

Warszawa, dnia 30 sierpnia 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Marty Pawłowskiej
pt. „Antybakteryjne działanie nanocząstek metali wobec wybranych bakterii
stanowiących typową mikroflorę górnych dróg oddechowych”.**

Zastosowanie nanotechnologii w celu otrzymania produktów z metalami szlachetnymi jest obiecującym kierunkiem rozwoju technologii form leku. Liczne prace eksperymentalne udowodniły, że nanocząstki niektórych metali szlachetnych mają właściwości m.in. przeciwdrobnoustrojowe. Przed tysiącami lat złoto było również stosowane m.in. w medycynie chińskiej i indyjskiej.

Celem pracy doktorskiej dr n. chem. inż. M. Pawłowskiej było przygotowanie kompozycji składu formułacji do zastosowań w infekcjach bakteryjnych nosogardzieli opartych na układzie mieszanin roztworów koloidalnych złota i srebra. Doktorantka wybrała do badań typowe szczepy bakteryjne kolonizujące błony śluzowe nosa i jamy ustnej, zarówno tlenowe jak i beztlenowe.

Zaproponowany przez doktorantkę kierunek badawczy, z powyższych względów, uważam za właściwy. Praca składa się z typowych rozdziałów przewidzianych w tego typu rozprawach.

W części teoretycznej pracy doktorantka dokładnie opisała zagadnienia, których znajomość będzie niezbędna do przygotowania i przeprowadzenia części doświadczalnej pracy. Rozdziały, w których doktorantka opisuje stany zapaleń nosogardzieli oraz substancji stosowanych w stanach infekcyjnych nosogardzieli, świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym doktorantki do przystąpienia do badań w zakresie tematu rozprawy doktorskiej.

Opisane zostały nanocząstki srebra AgNPs i nanocząstki złota AuNPs oraz ich mechanizmy oddziaływania. Ponadto przedstawione zostało wykorzystanie nanocząstek w medycynie oraz bezpieczeństwo i toksyczność stosowania w praktyce leczniczej.

W dalszej części teoretycznej doktorantka opisała również surowce roślinne i ich przetwory. Na szczególną uwagę zasługują takie rośliny jak: babka lancetowata, brzoza, drzewo herbaciane, imbir, tymianek, porost islandzki, jak i olejki roślinne jak: olejek eukaliptusowy, olejek z szałwii i olejek z oregano. Oczywiście jest znacznie więcej roślin mających znaczenie w medycynie, ale te które opisała doktorantka mają wyjątkowe znaczenie.

Stosowanie produktów leczniczych na błonę śluzową czy skórę organizmu wymaga często stosowania substancji o działaniu łagodzącym czy też nawilżającym, aby ograniczyć działanie niepożądane, co nie zostało pominięte w ocenianej pracy. Doktorantka opisała w tym rozdziale laktoferynę i dekspantenol.

W technologii postaci leku istotne jest zastosowanie promotorów ułatwiających przenikanie substancji leczniczej przez błony biologiczne czyli poprawiające dostępność biologiczną leku.

W tej części pracy doktorantka dokonała analizy wybranych substancji o udokumentowanym działaniu ułatwiającym przenikanie substancji przez błony biologiczne. Opisała znane substancje, których zastosowanie technologii formy leku pełnią m.in. funkcję promotorów przenikania substancji leczniczych. Doktorantka dokonała przeglądu i opisała m.in. eter dimetylowy, izosorbidu, hydroksyacetoenu. Każdy z wymienionych promotorów został opisany w zakresie informacji toksykologicznej, zastosowaniu i jego działaniu.

Opis tej części teoretycznej i zawarte w tej części najnowsze informacje w zakresie podjętej przez doktorantkę tematyki pracy doktorskiej, świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu dr n. chem. inż. M. Pawłowskiej do realizacji tematu rozprawy doktorskiej w części doświadczalnej.

Część teoretyczna została opisana na podstawie 222 pozycji literaturowych o zasięgu międzynarodowym.

W części doświadczalnej doktorantka zastosowała znane substancje chemiczne oraz pięć szczepów wzorcowych potencjalnych patogenów człowieka, takich jak:

- *Escherichia coli* ATCC 8739,
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6535,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
- *Candida albicans* ATCC 10231,
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Doktorantka wykorzystwała w badaniach znane podłoża wzorcowe stosowane w hodowli bakterii.

W procesie tworzenia badanych formułacji obok nanocząstek AgNPs i AuNPs doktorantka zastosowała wybrane promotory przenikania przez błony biologiczne, które uprzednio opisała. Doktorantka wyznaczyła wartości MIC i MBC dla badanych szczepów.

W tym miejscu moje wątpliwości budzi opisanie tych samych nanometali w kolejnych częściach doświadczalnych pracy. Moje pytanie dotyczy zastosowanych serii rozcieńczeń badanych związków w zakresie od 1:2 do 1:1024. Dokonując analizy uzyskanych wyników (w tabelach 1, 3, 5, 7, 9), można stwierdzić, że od rozcieńczenia 1:64 następuje wzrost badanych szczepów dla wszystkich formułacji. Przygotowanie dalszych rozcieńczeń budzi moje wątpliwości.

Uzyskane wyniki badań (tabele 1-10) w tej części prowadzonych doświadczeń wskazują, że srebro charakteryzuje się największym działaniem antymikrobowym. Kolejne etapy badań dotyczyły wyznaczenia aktywności badanych formułacji z wybranymi promotorami przenikania wobec bakterii Gram-ujemnych *Escherichia coli* i Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* oraz grzybów *Candida albicans*, najczęściej występujących przy nadkażeniach błony śluzowej nosogardzieli. Doktorantka wykorzystwała w tej części badań formułacje zawierające Nanosilver aXonnite®, Nanogold aXonnite® oraz substancje pomocnicze, których celem była spodziewana poprawa penetracji nanocząstek w podłożach mikrobiologicznych.

Uzyskane wyniki wskazują, że dimetylosulfotlenek DMSO w połączeniu z Nanosilver aXonnite® już przy 1% dodatku DMSO wykazywał silne działanie mikrobiologiczne (tabele 11-14).

Dalsze etapy badań dotyczyły wyznaczenia aktywności formułacji z surowcami pochodzenia roślinnego takimi jak: ekstrakt porostu islandzkiego oraz olejki z drzewa herbacianego, eukaliptusowy, z oregano, z szalwii i z tymianku. Doktorantka w tym miejscu używa „przetwory pochodzenia roślinnego”. Proponuję użyć określenia „surowce pochodzenia roślinnego”.

Uzyskane wyniki wskazywały na synergę działania Nanosilver aXonnite® i promotorów przenikania przez błony biologiczne z surowcami pochodzenia roślinnego (tabela 15).

W celu poprawy jakości określonego produktu stosowanego na skórę czy błony śluzowe należy wyeliminować działanie drażniące produktu. W pracy doktorantka wykorzystwała właściwości łagodzące pantenolu i laktoferyny. W przeprowadzonych badaniach uzyskane wyniki potwierdziły brak znaczącego wpływu tych dodatków na aktywność antymikrobową srebra (tabela 16-17).

Z kolei modyfikacja kompozycji badanych formułacji poprzez dodatek typowych zagęstników polimerowych (glikol polietylenowy, silikon lub karbomer) potwierdziły, że dodatek substancji modyfikujących konsystencję obniża aktywność antymikrobową nanometali (tabela 18-20).

Aktywność przeciwdrobnoustrojową, doktorantka potwierdziła także alternatywną metodą wyznaczania wartości MIC – metoda dyfuzyjno-krażkową, zgodnie z rekomendacjami EUCAST oraz KORLD.

Badania zostały wykonane z wykorzystaniem roztworu koloidalnego srebra w wodzie o stężeniu 100mg/L wody. Uzyskane wyniki wykonane metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym oraz dyfuzyjno-krażkową potwierdziły wysoką skuteczność antybakteryjną wybranych formułacji (tabele 21-29).

Dodatkowo przeprowadzona analiza skuteczności bakteriobójczej (MBC) badanych preparatów metodą dyfuzyjno-krażkową wykazała zahamowanie strefy wzrostu bakterii średnio o 1-3 mm poza obręb krążka (tabele 30-34).

W ostatnim etapie badawczym były przeprowadzone testy oznaczające wartość stężenia hamującego wzrost biofilmu (MBIC) wykonane na czystych preparatach dla nanosrebra i nanozłota. Badania potwierdziły wysoką skuteczność nanosrebra w stosunku do badanych szczepów tworzących biofilm (tabela 35-36).

Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka proponuje konkretne składniki mieszanin z nanocząteczkami nanosrebra. Uzyskane wyniki mogą mieć praktyczne zastosowanie w terapii leczenia infekcji gardła i nosa.

Praca doktorska napisana jest starannie. W podsumowaniu doktorantka dogłębnie opisuje uzyskane wyniki i jednocześnie formułuje wnioski. Moim zdaniem należy te wnioski umieścić w osobnym rozdziale pracy.

Moje dodatkowe uwagi są następujące:

- brak numerów serii produkcyjnych w zastosowanych substancjach;
- wielokrotnie opisywane w kolejnych rozdziałach właściwości fizykochemiczne tych samych substancji np. cząsteczki nanosrebra;
- brak rozdziału V – Wnioski.

Mimo zauważonych nielicznych uchybień stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz dr Marta Pawłowska powinna zostać dopuszczona do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Edmund Sieradzki