



**dr hab. Bożena Karolewicz, prof. uczelni**  
Katedra i zakład Technologii Postaci leku  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
ul. Borowska 211a; 50-556 Wrocław  
tel. (71) 784 03 24, faks (71) 784 03 17  
[bozena.karolewicz@umw.edu.pl](mailto:bozena.karolewicz@umw.edu.pl)

---

Wrocław, 29 sierpnia 2023r.

**OCENA**  
**rozprawy doktorskiej mgr Marty Pawłowskiej**

**pt. "Antybakteryjne działanie nanocząstek metali wobec wybranych bakterii stanowiących typową mikroflorę górnych dróg oddechowych".**

**wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Andrzeja Stańczaka**  
**- Kierownika Zakładu Farmacji Aptecznej Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi**

**Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie**

Ze względu na narastający problem lekooporności drobnoustrojów na dostępne opcje terapeutyczne, w praktyce klinicznej poszukiwanie nowych możliwości stosowania skutecznych terapii jest aktualnym podejmowanym tematem badawczym dla zapewnienia dalszego skutecznego leczenia pacjentów. Zwalczanie biofilmu i penetracja substancji mikrobiologicznie aktywnych do miejsca działania jest jednym z większych wyzwań stawianych produktom przeciwdrobnoustrojowym. W przedstawionej do oceny pracy skupiono się więc na ocenie aktywności serii formułacji opracowanych w skali laboratoryjnej na bazie nanocząstek metali srebra i złota o potencjale do zastosowania w leczeniu infekcji wirusowych czy bakteryjnych jamy ustnej i nosogardzieli. Ocena opracowanego składu formułacji, w tym substancji pomocniczych tj. promotorów wchłaniania, czy dodatku składowych o udowodnionym działaniu przeciwdrobnoustrojowym tj. przetwory surowców roślinnych, jako substancji o potencjalnie synergistycznym działaniu w stosunku do składnika aktywnego, pozwala wyselekcjonować kompozycje o potencjale do wykorzystania w terapii stanów zapalnych, zmniejszając potencjał korzystania z często nadużywanych antybiotyków, tym samym wpisując się w zakres działań podejmowanych w celu ograniczenia konsekwencji nieodpowiedniego stosowania dostępnych opcji terapeutycznych w walce z kolonizacją drobnoustrojami w infekcjach nosogardzieli.

## **Metodyka badawcza (założenia, cel, metody)**

W założeniach pracy przyjęto, że otrzymane w warunkach laboratoryjnych formułacje na bazie nanocząstek srebra i złota powinny wykazywać:

- silne działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec szczepów, będących typową mikroflorą błon śluzowych nosogardzieli, oraz
- wysoką skuteczność przeciwbiofilmową, czego nie posiadają inne dostępne komercyjne preparaty przeznaczone do stosowania na błony śluzowe.

Autorka rozprawy w metodyce pracy zastosowała szereg metod mikrobiologicznych z wykorzystaniem szczepów wzorcowych czy reprezentatywnych bakterii Gram (+), Gram (-), grzybów, w tym:

- metodę seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym do określenia wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) badanych formułacji nanocząstek srebra i złota zgodnie z zaleceniami EUCAST wobec wzorcowych szczepów potencjalnych patogenów oraz wobec szczepów drobnoustrojów reprezentatywnych,
- metodę określenia wartości minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) badanych formułacji stosując posiew na płytce z podłożem agarowym,
- metodą dyfuzyjno-krażkową dla określania wartości MIC formułacji wobec reprezentatywnych drobnoustrojów zgodnie z rekomendacjami EUCAST i KORLD,

dodatkowo:

- metodę seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym oraz dyfuzyjno-krażkową do określania wartości MIC badanych formułacji wobec drobnoustrojów mikroaerofilnych oraz beztlenowych,
- metodę określania minimalnego stężenia hamującego rozwój biofilmu (MBIC) dla badanych formułacji.

Zastosowane metody zostały dobrane w sposób prawidłowy, zapewniając realizację zakładanych celów.

## **Struktura rozprawy**

Praca z wyłączeniem spisu treści, listy użytych skrótów obejmuje ogółem 132 strony. Struktura pracy jest w dużej części tradycyjna, zawiera wspomniane: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wstęp i cel pracy, część teoretyczną składającą się z 3 podrozdziałów (łącznie 35 stron), obejmującą teoretyczne wprowadzenie do zagadnień przedstawionych w części doświadczalnej (26,5% całości). Kolejną część doświadczalną w 4 podrozdziałach

obejmuje opis stosowanej w badaniach metodologii, materiałów, jednocześnie podając i omawiając każdorazowo wyniki badań bezpośrednio po opisie zastosowanej w pracy metody (w sumie 63 strony, 47,7% całości). Ostatnią część rozprawy stanowi podsumowanie i wnioski (6 stron), streszczenie w języku polskim i angielskim, załączniki (wykazy rycin i tabel) oraz piśmiennictwo. Zaprezentowany materiał został zilustrowany 10 rycinami, głównie obrazującymi strukturę zastosowanych substancji pomocniczych, oraz 36 tabelami z wynikami badań.

### **Wykorzystane piśmiennictwo**

Autorka przytoczyła ogółem 222 pozycje piśmiennictwa, które obejmują w przeważającej liczbie publikacje naukowe, publikacje książkowe, wytyczne, pracę doktorską, magisterską, patenty, nieliczne odnośniki do stron internetowych. W części teoretycznej Doktorantka przeprowadziła analizę źródeł, przytaczając 219 pozycji piśmiennictwa. Publikacje dotyczące podejmowanej tematyki wydane po roku 2000 stanowią ponad 90% całości piśmiennictwa, co przy dynamice regulacji i obiegu wiedzy w nauce i praktyce zawodowej potwierdza aktualność zaczerpniętych odniesień z piśmiennictwa. Moje zastrzeżenia budzi poprawność cytowania wybranych źródeł (np. poz. 99 powinno być „OECD (2018), *Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070806-en>.”), kolejno pozycje 186, 189, 190, 193, 195, 209, 221) i dobór źródeł (poz. 151, 152, 220). Wybrane cytowane odnośniki nie pozwalają na identyfikację tekstów źródłowych, na które powołuje się Autorka. Dodatkowo zastrzeżenie budzi cytowanie w pozycji 211 Farmakopei Polskiej VIII, kiedy w mojej opinii biorąc pod uwagę treść odwołania w tekście, powinna być to obecnie obowiązująca Farmakopea Polska XII.

### **Szczegółowa ocena merytoryczna poszczególnych części rozprawy**

Wstęp do recenzowanej dysertacji doktorskiej zawiera krótkie uzasadnienie wyboru podjętego problemu badawczego, wyraźnie definiując weryfikowane w części badawczej założenia.

Kolejno, podrozdziały teoretyczne 1, 2 i 3, rozwijają i opisują: pierwszy - budowę miejsca aplikacji formulacji, problemy kliniczne związane z przyczyną infekcji, drugi - charakteryzuje nanocząstki metali: srebra i złota pod kątem ich potencjału działania przeciwdrobnoustrojowego, wykorzystania w terapii, bezpieczeństwa, oraz surowce i

przetwory roślinne o potencjale korzystnie wpływającym na leczenie stanów infekcyjnych nosogardzieli tj. m.in. olejki eteryczne, babka lancetowata, tymianek, porost islandzki, dekspantenol, trzeci – stanowi przegląd wybranych promotorów wchłaniania substancji czynnych z formułacji. W tej części pracy pragnę zwrócić uwagę na dostrzeżone omyłki językowe i nieścisłości, które uszczegóławiam w uwagach w dalszej części przedstawionej recenzji. Dodatkowo uważam, iż w rozdziałach dotyczących surowców i przetworów roślinnych i promotorów wchłaniania, odpowiednio 2 i 3 część treści można było ująć w sposób bardziej syntetyczny, korzystnie dla charakteryzowanych składowych ocenianych formułacji.

Cześć doświadczalna składa się z 4 podrozdziałów, bez typowego wydzielenia materiałów i metod jako odrębnej części. Każdy z podrozdziałów stanowi opis badania prowadzonego dla formułacji i zawiera wykaz użytych w metodzie materiałów, opis składu badanych formułacji, opis sposobu wykonania badania i omówienie jego wyniku. W pierwszym obszernym podrozdziale Doktorantka określała aktywność hamującą formułacji na bazie nanocząstek srebra i złota zastosowanych w różnych stężeniach wobec szczepów wzorcowych drobnoustrojów, następnie aktywność formułacji nanocząstek z dodatkiem substancji pomocniczych: promotorów wchłaniania, substancji zwiększających lepkość oraz substancji o potencjale łagodzącym czy przetworów roślinnych wobec reprezentatywnych szczepów drobnoustrojów metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym. W kolejnym 2. podrozdziale określano wartości MIC formułacji złożonych, o największym potencjale aktywności w ocenie na podłożu płynnym, z wybranymi promotorami wchłaniania, przetworami roślinnymi, substancjami o działaniu łagodzącym, wobec reprezentatywnych drobnoustrojów metodą dyfuzyjno-krażkową, potwierdzając ich wysoką aktywność mikrobiologiczną i stabilność. W podrozdziale 3. kontynuowano ocenę aktywności formułacji wobec drobnoustrojów mikroaerofilnych oraz beztlenowych o dużej odporności na antybiotykoterapię 2 metodami: seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym oraz dyfuzyjno-krażkową. Wykonana ocena jest istotna w kontekście klinicznym, gdyż wybrane szczepy są częstymi składnikami flory zasiedlającej nosogardziel, czynnikami etiologicznymi zakażeń, W podrozdziale 4. Doktorantka wyznaczyła dla formułacji nanocząstek srebra i złota minimalne stężenie hamujące rozwój biofilmu wobec 48 szczepów bakteryjnych oraz 5 szczepów grzybów występujących w biofilmie, potwierdzając ich wysoką skuteczność i tym samym potencjał jako składnika czynnego.

Rozdział ostatni dysertacji stanowi autorskie podsumowanie badań. Pewien mój niedosyt budzi brak powołania się i prowadzonej szerszej dyskusji wyników przy

wnioskowaniu, biorąc pod uwagę szeroko przytaczane przez Doktorantkę w części teoretycznej piśmiennictwo.

Po lekturze rozprawy, w mojej ocenie założenia rozprawy zostały rozstrzygnięte przez Doktorantkę.

Pragnę zwrócić uwagę na dostrzeżone omyłki językowe i nieścisłości w pracy:

1. Znalezione w pracy błędy nomenklaturowe:

w części *Lista skrótów użytych w pracy*:

- AgNPs użyte jako nanocząstka srebra zamiast konsekwentnie nanocząstki srebra, nieprawidłowo wyjaśnione skróty COLIPA, DMI, ECHA,

we *wstępie i części teoretycznej pracy*:

- brak konsekwencji stosowania użytej nomenklatury np. nanomateriały srebra dla określenia nanocząstek (str. 1, ang. Silver nanoparticles, AgNPs), czy niewłaściwe w mojej ocenie stosowanie określenia „nanometal”, „substancja nośna”, „farmaceutyk”, „booster”,

- brak stosowania i nie powoływanie się w pracy na nazewnictwo części surowców i postaci produktów leczniczych (str. 23 sprayach (...) do nosa) zgodnych z obowiązującą Farmakopeą Polską XII,

w części *doświadczalnej pracy*:

- niezasadne użycie określenia „dodatki reologiczne” w miejsce właściwego w mojej opinii określenia substancje pomocnicze, użycie sformułowania w punkcie 1.1.1.1. sformułowanie „substancje chemiczne” na określenie roztworów koloidalnych srebra i złota, omyłkowe użycie określenia „Ag4N” w wykazie materiałów stosowanych do badań dla roztworu koloidalnego złota, użycie sformułowania na str. 52 „dwoma mediatorami wspierającymi transport” na określenie promotorów wchłaniania, na stronie str. 67 wymieniając składniki emulsji nie podano polskiej nomenklatury, podobnie na str. 105, na str. 75 użyto nieprawidłowego skrótu „Eucast”,

2. W mojej opinii bardziej syntetycznie w pracy można było ująć treści zawarte w podrozdziale 2.2. dotyczące charakterystyki surowców i przetworów roślinnych tj. np. str 19. „Chętnie sadzona jest w ogrodach, parkach jako roślina ozdobna (...) Betula verrucosa Ehrh jest szeroko stosowana w wielu dziedzinach życia. W chemii materiał ten przetwarzany jest podczas procesu destylacji na odczynniki chemiczne, takie jak alkohol metylowy lub kwas etanowy.”, ograniczając ich zakres do informacji kluczowych dla istoty dysertacji.

3. Nie do końca zrozumiałe w opisie i tabelach rozdziale 1.2. i 1.5. przedstawiono stężenia formulacji AgNPs/AuNPs (2,5 – 20 ppm), czytając zastanawienia wymaga, czy odnoszą się one w tym przypadku sumarycznie do mieszaniny równych części roztworów koloidalnych nanocząstek obu metali? W tabelach w rozdziale 1.5. nie podano stężenia zastosowanej emulsji?
4. W rozdziale 3.1.3. w opisie wyników zabrakło mi rzetelnego podsumowania.
5. Biorąc pod uwagę liczbę wykonanych badań, dla czytelności wyników dysertacji wskazane byłoby w pracy zamieszczenie wniosków również w formie kluczowych punktów w rozdziale IV podsumowującym w sposób syntetyczny wyniki badań.

### **Język i formalna strona rozprawy**

Od strony językowej i formalnej praca zawiera wiele omyłek i nieścisłości, które poniżej pozwoliłam sobie zestawić, i które należałoby skorygować publikując treści rozprawy. Znalaziono błędy językowe, względnie literówki. Użyte niefortunne sformułowania:

str. 3 akapit 1 – „spenetrowanie przez substancję mikrobiologicznie aktywne”, str. 4 akapit 1 „nadinterpretowując zagrożenie dla organizmu”, str. 8 „nawet większego efektu terapeutycznego”, str. 9 akapit 1 – „NPs pewnych metali”, „są główną zaletą NPs metali”, str. 12 akapit 1 „właściwości są postrzegane jako dobre i bezpieczne. Nie obserwowano żadnych działań niepożądanych, przy znacznym zniwelowaniu ryzyka powstania infekcji bakteryjnych”, „wkomponowanego w strukturę polimeru”, str. 12 akapit 4 „inhibituje czynniki prozapalne”, str. 13 akapit 1 „na wąglika”, „zmiennych właściwościami, są niepotwierdzone”, str. 14 akapit 1 „po zabiegowych”, str. 15 3 akapit „jako dodatek do leków”, „docelowe miejsca organizmu człowieka”, „paklitakselenem”, str. 16 akapit 2. „0,38 µg/m (...) 20 µg/m”, str. 15 akapit 3. zdanie niejasne „wadze ciała, kolorze ..., śmiertelności, morfologii ...wśród zwierząt”, str. 17 akapit 2 „zbyt bardzo duża”, „po dawce doustnej”, str. 18 akapit 2 „elementów rośliny”, „kremach na twarz”, str. 20 akapit 2 „zahamowanie prawidłowego działania łańcucha oddechowego i wymiany jonów między komórką, a otoczeniem”, „traktowania skóry po ugryzieniu owadów i drobnych otarć”, str. 21 akapit 1 „konserwantu żywności”, „powłoki komórki bakteryjnej, co w konsekwencji skutkowało dostaniem się do jej wnętrza”, akapit 2 „przeznaczonych dla stomatologii”, str. 23 akapit 5 „bezpośrednie właściwości grzybobójcze”, str. 25 akapit 1 „w szczególnie wysokim poziomie w mleku ssaków. Głównie umiejscowiona gdzie w organizmie jest umieszczona laktoferyna to ziarnistość neutrofilów i uwalniana w procesie degradacji”, „Laktoferyna jest również mediatorem łączącym wrodzone i adaptacyjne odpowiedzi immunologiczne człowieka”, str. 26 akapit 2 „substancji obkurczającej błonę

śluzową nosa”, str. 29 akapit 3 „w wyższych procentach”, str. 31 „skutków na oczy”, „dostarczającym przez skórę”, „Należy więc uważać, stosując m.in. leki przeciwzakrzepowe, steroidy i środki uspokajające.”, str. 32 „Produkt z łatwością przenika przez błony biologiczne, dlatego też stał się nośnikiem stosowanych miejscowo produktów leczniczych.”, str. 33 „w badaniu początkowe zahamowanie wzrostu, nie odzwierciedlone przy zmniejszeniu wskaźników proliferacji komórek”, str. 35 „Pomaga w utrzymaniu ich stabilności i rozproszeniu składników aktywnych i zwiększa trwałość produktów”, str. 36 „wszechstronny rozpuszczalnik”, „kontrolować konsystencję produktów”, str. 40 „szczepy bakterii przesiewano”, str. 59 „w ich tworzeniu wykorzystano”, str. 71, 72 „dołączenie”, str. 102 „zarówno na bakterie”, str. 104 „na przeciętnym poziomie”, str. 105 „czyste preparaty”, str. 106 „przeciw infekcyjne”.

Wykorzystując przysługujący recenzentowi przywilej w toku obrony chciałabym zapytać Doktorantkę:

- o technologię otrzymywania formulacji, w jaki sposób uzyskiwano jałowość formulacji opracowywanych do badań?
- biorąc pod uwagę specyfikę badań mikrobiologicznych, czy wykonując badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej Doktorantka wykonywała powtórzenia pomiarów?
- w omówieniu wyników badań w podrozdziale 1.2.3. odnośnie wyznaczania aktywności formulacji z dodatkiem 5% DMSO wobec E. coli Doktorantka wskazuje, iż najsilniejszy efekt jej działania może mieć związek z budową ściany tych bakterii, czy mogłabym prosić o wyjaśnienie stawianej hipotezy?

Podsumowując opisywane w pracy wyniki badań chciałabym podkreślić, iż na docenienie w pracy zasługuje szeroki zakres wykonanych badań mikrobiologicznych formulacji, obejmujący ocenę aktywności wobec szczepów wzorcowych, reprezentatywnych, wobec drobnoustrojów mikroaerofilnych oraz beztlenowych, czy składowych biofilmu. Tak prowadzona ocena jest niezwykle istotna dla doboru składu zaproponowanych formulacji na bazie nanocząstek srebra o najkorzystniejszych właściwościach, dokumentując kompleksowe podejście do oceny aktywności formulacji o potencjale przeciwbakteryjnym.

**Wnioski i konkluzja końcowa**

Reasumując oceniana rozprawa doktorska mgr Marty Pawłowskiej stanowi oryginalne opracowanie badawcze, poruszające zagadnienia oceny aktywności opracowanych formułacji o potencjale przeciwbakteryjnym do zastosowań w infekcjach jamy ustnej i nosogardzieli, co dotychczas jest obszarem badań istotnym dla rozwoju nowych opcji terapeutycznych w terapii infekcji patogenami. Analizowane w dysertacji aspekty badawcze są istotne i aktualne, również w perspektywie praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników w projektowaniu formułacji, dla których dobór jakościowy i ilościowy składowych pozwala na uzyskanie synergizmu działania przeciwdrobnoustrojowego, korzystnie również na ograniczenie narastania nadmiernego wykorzystania antybiotyków, przy jednocześnie możliwości projektowania produktów czy wyrobów medycznych w oparciu o wyniki szerokich badań dokumentujących działanie hamujące wobec patogenów.

Przedstawiona rozprawa spełnia wymagania określone w *art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.)* stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Nauk Farmaceutycznych Wydziału Farmaceutycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Marty Pawłowskiej do dalszych etapów postępowania w celu nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA I ZAKŁAD  
TECHNOLOGII POSTACI LECZYW  
dr hab. Bożena Karolewicz, prof. uczelni