766.
- [127] Hadrup, N.; Lam, H.R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver - a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *68*, 1–7.
- [128] Lencastre, A.; Lobo, M.; João, A. Argyria - Case report. *An. Bras. Dermatol.* **2013**, *88*, 413–416.
- [129] Thati, B.; Noble, A.; Creaven, B.S.; Walsh, M.; McCann, M.; Kavanagh, K.; Devereux, M.; Egan, D.A. In vitro anti-tumour and cyto-selective effects of coumarin-3-carboxylic acid and three of its hydroxylated derivatives, along with their silver-based complexes, using human epithelial carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* **2007**, *248*, 321–331
- [130] Zhu, H.L.; Zhang, X.-M.; Liu, X.Y.; Wang, X.J.; Liu, G.F.; Usman, A.; Fun, H.K. Clear Ag–Ag bonds in three silver(I) carboxylate complexes with high cytotoxicity properties, *Inorg. Chem. Commun.*, **2003**, *6*, 1113–1116.
- [131] Liu, J.J.; Galetti, P.; Farr, A.; Maharaj, L.; Samarasinha, H.; McGeachan, A.C.; Baguley, B.C.; Bowen, R.J.; Berners-Price, S.J.; McKeage, M.J. In vitro antitumour and hepatotoxicity profiles of Au(I) and Ag(I) bidentate pyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake., *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 303–310.
- [132] Hindi, K.M.; Panzner, M.J.; Tessier, C.A.; Cannon, C.L.; Youngs, W.J. The medicinal applications of imidazolium carbene-metal complexes., *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3859–3884.

- [133] Teyssot, M.L.; Jarrousse, A.S.; Manin, M.; Chevy, A.; Roche, S.; Norre, F.; Beaudoin, C.; Morel, L.; Boyer, D.; Mahiou, R.; Gautier, A. Metal-NHC complexes: a survey of anti-cancer properties, *Dalton Trans.* **2009**, 35, 6894–6902.
- [134] Rubbiani, R.; Kitanovic, I.; Alborzinia, H.; Can, S.; Kitanovic, A.; Onambebe, L.A.; Stefanopoulou, M.; Geldmacher, Y.; Sheldrick, W.S.; Wolber, G.; Prokop, A.; Wolf, S.; Ott, I. Benzimidazol-2-ylidene Gold(I) Complexes Are Thioredoxin Reductase Inhibitors with Multiple Antitumor Properties, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 8608–8618.
- [135] Banti, C.N.; Hadjikakou, S.K. Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver(I) compounds. *Metallomics* **2013**, 5, 569–596.
- [136] Liu, X.Y.; Zhu, H.L. Strong silver-silver interactions in three silver(I) carboxylate complexes with high cytotoxicity properties. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Nano Met. Chem.* **2005**, 35, 325–332.
- [137] Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V.M.; Lachowicz, J.I.; Crisponi, G.; Zoroddu, M.A. Noble metals in medicine: Latest advances, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, 284, 329–350.
- [138] Massoud, A.A.; Langer, V.; Gohar, Y.M.; Abu-Youssef, M.A.M.; Jänis, J.; Lindberg, G.; Hansson, K.; Öhrström, L. Effects of different substituents on the crystal structures and antimicrobial activities of six Ag(I) quinoline compounds, *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 4046–4060.
- [139] Ortego, L.; Meireles, M.; Kasper, C.; Laguna, A.; Villacampa, M.D.; Gimeno, M.C. Group 11 complexes with amino acid derivatives: Synthesis and antitumoral studies, *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 156, 133–144.
- [140] <https://www.drugs.com/monograph/sulfadiazine.html>, dostęp **2021-05-30**
- [141] Stuart, M.C.; Kouimtzis, M.; Hill, S.R (editors). *WHO Model Formulary* **2008**. World Health Organization. 126, 205. ISBN 9789241547659.
- [142] Baenzinger N.C.; Struss A.W. Crystal structure of 2-sulfanilamidopyrimidinesilver(I), *Inorganic Chemistry*, **1976**, 15(8), 1807-1809.
- [143] Ustawa Prawo Farmaceutyczne, Dz. U. z **2020** r. poz. 944, 1493, 2112, z 2021 r. poz. 97.
- [144] Ustawa o zawodzie farmaceuty, Dz.U. z **2021** r., poz.97.
- [145] Jachowicz, R. (red.). Receptura apteczna. Sporządzanie leków jałowych i niejłowych. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, Wyd.1, **2021**
- [146] Olszewski, Z. Technika przyrządzania leków, PZWL, Warszawa, **1983**
- [147] <https://ziololek.pl/produkt/euceryna-bezwodna-s-05-kg/> . dostęp **2021-06-20**
- [148] <https://web.archive.org/web/20181014204045/http://amara.pl/content/uploads/2015/05/euceryna-bezwodna-II-amara1.pdf> . dostęp **2021-06-20**
- [149] <https://www.aptekarzpolski.pl/wiedza/monografia-euceryny-w-farmakopei-polskiej> . dostęp **2021-06-20**
- [150] Krówczynski, L. Ćwiczenia z receptury. Podręcznik dla studentów farmacji., wyd.III, PZWL, Warszawa, **1981**
- [151] <https://actifarm.pl/produkty-podloza-celugel/> dostęp **2021-06-22**
- [152] Muller, R.H.; Hildebrand, G.E. (red.). Technologia nowoczesnych postaci leków, PZWL, Warszawa **1998**
- [153] <https://www.aptekarzpolski.pl/wiedza/hydrozele-w-preparatyce-farmaceutycznej>, dostęp **2021-07-04**
- [154] Janicki, S.; Fiebig, A.; Sznitowska, M.; Achmatowicz, T. Farmacja stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji. Warszawa, Wyd. Lekarskie PZWL, **2003**
- [155] Khutoryanskiy, V.V.; Staikos, G. Hydrogen-bonded Interpolymer Complexes: Formation, Structure And Applications, World Scientific, **2009**
- [156] Nurkeeva, Z.S.; Khutoryanskiy, V.V.; Mun, G.A.; Sherbakova, M.V.; Ivaschenko, A.T.; Aitkhozhina, N.A. Polycomplexes of poly(acrylic acid) with streptomycin sulfate and their antibacterial activity, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2004**, 57(2), 245-249
- [157] Baker, M.I.; Walsh, S.P.; Schwartz, Z.; Boyan, B.D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res Part B*, **2012**, 100B, 1451–1457.
- [158] McDonald, M.; D'Aversa, G.; Perry, H.D.; Wittmann, J.R.; Nelinson, D.S. Correlating Patient-Reported Response to Hydroxypropyl Cellulose Ophthalmic Insert (LACRISERT®) Therapy with Clinical Outcomes: Tools for Predicting Response, *Current Eye Research*, **2010**, 35(10), 880-887.
- [159] Luchs, J.; Nelinson, D.; Macy, J. LAC-07-01 Study Group Efficacy of Hydroxypropyl Cellulose Ophthalmic Inserts (LACRISERT) in Subsets of Patients With Dry Eye Syndrome: Findings From a Patient Registry, *Cornea*, **2010**, 29(12), 1417-1427.

- [160] Koffler, B.H.; McDonald, M.; Nelinson, D. LAC-07-01 Study Group Improved Signs, Symptoms, and Quality of Life Associated With Dry Eye Syndrome: Hydroxypropyl Cellulose Ophthalmic Insert Patient Registry, *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, **2010**, 36(3), 170-176.
- [161] Sandford-Smith, J. Eye Diseases In Hot Climates. ELBS British Government, **1995**
- [162] <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/006144095/publication/US4438264A?q=pn%3DUS4438264>, dostęp **2021-07-04**
- [163] <http://www.amitcellulose.com/methyl-hydroxyethyl-cellulose.html>, dostęp **2021-07-04**
- [164] <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/026982530/publication/US3740421A?q=pn%3DUS3740421>, dostęp **2021-07-04**
- [165] <https://www.crodahealthcare.com/en-gb/products-and-applications/product-finder#>, dostęp **2021-07-04**
- [166] <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Astragalus+adscendens>, dostęp **2021-07-04**
- [167] <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=433295>, dostęp **2021-07-04**
- [168] Chambers, E. (ed.) (1728). "Diatragacanth". *Cyclopædia, or an Universal Dictionary of Arts and Sciences*. 1 (1st ed.). James and John Knapton, et al. p. 209.
- [169] Aptekarz Polski, Prosta receptura – sprawdź swoją wiedzę, Kasperek-Nowakiewicz R., ISSN 1899-8445, nr 14, maj **2018**
- [170] karty charakterystyki produktu leczniczego, www.urpl.gov.pl, dostęp **2021-07-19**
- [171] Fun, H.K.; Jebas, S.R.; Balasubramanian, T. Bis[1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitro-1H-imidazole-*kN*³]silver(I) nitrate. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, **2008**, 64(5), m668–m669.
- [172] CrysAlis PRO; Ver. 1.171.38.41q; Rigaku: Oxford, UK, **2015**
- [173] Sheldrick, G.M. SHELXT-Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2015**, 71, 3–8.
- [174] Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2015**, 71, 3–8.
- [175] Spackman, M.A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld Surface Analysis. *CrystEngComm*. **2009**, 11, 19–32.
- [176] Turner, M.J.; McKinnon, J.J.; Wol, S.K.; Grimwood, D.J.; Spackman, P.R.; Jayatilaka, D.; Spackman, M.A. CrystalExplorer17, University of Western Australia. 2017. Available online: <http://crystalexplorer.scb.uwa.edu.au/> (accessed on 23 November **2020**)
- [177] Sosnowska, K.; Winnicka, K. Ocena trwałości klotrimazolu w hydrożelach wykonanych na bazie Carbopolu 980 oraz hydroksyetylocelulozy, *Farmacja Polska*, **2010**, 66(2), 87-90.
- [178] Departament Farmakopei. *Farmakopea Polska*, wyd. 11; Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych: Warszawa, Polska, **2017**, 4482.
- [179] Żesławska, E.; Korona-Główniak, I.; Szczesio, M.; Olczak, A.; Żylewska, A.; Tejchman, W.; Malm, A. Structural analysis and antimicrobial activity of 2[1H]-pyrimidinethione/selenone derivatives, *J. Mol. Struct.* **2017**, 1142, 261-266.
- [180] Radko, L.; Minta, M. Cytotoxicity of some nitroimidazole derivatives - comparative studies on human and rat hepatoma cell lines. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. **2012**, 56, 579–584.
- [181] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63.
- [182] Borenfreund, E.; Puerner, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **1985**, 24, 119–124.
- [183] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- [184] Korzeniewski, C.; Calleawert, D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Method.* **1983**, 64, 313–320.
- [185] Pigge, F.C.; Burgard, M.D.; Rath, N.P. 1,3,5-Triarylbenzenes as Ligands: Synthesis and Characterization of Three New Coordination Polymers from the Tritopic Ligand 1,3,5-Tris(4,4',4''-tricyanobenzoyl)benzene and Ag(I)X (X) OSO₂CF₃, BF₄, or PF₆). *Cryst. Growth Des.* **2003**, 3, 331-333.
- [186] McKinnon, J.J.; Jayatilaka, D.; Spackman, M.A. Towards quantitative analysis of intermolecular interactions with Hirshfeld surfaces. *Chem. Commun.* **2007**, 37, 3814-3816.
- [187] Spek, A.L. Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **2009**, 65, 148-155/
- [188] Macrae, C.F.; Bruno, I.J.; Chisholm, J.A.; Edgington, P.R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P.A. New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, 41, 466–470.

- [189] O'Donnell, F.; Smyth, T.J.P.; Ramachandran, V.N.; Smyth W.F. A study of the antimicrobial activity of selected synthetic and naturally occurring quinolines. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *35*(1), 30–38.
- [190] Starek, M.; Dąbrowska, M.; Chebda, J.; Żyro, D.; Ochocki, J. Stability of Metronidazole and Its Complexes with Silver(I) Salts under Various Stress Conditions. *Molecules* **2021**, *26*, 3582.
- [191] Radko, L.; Minta, M.; Stypuła-Trębas, S. Influence of fluoroquinolones on viability of Balb/c 3T3 and HepG2 cells. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **2013**, *57*, 599–606.
- [192] Lozynskyi, A.; Zimenkovsky, B.; Radko, L.; Stypuła-Trębas, S.; Roman, O.; Gzella, A.K.; Lesyk, R. Synthesis and cytotoxicity of new thiazolo[4,5-b]pyridine-2(3H)-one derivatives based on α,β -unsaturated ketones and α -ketoacids. *Chem. Pap.* **2018**, *72*, 669–681.
- [193] Eisenbrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B.J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot, J.C.; Pieters, R.; et al. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 193–236.
- [194] Weyermenn, J.; Lohmann, D.; Zimmer, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* **2005**, *288*, 369–376.
- [195] Ramirez, T.; Strigun, A.; Verlohner, A.; Huener, H.A.; Peter, E.; Herold, M.; Bordag, N.; Mellert, W.; Walk, T.; Spitzer, M.; et al. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. *Arch. Toxicol.* **2017**, *92*, 893–906.
- [196] Natoli, M.; Leoni, B.D.; D'Agnano, I.; Zucco, F.; Felsani, A. Good Caco-2 cell culture practices, *Toxicology in Vitro* **2012**, *26*(8), 1243–1246.
- [197] Medvetz, D.A.; Hindi, K.M.; Panzner, M.J.; Ditto, A.J.; Yun, Y.H.; Youngs, W.J. Anticancer Activity of Ag(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes Derived from 4,5-Dichloro-1H-Imidazole. *Met. Based Drugs* **2008**, *2008*, 384010.
- [198] Krishnaraj, C.; Muthukumar, P.; Ramachandran, R.; Balakumaran, M.D.; Kalaichelvan, P.T. Acalypha indica Linn: Biogenic synthesis of silver and gold nanoparticles and their cytotoxic effects against MDA-MB-231, human breast cancer cells. *Biotechnol. Rep. (Amst.)* **2014**, *4*, 42–49.
- [199] Kaplan, A.; Akalin Ciftci, G.; Kutlu, H.M. The apoptotic and genomic studies on A549 cell line induced by silver nitrate. *Tumour. Biol.* **2017**, *39*, 1–12.
- [200] Brook I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. *J Infect Chemother.* **2016**, *22*(1), 1–13.
- [201] Christaki, E.; Marcou, M.; Tofarides, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol.* **2020**, *88*(1), 26–40.
- [202] Banti, C.N.; Giannoulis, A.D.; Kourkoumelis, N.; Owczarzak, A.M.; Poyraz, M.; Kubicki, M.; Charalabopoulos, K.; Hadjidakou, S.K. Mixed ligand–silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis. *Metallomics* **2012**, *4*, 545–560.
- [203] Banti, C.N.; Kyros, L.; Geromichalos, G.D.; Kourkoumelis, N.; Kubicki, M.; Hadjidakou, S.K. A novel silver iodide meta-lo-drug: experimental and computational modelling assessment of its interaction with intracellular DNA, lipoxygenase and glutathione. *Eur J Med Chem* **2014**, *17*, 388–399.
- [204] Hickey, J.L.; Ruhayel, R.A.; Barnard, P.J.; Baker, M.V.; Berners-Price, S.J.; Filipovska, A. Mitochondria-targeted chemotherapeutics: the rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *J AmChem Soc*, **2008**, *130*, 12570–12571.
- [205] Nobili, S.; Mini, E.; Landini, I.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Medicinal Research Reviews* **2009**, *30*, 550–580.
- [206] Ott, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 1670–1681.
- [207] Berners-Price, S.J.; Filipovska, A. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics*, **2011**, *3*, 863–873.
- [208] Azócar, M.I.; Gómez, G.; Velásquez, C.; Abarca, R.; Kogan, M.J.; Páez, M. Antibacterial, kinetics and bacteriolytic properties of silver(I) pyridinedicarboxylate compounds. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *37*, 356–362.
- [209] Hindi, K.M.; Siciliano, T.J.; Durmus, S.; Panzner, M.J.; Medvetz, D.A.; Reddy, D.V.; Hogue, L.A.; Hovis, C.E.; Hilliard, J.K.; Mallet, R.J.; Tessier, C.A.; Cannon, C.L.; Youngs, W.J. Synthesis, Stability, and Antimicrobial Studies of Electronically Tuned Silver Acetate N-Heterocyclic Carbenes *J. Med. Chem.* **2008**, *51*(6), 1577–1583.
- [210] Velluti, F.; Mosconi, N.; Acevedo, A.; Borthagaray, G.; Castiglioni, J.; Faccio, R.; Back, D.F.; Moyna, G.; Rizzotto, M.; Torre, M.H. Synthesis, characterization, microbiological evaluation, genotoxicity and synergism tests of new nano silver complexes with sulfamoxole: X-ray diffraction of $[Ag_2(SMX)_2] \cdot DMSO$ *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 58–69.
- [211] Ferreira, M.B.; Myiagi, S.; Nogales, C.G.; Campos, M.S.; Lage –Marques, J.L. Time- and concentration- dependent cytotoxicity of antibiotics used in endodontic therapy. *J. Appl. Oral Sci.* **2010**, *18*, 259–263.
- [212] Salahuddin, A.; Agarwal, S.M.; Avcilla, F.; Azam, A. Metronidazole thiosalicylate conjugates: Synthesis, crystal structure, docking studies and antiamoebic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *17*, 5694–5699.

- [213] Hausen, M.A.; Menna-Barreto, R.F.S.; Lira, D.C.; de Carvalho, L.; Barbosa, H.S. Synergic effect of metronidazole and pyrantelpamoate on *Giardia lamblia*. *Parasitol. Int.* **2011**, *1*, 54-58.
- [214] Dz. U. Nr 200, poz. 1679, z 2004 r. Nr 240, poz. 2407 oraz z 2005 r. Nr 157, poz. 1314
- [215] Korting, H.C.; Schöllmann, C. Current topical and systemic approaches to treatment of rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* **2009**, *23*, 876-82.
- [216] Nielsen, P.G. A double-blind study of 1% metronidazole cream versus systemic 42 oxytetracycline therapy for rosacea. *Br J Dermatol* **1983**, *109*, 63-65.
- [217] Ozturkcan, S.; Ermertcan, A.T.; Sahin, M.T.; Afsar, F.S. Efficiency of benzoyl peroxide-erythromycin gel in comparison with metronidazole gel in the 54 treatment of acne rosacea. *J Dermatol* **2004**, *31*, 610-617.
- [218] Wieczorkowska-Tobis, K.; Grześkowiak, E.; Józwiak, A. *Farmakoterapia geriatryczna*, Akademia Medycyny, **2008**
- [219] Kostka-Trąbka, E.; Woroń, J. *Interakcje leków w praktyce klinicznej*, PZWL, **2016**
- [220] Neumann-Podczaska, A.; Wieczorkowska-Tobis, K.; Grześkowiak, E. Kryteria potencjalnie niepoprawnej farmakoterapii w geriatрії, Akademia Medycyny, **2008**
- [221] Tymiński, R.; Woroń, J. (red). *Niekorzystne interakcje leków. Aspekty kliniczne i prawne*, Medical Tribune Polska, **2020**
- [222] van der Bijl, P.; van Eyk, A.D.; Seifart, H.I.; Meyer, D. In vitro transcorneal penetration of metronidazole and its potential use as adjunct therapy in *Acanthamoeba keratitis*. *Cornea.* **2004**, *23*, 386-389.
- [223] Kaczyńska-Dyba, E. *Technologia kropli do oczu z metronidazolem. Rozprawa doktorska*. Poznań **2006**
- [224] Hardten, D.R.; Lima, P.H.; Schmidt, B.J.; Nelson, J.D. In vitro evaluation of the effects of metronidazole on rabbit corneal epithelial cells. *Cornea* **1994**, *13*, 259-263.
- [225] Claros-Chacaltana, F.D.Y.; Aldrovani, M.; Kobashigawa, K.K. et al. Effect of metronidazole ophthalmic solution on corneal neovascularization in a rat model. *Int Ophthalmol.* **2019**, *39*, 1123-1135.
- [226] Abreu Caligaris, L.S.; Medina, N.H.; Durkin, S.R.; Haro-Muñoz, E.; Chinen, N.H. Assessment of the current ocular health practices within neonatal units in the City of São Paulo, Brazil. *Ophthalmic Epidemiol.* **2010**, *17*, 333-337.
- [227] Chen, H.; Yang, J.; Sun, L.; Zhang, H.; Guo, Y.; Qu, J.; Jiang, W.; Chen, W.; Ji, J.; Yang, Y.W.; et al. Synergistic Chemotherapy and Photodynamic Therapy of Endophthalmitis Mediated by Zeolitic Imidazolate Framework-Based Drug Delivery Systems. *Small* **2019**, *15*, e1903880.
- [228] Ye, Y.; He, J.; Qiao, Y.; Qi, Y.; Zhang, H.; Santos, H.A.; Zhong, D.; Li, W.; Hua, S.; Wang, W.; et al. Mild temperature photothermal assisted anti-bacterial and anti-inflammatory nanosystem for synergistic treatment of post-cataract surgery endophthalmitis. *Theranostics* **2020**, *10*, 8541-8557.
- [229] Anwar, A.; Abdalla, S.A.O.; Aslam, Z.; Shah, M.R.; Siddiqui, R.; Khan, N.A. Oleic acid-conjugated silver nanoparticles as efficient antiamoebic agent against *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 2295-2304.
- [230] Anwar, A.; Siddiqui, R.; Raza Shah, M.; Khan, N.A. Antidiabetic Drugs and Their Nanoconjugates Repurposed as Novel Antimicrobial Agents against *Acanthamoeba castellanii*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 713-720.
- [231] Sitruk-Ware, R. Transdermal application of steroid hormones for contraception, *J.Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **1995**, *53*, 247-251.
- [232] Wertz, P.W. The nature of the epidermal barrier: Biochemical aspects, *Advan Drug Delivery Rev*, **1996**, *18*, 283-294.
- [233] Fartasch, M. The nature of the epidermal barrier: Structural aspects, *Advan Drug Delivery Rev*, **1996**, *18*, 273-282.
- [234] Walker, R.B.; Sith, E.W. The role of percutaneous penetration enhancers, *Advan Drug Delivery Rev*, **1996**, *18*, 295-301.
- [235] Santus, L.M. Ultrasonic transdermal drug delivery system. Endodermic Medical Tech. Comp. U.S.A., World: PCT/US93/09798 (WO 94/08655), **1994**
- [236] Ghosh, T.K.; Banga, A.K.; Methods of Enhancement of Transdermal Drug Delivery: Part II A. Chemical Permeation Enhancers, *Pharm. Technol. Eur.* **1993**, *5*, 62-86.
- [237] Williams, A.C.; Barry, B.W. Skin absorption enhancers, *CRC*, **1992**, *9*, 305-353.
- [238] Noven Pharmaceuticals, I. Transdermal device containing polyvinylpyrrolidone as solubility enhancer. Noven Pharmac. Inc. U.S.A., World: PCT/US95/00022 (WO 95/18603), **1995**
- [239] Wu, A. Synthesis and characterisation ruthenium maltolato, sulfoxide, and nitroimidazole complexes as potential anticancer agents, praca magisterska, The University of British Colombia, 2002

11. Wykaz publikacji, komunikatów zjazdowych i materiałów konferencyjnych, udziałów w konferencjach i nagród oraz udział w projekcie badawczym

11.1. Publikacje bezpośrednio związane z tematem rozprawy doktorskiej

(łączny IF 24,247; punkty MNiSW 460)

1. Starek, Małgorzata; Dąbrowska, Monika; Chebda, Joanna.; **Żyro, Dominik**; Ochocki, Justyn: Stability of Metronidazole and Its Complexes with Silver(I) Salts under Various Stress Conditions. *Molecules* **2021**, 26, 3582. DOI:10.3390/molecules26123582, MNiSW₂₀₂₁ = **100 punktów**, IF₂₀₂₁ = **4,411 – oryginalny**
2. Waszczykowska, Arleta; **Żyro, Dominik**; Ochocki, Justyn; Jurowski, Piotr: Clinical Application and Efficacy of Silver Drug in Ophthalmology: A Literature Review and New Formulation of EYE Drops with Drug Silver (I) Complex of Metronidazole with Improved Dosage Form, *Biomedicines*, MDPI, vol. 9, nr 2, **2021**, s. 1-12, DOI:10.3390/biomedicines9020210, MNiSW₂₀₂₁ = **20 punktów**, IF₂₀₂₁ = **6,081 – przeglądowy**
3. Waszczykowska, Arleta Maria; **Żyro, Dominik Karol**; Jurowski, Piotr; Ochocki, Justyn: Effect of treatment with silver(I) complex of metronidazole on ocular rosacea: design and formulation of new silver drug with potent antimicrobial activity, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **2020**, s. 1-7, DOI:10.1016/j.jtemb.2020.126531, MNiSW₂₀₂₀ = **100 punktów**, IF₂₀₂₀ = **3,849 – oryginalny**

4. **Żyro, Dominik**; Śliwińska, Agnieszka; Szymczak-Pajor, Izabela; Stręk, Małgorzata; Ochocki, Justyn: Light Stability, Pro-Apoptotic and Genotoxic Properties of Silver (I) Complexes of Metronidazole and 4-Hydroxymethylpyridine against Pancreatic Cancer Cells In Vitro, *Cancers*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), nr 12, **2020**, s. 1-17, DOI:10.3390/cancers12123848, **MNiSW₂₀₂₀ = 140 punktów, IF₂₀₂₀ = 6,639 – oryginalny**

5. Radko, Lidia; Stypuła-Trębas, Sylwia; Posyniak, Andrzej; **Żyro, Dominik**; Ochocki, Justyn: Silver(I) complexes of the pharmaceutical agents metronidazole and 4-hydroxymethylpyridine: comparison of cytotoxic profile for potential clinical application, *Molecules*, vol. 24, nr 10, **2019**, E1949-E1949, DOI:10.3390/molecules24101949, **MNiSW₂₀₁₉ = 100 punktów, IF₂₀₁₉ = 3,267 – oryginalny**

11.2. Komunikaty zjazdowe i materiały konferencyjne

1. **Żyro, Dominik**; Stręk, Małgorzata; Śliwińska, Agnieszka; Chęcińska, Lilianna; Kusz, Joachim; Ochocki, Justyn: SYNTHESIS, SPECTROSCOPY AND BIOLOGICAL EVALUATION OF SILVER(I) COMPLEXES WITH METRONIDAZOLE. X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF $[Ag_2(MTZ)_4]SO_4$, w: *Liki-lûdinî. Sučasni problemi farmakoterapiï i pryznačennâ likars'kih zasobiv : materialî IV Mižnarodnoï naukovo-praktičnoï konferencii : 12-13 bereznâ 2020 roku m. Kharkiv. T. 1 / Kotvic'ka A. A. (red.), Liki-lûdinî. Sučasni problemi farmakoterapiï i pryznačennâ likars'kih zasobiv, 2020, National University of Pharmacy, Kharkov, s. 35-43 – material konferencyjny*

2. **Żyro, Dominik**; Waszczykowska, Arleta; Jurowski, Piotr; Ochocki, Justyn: HIGH EFFECTIVITY OF SILVER (I) COMPLEX WITH METRONIDAZOLE. FORMULATIONS OF OPHTHALMIC DOSAGE FORMS w: *Liki-lûdinî. Sučasni problemi farmakoterapiï i pryznačennâ likars'kih zasobiv : materialî V Mižnarodnoï naukovo-praktičnoï konferencii : 11-12 bereznâ 2021 roku m. Kharkiv. Kotvic'ka A. A. (red.), Liki-lûdinî. Sučasni problemi farmakoterapiï i pryznačennâ likars'kih zasobiv,*

2021, National University of Pharmacy, Kharkov, s. 165-168 – **material konferencyjny**

11.3. Inne publikacje

1. Hanna Panfilova, Anzhela Olkhovska, Lyubov Boboshko, Gennadii Iurchenko, Maksym Bandura, and **Dominik Żyro**. Results of a Comparative Analysis of the Dynamics of Healthcare Expenditure from the GDP of Countries, Cash Payments from Families and State Expenditures on Healthcare in Ukraine, Poland and in the WHO European Countries. ScienceRise: Pharmaceutical Science, PC Technology Center, nr 1, **2021**, s. 17–24, DOI:10.15587/2519-4852.2021.225443 – **MNiSW₂₀₂₁ = 20 punktów – oryginalny**
2. Panfilova Hanna, Matushchak Marta, Kostyshyn Liliia, Skrynychuk Olha, **Żyro Dominik**, Tsurikova Oksana: Assessment of the state of the epidemiological situation of lymphogranulomatosis in different regions of Ukraine as an important component in the development of directions for improvement of pharmaceutical support of oncohematological patients, ScienceRise: Pharmaceutical Science, PC Technology Center, nr 6, **2020**, s. 19-28, DOI:10.15587/2519-4852.2020.221043, **MNiSW₂₀₂₀ = 5 punktów – oryginalny**

11.4. Udział w konferencjach

1. **2020** Tytuł konferencji: IV International Scientific and Practical Conference «Medical drugs for humans. Modern issues of pharmacotherapy and prescription of medicine», dedicated to the 35th anniversary of the department of Pharmacotherapy
2. **2021** Tytuł konferencji: V International Scientific and Practical Conference «Medical drugs for humans. Modern issues of pharmacotherapy and prescription of medicine»

11.5. Nagrody

Nagroda I stopnia za cykl publikacji pt.: "Analiza cytotoksyczności kompleksów srebra z aktywnymi substancjami farmaceutycznymi i analiza rentgenowska nowego polimorfu bioliganda 3-aminoflawonu" IF 6,120 – 2020 rok

11.6. Udział w projektach

Wykonawca w projekcie NCN „OPUS 8” pn.: Kompleksy srebra(I) z pochodnymi imidazolu i pirydyny - synteza, charakterystyka strukturalna, aktywność mikrobiologiczna i cytotoksyczna, kier. Prof. dr hab.n.farm. Justyn Ochocki, 2014/15/B/NZ7/00944