



Wrocław, 15.11.2021

**Prof. dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka**

Zespół Biologicznej Chemii Nieorganicznej

e-mail: [elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl](mailto:elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl)**RECENZJA**

rozprawy doktorskiej mgr farm., inż. Dominika Żyro

pt. „Synteza, charakterystyka spektroskopowa i rentgenostrukturalna kompleksów srebra(I) z metronidazolem wykazujących aktywność przeciwbakteryjną i cytotoksyczną”  
wykonanej w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej, Katedrze Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem Prof. dr hab. n. farm. Justyna Ochockiego i dr n. farm. Małgorzaty Fabijańskiej

Problem lekooporności przez szereg mikroorganizmów wzrasta na całym świecie, stając się coraz poważniejszym zagrożeniem dla globalnego zdrowia publicznego. Wyjątkowo wysokie wskaźniki infekcji szpitalnych spowodowanych przez bakterie o wysokiej oporności, takie jak np. odporne na metycylinę szczepy gronkowca *Staphylococcus aureus* (MRSA) oraz bakterie Gram-ujemne odporne na wiele leków stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. Również częstość występowania opornych na leki infekcji grzybiczych zwiększyła się znacząco, co staje się poważnym problemem medycznym, nie ograniczonym jedynie do pacjentów z obniżoną odpornością. Nowe mechanizmy oporności pojawiają się i rozprzestrzeniają globalnie, co sprawia, że pospolite infekcje stają się nieuleczalne, powodując wzrost śmiertelności lub niepełnosprawność pacjentów. Wobec powyższego, obecnie bardzo intensywnie poszukuje się nowych, wysoce specyficznych leków, które pokonają oporność wśród mikroorganizmów.

Związki koordynacyjne srebra z szeregiem różnych ligandów (np. N-heterocyklicznych i innych) posiadają szereg właściwości, od przeciwbakteryjnych, przeciwzapalnych i antyseptycznych, po przeciwnowotworowe. Posiadają również potencjał jako związki zdolne do pokonania lekooporności i odpornych na antybiotyki bakterii, grzybów i pasożytów. Pomimo dużej liczby badań podejmowanych w tej dziedzinie i syntezy kilku nowych kompleksów srebra, większość z nich nadal pozostaje w sferze badań akademickich, a niewiele z nich zostało faktycznie zatwierdzonych do leczenia ludzkich chorób. W związku z tym, można śmiało stwierdzić, że w przestrzeni tego metalu szlachetnego ciągle jest jeszcze miejsce na ciekawość naukową prowadzącą do nowatorskich rozwiązań poprawiających skuteczność dostępnych jego związków, ich właściwości, zrozumienie sposobów działania i potencjalnych zastosowań klinicznych i terapeutycznych.

W podobnym nurcie badawczym mieści się praca doktorska Pana mgr farm., inż. Dominika Żyro, który w ramach rozprawy podjął się syntezy, przeprowadzenia analizy strukturalnej, fizykochemicznej oraz trwałości dwóch kompleksów srebra(I) z metronidazolem, tj.  $[Ag(MTZ)_2]NO_3$  oraz  $[Ag(MTZ)_2]_2SO_4$ . Ponadto, dla obu związków określone zostały właściwości cytotoksyczne oraz

przeciwbakteryjne. Celem prowadzonych badań było uzupełnienie i poszerzenie danych dostępnych w literaturze dla pierwszego ze związków oraz uproszczenie jego ścieżki syntezy, bardzo istotne przy ostatecznym celu badań, tj. opracowaniu formułacji czterech postaci leków: maści do użytku zewnętrznego, żelu do użytku zewnętrznego, maści ocznej i kropli do oczu. Co bardzo cenne, aktywność przygotowanych produktów leczniczych została przetestowana na kilku pacjentach, co sprawia że przedstawione badania mają duże znaczenie poznawcze. Tematyka dysertacji jest nadal bardzo aktualna i wypełnia zapotrzebowanie na badania ukierunkowane na rozwój i ulepszenie metod formułacji leków, które nie wykazują się wystarczającą stabilnością i nie mogą być przygotowane w zakładach farmaceutycznych oraz przechowywane i dostarczone do pacjenta. Rozprawa doktorska została wykonana w grupie Profesora Justyna Ochockiego, w Katedrze Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, który od wielu lat prowadzi badania z zakresu chemii bionieorganicznej kompleksów metali w aspekcie wykorzystania ich właściwości terapeutycznych. Promotorem pomocniczym rozprawy jest dr n. farm. Małgorzata Fabijańska.

Rozprawa doktorska mgr farm., inż. Dominika Żyro przedstawiona została w formie opracowania (158 stron), w którym zaprezentowane zostały tezy oraz najważniejsze osiągnięcia rozprawy. Doktorant zamieścił również wykaz swoich publikacji i osiągnięć, tj. listę publikacji związanych z tematyką rozprawy doktorskiej (5 artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR), komunikaty zjazdowe i materiały konferencyjne, publikacje tematycznie niezwiązane z rozprawą doktorską (2 artykuły w czasopiśmie z listy MNIŚW), udział w konferencjach oraz projektach naukowych, jak również przyznane nagrody.

W obszernym opracowaniu Doktorant przedstawił wstęp teoretyczny, cel pracy, część eksperymentalną, wyniki wraz z dyskusją oraz wnioski, po których znajduje się bibliografia zawierająca 239 pozycji literaturowych. Podoba mi się sposób prezentacji informacji, który we wstępie wyposaża czytelnika w podstawową wiedzę dotyczącą azoli i ich pochodnych oraz srebra i jego soli, a wszystko w kontekście ich właściwości przeciwmikrobiologicznych. Autor dysertacji przedstawia również półstałe i płynne postaci leku, wskazując najważniejsze składowe możliwości formułacji, zwracając uwagę na możliwości oraz ograniczenia stosowanych podłoży oraz korelacje składowych i substancji czynnych. W rozdziałach poświęconych opisowi części praktycznej (rozd. 3), a potem opisowi wyników (rozd. 4) Doktorant w sposób zwięzły przedstawił metody syntezy związków kompleksowych,  $[Ag(MTZ)_2]NO_3$  oraz  $[Ag(MTZ)_2]_2SO_4 \cdot 5H_2O$ , wskazując, że dla pierwszego z nich celem była modyfikacja metody do jednego kroku, a zmiana rozpuszczalnika na wodę skróciła czas reakcji do dwóch minut. Skład obu kompleksów potwierdzono wykorzystując standardowe metody analityczne (spektroskopię NMR oraz podczerwieni), a związek drugi dodatkowo opisano za pomocą analizy rentgenograficznej. Dalej, Doktorant w sposób szczegółowy, bardzo uporządkowany i klarowny przeprowadza czytelnika przez opis przygotowania kilku formułacji postaci leku (maści, żelu do użytku zewnętrznego na skórę/błony śluzowe oraz maści i kropli do oczu), niejednokrotnie powtarzając procedurę w warunkach laboratoryjnych oraz funkcjonowania rzeczywistej apteki. Opis postępowania został opatrzony odpowiednimi zdjęciami, które potwierdzają trwałość formułacji



ZAKŁAD CHEMII BIOLOGICZNEJ I MEDYCZNEJ

ul. F. Joliot-Curie 14  
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 72 51

www.uni.wroc.pl

przez okres 4 tygodni. Dla przygotowanych postaci kompleksów Autor przeprowadził również badania ich trwałości w różnych warunkach przechowywania (w świetle dziennym na powietrzu, w ciemności), analizując wyniki w porównaniu do wyjściowych soli azotanowych i metronidazolu. Otrzymane wyniki zinterpretował jako zwiększenie stabilności i odporności kompleksów na promieniowanie UV-A. Ponadto, dla przygotowanych związków przeprowadził testy cytotoksyczności (na wybranych pięciu liniach komórkowych) oraz badania mikrobiologiczne (dla kilkunastu rodzajów bakterii), kompleksowo dyskutując najważniejsze osiągnięcia wynikające z poszczególnych eksperymentów i jednoznacznie wskazując na wyższą aktywność przeciwmikrobiologiczną dla wybranych kilkunastu szczepów bakterii tlenowych i fakultatywnie beztlenowych, Gram-dodatnich i Gram-ujemnych w stosunku do metronidazolu, oraz porównywalną z lekiem referencyjnym (kompleksem srebra z sulfadiazyną). Ta część opracowania zawiera wiele wykresów, obrazów i zestawień w formie tabel – przygotowanych w bardzo staranny i przemyślany sposób, ułatwiających czytelnikowi zrozumienie procesu analizy uzyskanych wyników.

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana, a interpretacja, prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone w bardzo systematyczny i czytelny sposób. Uproszczona, efektywna ścieżka syntezy, otrzymanie kompleksów oraz trafny wybór metod potwierdzenia składu i struktury kompleksów, określenie ich właściwości biologicznych oraz przygotowanie odpowiednich formułacji leków pozwolił na uzyskanie preparatów o wysokiej stabilności i trwałości, a także wstępnie wykazanej skuteczności u pacjentów. Na podstawie przedstawionej analizy i dyskusji można z całą pewnością stwierdzić, iż Doktorant zdobył warsztat badawczy w zakresie prowadzonych eksperymentów oraz umiejętność prezentacji otrzymanych wyników. W ostatnim rozdziale dysertacji mgr Żyro podsumował wyniki swoich badań oraz przedstawił wynikające z nich wnioski.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr farm. Dominika Żyro, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam:

- Opracowanie szybkiej, jedno-etapowej, wygodnej drogi syntezy i otrzymanie kompleksów metronidazolu z jonami Ag(I), szczególnie nowej postaci  $[Ag(MTZ)_2]_2SO_4 \cdot 5H_2O$ , oraz określenie ich składu, struktury oraz właściwości fizyko-chemicznych; związki wykazują zwiększoną rozpuszczalność w porównaniu do MTZ oraz  $Ag_2SO_4$ , co ma istotne znaczenie w aspekcie ich wykorzystania w preparatach farmaceutycznych.
- Wykazanie zwiększonej stabilności (na promienie UV-A, pH, temperatura) obu związków w stosunku do soli Ag(I).
- Określenie właściwości biologicznych obu kompleksów, tj. aktywności cytotoksycznej oraz przeciwmikrobiologicznej; wykazanie zróżnicowanego działania cytotoksycznego kompleksów  $[Ag(MTZ)_2]_2SO_4 \cdot 5H_2O$  oraz  $[Ag(MTZ)_2]NO_3$ , oraz ich zwiększonego działania przeciwmikrobiologicznego wobec wielu szczepów bakterii w stosunku do składowych kompleksów (soli srebra oraz metronidazolu), będących konsekwencją wyższej biodostępności i przedłużonego uwalniania jonów Ag(I) z kompleksów.

- Przygotowanie czterech postaci leków zgodnie z receptą lekarza oraz wskazanie najbardziej optymalnych parametrów zapewniających utrzymanie niezmięnionej postaci otrzymanych preparatów podczas przechowywania; wykorzystanie NaOH do stabilizacji pH kropli do oczu (rozwiązanie innowacyjne w stosunku do zalecanego w farmakopei polskiej w recepturowej preparatyce kropli do oczu).

- Zastosowanie przygotowanych formułacji u pacjentów i pozytywny wynik ich działania.

Należy podkreślić, że rozprawa doktorska opiera się na wynikach opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu, tj. *Molecules* (2 artykuły), *Biomedicines*, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *Cancers* (łączny IF = 24.247, 460 punktów MNiSW), i przedstawione wyniki były już poddane gruntownej ocenie merytorycznej przez recenzentów poszczególnych artykułów.

Poniżej, raczej z ciekawości, wymieniam pytania ogólne pojawiające się po lekturze rozprawy doktorskiej i prac:

1. Jaki jest mechanizm przenikania jonów srebra przez błony biologiczne, i czy może on być inny u bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów?
2. Czy mikroorganizmy wypracowały mechanizmy pozbywania się srebra z organizmu i jak to się ma do działania tzw. „bakterii zombi”?
3. Czy obecny stan wiedzy ewidentnie wyklucza synergizm srebra i leków przeciwdrobnoustrojowych, które to jony mogłyby poprawiać np. wchłanianie ligandów w formie kompleksów właśnie?
4. Czy znana jest trwałość termodynamiczna kompleksów Ag(I) z metronidazolem? I czy poprawiając trwałość kompleksów możemy jeszcze poprawić efekt przeciwmikrobiologiczny?

Na koniec, zwracam uwagę na dużą staranność edytorską, która sprawiła, że w pracy pojawiły się bardzo nieliczne błędne zapisy czy sformułowania stylistyczne, których nie będę tutaj nawet wymieniać.

Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a uzyskane z dużą starannością wyniki należy uznać za istotny wkład w poszerzenie wiedzy dotyczącej właściwości kompleksów srebra(I) z metronidazolem. Pan mgr farm., inż. Dominik Żyro wykazał, że zarówno kompleksy, jak i ich formułacje oferują wiele potencjalnych korzyści.

Praca powstała w ramach projektu OPUS8 finansowanego przez NCN, którego kierownikiem jest prof. dr hab. n. farm. Justyn Ochocki, a w którym Doktorant był wykonawcą.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia w pełni ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018r., poz. 1668), i wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w



ZAKŁAD CHEMII BIOLOGICZNEJ I MEDYCZNEJ

ul. F. Joliot-Curie 14  
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 72 51

[www.uni.wroc.pl](http://www.uni.wroc.pl)

Łodzi o dopuszczenie Pana mgr farm., inż. Dominika Żyro do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy z uwagi na bardzo ciekawe i rzetelne wyniki oraz wysoki poziom naukowy prowadzonych badań.

*Prof. Jeronima - Kucucha*