

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

MARTA PAWŁOWSKA

ROZPRAWA DOKTORSKA

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

**Antibacterial effect of metal nanoparticles
against selected bacteria
constituting the typical microflora of the upper respiratory tract**

Promotor:

prof. dr hab. n. farm. Andrzej Stańczak

Kierownik Zakładu Farmacji Aptecznej

Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi

Łódź 2023

Podziękowania:

Pragnę serdecznie podziękować prof. dr hab. Andrzejowi Stańczakowi za nieocenione wsparcie i zaangażowanie, merytoryczną pomoc oraz wszystkie cenne wskazówki przekazane podczas przygotowywania niniejszej pracy.

Również ogromne podziękowania ślę w stronę Pani dr hab. Anny Grudniak oraz dr Pawła Lisieckiego za realizację badań na stworzonych formułacjach oraz wsparcie w analizie wyników badań.

Szczególne podziękowania przekazuję do zespołu firmy Nano-tech Polska, nie tylko za udostępnienie surowców aXonnite® do wykonania formułacji, ale także za wyjątkowe wsparcie w realizacji tej pracy.

Bukiet podziękowań ślę w stronę Pani Irminy Białeckiej, która wierzyła we mnie wtedy gdy było najtrudniej.

Dziękuję wszystkim moim bliskim, przyjaciołom i kolegom; osobom które wspierały mnie i dawały dobre słowo i ogrom życzliwości.

Pracę dedykuję moim kochanym dzieciom Dorocie, Grzegorzowi i Wojciechowi, abyście nigdy nie przestali wierzyć w siebie, marzyli i podążali za tymi marzeniami, gdziekolwiek one prowadzą. Wiedzieli, że świat nauki jest fascynującą drogą.

Dorobek publikacyjny

1. M. Kalita, A. Sołgała, M. Siekierski, M. Pawłowska, G. Rokicki, W. Wieczorek „The effect of receptor–polymer matrix compatibility on electrochemical properties of PEO-based polymer electrolytes containing supramolecular additives: Part 2. Ionic transport study”. *Journal of Power Sources* 2007, 11; 173, 2, 765–773.
2. M. Pawłowska and co-workers „Nanomaterials as an alternative for preservative and biocidal substances”. *European Journal of Medical Technologies* 2019, 3; 24, 1-12.
3. M. Pawłowska, A. Stańczak, P. Hudemowicz, M. Pięta, A. Grudniak „Bezpieczeństwo i wykorzystanie nanocząstkowego srebra w chorobach o epidemiologii bakteryjnej, Safety and use of nanoparticle silver in diseases with bacterial epidemiology”, *Zakażenia XXI w.*, 2018; 6, 291-294.*
4. P. Hudemowicz, M. Pawłowska „Srebro jako alternatywa dla antybiotyków i leków przeciwwirusowych – nowe potencjalne wykorzystanie” *Lek w Polsce* 2022, 05; 32, 372.*
5. M. Pawłowska, P. G. Parzuchowski, G. Rokicki „Polymeric systems containing anionoselective calixarenes”, V International Polymer Seminar, Gliwice 200, *Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej* (2003).
6. M. Pawłowska, P. Parzuchowski, G. Rokicki, „Jonofory kaliksarenowe zdolne do trwałej immobilizacji na matrycy polimerowej”, XLVI Zjazd PTChem Lublin, 15-18 września 2003, *Preprints* s. 233.
7. P. Pawłowski, M. Pawłowska, G. Rokicki, J. Kozakiewicz. J. Przybylski „Elastomery poli (uretano-mocznikowe) na podstawie oligowęglanodioli - materiały do zastosowań medycznych i analitycznych", *Chemik*, 2005, 58; 2, 63-67.
8. J. Arct, K. Pytkowska, M. Pawłowska, M. Stolarek „Nanosrebro w medycynie i kosmologii-zastosowanie i bezpieczeństwo” *Dermatologia Etetyczna* 2015, 17, 230-239.*
9. A. Samet, R. Nowicki, A. Grudniak, M. Pawłowska „Nanobiotic nowej technologii aXon-nite - w leczeniu ran i AZS” *Akademia Naukowa dla Dermatologów i Alergologów (ADA 2017)*.*
10. A. Cenian, A. Grudniak, B. Gruber-Bzura, E. Drozd, M. Pawłowska „Nanocząstki nanocząstką nierówne”, – *Akademia Naukowa dla Dermatologów i Alergologów (ADA 2018)*.*

11. M. Pawłowska „Bezpieczeństwo stosowania nanosrebra w kosmetyce i medycynie” - Kwartalnik Chemiczny 03/18.*
12. M. Bronk, M. Pawłowska, A. Samet R. Nowicki, A. Grudniak „Antybakteryjne działanie srebra axonnite na karbapenemo-oporne szczepy klebsiella pneumoniae (new delhi) i acinetobacter baumannii” Akademia Naukowa dla Dermatologów i Alergologów (ADA 2019).*
13. A. Grudniak, R. Nowicki, A. Samet, P. Szweda, I. Papka, M. Bronk, M. Pawłowska „Przeciwrzybicze działanie nanometali axonnite® na grzyby z rodzaju Candida” Akademia Naukowa dla Dermatologów i Alergologów (ADA 2018).*
14. A. Samet, R. Nowicki, M. Pawłowska „Przegląd prozdrowotnego działania nanometali axonnite® w chorobach grzybiczych stóp i grzybicy żołądździ” Akademia Naukowa dla Dermatologów i Alergologów (ADA 2017).*
15. Podręcznik akademicki „Chemia kosmetyczna” – praca zbiorowa pod red. J. Klonowskiej 2022 r. rozdziały 9, 10, 12.
16. M. Pawłowska, A. Grudniak, J. Małek, A. Tul, P. Siejko „Kompozycja bazowa środka biobójczego" nr Pat.242545 z wzorem użytkowy nr W.118872.*

*Publikacje związane tematycznie z rozprawą doktorską

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP I CEL PRACY	1
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	3
1. Stany zapalne nosogardzieli.....	3
1.1. Budowa nosogardzieli. Problemy w diagnozowaniu źródła zakażeń	3
1.2. Szczepy patogenne kolonizujące błony śluzowe w nosogardzieli	5
1.3. Problemy w zwalczaniu infekcji nosogardzieli	7
2. Substancje stosowane w stanach infekcyjnych nosogardzieli	9
2.1. Nanometale.....	9
2.1.1. Nanocząstki srebra (AgNPs).....	10
2.1.1.1. Mechanizm oddziaływania.....	10
2.1.1.2. Wykorzystanie nanosrebra w medycynie.....	11
2.1.1.3. Bezpieczeństwo, toksyczność	13
2.1.1.4. Podsumowanie	14
2.1.2. Nanozłoto (AuNPs).....	14
2.1.2.1. Mechanizm oddziaływania.....	14
2.1.2.2. Wykorzystanie nanozłota w medycynie.....	15
2.1.2.3. Bezpieczeństwo, toksyczność	16
2.1.2.4. Podsumowanie	17
2.2. Surowce i przetwory roślinne	17
2.2.1. Babka lancetowata	18
2.2.2. Brzoza	19
2.2.3. Drzewo herbaciane.....	20
2.2.4. Imbir	20
2.2.5. Tymianek.....	21

2.2.6.	Porost islandzki	22
2.2.7.	Olejek eukaliptusowy	22
2.2.8.	Olejek z szałwii	23
2.2.9.	Oregano	24
2.3.	Substancje o działaniu łagodzącym, nawilżającym i powlekającym	24
2.3.1.	Laktoferyna	25
2.3.2.	Dekspantenol (pantenol)	25
3.	Przegląd wybranych promotorów przenikania przez błony biologiczne	27
3.1.	Eter dimetylowy izosorbidu	28
3.1.1.	Informacje toksykologiczne	28
3.1.2.	Zastosowanie i działanie	28
3.2.	Hydroksyacetofenon	30
3.2.1.	Informacje toksykologiczne	30
3.2.2.	Zastosowanie i działanie	30
3.3.	Dimetylosulfotlenek	31
3.3.1.	Informacje toksykologiczne	31
3.3.2.	Zastosowanie i działanie	31
3.4.	Glikol kaprylowy	32
3.4.1.	Informacje toksykologiczne	32
3.4.2.	Zastosowanie i działanie	33
3.5.	Etyloheksylogliceryna	34
3.5.1.	Informacje toksykologiczne	34
3.5.2.	Zastosowanie i działanie	34
3.6.	Gliceryna	35
3.6.1.	Informacje toksykologiczne	35
3.6.2.	Zastosowanie i działanie	35
3.7.	Glikol heksylenowy	36

3.7.1.	Informacje toksykologiczne	36
3.7.2.	Zastosowanie i działanie	36
III.	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	38
1.	Określanie wartości MIC badanych formułacji metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym	38
1.1.	Wyznaczenie aktywności badanych formułacji wobec wzorcowych szczepów drobnoustrojów	38
1.1.1.	Materiały wykorzystane w badaniach	39
1.1.1.1.	Substancje chemiczne stosowane w badaniach	39
1.1.1.2.	Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach	39
1.1.1.3.	Pożywki wykorzystywane w badaniach	40
1.1.2.	Przygotowanie szczepów do badań	40
1.1.3.	Formułacje użyte do badań i ich przygotowanie	40
1.1.3.1.	Przygotowanie formułacji	40
1.1.4.	Wykonanie oznaczenia	41
1.1.5.	Omówienie wyników	52
1.2.	Wyznaczenie aktywności badanych formułacji z wybranymi promotorami przenikania wobec reprezentatywnych drobnoustrojów	52
1.2.1.	Materiały wykorzystane w badaniach	53
1.2.1.1.	Substancje chemiczne stosowane w badaniach	53
1.2.1.2.	Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach	53
1.2.1.3.	Formułacje użyte do badań i ich przygotowanie	54
1.2.2.	Wykonanie oznaczenia	54
1.2.3.	Omówienie wyników	54
1.3.	Wyznaczenie aktywności badanych formułacji z wybranymi przetworami pochodzenia roślinnego	59
1.3.1.	Materiały wykorzystane w badaniach	59
1.3.1.1.	Substancje chemiczne stosowane w badaniach	59

1.3.1.2.	Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach	60
1.3.1.3.	Formulacje użyte do badań i ich przygotowanie.....	60
1.3.2.	Wykonanie oznaczenia.....	60
1.3.3.	Omówienie wyników	62
1.4.	Wyznaczenie aktywności badanych formulacji z wybranymi substancjami łagodzącymi	62
1.4.1.	Materiały wykorzystane w badaniach.....	63
1.4.1.1.	Substancje chemiczne stosowane w badaniach.....	63
1.4.1.2.	Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach	64
1.4.1.3.	Formulacje użyte do badań i ich przygotowanie.....	64
1.4.2.	Wykonanie oznaczenia.....	64
1.4.3.	Omówienie wyników	64
1.5.	Wyznaczenie aktywności badanych formulacji z wybranymi substancjami poprawiającymi właściwości fizykochemiczne poprzez zwiększenie lepkości	66
1.5.1.	Materiały wykorzystane w badaniach.....	67
1.5.1.1.	Substancje chemiczne stosowane w badaniach.....	67
1.5.1.2.	Przygotowanie emulsji	68
1.5.1.3.	Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach	68
1.5.1.4.	Formulacje użyte do badań i ich przygotowanie.....	68
1.5.2.	Wykonanie oznaczenia.....	68
1.5.3.	Omówienie wyników	71
2.	Określanie wartości MIC badanych formulacji metodą dyfuzyjno-krażkową	73
2.1.	Wyznaczenie aktywności badanych formulacji z wybranymi promotorami przenikania wobec reprezentatywnych drobnoustrojów.....	73
2.1.1.	Materiały wykorzystane w badaniach.....	73
2.1.1.1.	Substancje chemiczne stosowane w badaniach.....	73
2.1.1.2.	Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach	74
2.1.1.3.	Formulacje użyte do badań i ich przygotowanie.....	74

2.1.2.	Wykonanie oznaczenia.....	74
2.1.3.	Omówienie wyników	87
3.	Określanie wartości MIC badanych formułacji wobec drobnoustrojów mikroaerofilnych oraz beztlenowych metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym oraz dyfuzyjno-krażkową	89
3.1.	Wyznaczenie aktywności badanych formułacji	89
3.1.1.	Materiały wykorzystane w badaniach.....	89
3.1.1.1.	Substancje chemiczne stosowane w badaniach.....	89
3.1.1.2.	Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach	90
3.1.1.3.	Formułacje użyte do badań i ich przygotowanie.....	90
3.1.2.	Wykonanie oznaczenia.....	90
3.1.3.	Omówienie wyników	95
4.	Określanie minimalnego stężenia hamującego rozwój biofilmu dla badanych formułacji.....	97
4.1.	Wyznaczenie aktywności badanych formułacji	97
4.1.1.	Materiały wykorzystane w badaniach.....	98
4.1.1.1.	Substancje chemiczne stosowane w badaniach.....	98
4.1.1.2.	Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach	98
4.1.1.3.	Formułacje użyte do badań i ich przygotowanie.....	98
4.1.2.	Wykonanie oznaczenia	98
4.1.3.	Omówienie wyników	101
IV.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	102
V.	STRESZCZENIE.....	107
1.	Wersja Polska	107
2.	English version	109
VI.	ZAŁĄCZNIKI	112
1.	Wykaz rycin.....	112
2.	Wykaz tabel	112

VII. PIŚMIENNICTWO	116
--------------------------	-----

Lista skrótów użytych w pracy:

AgNPs – ang. *Silver nanoparticles*, nanocząstka srebra

AuNPs – ang. *Gold nanoparticles*, naocząstka złota

BPO - nadtlenuk benzoilu

CAS – ang. *Chemical Abstracts Service*

CIR- ang. *Cosmetic Ingredient Review*, Przegląd Składników Kosmetycznych

COLIPA – ang. *European Cosmetic and Perfumery Association*, Europejskie Stowarzyszenie Kosmetyków

CRP – ang. *C Reactive Protein*, białko C-reaktywne

CuNPs – ang. *Copper Nanoparticles*, nanocząstki miedzi

DMI - etylheksyl gliceryna

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – ang. *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy

EDG – etoksydiglikol

ECHA – ang. *European Medicines Agency*, Europejska Agencja Leków

EMA - ang. *European Medicines Agency*, Europejska Agencja Leków

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości

FAO - ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa

FDA – ang. *Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków

GRAS – ang. *Generally Recognized as Safe*, powszechnie uznana za bezpieczną

HA - hydroksyacetonfenon

INCI – ang. *International Nomenclature of cosmetic ingredients*, Międzynarodowe nazewnictwo składników kosmetyków

KORLD - Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów

LD₅₀ – ang. *Lethal Dose*, miara ostrej toksyczności i oznacza taką dawkę substancji, która zbija 50% badanej populacji

MBC- ang. *Minimum Bactericidal Concentration*, minimalne stężenie bakteriobójcze

MBIC – ang. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*, minimalne stężenie hamujące biofilm

MIC - ang. *Minimum Inhibitory Concentration*, minimalne stężenie hamujące

MMP - metaloproteinazy

NOAEL - ang. *No-Observed-Adverse-Effect Level*, poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków

NOEL - ang. *No-Observable-Effect Level*, poziom niewywołujący obserwowalnych skutków

NPs – ang. *Nanoparticles*, nanocząstka

OECD – ang. *The Organisation for Economic Co-operation and Development*, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju

PMMA- ang. *poly(methylmethacrylate)*, polimetakrylan metylu

RNA – ang. *ribonucleic acid*, czyli kwas rybonukleinowy

ROS – ang. *Reactive Oxygen Species*, reaktywne formy tlenu

SCCP- ang. *Scientific Committee on Consumer Products*, Komitet Naukowy ds. Produktów Konsumenckich

U.E – ang. *European Union*, Unia Europejska

USA – ang. *United States of America*, Stany Zjednoczone Ameryki

I. WSTĘP I CEL PRACY

Mikroflorę jamy ustnej tworzy ponad 700 gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, zarówno tlenowych jak i beztlenowych. Bakterie te wykazują gatunkowo swoistą topografię kolonizując zęby, język, błonę śluzową jamy ustnej, podniebienie twarde i kieszonki dziąsłowe. Niektóre z nich odgrywają ważną rolę w utrzymaniu zdrowego stanu jamy ustnej, inne są potencjalnymi czynnikami chorobotwórczymi. Jednak w przypadku ich nadmiaru lub zachwianej równowagi stają się czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych tkanek miękkich jamy ustnej, dziąseł i przyzębia oraz próchnicy.

Ciągłym źródłem infekcji jamy ustnej są także protezy zębowe, implanty i aparaty ortodontyczne, chętnie zasiedlane przez drobnoustroje, tworzące na ich powierzchni zwartą warstwę biofilmu. Ich konstrukcja, blokująca prawidłowy przepływ śliny, znacznie utrudnia utrzymywanie prawidłowej higieny jamy ustnej. Profilaktyka i zwalczanie biofilmu tworzącego się na protezach, aparatach ortodontycznych i przylegającej tkance opiera się głównie na mechanicznym usuwaniu drobnoustrojów. Wspiera je stosowanie past do zębów i płynów do płukania jamy ustnej, zawierających substancje o właściwościach przeciwbakteryjnych. Ale pozbycie się ich tradycyjnymi metodami jest niemal niemożliwe i często zmusza pacjenta do przewlekłej antybiotykoterapii, wymiany protezy, a co za tym idzie do ponoszenia dodatkowych kosztów^{1,2,3,4}.

Nanocząstki (ang. *Nanoparticles*, NPs) metali, w tym złota, srebra i miedzi mogą stanowić składnik preparatów do higieny jamy ustnej i nosa. Wykazują bowiem wysoką skuteczność wobec konsorcjów drobnoustrojowych kolonizujących często powierzchnię błon śluzowych i przyczyniających się do rozwoju przewlekłych infekcji w obrębie jamy ustnej i nosogardzieli. Praca ta ma na celu opracowanie i weryfikację doświadczalną w skali laboratoryjnej serii formułacji, zawierających nanomateriały srebra (ang. *Silver nanoparticles*, AgNPs) i złota (ang. *Gold nanoparticles*, AuNPs), wykazujących dużą skuteczność wobec patogenów wybranych z grupy bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych i grzybów. W założeniach wstępnych pracy, obok AgNPs i AuNPs, wzięto również pod uwagę nanomiedź (ang. *Copper nanoparticles*, CuNPs), choć zgodnie z doniesieniami piśmiennictwa, nanometal ten jest głównie aktywny wobec grzybów, czyli mikroflory, która nie występuje zbyt często w stanach infekcyjnych nosogardzieli.

W założeniach pracy przyjęto, że otrzymane formułacje powinny wykazywać:

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

Zwalczanie biofilmu i penetracja substancji mikrobiologicznie aktywnych jest jednym z większych wyzwań stawianych produktom przeciwdrobnoustrojowym. W pracy skupiono się więc na badaniach, w których nie tylko zastosowano AgNPs i AuNPs, ale również substancje, ułatwiające przenikanie przez błony biologiczne zakładając, że wykorzystane promotory przenikania będą wspierać aktywność nanometali i niwelować drobnoustroje obecne w strukturach biofilmu. Natomiast w celu zwiększenia atrakcyjności potencjalnego produktu stosowanego w infekcjach wirusowych czy bakteryjnych jamy ustnej i nosogardzieli, a także licząc na synergizm działania formułacji zawierających AgNPs i AuNPs oraz promotory przenikania przez błony biologiczne włączono także przetwory surowców roślinnych o udowodnionym działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Mam nadzieję, że przeprowadzone badania przełożą się na praktyczne wykorzystanie nanometali w produktach do higieny jamy ustnej oraz wspomogą proces leczenia stanów zapalnych jamy ustnej, nosa czy zatok.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Stany zapalne nosogardzieli

1.1. Budowa nosogardzieli. Problemy w diagnozowaniu źródła zakażeń

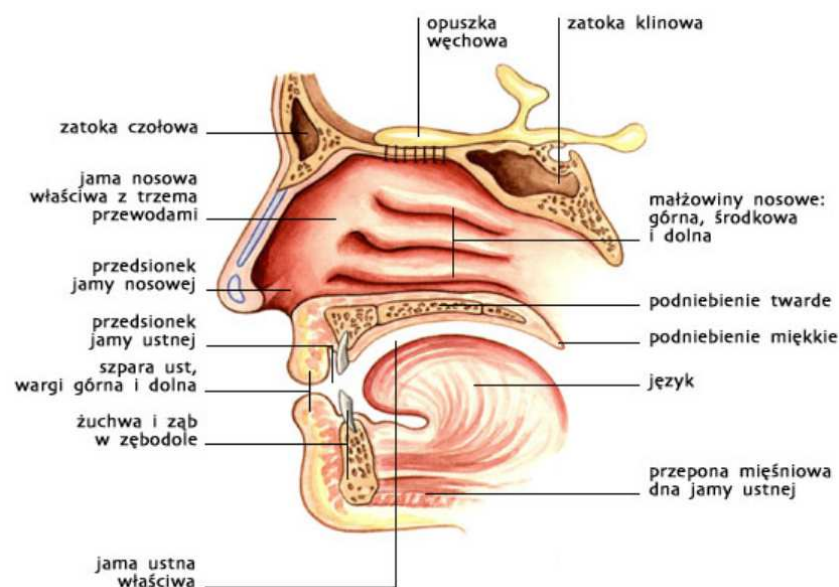
Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej i nosogardzieli w fazie ostrej lub przewlekłej jest jednym z najczęstszych objawów zgłaszanych przez pacjentów w gabinetach internistycznych, stomatologicznych i otolaryngologicznych. Przyczyny zapalenia tkanek są zazwyczaj niejednoznaczne i trudne do zdiagnozowania. Często towarzyszą im również zaburzenia drożności nosa i inne objawy czy dysfunkcje, takie jak zapalenie zatok przynosowych lub migdałów gardłowych. Jednym z większych problemów jaki należy wziąć pod uwagę w leczeniu stanów zapalnych nosogardzieli jest także tworzący się biofilm bakteryjny, którego pozbycie się lub spenetrowanie przez substancję mikrobiologicznie aktywne jest często bardzo trudne lub wręcz niemożliwe⁵.

Nosogardło możemy podzielić na dzielącą się nieparzyście przestrzeń zagardłową i parzystą przygardłową. Co istotne, na ścianie bocznej nosogardzieli znajduje się ujście gardłowe trąbki słuchowej, natomiast górna i tylna część trąbki słuchowej otacza migdałek trąbkowy tworzący tzw. wał trąbkowy⁶. Głębiej znajduje się też migdałek gardłowy o kształcie przypominającym czworokąt bądź trójkąt. Pokryty jest on nabłonkiem dwuwarstwowym walcowatym, który w niższych partiach (w aspekcie położenia względem układu jamy nosogardzieli) zmienia się w nabłonek wielowarstwowy płaski (Ryc.1).

Migdałki są bardzo ważnym segmentem naszego układu odpornościowego, ale także co w ostatnich latach odkryto, stanowią ważny element metabolizmu człowieka. Jak udowodniono dzieci, u których dokonano *tonsillektomi* lub *tonsillotomi* (usunięcia migdałków) przed 7 rokiem życia są bardziej narażone na otyłość⁷. Mechanizm ten nie jest jeszcze dobrze poznany, ale ma to prawdopodobny związek z mikrobiomem wewnątrzjelitowym, który ściśle powiązany jest z „rezerwuarem” mikrobiologicznym znajdującym się w migdałkach. Migdałki są też jed-

nym z pierwszych organów kontaktujących się z mikroorganizmami znajdującymi się w otoczeniu zewnętrznym człowieka. Jest to więc jeden z ważniejszych elementów budujących odporność. Ale należy także pamiętać, że są też w stanie przysparzać wiele problemów nadinterpretowując zagrożenie dla organizmu i przyczyniać się do zintensyfikowania objawów chorób autoimmunologicznych, takich jak chociażby łuszczyca, w której to nadreaktywne migdałki mogą powodować zwiększenie świądu skóry⁸. Z tego też powodu u chorych na łuszczycę występuje często skłonność do stanów zapalnych gardła^{9, 10}.

Infekcje nosogardzieli, przy pierwszej obserwacji, są trudne w ocenie klinicznej. W postawieniu prawidłowej diagnozy pomocne są posiewy wykonywane przy nadkażeniach bakteryjnych, niemiarodajne przy zapaleniach wirusowych. Rozpoznanie infekcji wirusowych stwierdza się więc po obserwacji objawów takich jak wodnisty katar, miejscowy ból tylnej ściany gardła, suchy kaszel a uwzględniając diagnostykę laboratoryjną - poziom białka C-reaktywnego (ang. *C Reactive Protein*, CRP), glikoproteiny należącej do grupy białek ostrej fazy. Jej wartość zwykle nie przekracza ono 40 mg/l, ale przy zakażeniach bakteryjnych może osiągać poziom nawet powyżej 200 mg/l^{11,12,13}. Ale infekcje nosogardzieli mają często charakter mieszany i dlatego też preparaty stosowane w tych zakażeniach powinny wykazywać szerokie spectrum działania, zarówno na wirusy jak i bakterie.



Rycina 1. Przekrój nosogardzieli¹⁴.

Większość zakażeń nosogardzieli ma przebieg łagodny i nie wymaga włączenia antybiotyków czy glikokortykosterydów, a jedynie zastosowania preparatów miejscowych o szerokim spektrum działania antybakteryjnego i antywirusowego. Jak wykazują statystyki, nawet w 30%

przypadków wdrożenie antybiotykoterapii w tych infekcjach jest nieuzasadnione i może przyczynić do groźnej w skutkach lekooporności^{15,16,17}. Dlatego też w pierwszej kolejności należy wspierać układ immunologiczny, stosować preparaty miejscowe, bez możliwości działania ogólnoustrojowego. Wydaje się więc, że nanometale srebro i złoto (AgNPs i AuNPs), przed którymi mikroorganizmy nie znalazły jeszcze skutecznego sposobu obrony mogą stanowić obiecującą alternatywę w walce z drobnoustrojami kolonizującymi nosogardziel. Efektywnym sposobem zwalczania infekcji może być także fitofarmakologia. Jak udowodniono w badaniach przeprowadzonych na wirusach wywołujących ostre zapalenie zatok (łac. *Rhinosinusitis acuta*) tradycyjne produkty roślinne, takie jak: czarny bez, szczaw, goryczka, werbena wykazują działanie przeciwwirusowe, skutecznie ograniczając replikację wirusów¹⁸.

1.2. Szczepy patogenne kolonizujące błony śluzowe w nosogardzieli

Zdecydowana większość infekcji w obrębie nosogardzieli rozpoczyna się od wywołania stanu zapalnego po kontakcie z wirusami, które to ułatwiają bakteriom inwazję i przyleganie do nabłonka wyściełającego drogi oddechowe. W procesie adhezji czynnie uczestniczą dwa typy struktur, obecnych na powierzchni większości bakterii Gram-ujemnych, ale też u niektórych przedstawicieli bakterii Gram-dodatnich, takich jak np. *Streptococcus*. Są to włosowate struktury komórkowe – fimbrie, biorące udział w procesie wiązania komórki bakteryjnej do komórek gospodarza oraz stanowiące aparat ruchu rzęski (ang. *flagella*). Można więc uznać je, za odpowiedzialne za pierwsze etapy zakażenia i wpływ na późniejszy przebieg choroby.

Kontakt, a następnie skolonizowanie bakterii na błonach śluzowych nosogardzieli uruchamia procesy obronne organizmu - fagocytozę, podczas której wyspecjalizowane komórki gospodarza wychwytyją i niszczą intruza. Gdy jednak patogen pokona ciągłość nabłonka dróg oddechowych dochodzi do aktywowania odczynu zapalnego, czego konsekwencją jest uszkodzenie struktur błon śluzowych a następnie tkanek miękkich, zwiększona przepuszczalność naczyń krwionośnych, obrzęk błony śluzowej oraz wzrost wydzielania surowiczo-śluzowego, a także degradacja komórek urzęsionych i nieurzęsionych dróg oddechowych, spowolniająca transport śluzowo-rzęskowy i przyczyniająca się do zalegania wydzieliny. Dane źródłowe wskazują, iż najczęstszą przyczyną bakteryjnego zapalenia gardła czy migdałków są bakterie z rodzaju paciorkowców i gronkowców między innymi: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

pneumonia, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Haemophilus influenzae*, natomiast bakterie z rodzaju *Mycoplasma* i *Chlamydia pneumoniae* stanowią mniej niż 1% przypadków zakażeń^{19,20}. Przykładami patogennych bakterii kolonizujących nosogardziel są:

a. bakterie Gram-dodatnie

- gronkowce (*Staphylococcus*),
- paciorkowce (*Streptococcus*),
- laseczka tężca (*Clostridium tetani*),
- laseczki zgorzeli gazowej (*Clostridium perfringens*),
- laseczka wąglika (*Bacillus anthracis*),
- maczugowiec błonicy (*Corynebacterium diphtheriae*),
- prątek gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*),
- prątek trądu (*Mycobacterium leprae*).

b. bakterie Gram-ujemne

- pałeczki z rodzaju *Brucella*,
- pałeczki z rodzaju *Salmonella*,
- pałeczki z rodzaju *Shigella*,
- pałeczki z rodzaju *Klebsiella*,
- krętek błądy (*Treponema pallidum*),
- pałeczka okrężnicy (*Escherichia coli*),
- pałeczka dżumy (*Yersinia pestis*),
- przecinkowiec cholery (*Vibrio cholerae*),
- pałeczka (*Helicobacter pylori*),
- pałeczka grypy (*Haemophilus influenzae*),
- pałeczka z rodzaju *Proteus*,
- pałeczka krwawa (*Serratia marcescens*).

W terapii infekcji jamy ustnej i nosogardzieli należy uwzględnić także, że bakterie kolonizujące ten obszar próbują skutecznie „walczyć o przetrwanie”, wykształcając szereg mechanizmów mających wpływ na ich zjadliwość. Niektóre z nich, w tym *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis* czy *Staphylococcus aureus* hamują fagocytozę, utrudniając eliminację inwazyjnego patogenu, inne jak m.in. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* organizują się w strukturę biofilmu, blokując dostęp substancji aktywnych mikrobiologicznie²¹.

1.3. Problemy w zwalczaniu infekcji nosogardzieli

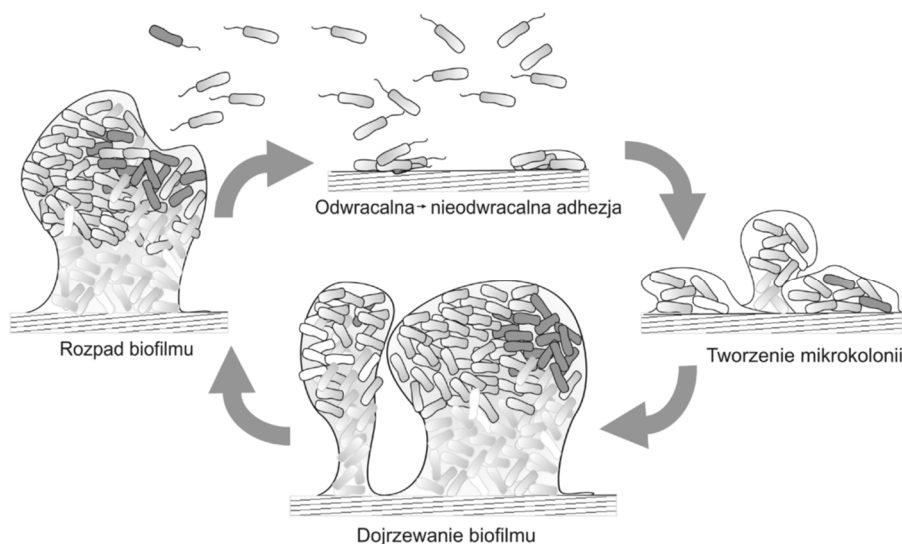
Dużym utrudnieniem w obrazowaniu, właściwej analizie mikroorganizmów a także leczeniu infekcji nosogardzieli jest występowanie biofilmu, pokrywającego błonę śluzową, w tym również migdałków przygardłowych. Biofilm tworzą osiadłe populacje jednego lub wielu gatunków mikroorganizmów, przytwierdzone do podłoża, pokryte zewnątrzkomórkową polimerową substancją - macierzą (ang. *Matrix*), złożoną głównie z wielocukrów, białek i kwasów nukleinowych, stanowiącą skuteczną barierę chroniącą przed działaniem antybiotyków, antyseptyków oraz układu immunologicznego gospodarza²². Cykl życia biofilmu można podzielić na występujące po sobie cztery główne etapy: adhezja, tworzenie mikrokolonii, dojrzewanie biofilmu i jego rozpad (Ryc. 2)²³.

Zdolność drobnoustrojów do tworzenia struktury biofilmu wpływa niekorzystnie na proces leczenia infekcji. Mikroorganizmy znajdujące się pod macierzą tolerują bowiem nawet 1000-krotnie wyższą dawkę toksycznych dla nich związków, w porównaniu z bakteriami nieskolonizowanymi²⁴. Oporność ta związana jest z kilkoma czynnikami. W pierwszej kolejności należy wymienić tu wydłużony czas wnikania substancji aktywnej, co w konsekwencji daje możliwość wytworzenia lub uruchomienia przez patogenne bakterie mechanizmów obronnych, np. produkcję enzymów β -laktamaz katalizujących hydrolizę antybiotyków β -laktamowych. Również nie bez znaczenia jest efekt dawki substancji przeciwdrobnoustrojowej, bowiem *matrix* skutecznie uniemożliwia działanie pojedynczej dawki leku, co ma ogromny wpływ na skuteczność niwelowania kolonii biofilmu²⁵.

Możliwość współdziałania różnych szczepów drobnoustrojów w procesie tworzenia biofilmu jest kolejnym mechanizmem stanowiącym spore utrudnienie w zwalczaniu patogennych mikroorganizmów. Polega to najczęściej na aktywnej wymianie produktów niezbędnych do życia, co zwiększa szansę przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Ale sytuacja może być wręcz odwrotna. Niektóre patogeny wydzielają bowiem substancje takie jak biosurfaktanty, czy enzymy trawienne, blokujące rozwój innych szczepów mikroorganizmów²⁶.

Wszystkie wyżej przedstawione kwestie utrudniają aktywne leczenie i sprawiają, że skuteczne zwalczanie infekcji i stanów zapalnych stanowi duże wyzwanie, jakiemu musi podołać współczesna medycyna. Poszukiwanie nowatorskich rozwiązań skierowało więc badania nie tylko w kierunku otrzymywania nowych substancji aktywnych, ale także wykorzystania nowo-

czesnych technologii, które umożliwiłyby zwalczanie biofilmu i penetrację substancji przeciwmikrobowych przez *matrix*²⁷. Mimo licznych doniesień piśmiennictwa związanych z aktywnością NPs srebra, złota i miedzi wobec szczepów bakterii, wirusów i grzybów, informacje odnoszące się do zwalczania przez NPs metali biofilmu są wciąż bardzo ograniczone. Dlatego badania nad ich potencjałem doskonale wpisują się w oczekiwania medycyny.



Rycina 2. Kolejne stadia tworzenia biofilmów bakteryjnych¹⁷.

Przegląd piśmiennictwa dostarcza także informacji na temat synergizmu działania NPs metali z innymi związkami aktywnymi biologicznie, w tym z antybiotykami czy substancjami czynnymi roślinnych produktów leczniczych. Przewagą takich połączeń jest przede wszystkim możliwość zastosowania niższych dawek chemioterapeutyków, przy zachowaniu takiego samego, a nawet większego efektu terapeutycznego. Terapie skojarzone dają również szansę przywrócenia medycynie produktów leczniczych dobrze poznanych i opisanych, które straciły efektywność działania w wyniku lekooporności. W przeprowadzonych badaniach potwierdzono już istnienie oddziaływań synergistycznych między AgNPs a ampicyliną, gentamycyną, streptomycyną i wankomycyną wobec szczepów *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*^{13,15,28,29}.

2. Substancje stosowane w stanach infekcyjnych nosogardzieli

2.1. Nanometale

Jedną z ciekawszych i najbardziej obiecujących dziedzin technologicznych, wykorzystywanych obecnie dość często w produktach stosowanych w medycynie jest nanotechnologia. W ostatnich latach szczególną uwagę poświęcono badaniom nad metalami szlachetnymi i półszlachetnymi w rozmiarze *nano*. Odkryto bowiem, że substancje te przeniesione do tej skali wykazują znakomite właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Liczne prace eksperymentalne udowodniły, że NPs pewnych metali są skuteczne już w bardzo niskich stężeniach, a jednocześnie nie wykazują lub wykazują niską toksyczność w stosunku do komórek ludzkich. Skuteczność, możliwość długotrwałego stosowania, a także szerokie spektrum działania na mikroorganizmy są główną zaletą NPs metali, a różnorodność procesów eliminacji utrudnia mikroorganizmom wytworzenie mechanizmów obronnych³⁰.

Znakomite właściwości metali były znane od wieków. Od czasów średniowiecznych aż do lat 70 XX wieku używano jednak głównie srebra metalicznego oraz jego związków (azotanu srebra *in lapis* lub sulfadiazyny srebra), wykorzystując ich działanie antybakteryjne zarówno w medycynie, jak i w kosmetyce^{31,32,33,34,35,36}. Dopiero w II połowie XX wieku, kiedy rozwinął się przemysł farmaceutyczny i produkcja antybiotyków ruszyła na dużą skalę, droższy i mniej dostępny kruszec zaczął być rzadziej stosowany. Uwzględniając jednak fakt, że wiele substancji wykorzystywanych w antybakteryjnych i antywirusowych produktach leczniczych ma udowodnione działania niepożądane trwa ciągłe poszukiwanie nowych rozwiązań, bezpieczniejszych dla ludzi i środowiska^{37,38,39}.

Rosnącą odporność drobnoustrojów na znane leki przeciwbakteryjne skłania także do szerokiego zainteresowania antybakteryjnymi i antywirusowymi właściwościami nanometali. Dobrym rozwiązaniem wydają się być zwłaszcza nanosrebro (AgNPs)⁴⁰, które uznawane jest za nową generację środków antybakteryjnych stosowanych w medycynie⁴¹.

2.1.1. Nanocząstki srebra (AgNPs)

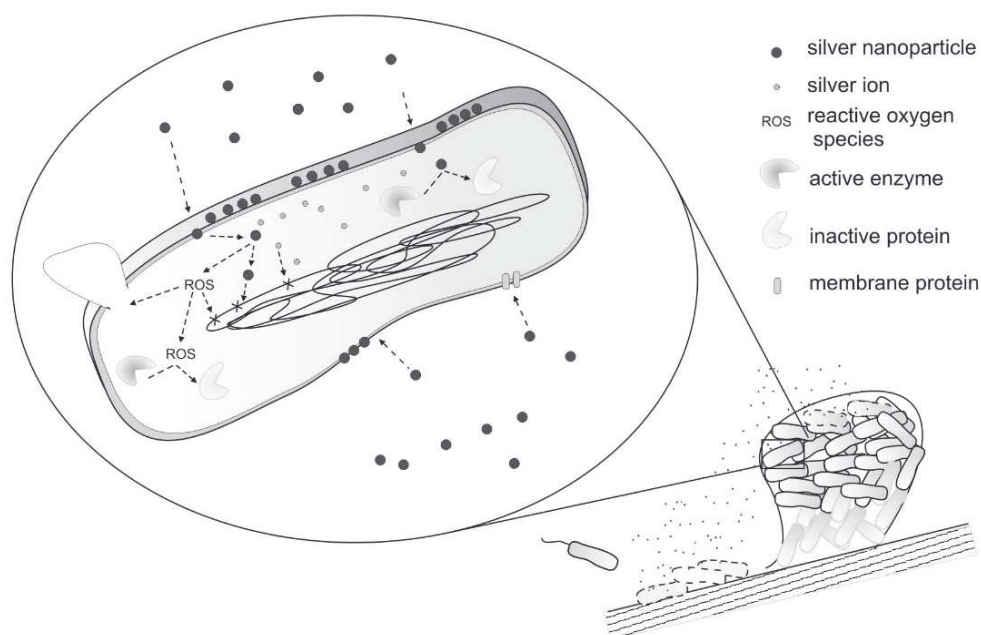
Srebro jest pierwiastkiem chemicznym należący do grupy pierwiastków przejściowych 11(1B). Sam metal jak i jego jony stosowano w medycynie od wieków. Jednak późniejsze badania, związane z wykorzystywaniem srebra do pokrywania narzędzi chirurgicznych, wykazały niską aktywność antymikrobową obu tych form^{42,43}. Przyczyną tego zjawiska mogła być „dezaktywacja” srebra metalicznego i jonowego w kontakcie z krwią. Ale późniejsze prace, związane z analizą aktywności AgNPs, przeprowadzone na płytkach silikonowych pokrytych warstwą nanometalu wykazały znakomite właściwości przeciwdrobnoustrojowe⁴⁴, co dało możliwość wykorzystania nanocząstek srebra także obszarze zastosowania medycznego.

2.1.1.1. Mechanizm oddziaływania

Wniknięcie AgNPs do komórki bakteryjnej powoduje szereg zmian, co zaburza wewnętrzną organizację struktury oraz funkcjonowanie komórki. Prawdopodobny mechanizm przeciwdrobnoustrojowy nanosrebra nie polega jedynie na reakcji chemicznej, ale także na zdolności przenoszenia bądź magazynowania tlenu atomowego lub oddziaływania bioelektryczne. Łącuch procesów rozpoczyna połączenie się AgNPs z grupami sulfonowymi peptydoglikanu, występującego w ścianie komórkowej bakterii i zmniejszenie usieciowania głównego polimeru (mureiny), co w rezultacie prowadzi do lizy komórki. Obniżenie stopnia usieciowana wspiera również penetrację w głąb komórki, gdzie srebro, które jest zdolne do silnej interakcji z resztami fosforanowymi, imidazolowymi, sulfhydrylowymi oraz karboksylowymi wchodzącymi w skład białek oraz kwasów nukleinowych⁴⁵, wbudowuje się w łańcuch DNA bakterii, uniemożliwiając ich replikację^{46,47}. AgNPs blokują również reakcje w łańcuchu oddechowym, co skutkuje hamowaniem przepływu informacji w komórce a także wpływa na powstawanie dużej ilości reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS)^{48,49}. Indukowany na tej drodze stres oksydacyjny rzutuje na działanie białek i zahamowanie wzrostu oraz zniekształcenie struktury komórkowej, zarówno wewnętrznej jak i zewnętrznej, prowadząc ostatecznie do śmierci drobnoustrojów (Ryc. 3)^{50,51,52,53}.

Srebro jest bezpieczne dla ludzi, gdyż mureina, główny składnik budulcowy ściany komórkowej bakterii i nie występuje w komórkach eukariotycznych, co uniemożliwia penetrację AgNPs do wnętrza nieuszkodzonych komórek ludzi czy zwierząt. Przeprowadzone prace wykazały, że skuteczność nanosrebra jest związana z wielkością cząstki. Ale jak udowodniono, antybakteryjne działanie AgNPs jest uzależnione nie tylko od jej rozmiarów⁵⁴, ale również od

kształtu⁹, przy czym nanocząstki w kształcie trójkątnym są bardziej reaktywne niż cząstki sferyczne⁵⁵.



Rycina 3. Działanie nanocząstek srebra na komórkę bakterii¹⁷.

AgNPs wykazują działanie antybakteryjne zarówno na bakterie Gram-ujemne, jak i Gram-dodatnie choć uważa się, że to szczepy Gram-ujemne są bardziej wrażliwe na AgNPs, głównie ze względu na większą łatwość przenikania cząstek przez ścianę komórkową^{56,57}. Bakterie Gram-ujemne mają bowiem cienką warstwę peptydoglikanu i zewnętrzną warstwę lipopolisacharydów, w której kowalencyjne połączenia z polisacharydami generują ładunek ujemny, sprzyjający przyciąganiu dodatniego ładunku na AgNPs, co niewątpliwie ułatwia adhezję nanocząstek. W przypadku bakterii Gram-dodatnich proces ten jest bardziej utrudniony ze względu na grubą warstwę peptydoglikanu ściany komórkowej. Jednak niezależnie od budowy bakterii, proces przyłączenia substancji mikrobiologicznie aktywnej zapoczątkowuje wielokierunkowy mechanizm dezaktywacji i śmierć komórek bakteryjnych.

2.1.1.2. Wykorzystanie nanosrebra w medycynie

Właściwości antybakteryjne AgNPs są szeroko wykorzystywane w medycynie. Współcześnie, AgNPs wchodzi w skład nie tylko żeli antybakteryjnych stosowanych do dezynfekcji skóry^{58,59}, ale służy także do powlekania implantowanych wyrobów medycznych: implantów protez, cewników, zastawek, itp.^{60,61,62}, tworząc powłokę antybakteryjną na ich powierzchni⁶³. Właściwości AgNPs ukierunkowane na obecne w organizmie szczepy *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus epidermidis* są wykorzystywane przy produkcji cewników stosowanych przy operacjach mózgu^{64,65}.

W zastosowaniach chirurgicznych AgNPs i jego antybakteryjne właściwości są postrzegane jako dobre i bezpieczne. Nie obserwowano żadnych działań niepożądanych⁶⁶, przy znacznym zniwelowaniu ryzyka powstania infekcji bakteryjnych⁶⁷. Badania na zwierzętach, którym wszczepiono silikonowe zastawki powleczone nanosrebrem, potwierdzały dobrą biokompatybilność⁶⁸, a zastosowanie AgNPs wkomponowanego w strukturę polimeru zdecydowanie opóźniło powstanie biofilmu⁶⁹. Brak toksyczności potwierdziły także badania *in vivo* przeprowadzone w testach 10-dniowych na myszach⁷⁰.

Nanosrebro jest wykorzystywane także w chirurgii ortopedycznej jako dodatek do polimerowego cementu kostnego (ang. *poly(methylmethacrylate*, PMMA), który stosuje się w zabiegach implantacji protez stawów biodrowych i kolanowych^{71,72}. Antybakteryjne właściwości nanocząstek zmniejszają ryzyko infekcji oraz odrzutów, które w tego typu operacjach jest dość wysokie i wynosi od 1 do 4%. Chociaż zastosowanie antybiotyków w masie cementu kostnego zmniejsza również prawdopodobieństwo wystąpienia infekcji od 0,4 do 1,8%, jednakże nie jest ono korzystne ze względu na nabywanie oporności bakterii na stosowaną substancję aktywną⁷³.

Srebro metaliczne było wykorzystywane od lat w stomatologii w wypełnieniach amalgamatowych. Jednak mała plastyczność materiału, zawartość rtęci oraz interakcje srebra z surowicą krwi skutkujące zaciemnianiem zęba, spowodowały powolny zwrot zainteresowania w kierunku nowoczesnych wypełnień polimerowych wspartych także nanosrebrem. I tak w 2011 r. otrzymano eksperymentalny kompozyt dentystyczny o potwierdzonym w testach *in vitro* oraz *in vivo* działaniu antypróchnicowym, który zawierał związki srebra⁷⁴, a w 2012 r. dodano do polimerowego wypełnienia AgNPs, wykorzystując ich własności antybakteryjne⁷⁵.

Od bardzo dawna stosowano srebro w przypadkach poważnych uszkodzeń skóry jako dodatek do bandaży, a także w tekstyliach używanych przez pacjentów z ranami poparzeniowymi, owrzodzeniami lub przy zmianach związanych z atopią skóry⁷⁶. Obok działania przeciwdrobnoustrojowego AgNPs wykazuje bowiem dwutorowe działanie przeciwzapalne:

- inhibituje czynniki prozapalne oraz
- aktywuje apoptozę w komórkach zapalnych bez indukcji na zdrowe komórki.

W medycynie bardzo chętnie wykorzystuje się też żele oraz kremy, które znakomicie wpływają na regenerację zranionej lub poparzonej skóry. Użycie preparatów z AgNPs przyspiesza gojenie się ran dzięki zabezpieczeniu jej przed rozwojem drobnoustrojów. Opatrunki ze srebrem takie jak: Atrauman, Medisorb, UrgoClean, ale także produkty powlekające w sprayu jak

Nanobiotic Silver Plus czy Farmactive Silver są dziś powszechnie wykorzystane w terapii ran powikłanych.

W roku 2008 opublikowano prace, w których opisano przeciwdrobnoustrojowe działanie nanosrebra na węglika, jednak do tej pory nie zostały one wykorzystane w praktyce^{77,78}.

2.1.1.3. Bezpieczeństwo, toksyczność

Z przeprowadzonych badań nad AgNPs wynika brak ich toksyczności⁷⁹, a obawy związane ze stosowaniem, wynikające prawdopodobnie z małym rozmiarem nanocząstek oraz zmiennymi właściwościami, są niepotwierdzone⁸⁰. Ewentualna toksyczność srebra wyrażona argyrią jest możliwa tylko w przypadku wchłonięcia dużej ilości jonów metalu, a nie cząstek nanometrycznych⁶⁷. Nie ma też jednoznacznych badań, które by w jakikolwiek sposób wskazywały, że srebro jest powodem występowania zmian alergicznych⁸¹.

Stosowanie wyrobów medycznych ze srebrem wciąż jest jednak traktowane z dużą obawą, pomimo bardzo pomyślnych wyników badań, świadczących o braku toksyczności AgNPs i szerokiego zastosowania w medycynie⁸², w produktach pielęgnacyjnych i higienicznych^{83,84}, stosowanych głównie na poparzenia, zespół Stevena-Johansona, pęcherzycy⁸⁵, toksycznej martwicy skóry⁸⁶ i przewlekłych owrzodzeniach⁸⁷. Być może powodem tego jest utrudniona ocena toksykologiczna, wynikająca z bardzo organicznego wchłanianie NPs (nawet po podaniu dostnym) i niskiej dystrybucji do narządów wewnętrznych człowieka⁸⁸. W przypadku produktów z AgNPs stosowanych bezpośrednio na skórę biodostępność w ogóle jest mało prawdopodobna nawet w zagięciach czy po rozciągnięciu skóry⁸⁹. Co prawda, nanosrebro wykrywano w uchyłkach mieszków włosowych, ale nie pokonywało ono bariery mieszka i nie było lokalizowane się w głębszych partiach skóry⁹⁰.

Z teoretycznego punktu widzenia zawsze istnieje zagrożenie ewentualnej możliwości wbudowania się AgNPs w helisę DNA, co może bezpośrednio prowadzić do zniszczenia łańcucha lub denaturacji białek i enzymów oraz indukować wytwarzanie wolnych rodników⁹¹. Jednak udokumentowane podanie inhalacyjne i doustne, przeprowadzone w testach 28-dniowych na szczurach, nie potwierdziły toksyczności⁹² mimo, że badania *in vitro* na liniach komórkowych sugerowały działanie cytotoksyczne nanosrebra, reakcje w mitochondrium komórki oraz produkcję reaktywnych form tlenu (ROS)⁹³,

2.1.1.4. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literaturowego potwierdzono szerokie zastosowanie nanosrebra w takich dziedzinach jak medycyna czy kosmetologia. Nanosrebro znakomicie sprawdza się jako materiał powlekający w implantach czy komponentach polimerowych, z których wytwarzane są cewniki. Jego antybakteryjne właściwości znacznie zmniejszają możliwość powikłań po zabiegowych i infekcji bakteryjnych prowadzących do zakażeń ogólnoustrojowych. Nanosrebro znakomicie sprawdza się również w pielęgnacji uszkodzonej po oparzeniach skóry i w dermatozach. Rezultaty stosowania są bardzo dobre, a preparaty z AgNPs nie mają wad antybiotyków. Nie znaleziono dowodów nawet w przypadkach wystąpienia argirii, że srebro w jakiegokolwiek postaci, a tym bardziej nanosrebro, ma negatywny czy toksyczny wpływ na organizm człowieka⁹⁰.

W badaniach *in vitro*, które wskazywały na szkodliwy efekt cząsteczek nanosrebra, wielu badaczy zgadza się z tezą, że genotoksyczność związana jest z dodatkami stosowanymi w celu zapobiegania aglomeracji cząstek, a właściwa ocena ryzyka stosowanych nanomateriałów powinna odbywać się po wyeliminowaniu wpływów dodatków takich jak surfaktanty, sole, polimery^{94,58,95}. W badaniach *in vivo* toksyczność nanosrebra nie została więc potwierdzona^{96,97,98}.

2.1.2. Nanozłoto (AuNPs)

Złoto to pierwiastek chemiczny o liczbie atomowej 79, należący do pierwiastków przejściowych grupy 11(1B). Jest metalem szlachetnym miękkim i błyszczącym, będącym najbardziej kowalnym i ciągliwym spośród wszystkich znanych metali. Jeden gram złota może być obrobiony i rozciągnięty do arkusza o powierzchni 1 m². Płatek złota może być rozwalcowany do tego stopnia, że staje się półprzezroczysty. Czyste złoto ma jasnożółty kolor i wyraźny połysk, nie utlenia się w wodzie czy powietrzu. Nie jonizuje w biologicznych mediach⁹⁹, jest nietoksyczny^{100,101,102}. Na powietrzu nie ulega ciemnieniu i jest odporne na działanie większości czynników korozyjnych. Jest to najbardziej obojętny biologicznie i chemicznie metal¹⁰³. Uważa się, że informacje dotyczące szkodliwości złota mogą wynikać z zanieczyszczeń stopów złota innymi metalami lub złotem w postaci zjonizowanej.

2.1.2.1. Mechanizm oddziaływania

Wnikając do komórki bakteryjnej nanostruktury złota zmieniają charakter lipofilowy błony komórkowej, tworzą w niej wgłębienia (pory), za pomocą których możliwe jest dotarcie do

cytozolu¹⁰⁴. We wnętrzu komórki AuNPs upośledzają syntezę białek, niszczą białka strukturalne oraz wiele enzymów a konsekwencją tych działań jest całkowita zmiana przemian metabolicznych bakterii. Fragmenty cytoplazmy i organelli wypływają z jej wnętrza za pomocą porów w błonie, przyczyniając się do śmierci komórki. W procesie eliminowania drobnoustrojów uczestniczą także powstające reaktywne formy tlenu (ROS), wywołujące indukowany stres oksydacyjny.

2.1.2.2. Wykorzystanie nanozłota w medycynie

Zastosowanie złota sięga już czasów starożytnych, gdyż było znajdowane w z mumifikowanych ciałach. W Egipcie, aby zachować piękny i młody wygląd wszywano bowiem złote nici w skórę,¹⁰⁵

Złoto i związki złota stosowane są od wielu lat. Zarówno w medycynie jak i kosmetyce wykorzystywana jest jego zdolność do pobudzania procesów regeneracyjnych, biostymulujących oraz działanie przeciwzapalne. Złoto znalazło więc zastosowanie w kremach, lotionach oraz ampułkach w postaci serum do twarzy. W skali nano złoto działa nie tylko przeciwbakteryjnie, ale korzystnie na skórę dojrzałą, poprawiając jej poziom nawilżenia i ujędrnienia. Przeprowadzone badania wykazały, że AuNPs spowalniają degradację kolagenu i rozpad elastyny¹⁰⁶.

Złoto jest wykorzystywane do produkcji nici stosowanych w medycynie estetycznej a także zatwierdzone jako dodatek do leków^{107,108}. Ze względu na właściwości zmniejszania stanu zapalnego i likwidowania uszkodzeń wywołanych przez reaktywne formy tlenu (ROS), AuNPs znalazło też zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. Przyspiesza bowiem gojenie tkanki kostnej lub chrzęstnej, wpływając na proliferację odtwarzających się komórek⁸⁹.

Z uwagi na bardzo rozwiniętą powierzchnię kontaktową i możliwość tworzenia ligandów z lekami, nanocząstkami złota mogą stanowić znakomity nośnik transportu leków w docelowe miejsca organizmu człowieka¹⁰⁹. Przeprowadzone prace udokumentowały możliwość utworzenia połączeń z 70 cząsteczkami leków, w tym z paklitakselenem, lekiem powodującym zahamowanie mitozy zmienionych komórek, dostarczany bezpośrednio w okolice zmian nowotworowych¹¹⁰.

W diagnostyce laboratoryjnej nanozłoto stosowane jest jako kontrast przy badaniach spektrofotometrycznych¹¹¹. Może być także wykorzystane do rozpoznawania pewnych biomolekuł lub wykrywania i eliminacji komórek nowotworowych^{112,113,114}. Dostarczone do guzów ter-

mowrażliwych i napromieniowane falami o długości 800-1200 nm powoduje ich lokalne przegrzanie i zniszczenie¹¹⁵. Wykazano także wyjątkową wrażliwość niektórych typów czerniaka na działanie nanozłota¹¹⁶.

AuNPs posiada dużą aktywność katalityczną. Wykazując właściwości słabego kwasu Lewisa, aktywuje nienasycone związki organiczne, tworząc wiązania C-C lub C-N w niezwykle łagodnych warunkach¹¹⁷. Znalazło to zastosowanie w konstrukcji elektrochemicznych immunosensorów wykrywających substancje antygenowe¹¹⁸.

2.1.2.3. *Bezpieczeństwo, toksyczność*

Badania naukowe i opracowania literaturowe ukazują bardzo szerokie zastosowanie nanozłota^{119,120,121,122}. Jednak pomimo tak dużego zainteresowania w dostępnym piśmiennictwie brak jest szczegółowych danych na temat jego toksyczności. Można znaleźć jedynie informacje dotyczące wartości poziomu niewywołującego dających się zaobserwować szkodliwych skutków (ang. *No-Observed-Adverse-Effect-Level*, NOAEL) po podaniu drogą inhalacyjną. Na podstawie badań przeprowadzonych na szczurach w testach 90-dniowych (wielkość cząstek 4-5 nm) obliczona NOAEL inh. wynosi 0,38 µg/m^{97,100} a najniższy poziom obserwowanych działań niepożądanych (ang. *Lowest-observed-adverse-effect level*, LOAEL) 20 µg/m^{97,123}.

Dane piśmiennictwa dowodzą, że złoto w niewielkim stopniu przenikania przez barierę naskórkową^{124,125,126}. Jednakże opis samego eksperymentu nie jest wystarczająco klarowny, a biorąc pod uwagę warunki jakie są potrzebne do zapewnienia biodostępności substancji bez jej modyfikacji czy immobilizacji na nośniku, wydaje się mało prawdopodobne, aby dochodziło do penetracji bariery naskórkowej przez AuNPs. Złoto jak i jego forma *nano* posiada bowiem charakter hydrofilowy i jego przenikanie przez lipofilowy płaszcz i strukturę *stratum corneum* jest praktycznie niemożliwe.

Złoto znajduje się w organizmie ludzkim, średnio w ilości około 10 mg, z czego ponad połowa zgromadzona jest w kościach^{127,128}. Dystrybucja nanocząsteczek zależy od drogi podania oraz od rozmiarów cząstek złota. Podczas narażenia drogą inhalacyjną złoto było wykrywane głównie w płucach i nerkach, podczas narażenia drogą doustną przede wszystkim w wątrobie, śledzionie oraz nerkach, przy podaniu drogą dożylną przeważnie w wątrobie, przy bardzo małej obecności złota w innych tkankach. Wydalane jest z organizmu głównie z moczem (ok. 70%), przy czym cząstki wielkości 1,9 nm wydalane są ilościowo⁹⁶.

Niezależnie jednak od drogi podania, wielkości cząstek oraz warunków ewentualnej akumulacji nie zaobserwowano toksyczności czy zmian w zachowaniu, wadze ciała, kolorze,

śmiertelności, morfologii wśród zwierząt, na których realizowane były badania^{101,113,129,130}. Nie stwierdzono także efektu toksycznego w wykonanych *in vivo* badaniach po dożylnym podaniu AuNPs w ilości 12,5 nm^{107,113}. Z kolei eksperyment *in vitro*, przeprowadzony na cząstkach o wielkości od 0,8 nm, 1,5 nm, 3 nm, 10 nm, 50 nm do 100 nm potwierdził brak reprotoksyczności i cytotoksyczności^{115,131}. Wykazano w nim, że jedynie cząstka złota o wielkości 1,4 nm ma możliwość wbudowania się w łańcuch DNA¹³², co prawdopodobnie związane jest z idealnie pasującą wielkością luki molekularnej łańcucha DNA¹³³.

Jednak możliwość tworzenia połączeń z białkami stwarza ryzyko wbudowania się cząstek nanozłota w łańcuch DNA czy RNA, a co za tym idzie potencjalne zagrożenie cytotoksycznością, genotoksycznością czy reprotoksycznością. Trudno jednak oceniać AuNPs jednoznacznie, gdyż rozpiętość warunków badań była zbyt bardzo duża.

2.1.2.4. Podsumowanie

AuNPs wykazują aktywność przeciwbakteryjną zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych^{134,135}. Z przeprowadzanych badań wynika, że absorpcja ogólnoustrojowa złota występuje na bardzo niskim poziomie, a ryzyko stosowania AuNPs związane jest jedynie z działaniem w miejscu ekspozycji, czyli np. płuca (inhalacja), wątroby (podanie doustne) czy skóry (kontakt dermalny). W przypadku skóry wychwytywanie nanometali i absorpcja przez skórę jest albo bardzo niska albo w ogóle nie występuje. Z kolei ogólnoustrojowe działanie po dawce doustnej jest uważane za dużo niższe niż w przypadku cząsteczek złota rozpuszczalnych w wodzie. A zatem na podstawie wyników przeprowadzonych badań *in vivo* czy *in vitro* uznaje się brak toksyczności AuNPs.

Wniknięcie AuNPs do wnętrza komórki skutkuje wytworzeniem wokół niej korony białkowej, która staje się zewnętrznym elementem jej budowy. Prawidłowość ta ma wpływ na skuteczność i szybkość eliminacji komórek bakteryjnych. Zwiększenie efektywności nanozłota wymaga więc przeprowadzenia pewnych modyfikacji składu produktu z AuNPs, dzięki któremu immobilizacja AuNPs na powierzchniach biologicznych będzie szybka i spersonalizowana przeciwko konkretnemu działaniu, na konkretny gatunek bakterii.

2.2. Surowce i przetwory roślinne

Zgodnie z szacunkowymi informacjami źródłowymi, na ziemi występuje od 250 000 do 500 000 gatunków roślin, które to od początku ludzkości wykorzystywane były zarówno jako

składniki diety człowieka, jak również uzyskiwano z nich cenne substancje aktywne wykorzystywane w celach leczniczych. Informacje na temat ich działania przekazywane były w formie ustnej, a następnie spisywane i opisywane bibliograficznie. Obecnie skuteczność ich działania oraz wpływ na procesy życiowe organizmu człowieka potwierdzana jest przez wiele badań naukowych, a naturalne produkty roślinne i ich przetwory znalazły swoje stałe miejsce w fitofarmakologii¹³⁶. W dobie gwałtownego rozwoju nanotechnologii i rosnącego zapotrzebowania na nowe produkty lecznicze, coraz częściej dokonuje się połączenia współczesnej wiedzy z znanymi od wielu lat właściwościami farmakologicznymi substancji zawartych w roślinach.

2.2.1. Babka lancetowata

Babka lancetowata (łac. *Plantago lanceolata* L.) jest byliną występującą na całej półkuli północnej, na terenach nizinnych klimatu umiarkowanego. Pojawia się w pobliżu miejsc wzrostu innych roślin takich jak lucerna, koniczyna, zboże jare lub ozime¹³⁷. Wyjątkowy kształt blaszki liściowej dał początek nazwie rośliny. *Plantago lanceolata* posiada w swoim składzie wiele związków śluzowatych i aktywnych biologicznie takich jak glikozydy irydooidowe i fenetylowe, flawonoidy oraz garbniki. Na jakość związków występujących w roślinie ma wpływ rodzaj gleby, jej pH, ilość dostarczanej wody oraz kontakt podłoża z herbicydami i nawozami. Ze względu na wyjątkowe właściwości lecznicze i pielęgnacyjne babka lancetowata uprawiana jest chętnie, zarówno na obszarach łąk i pastwisk, a jej substancje aktywne otrzymywane są również na dużą skalę metodami biotechnologicznymi¹³⁸.

W przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym korzysta się ze wszystkich elementów rośliny, ale głównie wykorzystuje się liście lub korzenie. W kosmetyce *Plantago lanceolata* w postaci wyciągu wodnoglicerynowego lub olejku stosowana jest w kremach na twarz dla skóry łojotokowej, z atopowym zapaleniem oraz trądzikowej. Skuteczność antybakteryjna babki lancetowatej została potwierdzona w wielu publikacjach naukowych. Badania dowiodły też, że niektóre gatunki *Plantago* mają silne działanie przeciwwirusowe, przeciwzapalne, przeciwutleniające¹³⁹. Wydają się więc, że roślina ta może odgrywać istotną rolę w zwalczaniu infekcji w obrębie jamy ustnej¹⁴⁰. Według Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA)¹⁴¹ napar z liści *Plantago lanceolata* stosowany jest w krajach europejskich jako środek łagodzący w miejscowym leczeniu podrażnień jamy ustnej lub gardła i jest uważany za preparat bezpieczny, bez znanych przeciwwskazań.

Liście babki lancetowatej z rodziny *Plantagiaceae* są od wielu lat stosowane jako ziołowy środek gojący rany w medycynie tradycyjnej¹⁴². Niektóre składniki, takie jak polisacharydy,

lipidy, pochodne kwasu kawowego, flawonoidy, glikozydy irydooidowe i terpenoidy występujące w tym ekstrakcie roślinnym, mają działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwbólowe, immunomodulujące, przeciwwrzodowe i słabe działanie antybiotyczne¹⁴³.

2.2.2. Brzoza

Brzoza brodawkowata (łac. *Betula verrucosa Ehrh*), zwana też brzozą białą nie jest drzewem szczególnie wymagającym, dlatego dobrze odnajduje się w miejscach, w których klimat jest umiarkowany, takim jak Europa. Chętnie sadzona jest w ogrodach, parkach jako roślina ozdobna. W korze brzozy obecny jest surowiec betulina oraz lupeol, które odpowiadają za jej charakterystyczny, biały kolor pnia¹⁴⁴.

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. Jest również chętnie stosowana w ziołolecznictwie, do naparów i herbat ziołowych. Ponadto, ekstrakt z liści brzozy jako składnik przeciwnowotworowy stosowany jest w leczeniu między innymi raka wątroby lub prostaty, w dermatologii do leczenia skóry zmienionej chorobowo z wysypką, infekcją i stanem zapalnym¹⁴⁵. Brzoza znalazła również zastosowanie w kosmetologii i chemii kosmetycznej dzięki swoim właściwościom wpływającym na stan skóry, takim jak: ujednolicanie kolorytu skóry, usuwanie nadmiernej warstwy rogowej, przeciwstarzeniowe, rozjaśniające oraz przeciwdrobnoustrojowe. W produktach kosmetycznych w formie szamponów i odżywek do włosów wyciągi z brzozy chętnie stosowane są w pielęgnacji skóry głowy i włosów z problemem przetłuszczającej się skóry głowy, łupieżu i łojotokowego zapalenia skóry.

Działanie bakteriobójcze wyciągów z brzozy znajdują zastosowanie w zwalczaniu patogenów w organizmie. Zawarte w roślinie związki takie jak kwasy, lupeol i najbardziej znana – betuina mają działanie aktywne w stosunku do kropidlaka *Aspergillus fumigatus* oraz *Candida albicans*, wywołujących grzybicę skóry. Kwas betulinowy i lupeol działają także na bakterie *Escherichia coli*, których nadmierna kolonizacja jest skutkiem nieprawidłowej higieny. Kwasy oleanolowy i betulinowy wykazują aktywność przeciwbakteryjną wobec wspomnianej wcześniej bakterii oraz bakterii ze szczepu *Pseudomonas – Pseudomonas aeruginosa.*, a także w kierunku bakterii Gram-dodatniej *Staphylococcus aureus*¹⁴⁶.

2.2.3. Drzewo herbaciane

Drzewo herbaciane (łac. *Melaleuca alternifolia*) pochodzi z Australii, ale jest uprawiane w Afryce, Tanzanii, Zimbabwie, na Madagaskarze, w Tajlandii oraz w Stanach Zjednoczonych¹⁴⁷. Aborygeni, pili napar z liści *Melaleuca*, który był dla nich zamiennikiem herbaty. Dzięki silnym właściwościom przeciwdrobnoustrojowym olejku eterycznego stosowany był do różnych zabiegów mających zachować między innymi czystość skóry¹⁴⁸.

Głównym składnikiem aktywnym olejku z drzewa herbacianego jest terpinen-4-ol. Przeprowadzono wiele badań nad zastosowaniem produktów, w tym olejku z drzewa herbacianego jako środka przeciwbakteryjnego. Wykazano w nich, że szeroka gama drobnoustrojów jest podatna na wyciągi z drzewa herbacianego. Są to m.in. komensalne gronkowce skórne i mikrokokki, *Enterococcus faecalis* i *Pseudomonas aeruginosa*¹⁴⁹. Najwięcej uwagi poświęcono jego bakteriobójczemu działaniu wobec *Staphylococcus aureus*¹⁵⁰. Badania potwierdziły, że szczepy traktowane olejkiem są wrażliwe na jego działanie, w ich komórkach dochodzi do zmian morfologicznych i strukturalnych. Opisano również zahamowanie prawidłowego działania łańcucha oddechowego i wymiany jonów między komórką, a otoczeniem.

Oprócz medycznego zastosowania surowiec ten jest chętnie używany w zabiegach pielęgnacyjnych. Wspomniane wcześniej antymikrobowe cechy są wykorzystywane w pielęgnacji skóry na przykład z grzybicą stóp czy nadpotliwości. Szampon z olejkiem herbacianym stosowany jest też u osób zmagających się z łupieżem lub nadmiernym przetłuszczaniem się skóry głowy. W postaci kremów lub maści używa się go do traktowania skóry po ugryzieniu owadów i drobnych otarć, ponieważ ma właściwości łagodzące¹⁵¹.

2.2.4. Imbir

Imbir (łac. *Zingiber officinale*) to roślina uprawiana na terenach południowo-wschodniej Azji. Ma charakterystyczny smak oraz zapach. Najbardziej rozpoznawalną częścią rośliny jest kłącze, będące surowcem olejodajnym. Kształtem przypomina poroże jelenia, stąd pochodzi jego nazwa¹⁵². Wnętrze jego jest mięsiste o żółtawej barwie. *Zingiber officinale* jest chętnie stosowany od setek lat w tradycyjnej kuchni azjatyckiej jako przyprawa. Ma ostry i cierpki smak. Chętnie wykorzystywany jest też jako roślina lecznicza między innymi dzięki swoim właściwościom rozgrzewającym. Kłącze imbiru zawiera znaczne ilości makroelementów, w tym magnezu oraz wapnia, niezbędnych w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. W pie-

łęgnacji ciała używany jest w formie kremów, olejków, wcierek do włosów. Działając rozgrzewająco i pobudzająco na krążenie znalazł zastosowanie w produktach antycellulitowych. Regeneruje, odżywia i poprawia koloryt skóry.

Pod koniec sierpnia 2020 r. opublikowano badanie koncentrujące się na zastosowaniu olejku imbirowego jako potencjalnego konserwantu żywności. Chińscy badacze przeprowadzili eksperyment z jego zastosowaniem wobec bakterii Gram-ujemnych – *Escherichia coli* oraz Gram-dodatnich – *Staphylococcus aureus*. Wyniki ich pracy udokumentowały aktywność przeciwbakteryjną wobec tych dwóch mikroorganizmów. Surowiec wykazywał doskonałe działanie bakteriobójcze polegające na niszczeniu zewnętrznej powłoki komórki bakteryjnej, co w konsekwencji skutkowało dostaniem się do jej wnętrza, wpływaniem na jej procesy metaboliczne, uszkodzeniem organelli i wypływem cytozolu na zewnątrz, a następnie śmiercią bakterii¹⁵³.

2.2.5. Tymianek

Tymianek pospolity (łac. *Thymus vulgaris L.*) jest rośliną występująca na terenach suchych, ciepłych, o wapiennym podłożu. Spotykany jest w krajach takich jak Włochy, Francja, Hiszpania – w okolicy Morza Śródziemnego. W Polsce jest również uprawiany i wykorzystywany jako roślina zielarska¹⁵⁴. Liście lub całe ziele poddaje się destylacji z parą wodną w celu uzyskania olejku eterycznego, z którego uzyskuje się czystą substancję – tymol. Tymol (2-izopropyl-5-metylofenol) i karwakrol (2-metylo-5-(propan-2-yl)fenol) są podstawowymi związkami chemicznymi obecnymi w roślinie. Oba dobrze rozpuszczają się w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych. Tymol wykazuje działanie antyseptyczne i można go znaleźć w składzie produktów przeznaczonych dla stomatologii. Znalazł też zastosowanie w produkcji past do zębów, płynów do płukania jamy ustnej, Trzeba jednak pamiętać, że w dużym stężeniu wykazuje silnie działanie alergizujące objawiające się zaczerwienieniem i pieczeniem skóry.

Potencjał leczniczy został potwierdzony w badaniu, w którym wykazano, że na bezpośrednie przeciwbakteryjne działanie tymolu ma wpływ obecność substancji 2-izopropyl-5-metylofenolu. Jego hydrofobowy pierścień benzenowy i alifatyczne łańcuchy boczne zapadają się do wewnętrznej części błony biologicznej mikroorganizmu, czego skutkiem jest zmiana płynności warstwy lipidowej oraz przepuszczalności dla jonów K^+ i jonów H^+ . Jednym z innowacyjnych rozwiązań może okazać się też zastosowanie tymianku, a właściwie tymolu w chorobach nowotworowych z zastosowaniem najnowszych technologii nanostruktur¹⁵⁵.

2.2.6. Porost islandzki

Porost islandzki, inaczej płucnica islandzka (łac. *Cetraria islandica*) ma właściwości przeciwzapalne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne. Wyciągi z porostu islandzkiego, dzięki zawartości substancji śluzowych od lat wykorzystywane są w leczeniu chorób górnych dróg oddechowych z towarzyszącą suchością oraz podrażnieniem błony śluzowej gardła, krtani i oskrzeli^{156, 157, 158, 159}. W medycynie ludowej porost islandzki jest stosowany w leczeniu schorzeń, takich jak kaszel, choroby gardła, choroby płuc. Jest również wykorzystywany w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym jako składnik preparatów przeciwzapalnych i regenerujących. W produktach do nosa jest często stosowany jako środek zmiękczający i ochronny dla błony śluzowej nosa, szczególnie w przypadku suchości i podrażnień. Może być również użyty w leczeniu nieżyty nosa, kataru siennego, zapalenia zatok i innych chorób związanych z układem oddechowym.

W składzie surowca z porostu islandzkiego znajdują się polisacharydy: lichenan (lichenina), izolichenan (izolichenina), celuloza, hemiceluloza, kwasy, w tym fumarowy, fumaroprotocetrarowy, protocetrarowy, cetnarowy, protolichesterynowy, alloprotolichesterynowy, lichesterynowy, fizydowy, usninowy (śladowe ilości) oraz flawonoidy, które wykazują działanie antibakteryjne, przeciwzapalne i przeciwwirusowe. Kwasy te, głównie kwas fumarowy o właściwościach immunomodulujących, są odpowiedzialne za głównie działanie - okluzyjne i powlekające, ale również przeciwdrobnoustrojowe, natomiast sacharydy działają nawilżająco. Kwas protolichesterynowy hamuje także wzrost kolonii *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*. Plecha płucnicy zawiera spore ilości kwasu fumaroprotocetrarowego o silnym działaniu przeciwutleniającym i bakteriostatycznym.

2.2.7. Olejek eukaliptusowy

Olejek eukaliptusowy (łac. *Eucalyptus globulus*) - zaliczany do olejków eterycznych jest otrzymywany z liści drzewa eukaliptusowego. Ma silny, charakterystyczny zapach, stąd stosowany jest jako dodatek do inhalacji, kropli do nosa czy gardła a także płukanek. Głównym składnikiem olejku jest eukaliptol (1,8-cineol), stanowiący około 70-90% masy. Ma on właściwości przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i wykrztusne. W skład olejku eukaliptusowego wchodzi również *alfa-pinen*, *limonen*, *felandren*, *pinokarwon* o właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych^{160,161,162,163,164}.

W medycynie olejek eukaliptusowy stosowany jest jako lek przeciwzapalny, przeciwbólowy, przeciwbakteryjny oraz jako środek wykrztuśny. Wpływa także na zmniejszenie wydzielania śluzu w drogach oddechowych. Ponadto używany jest także w przemyśle kosmetycznym oraz spożywczym.

2.2.8. Olejek z szaławii

Szałwia (łac. *Salvia officinalis*) jest produktem roślinnym o silnym aromacie i charakterystycznym smaku. Wsuszone liście szaławii były stosowane od dawna w medycynie ludowej¹⁶⁵. Dziś także szałwię używa się jako tradycyjny produkt leczniczy roślinny^{166,167}, gdyż ekstrakt z liści zawiera olejki eteryczne, w tym tymol, kamforę i borneol, które wykazują właściwości antibakteryjne i przeciwgrzybicze^{168,169}.

Stosowana jest przede wszystkim ze względu na działanie antyseptyczne, także przeciwzapalne i antyoksydacyjne w leczeniu stanów zapalnych jamy ustnej, bólu gardła, infekcji dróg oddechowych. W postaci ekstraktu, olejku eterycznego lub wyciągu z ziół znalazła także zastosowanie w sprayach lub kroplach do nosa a jej obecność ma na celu wspomaganie ochrony przed infekcją oraz łagodzenie objawów zapalenia błony śluzowej nosa, takich jak zatkanie nosa, podrażnienie, przekrwienie i ból.

Przeprowadzone badania wykazywały, iż płukanki jamy ustnej zawierające ekstrakt z szaławii w stężeniu 1% wpływają pozytywnie na redukcję mikroorganizmów, znacząco zmniejszając w płytce nazębnej liczbę kolonii *Streptococcus mutans*, głównej bakterii odpowiedzialnej za proces próchnicowy^{170,171,172}. Udowodniono także, że średnia liczba kolonii w grupie testowej, wynosząca 3900, obniżyła się do 300 po zastosowaniu płynu do płukania ust¹⁷³.

Ekstrakt z szaławii bogaty w saponiny został także przebadany na aktywność przeciwgrzybiczą wobec szczepów referencyjnych i klinicznych *Candida albicans*, ich konwersji z drożdży do hipofali, adhezję i tworzenie biofilmu. Przeprowadzone badania udokumentowały bezpośrednie właściwości grzybobójcze/fungistatyczne. Ekstrakty z *Medicago sativa* i *Salviae officinalis* hamowały powstawanie zarodków *Candida albicans*, ograniczały wzrostu hipsów, zmniejszały adhezję drożdży oraz tworzenie biofilmu i eliminowały obecność dojrzałego biofilmu. Saponiny występujące w szaławii wskazują więc istotny potencjał przeciwgrzybiczy i wydają się być obiecujące, jako substancja wspomagająca leczenie infekcji bakteryjnych czy grzybiczych¹⁷⁴.

2.2.9. Oregano

Oregano (łac. *Origanum vulgare*) jest głównie wykorzystywany jako przyprawa. Jednakże przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze właściwości umożliwiają wykorzystanie tego surowca roślinnego w medycynie i farmacji. W badaniach wykazano, że olejek z oregano może mieć potencjalne korzyści prozdrowotne, takie jak wsparcie układu odpornościowego, łagodzenie objawów infekcji, poprawa stanu skóry i redukcja stanów zapalnych^{175,176,177}. Zawiera on bowiem substancje o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym, przeciwgrzybiczym i przeciwzapalnym, wpływające nie tylko na jego aromat. W skład olejku z oregano wchodzi:

- karwakrol - jedna z najważniejszych substancji czynnych w oregano, o silnych właściwościach antybakteryjnych, przeciwwirusowych i przeciwgrzybiczych,
- tymol, który podobnie jak karwakrol jest związkiem o silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i przeciwzapalnych,
- rosmarynian - przeciwutleniacz, wspomagający ochronę komórek przed szkodliwymi działaniami wolnych rodników, o właściwościach przeciwzapalnych,
- kwas rozmarynowy - związek fenolowy wykazujący właściwości przeciwbakteryjne i przeciwzapalne¹⁷⁸.

W przeprowadzonych badaniach hamowania wzrostu badanych szczepów bakteryjnych metodą dyfuzyjno-krażkową udowodniono, że oregano wykazuje większą skuteczność wobec bakterii Gram-dodatnich, przy czym silniejszy efekt wywierał ekstrakt wodny a nie olejek eteryczny¹⁷⁹.

2.3. Substancje o działaniu łagodzącym, nawilżającym i powleka- jącym

Substancje wykazujące działanie łagodzące i nawilżające to takie, które tworzą barierę ochronną, izolując miejsce występowania zmiany od szkodliwych lub drażniących czynników zewnętrznych. Poprzez podwyższenie stopnia hydratacji i utworzenie na powierzchni filmu utrzymują prawidłowe nawilżenie i elastyczności błony śluzowej, zmniejszając przy tym dyskomfort pacjenta. Tworzą więc pewnego rodzaju „opatrunek” wspomagający proces leczenia czy regeneracji. Dodatkowo dzięki hamowaniu rozwoju innych, patogennych gatunków bakterii i grzybów tworzą optymalne warunki rozwoju mikrobiomu.

2.3.1. Laktoferyna

Laktoferyna jest glikoproteiną z rodziny transferyn o ciężarze cząsteczkowym ok 80 kDa. Ma zdolność do odwracalnego wiązania jonów żelaza, pełniąc funkcję regulatora jego poziomu zwłaszcza u małych dzieci, maksymalnie łączy się z dwoma cząsteczkami metali. Znajduje się w większości płynów biologicznych człowieka, w szczególnie wysokim poziomie w mleku ssaków¹⁸⁰. Głównie umiejscowiona gdzie w organizmie jest umieszczona laktoferyna to ziarnistość neutrofilów i uwalniana w procesie degradacji.

Posiada właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, wykazuje silne działanie wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych a także wirusów i grzybów. Mechanizm działania tej glikoproteiny polega głównie na wcześniej wspomnianym wiązaniu jonów żelaza co przy jego braku uniemożliwi a bakteriom wzrost i namnażanie się w organizmie, a także bezpośrednio uszkadza błony komórkowe drobnoustrojów. Może także wiązać i sekwestrować lipopolisacharydy, zapobiegając aktywacji ścieżki prozapalnej w sepsie i uszkodzeniu tkanek. Laktoferyna jest również mediatorem łączącym wrodzone i adaptacyjne odpowiedzi immunologiczne człowieka. Ma charakter kationowy, związany z dodatnio naładowanym *N*-końcowym fragmentem cząsteczki, który wchodzi w elektrostatyczne interakcje z receptorami błon komórkowych oraz z komórkami bakterii i wirusów.

Laktoferyna wydaje się być doskonałą substancją do wielu zastosowań spożywczych i farmaceutycznych. Znajduje zastosowanie w preparatach hamujących rozwój zakażenia spowodowanego wirusem zapalenia wątroby typu C, stosowanych na skórę - łagodzących objawy trądziku, wspomagających farmakoterapię choroby wrzodowej żołądka¹⁸¹. W trakcie produkcji należy pamiętać, iż laktoferyna jako białko składające się z ok 700 aminokwasów jest dość wrażliwa ma wiele czynników zewnętrznych jak temperatura, enzymy, pH już ok 3,5 może doprowadzać do denaturacji białka.

2.3.2. Dekspantenol (pantenol)

Dekspantenol, znany również pod nazwą prowitamina B₅, stanowi pochodną kwasu pantotenowego, substancji naturalnie występującej w skórze, włosach i paznokciach. Stanowi zredukowaną do alkoholu formę tego kwasu, ulegającą w organizmie przemianom do kwasu pantotenowego. Kwas pantotenowy to pochodna aminokwasu alaniny, konieczny do funkcjonowania każdej żywej komórki. Jest bowiem głównym składnikiem koenzymu A, uczestniczącego w procesach metabolicznych zachodzących w ludzkim organizmie. Kwas pantotenowy jest

także niezbędny dla właściwego funkcjonowania tkanek nabłonkowych i stanowi naturalną część zdrowej skóry.

Działa na skórę łagodząco, kondycjonująco i kojąco. Pomaga utrzymać optymalny stopień nawilżenia naskórka, wykazuje właściwości zmiękczające i wygładzające, a także regenerujące. Wykazuje działanie stymulujące na podziały komórkowe, przyspiesza gojenie ran, Stymuluje proces gojenia się ran poprzez aktywację fibroblastów oraz przyspieszenie nabłonkowania rany. Jest uważany za niezbędny do prawidłowego przebiegu procesu proliferacji i różnicowania keratynocytów, przez wpływ na syntezę kolagenu typu IV i czynnika wzrostu keratynocytów. Stąd, zapotrzebowanie na ten kwas pantotenowy silnie wzrasta przy uszkodzeniach skóry, ponieważ zużycie w skórze koenzymu A jest wtedy wysokie a jego niedobór objawia się zmianami patologicznymi takimi jak: nadmierne złuszczenie albo rogowacenie naskórka, zaburzenia pigmentacyjne czy wypadanie włosów.

Dekspantenol, wykazujący większą stabilność w roztworach wodnych, znalazł zastosowanie w preparatach podawanych donosowo, gdyż sprzyja proliferacji komórek i działa ochronnie na nabłonek. Wykorzystywany jest jako składnik preparatów o działaniu regenerującym i nawilżającym błonę śluzową nosa i zatok po urazach, zabiegach, krwotokach oraz w stanach suchości śluzówki. Dostępne są również leki zawierające połączenie substancji obkurczającej błonę śluzową nosa (ksylometazolina) z dekspantenolem, wskazane w leczeniu objawowym niedrożności przewodów nosowych w przebiegu przeziębienia, a także po przebytej operacji nosa w celu pobudzenia gojenia się śluzówki oraz poprawy drożności nosa. Jak udowodniono, kombinacja dekspantenolu z sympatykomimetykami znacząco zmniejsza negatywny wpływ tych substancji na funkcję rzęsek i wzrost komórek, zwiększa skuteczność terapii i prowadzi do szybszego ustąpienia objawów.

Dekspantenol działa barierowo, nawilżająco, emolienicyjnie i zmiękczająco. Tworzy ochronny film, zabezpieczając miejsce zastosowania przed utratą wilgoci i szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych^{182, 183, 184, 185}.

3. Przegląd wybranych promotorów przenikania przez błony biologiczne

Penetracji błon biologicznych, takich jak błony komórkowe, błony organelli wewnętrznych, a także błona śluzowa lub skóra jest ważnym aspektem oddziaływania na organizmy żywe związków chemicznych, toksyn a także leków. Substancja przenikająca błonę biologiczną, musi bowiem pokonać różne bariery, takie jak warstwa lipidowa, białkowe kanały jonowe i transporterowe, a także białka integralne błony. Proces ten jest złożony i zależy od wielu czynników, przykładowo: rozmiar cząsteczki, ładunek elektryczny, właściwości hydrofobowe i hydrofilowe, a także struktura chemiczna błony.

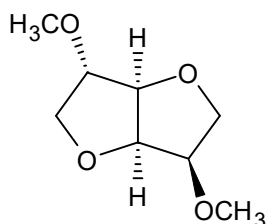
Rozmiar cząsteczki jest jednym z najważniejszych czynników decydujących o zdolności substancji przenikania przez błony biologiczne. Małe cząsteczki i jony mogą swobodnie przenikać przez błony biologiczne, podczas gdy większe wymagają aktywnych procesów transportu, takich jak endocytoza czy fagocytoza. Ładunek elektryczny jest kolejnym ważnym czynnikiem, który wpływa na penetrację błon. Cząsteczki o ładunku dodatnim są zwykle wchłaniane lepiej przez błony komórkowe, ponieważ negatywnie naładowane grupy fosforanowe w błonie przyciągają cząsteczki o ładunku dodatnim. Stąd też cząsteczki o ładunku ujemnym często napotykać większe trudności w przenikaniu przez błony biologiczne. Właściwości hydrofobowe i hydrofilowe substancji mają dominujące znaczenie dla penetracji przez błony biologiczne. Substancje o właściwościach hydrofobowych często lepiej przenikają przez błony, ponieważ są one zbudowane z dwuwarstwy fosfolipidowej, która jest hydrofobowa i chroni komórkę przed niepożądanym przepływem wody i substancji rozpuszczalnych w wodzie. Podsumowując, zdolność substancji do penetracji przez błony biologiczne zależy od ich struktury chemicznej i interakcji z błoną.

W tej części pracy dokonano analizy niektórych substancji o znanym działaniu wspierającym przenikanie innych substancji przez błony biologiczne (tzw. promotorów przejścia). Część z nich, tak jak gliceryna są powszechnie używane w wielu zastosowaniach farmaceutycznych, gdzie wykorzystywane jest również jej działania higroskopijne, zwiększające nawilżenie, a tym samym komfort użycia preparatu. Jednym z lepszych promotorów przenikania błon biologicznych jest dimetylosulfotlenek (DMSO), wykorzystywany powszechnie w farmacji. Prezent-

wane substancje, zaproponowane w badaniu, nie są powszechnie używane w produktach farmaceutycznych, ale ich potencjał wspierania przenikania wydaje się być interesujący i mogą być dobrą alternatywą dla gliceryny czy DMSO.

3.1. Eter dimetylowy izosorbidu

Dimethyl Isosorbide (DMI), CAS 5306-85-4



Rycina 4. Wzór strukturalny eteru dimetylowego izosorbidu.

3.1.1. Informacje toksykologiczne¹⁸⁶

- LD₅₀ doustna = 5.63 ml/kg masy ciała;
- Nie drażniące dla skóry i oczu;
- Nie uczuła;
- Doustna dawka powtarzalna = NOAEL 375 mg/kg masy ciała;
- Nie jest genotoksyczny;
- W warunkach badania, 300 mg/kg masy ciała/dzień uznano za poziom nieobserwowanego;
- Wpływa zarówno na toksyczność materiału badanego dla matki, jak i płodu.

3.1.2. Zastosowanie i działanie

Oprócz dobrych właściwości rozpuszczania cząsteczek organicznych, eter dimetylowy izosorbidu ma również właściwości zwiększające penetrację. Przeprowadzone *in vitro* badania wykazują jego silne właściwości sprzyjające penetracji steroidów płciowych¹⁸⁷. W układach z wodą jest dobrze rozpuszczalny nawet w stosunku molowym 1:2 (DMI : woda). Wynika to prawdopodobnie z faktu, że DMI posiada dwa miejsca wiązania wodoru, z których każde jest zdolne do tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczką wody. DMI jest przeznaczony do wspomagania penetracji w głąb naskórka poprzez zwiększenie polaryzacji powierzchniowych warstw skóry¹⁸⁸.

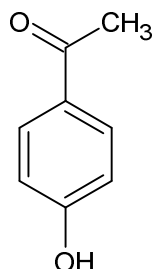
DMI jest doskonałym rozpuszczalnikiem lub współrozpuszczalnikiem dla wielu składników opóźniających starzenie się skóry, w tym kwasu L-askorbinowego w połączeniu z piroli- donem *N*-metylowym¹⁸⁹. Rozpuszcza i zwiększa rozpuszczalność wielu różnych substancji ak- tywnych, w tym benzokainy, kwasu pirogronowego, kwasu ferulowego, salicylanu metylu i kwasu salicylowego, kwasu acetylosalicylowego, chlorowodoru nikardypiny, kwasu 5-ami- nolewulinowego, azotanu potasu (w połączeniu z wodą do odczulania zębów), hydrokortyzonu, deksametazonu i tretinoiny (kwasu *trans*-retynowego), dihydroksyacetonu, metaksalonu, tetra- cykliny, cyklosporynu, acetonidu triamcynolonu, halcynonidu, progesteronu, testolaktonu, azo- tanu ekonazolu, mikonazolu i nystatyny, erytromycyny, neomycyny, indometacyny, ibupro- fenu, flurbiprofenu i naproksenu, dibenzylidenu sorbitolu, mononitratu izosorbidu i dinitratu, diazepamu, minoksydylu, prednizonu i estradiolu, betametazonu, chlorowodoru fenylefryny i chlorowodoru tetrahydrozolini, kwasu betulinowego i wielu innych składników aktywnych o ograniczonej rozpuszczalności w wodzie, takich jak witaminy A, D i E czy cholesterol⁸⁶.

W przypadku zastosowań do pielęgnacji skóry, w tym do spłukiwania i pozostawiania na powierzchni skóry, nie istnieją znane ograniczenia dotyczące poziomu stosowania zarówno w USA jak i krajach UE. Dotychczas nie wydano też żadnego sprawozdania CIR (ang. *Cosme- tic Ingredient Review*) na temat eteru dimetyloizosorbidu. Ponadto nie przekazano żadnych opi- nii ani zaleceń dotyczących poziomu stosowania, wydanych przez Komitet Naukowy ds. Produktów Konsumenckich (ang. *Scientific Committee on Consumer Products*, SCCP) lub Eu- ropejskie Stowarzyszenie Kosmetyków (ang. *European Cosmetic and Perfumery Association*, COLIPA).

W przypadku zastosowań farmaceutycznych jedynymi znanymi wskazówkami dotyczą- cymi poziomu stosowania jest wykaz do miejscowego stosowania eteru dimetylowego izosor- bidu w emulsjach i kremach, jako składnika nieaktywnego, sporządzony przez Agencję Żyw- ności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, ograniczającym poziom maksymalny dawki do 15%¹⁹⁰). W badaniach wykazano, że 4% dodatek nadtlenu benzoilu (BPO) w kremie zawierającym DMI zapewnia lepsze działanie antybakteryjne przeciwko *Propionibacterium acnes* w porównaniu z wieloma innymi systemami zawierającymi BPO w wyższych procen- tach¹⁹¹.

3.2. Hydroksyacetofenon

4'-Hydroxyacetophenone, Hydroksyacetofenon (HA), CAS 99-93-4



Rycina 5. Wzór strukturalny hydroksyacetofenonu.

3.2.1. Informacje toksykologiczne⁸³

- LD₅₀ doustna = 2 240 mg/kg masy ciała;
- LD₅₀ skóra = > 2 000 mg/kg masy ciała;
- Nie drażniący na skórę, drażniący na oczy;
- Nie wywołuje uczulenia;
- Doustna dawka powtarzalna = NOAEL 45 mg/kg masy ciała;
- Nie wykazuje genotoksyczności;
- Toksyczność dla rozrodczości = NOAEL 600 mg/kg masy ciała;
- Wchłanianie 4'-hydroksyacetofenonu (podanie doustne: 100%, na skórę: 50%).

3.2.2. Zastosowanie i działanie

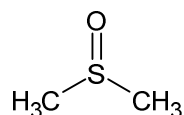
4-Hydroksyacetofenon (HA) jest aromatycznym ketonem o właściwościach antyoksydacyjnych, stosowanym głównie jako prekursor żywic i substancji zapachowych. Występuje wraz z mieszaniną izomerów w kilku naturalnych produktach, takich jak jabłko, banan, kalafior. Jest używany jako środek aromatyzujący. Syntetyczny hydroksyacetofenon otrzymuje się bezpośrednio przez C-acylowanie fenolu kwasem octowym¹⁹².

Zgodnie z FAO (ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) 4-hydroksyacetofenon wraz z jego izomerami i pochodnymi takimi jak 2-hydroksyacetofenon, dihydroksyacetofenon przy obecnych poziomach spożycia tych substancji nie stanowi zagrożenia dla zdrowia konsumentów¹⁹³. W medycynie HA jest stosowany jako składnik wielu leków o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym, przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym¹⁹⁴. Jest to związane z jego właściwościami antyoksydacyjnymi i zdolnością do blokowania aktywności enzymów zaangażowanych w procesy zapalne i reakcje układu odpornościowego¹³³. HA jest

również wykorzystywany jako składnik kosmetyków przeciwzmarszczkowych, ponieważ pomaga w utrzymaniu skóry w dobrej kondycji poprzez neutralizację wolnych rodników i zapobieganie uszkodzeniom DNA.

3.3. Dimetylosulfotlenek

Dimethyl sulfoxide (DMSO), CAS 67-68-5



Rycina 6. Wzór strukturalny dimetylosulfotlenku.

3.3.1. Informacje toksykologiczne¹⁹⁵

- LD₅₀ doustna = 28 300 mg/kg masy ciała;
- Nieznacznie drażniący na oczy i skórę;
- Nie uczula;
- Doustna dawka powtarzalna = NOAEL 1100 mg/kg/ masy ciała z wyłączeniem skutków na oczy;
- Nie jest genotoksyczny;
- W warunkach badania, 1000 mg/kg masy ciała/dzień. Rozwój embrionalny nie został zakłócony i nie stwierdzono skutków teratogennych przy żadnym poziomie dawki. Poziom braku działań niepożądanych (NOAEL) dla rozwoju zarodka i toksyczności dla matki został ustalony na poziomie 1000 mg/kg/dzień. Poziom braku wpływu (NOEL) dla toksyczności matczynej został ustalony na poziomie 300 mg/kg/dzień.

3.3.2. Zastosowanie i działanie

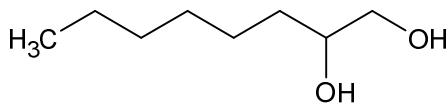
Jest to naturalny związek siarki organicznej i produkt uboczny produkcji papieru. Dimetylosulfotlenek jest rozpuszczalnikiem, który ma długą historię wykorzystania zarówno w przemyśle jak i farmakologii. Od 1960 roku jest stosowany jako środek zwiększający przenikanie substancji leczniczych¹⁹⁶, dostarczającym przez skórę zarówno leki hydrofilowe jak i lipofilowe. W medycynie ludzkiej stosuje się go w stężeniach do 50%, a w weterynarii nawet 90%¹³⁷. DMSO wchodzi w interakcje z niektórymi lekami, zwiększając ich siłę działania. Należy więc uważać, stosując m.in. leki przeciwzakrzepowe, steroidy i środki uspokajające.

Według wielu przeprowadzonych badań DMSO wykazuje działania lecznicze zarówno na zwierzęcy, jak i na ludzki organizm. Jest ono bardzo szerokie. DMSO zwalcza stany zapalne, działa antybakteryjnie, zabija grzyby i wirusy. Pomaga w szybszym gojeniu ran i pozytywnie wpływa na pracę układu immunologicznego¹⁹⁷. Przeciwzapalne i przeciwbólowe właściwości DMSO są wykorzystywane w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów. I choć nie ma badań nad właściwą dawką DMSO, większość żeli stosowanych w leczeniu zwyrodnień ma stężenie 25%. Przy aplikacji produktu na skórę należy jednak pamiętać, że ułatwia on wchłanianie do tkanek każdej substancji, która się na niej znajduje. Dlatego warunkiem koniecznym jest dokładne umycie rąk^{198,199,200}. Kolejnym zastosowaniem DMSO są trudno gojące się rany i odleżyny. Produkt z łatwością przenika przez błony biologiczne, dlatego też stał się nośnikiem stosowanych miejscowo produktów leczniczych. W przypadku ran trudno gojących się DMSO łagodzi ból, zmniejsza zaczerwienienie, przyspiesza gojenie owrzodzeń i zmniejsza obrzęk. DMSO jest również lekiem dopuszczonym do obrotu w przypadku śródmiąższowego zapalenia pęcherza²⁰¹. Zabieg ten wykonuje się raz na 1-2 tygodnie przez ok. 6-8 tygodni, wprowadzając lek poprzez cewnik^{202,203}.

Prace dotyczące stomatologicznego zastosowania DMSO są nieliczne. Sugerują one jednak, że DMSO poprawia zarówno natychmiastową jak i długoterminową siłę wiązania adhezyjnego w zębinie^{204,205}. Wzrost siły natychmiastowego wiązania może być związany ze zdolnością DMSO do zmniejszania swobodnej energii powierzchniowej zębiny, poprawiania zwilżalności i penetracji kleju²⁰⁶. Zachowanie trwałości wiązania może przynajmniej częściowo wynikać też z hamowania przez DMSO metaloproteinazy (MMP)²⁰⁷.

3.4. Glikol kaprylowy

Caprylyl Glycol, Octane-1,2-diol, CAS: 1117-86-8



Rycina 7 Wzór strukturalny glikolu kaprylowego.

3.4.1. Informacje toksykologiczne^{208,209}

- LD₅₀ doustna = 2 500 mg/kg masy ciała;
- Nieznaczna możliwość drażniąca na oczy i skórę;

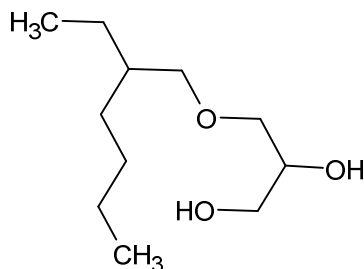
- Nie uczuła;
- Doustna dawka powtarzalna = NOAEL 1100 mg/kg/ masy ciała z wyłączeniem skutków na oczy;
- Potencjał genotoksyczny oktanu-1,2-diolu badano w trzech badaniach *in vitro* Ames (OECD 471 lub inne odpowiednie odniesienia), jednym badaniu *in vitro* aberracji chromosomowej (Notyfikacja 1604 MHW Japonia 1999, podobna do OECD 473) i jednym badaniu *in vitro* mutacji genowej (OECD 476), każde z nich z i bez aktywacji metabolicznej. W każdym z tych badań nie były widoczne spójne, powtarzalne i istotne toksykologicznie oznaki genotoksyczności;
- Cytotoksyczność była widoczna przy górnych stężeniach badawczych we wszystkich badaniach genotoksyczności, chociaż była niespójna w badaniu aberracji chromosomowej *in vitro*, w badaniu początkowe zahamowanie wzrostu, nie odzwierciedlone przy zmniejszeniu wskaźników proliferacji komórek;
- Toksokinetyka; najbardziej prawdopodobna C-oksydacja związku, jest promotorem przenikania we właściwym stosowaniu nie stwarza zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka.

3.4.2. Zastosowanie i działanie

Glikol kaprylowy to związek chemiczny z grupy alkoholi, stosowany w medycynie głównie jako środek konserwujący w preparatach do użytku zewnętrznego, takich jak maści i kremy. Ma zdolność wiązania wody, co pozwala na utrzymanie odpowiedniego poziomu nawilżenia błony śluzowej czy skóry. Posiada właściwości bakteriobójcze i antyfungicydowe. Działanie antybakteryjne wynika z jego zdolności zakłócania metabolizmu mikroorganizmów oraz niszczenia ich błon komórkowych. Odbywa się to tylko na powierzchni bakterii i prowadzi do utraty homeostazy wewnętrznej bakterii a w konsekwencji do śmierci komórki.

3.5. Etyloheksylogliceryna

Ethylhexylglycerin, 3-(2-ethylhexyloxy)propane-1,2-diol, CAS: 70445-33-9



Rycina 8. Wzór strukturalny etyloheksylogliceryny.

3.5.1. Informacje toksykologiczne

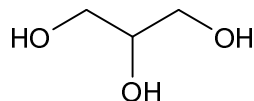
- LD₅₀ doustna = 2 000 mg/kg masy ciała;
- Nieznaczna możliwość drażniąca na oczy, nie drażni skóry;
- Nie uczula;
- Absorpcja przesnaskórkowa 20,38 µg/cm²/godz;
- NOEL 100 mg/kg masy ciała /dzień, we właściwym stosowaniu nie stwarza zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka.

3.5.2. Zastosowanie i działanie

Etyloheksylogliceryna jest organicznym związkiem chemicznym, który znajduje zastosowanie w medycynie jako składnik kosmetyków i produktów farmaceutycznych. Działa jako środek konserwujący i nawilżający. Etyloheksylogliceryna jest bezpiecznym składnikiem kosmetyków i produktów farmaceutycznych, zatwierdzonym przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA). Działa na błony komórkowe bakterii, zaburzając ich strukturę i funkcję powodując destabilizację ich struktury. Wpływając na ich przepuszczalność, zwiększa się działanie innych substancji bakteriobójczych, między innymi popularnych konserwantów, takich jak fenoksyetanol²¹⁰. Etyloheksylogliceryna działa również na enzymy bakteryjne, które są niezbędne do przeprowadzania procesów metabolicznych w komórkach bakteryjnych, co prowadzi do zaburzenia procesów metabolicznych i w konsekwencji prowadzi do śmierci bakterii.

3.6. Gliceryna

Glycerin, 1,2,3-propanotriol, CAS: 56-81-5



Rycina 9. Wzór strukturalny gliceryny.

3.6.1. Informacje toksykologiczne

- LD₅₀ doustna = 12 600 mg/kg masy ciała;
- Nie wykazuje działania drażniącego;
- Nie uczula;
- Absorpcja przeznaskórkowa założenie 100%, brak jednolitych danych;
- NOAEL 2 000 mg/kg masy ciała /dzień, we właściwym stosowaniu nie stwarza zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka.

3.6.2. Zastosowanie i działanie

Gliceryna, znana również jako glicerol to organiczny związek chemiczny z grupy alkoholi wielowodorotlenowych. Jest bezbarwną, lepką substancją o słodkim smaku. Miesza się z wodą i alkoholem w dowolnych proporcjach, co sprawia, że jest użyteczna jako składnik różnych produktów, takich jak płyny do płukania ust, syropy czy kosmetyki²¹¹. Jest często stosowana jako substancja nośna lub rozpuszczalnik w wielu produktach farmaceutycznych i kosmetycznych²¹². Pomaga w utrzymaniu ich stabilności i rozproszeniu składników aktywnych i zwiększa trwałość produktów.

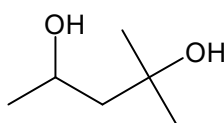
Gliceryna jest nietoksyczna. Po spożyciu jest szybko wchłaniana z żołądka i jelit, osiągając szczytowe stężenie w surowicy w ciągu 60 do 90 minut²¹³. Jest metabolizowana w wątrobie przez glicerokinazę do dwutlenku węgla i wody lub włączana do standardowych szlaków metabolicznych w celu utworzenia glukozy i glikogenu²¹⁴. W organizmie, głównie w wątrobie (80%-90%) i nerkach (10%-20), może ulegać fosforylacji z udziałem kinazy glicerolowej do α -glicerofosforanu, wchodząc w szlak glukoneogenezy. W wątrobie gliceryna może również łączyć się z wolnymi kwasami tłuszczowymi, tworząc trójglicerydy, dystrybuowane do tkanki tłuszczowej. Wolna gliceryna jest naturalnie obecna w ludzkim osoczu. Jej poziomy w surowicy dorosłych osób wahają się od 0,05 do 0,1 mmol/l. Wydalana jest głównie przez

nerki^{215,216} a jej wydalanie moczem jest związane z stężeniem glicerolu w osoczu $>0,327 + 0,190 \text{ mmol/l}^{217}$.

Gliceryna nie wykazuje wpływu na rozrodczość i rozwój zwierząt. Nie jest też genotoksyczna. Nie działa drażniąco i nie powodował uczuleń²¹². Jest oceniona przez FDA jako substancja bezpieczna do stosowania w żywności (ang. *Generally Recognized as Safe*, GRAS).

3.7. Glikol heksylenowy

Hexylene Glycol, 2-metylopentano-2,4-diol, CAS: 107-41-5



Rycina 10. Wzór strukturalny glikolu heksylenowego.

3.7.1. Informacje toksykologiczne

- LD₅₀ doustna $> 2\ 000 \text{ mg/kg}$ masy ciała; brak śmierci zwierząt
- minimalnie drażniący (skóra i oczy);
- Nie uczuła;
- Absorpcja przesnaskórkowa założenie 100%,
- NOAEL 450 mg/kg masy ciała/dzień, we właściwym stosowaniu nie stwarza zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka.

3.7.2. Zastosowanie i działanie

Glikol heksylenowy to klarowna, bezbarwna ciecz należąca do klasy eterów glikolu. Jest szeroko stosowany w różnych gałęziach przemysłu, w tym w kosmetykach, środkach higieny osobistej i farmaceutykach. Po spożyciu ulega wchłanianiu z przewodu pokarmowego i jest częściowo wydalany z moczem. Nie ma danych na temat innych możliwych dróg eliminacji.

Wykorzystywany jest głównie jako wszechstronny rozpuszczalnik składników aktywnych w preparatach kosmetycznych i farmaceutycznych. Działa również jako środek zwiększający lepkość, pomagając kontrolować konsystencję produktów. Glikol heksylenowy ma właściwo-

ści humektantu, co oznacza, że pomaga zatrzymywać wilgoć²¹⁸. Jak większość alkoholi wielowodorotlenowych działa jako *booster*, zwiększając skuteczność niektórych produktów przeciwdrobnoustrojowych. Może także przyczynić się do poprawy trwałości i stabilności mikrobiologicznej produktów poprzez hamowanie rozwoju mikroorganizmów.

Ze względu na jego właściwości higroskopijne glikol heksylenowy był kiedyś używany do impregnacji opatrunków na oparzenia. Jednak istnieją doniesienia o toksycznych skutkach stosowania tych opatrunków i ustąpieniu niekorzystnych zmian po ich usunięciu²¹⁹.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Określanie wartości MIC badanych formułacji metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym

Analizę wrażliwości patogenów najczęściej kolonizujących nosogardziel człowieka przeprowadzono w celu ewaluacji potencjału badanych formułacji pod względem terapeutycznym lub profilaktycznym. Część doświadczalną wykonano na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Diagnostyki Mikrobiologicznej oraz na Uniwersytecie Warszawskim w Zakładzie Genetyki Bakterii. Obejmowała ona szeroki zakres badań mikrobiologicznych, do których wykorzystano formułacje AgNPs i AuNPs z promotorami przenikania przez błony biologiczne jak i prototypy preparatów na infekcje nosogardzieli zawierające nanometale, promotory przenikania, przetwory produktów roślinnych oraz dodatki reologiczne. Badania mikrobiologiczne wykonano na wzorcowych szczepach bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów oraz na szerokim spectrum typowych drobnoustrojów bytujących w nosogardzieli, w tym także na drobnoustrojach mikroaerofilnych, beztlenowych oraz występujących w strukturach biofilmu.

1.1. Wyznaczenie aktywności badanych formułacji wobec wzorcowych szczepów drobnoustrojów

Celem przeprowadzonego badania było określenie aktywności AgNPs i AuNPs wobec wzorcowych szczepów drobnoustrojów. Badanie wykonano zgodnie z zaleceniami EUCAST (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), wyznaczając wartość minimalnego stężenia hamującego (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym Mullera-Hinton i RPMI-1640.

Metoda ta nie pozwala jednak na jednoznaczne stwierdzenie charakteru działania badanej formułacji (bójcze, czy statyczne) i dlatego wyznaczono wartości minimalnego stężenia bakteriobójczego (ang. *Minimum Bactericidal Concentration*, MBC), stosując posiew na płytce z odpowiednim podłożem agarowym.

1.1.1. Materiały wykorzystane w badaniach

1.1.1.1. Substancje chemiczne stosowane w badaniach

1. Nanosilver aXonnite® (INCI: aqua, silver (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-22-4, roztwór koloidalny srebra w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Srebro metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 5 – 50 μS.

Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.

2. Nanogold aXonnite® (INCI: aqua, gold (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-57-5, roztwór koloidalny złota w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Złoto metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 2 – 50 μS.

Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.

3. Polisorbat (INCI: Polysorbate - 20), CAS: 9005-65-6, postać płynna, stężenie 100%.

Producent: Donauchem.

4. Glikol kaprylowy (INCI: Caprylyl glycol) CAS: 1117-86-8, postać płynna, stężenie 100%.

Producent: Inolex.

5. Etyloheksylogliceryna (INCI: Ethylhexylglycerin) CAS: 70445-33-9, postać płynna, stężenie 100%.

Producent: Brenntag.

1.1.1.2. Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach

Badania wykonano na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Diagnostyki Mikrobiologicznej, wykorzystując pięć wzorcowych szczepów potencjalnych patogenów człowieka:

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

1.1.1.3. Pożywki wykorzystywane w badaniach

W badaniach wykorzystano następujące podłoża wzrostowe:

- bulion Mueller-Hinton (Becton Dickinson),
- płynne podłoże RPMI-1640 (Biomed),
- agarowe podłoże Mueller-Hinton (Becton Dickinson),
- agarowe podłoże Sabouraud (Becton Dickinson).

1.1.2. Przygotowanie szczepów do badań

Badane szczepy przechowywano w temperaturze -70°C zawieszono w bulionie odżywczym z dodatkiem 50% glicerolu. W trakcie wykonywania doświadczeń szczepy bakterii przesiewano metodą redukcyjną na agarowe podłoże Mueller-Hinton, a szczepy grzybów na agarowe podłoże Sabouraud. Płytki z bakteriami inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a z grzybami w temperaturze 30°C przez 48 h. Tak otrzymane hodowle wykorzystywano w dalszych etapach badań.

1.1.3. Formułacje użyte do badań i ich przygotowanie

W procesie tworzenia badanych formułacji obok nanometali AgNPs i AuNPs zastosowano wybrane promotory przenikania przez błony biologiczne, zapewniające właściwą penetrację i migrację cząstek w podłożach mikrobiologicznych oraz solubilizator - Polisorb-20, gwarantujący pożądane rozproszenie w roztworach wodnych. W ocenie skuteczności antydrobnoustrojowej wykorzystano pięć formułacji:

1. Nanosilver aXonnite® (15 ppm),
2. Nanosilver aXonnite® (15 ppm) + Nanogold aXonnite® (5 ppm),
3. Nanosilver aXonnite® (15 ppm) + Glikol kaprylowy (1,5 %) + Polisorb-20 (3%),
4. Nanosilver aXonnite (15 ppm) + Etyloheksylogliceryna (2%) + Polisorb-20 (3%),
5. Nanosilver aXonnite (15 ppm) + Glikol kaprylowy (1,5 %) + Polisorb-20 (6%) + Etyloheksylogliceryna (2%).

1.1.3.1. Przygotowanie formułacji

Substancje służące do przygotowania badanych formułacji dodawano równocześnie do wody w ilościach zgodnych z pkt 1.1.3., mieszając mieszadłem mechanicznym z prędkością 50-200 obr/min w czasie ok 8-10 minut i uzupełniono wodą do uzyskania 1000 ml roztworu.

1.1.4. Wykonanie oznaczenia

Do jałowej probówki odpipetowano 5 ml jałowej wody. Za pomocą ezy przenoszono kilka kolonii szczepu wzorcowego tak, aby gęstość optyczna powstałej zawiesiny wynosiła 0,5 wg skali McFarlanda. Ocenę gęstości optycznej zawiesiny dokonywano za pomocą nefelometru. Przygotowane w ten sposób zawiesiny drobnoustrojów zawierały w 1 ml $1,5 \times 10^8$ komórek i stanowiły *inokulum*, które wykorzystano w wyznaczaniu wartości MIC.

Do wgłębień sterylnych płytek mikrotitracyjnych o 8 rzędach po 12 studzienek o zaokrąglonym dnie nalewano przy użyciu pipety automatycznej po 100 μ l jałowego bulionu Mullera-Hinton (dla bakterii) lub płynnego podłoża RPMI-1640 (dla grzybów). Do każdej pierwszej studzienki z danego rzędu przenoszono 100 μ l badanej formacji. Następnie po dokładnym wymieszaniu zawartości, pobierano z niej 100 μ l mieszaniny i przenoszono do kolejnej studzienki w rzędzie. Czynność tę powtarzano 9 razy dla kolejnych studzienek. Ze studzienki 10, po wymieszaniu, wylewano 100 μ l mieszaniny. W ten sposób otrzymano serię podwójnych rozcieńczeń badanych związków – 1:2 do 1:1024. Studzienka 11 stanowiła kontrolę wzrostu, a studzienka 12 jałowości podłoża. Następnie przy użyciu pipety automatycznej do studzienek 1-11 dodawano 10 μ l wcześniej wystandaryzowanej zawiesiny drobnoustrojów testowych. Płytki ze szczepami bakterii inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a płytki ze szczepami grzybów w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Wartość najniższego stężenia substancji tworzących badaną formację hamującą wzrost drobnoustrojów (MIC) określano przez makroskopową ocenę wzrostu w postaci zmętnienia podłoża lub osadu na dnie studzienki. Dodatkowo, stopień zmętnienia hodowli oceniano za pomocą pomiaru absorbancji przy długości fali 595 nm w aparacie Microplate Reader 680 (Biorad).

Aktywność bójczą badanych formacji oceniano wartością MBC, określając najmniejsze stężenie substancji tworzących daną formację, pod wpływem której ginie 99,9% komórek drobnoustrojów. W tym celu z każdej studzienki, w której nie zaobserwowano wzrostu pobierano eż mieszaninę i posiewano na powierzchnię podłoża Mueller-Hinton, a szczepy grzybów na agarowe podłożo Sabouraud. Posiewy z bakteriami inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a posiewy z grzybami w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Brak wzrostu szczepów świadczył o działaniu bójczym badanej formacji. Wyniki badań zestawiono w tabelach 1-10.

Tabela 1. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739.

SKŁAD FORMULACJI	ROZCIĘCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (3%)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat-20 (3%)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

- brak wzrostu

+ wzrost

Tabela 2. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Escherichia coli* ATCC 8739. W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych.

SKŁAD FORMULACJI	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	
	MIC	MBC
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	7,5 ppm	7,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	7,5 ppm	7,5 ppm
Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	2,5 ppm	2,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	1,875 ppm	1,875 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,187 %	0,187 %
Polisorbat-20 (3%)	0, 375 %	0, 375 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	0,937 ppm	0,937 ppm
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,125 %	0,125 %
Polisorbat-20 (3%)	0, 187 %	0, 187 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	0,468 ppm	0,468 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,046 %	0,046 %
Polisorbat-20 (6%)	0,187 %	0, 187 %
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,062 %	0,062%

Tabela 3. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

SKŁADFORMULACJI	ROZCIEŃCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (3%)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat-20 (3%)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

- brak wzrostu

+ wzrost

Tabela 4. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych.

SKŁAD FORMULACJI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	
	MIC	MBC
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	7,5 ppm	7,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	7,5 ppm	7,5 ppm
Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	2,5 ppm	2,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	3,75 ppm	3,75 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,375 %	0,375 %
Polisorbat-20 (3%)	0,75 %	0,75 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	3,75 ppm	3,75 ppm
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,5 %	0,5 %
Polisorbat-20 (3%)	0,75 %	0,75 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	1,875 ppm	1,875 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,1875 %	0,1875 %
Polisorbat-20 (6%)	0,75 %	0,75 %
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,25 %	0,25%

Tabela 5. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

BADANA FORMULACJA	ROZCIĘNCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (3%)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat-20 (3%)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

- brak wzrostu

+wzrost

Tabela 6. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych.

BADANA FORMULACJA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
	MIC	MBC
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	7,5 ppm	7,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	7,5 ppm	7,5 ppm
Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	2,5 ppm	2,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	3,75 ppm	3,75 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,375 %	0,375 %
Polisorbat-20 (3%)	0,75 %	0,75 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	1,875 ppm	1,875 ppm
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,25 %	0,25 %
Polisorbat-20 (3%)	0,375 %	0,375 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	0,937 ppm	0,937 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,0937 %	0,0937 %
Polisorbat-20 (6%)	0,375 %	0,375 %
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,125 %	0,125 %

Tabela 7. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Candida albicans* ATCC 10231.

SKŁAD FORMULACJI	ROZCIĘCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (3%)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat-20 (3%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

- brak wzrostu

+ wzrostu

Tabela 8. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Candida albicans* ATCC 16404. W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych.

BADANA FORMULACJA	<i>Candida albicans</i> ATCC 16404	
	MIC	MBC
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	>7,5 ppm	>7,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	>7,5 ppm	>7,5 ppm
Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	>2,5 ppm	>2,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	1,875 ppm	1,875 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,1875 %	0,1875 %
Polisorbat-20 (3%)	0,375 %	0,375 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	0,468 ppm	0,468 ppm
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,0625 %	0,0625 %
Polisorbat-20 (3%)	0,0937 %	0,0937 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	0,468 ppm	0,468 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,0468 %	0,0468 %
Polisorbat-20 (6%)	0,1875 %	0,1875 %
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,0625 %	0,0625%

Tabela 9. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Aspergillus brasiliensis* ATCC1640.

SKŁAD FORMULACJI	ROZCIEŃCZENIA BADANEJ FORMULACJI									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (3%)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Etyloheksylogliceryna (2%) Polisorbat-20 (3%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Nanosilver aXonnite® (15 ppm) Glikol kaprylowy (1,5 %) Polisorbat-20 (6%) Etyloheksylogliceryna (2%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

- brak wzrostu;

+ wzrost

Tabela 10. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Aspergillus brasiliensis* ATCC 10231. W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych.

BADANA FORMULACJA	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 10231	
	MIC	MBC
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	7,5 ppm	>7,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	7,5 ppm	>7,5 ppm
Nanogold aXonnite® (5 ppm Au)	2,5 ppm	>2,5 ppm
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	0,9375 ppm	7,5 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,0937 %	0,75 %
Polisorbat-20 (3%)	0,1875 %	1,5 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	0,9375 ppm	3,75 ppm
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,125 %	0,5 %
Polisorbat-20 (3%)	0,1875 %	0,75 %
Nanosilver aXonnite® (15 ppm)	0,468 ppm	0,9375 ppm
Glikol kaprylowy (1,5 %)	0,0468 %	0,0937 %
Polisorbat-20 (6%)	0,1875 %	0,375 %
Etyloheksylogliceryna (2%)	0,0625 %	0,125%

1.1.5. Omówienie wyników

Uzyskane rezultaty wskazują na dużą aktywność mikrobiologiczną zastosowanych formu-
lacji zarówno w stosunku do szczepów bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich, a także
drożdży i pleśni. Najwyższą skuteczność wykazywała mieszanina Nanosilver aXonnite® w stę-
żeniu 15 ppm z dwoma mediatorami wspierającymi transport przez błony biologiczne: glikolem
kaprylowy (1,5%) i etyloheksylogliceryną (2%). Porównując te dwa promotory przenikania
względem siebie glikol kaprylowy i etylheksyloglicerynę lepszą aktywność wykazywała mie-
szanina zawierająca etyloheksyloglicerynę. Jednakże najsilniejszy efekt osiągnięto przy połą-
czeniu dwóch promotorów przejścia, co potwierdza ich synergiczne działanie względem siebie.

W badaniu ustalono też, że dodatek nanocząstek złota nie wpływał na zwiększenie działania
przeciwdrobnoustrojowego wobec badanych szczepów. Poziom działania przeciwdrobnoustro-
jowego pozostał na tym samym poziomie. Badania te potwierdziło informacje literaturowe
o tym, iż srebro wykazuje najsilniejsze działanie antymikrobowe i umożliwiło podjęcie decyzji,
aby w kolejnych badaniach skupić się na tym, że głównym metalem wybranym do tworzenia
prototypu produktu pozostanie Nanosilver aXonnite®. W eksperymencie potwierdzono też,
iż dodatek solubilizatora nie wpływa negatywnie na aktywność nanometali.

1.2. Wyznaczenie aktywności badanych formu- lacji z wybranymi promotorami przenikania wobec reprezentatywnych drob- noustrojów

W celu określenia aktywności nanocząstek w stosunku do wybranych reprezentatywnych
przedstawicieli drobnoustrojów: bakterii Gram-ujemnych – *Escherichia coli* i Gram-dodatnich
– *Staphylococcus aureus* oraz grzybów – *Candida albicans*, najczęściej występujących przy
nadkażeniach błony śluzowej nosogardzieli, wykorzystano formu-
lacje zawierające Nanosilver aXonnite®, Nanogold aXonnite® oraz substancje pomocnicze, których celem było zwiększe-
nie penetracji nanocząstek w zawiesinach lub mieszaninach o większych gęstościach oraz uła-
twienie ich migracji w podłożach mikrobiologicznych²²⁰.

1.2.1. Materiały wykorzystane w badaniach

1.2.1.1. Substancje chemiczne stosowane w badaniach

1. Nanosilver aXonnite® (INCI: aqua, silver (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-22-4, roztwór koloidalny srebra w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Srebro metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 5 – 50 μS.

Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.

2. Nanogold aXonnite® (INCI: aqua, gold (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-57-5, roztwór koloidalny złota w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Złoto metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 2 – 50 μS.

Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.

3. Dimetylosulfotlenek (INCI: dimethyl sulfoxide, DMSO), CAS: 67-68-5 postać płynna.

Producent: Chempur.

4. Eter dimetylowy izosorbidu (INCI: Dimethyl Isosorbide, DMI), CAS: 5306-85-4, postać płynna stężenie 100%.

Producent: Salicyles and Chemicals.

5. 4-Hydroksyacetofenon (INCI: Hydroxyacetophenone, HA), CAS: 99-93-4, postać stała, kryształy, białe, stężenie 100%.

Producent: Aromat Vertex.

6. Gliceryna (INCI: Glycerin), CAS: 56-81-5, postać płynna, bezbarwna ciecz o wysokiej lepkości, stężenie 100%

Producent: Brenntag.

1.2.1.2. Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach

Patogenne szczepy *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* wykorzystane w oznaczeniu aktywności mikrobiologicznej pochodziły z kolekcji własnej Zakładu Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego.

1.2.1.3. Formulacje użyte do badań i ich przygotowanie

W celu oceny skuteczności mikrobiologicznej wykonano formulacje zawierające Nanosilver aXonnite® oraz Nanogold aXonnite® w stężeniach 20 ppm, 10 ppm, 7,5 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm z odpowiednimi z promotorami przenikania przez błony biologiczne, innymi niż opisane w pkt 1.1.3., a mianowicie: DMSO, hydroksyacetonem, eterem dimetylowym izosorbidu oraz gliceryną w stężeniach przedstawionych w tabelach 11-14. Formulacje przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt 1.1.3.1.

1.2.2. Wykonanie oznaczenia

Oznaczenie aktywności oraz wyznaczenie wartości MIC badanych formulacji przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym wobec bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* oraz grzybów – *Candida albicans*, zgodnie ze standardową procedurą opisaną w pkt 1.1.4. Uzyskane rezultaty przedstawiono w tabeli 11-14.

1.2.3. Omówienie wyników

W analizie wpływu promotorów przejścia przez błony biologiczne wykazano, że najlepszy rezultat mikrobiologiczny uzyskano wykorzystując znany z zastosowań farmaceutycznych dimetylosulfotlenek (DMSO) w połączeniu z Nanosilver aXonnite®. Formulacja ta już przy 1% dodatku DMSO wykazywała silne działanie mikrobiologiczne, choć porównywalne z formulacjami zawierającymi inne promotory, tj. glicerynę i eter dimetyloizosorbidu. Różnice w aktywności przeciwdrobnoustrojowej uwidoczniły się zdecydowanie przy 5% dodatku DMSO i były obserwowane w odniesieniu do wszystkich badanych szczepów, choć najsilniejszy efekt wystąpił w stosunku do szczepów *Escherichia coli*, przedstawiciela bakterii Gram-ujemnych, co może mieć związek ze specyficzną budową ściany komórkowej tych bakterii.

Dobre rezultaty uzyskano również w formulacjach zawierających 5% dodatek gliceryny i AgNPs. Hydroksyaceton nie wpływał znacząco na wartość MIC.

Tabela 11. Aktywności nanocząstek w badanych formulacjach wobec szczepów *Escherichia coli*-

PROMOTOR	NPs aXonnite®	<i>Escherichia coli</i>				
		20 ppm	10 ppm	7,5 ppm	5 ppm	2,5 ppm
Gliceryna 1%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	+	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Gliceryna 5%	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
DMSO 1%	AgNPs	0	0	0	0	0
	AgNPs/AuNPs	0	+	+	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
DMSO 5%	AgNPs	0	0	0	0	0
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	0	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Hydroksyacetoftenon 0,5%	AgNPs	0	0	0	0	0
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Eter dimetylowy izosorbidu 5%	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+

0 - brak wzrostu, co jest jednoznaczne z wrażliwością na nanocząstki
 + wzrost mikroorganizmów

Tabela 12. Aktywności nanocząstek w badanych formulacjach wobec szczepów *Staphylococcus aureus*.

PROMOTOR	NPs aXonnite®	<i>Staphylococcus aureus</i>				
		20 ppm	10 ppm	7,5 ppm	5 ppm	2,5 ppm
Gliceryna 1%	AgNPs	0	0	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	+	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Gliceryna 5%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	+	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
DMSO 1%	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	+	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
DMSO 5%	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Hydroksyacetonfenon 0,5%	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Eter dimetylowy izosorbidu 5%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+

0 - brak wzrostu, co jest jednoznaczne z wrażliwością na nanocząstki
 + wzrost mikroorganizmów

Tabela 13. Aktywności nanocząstek w badanych formułacjach wobec szczepów *Candida albicans*.

PROMOTOR	NPs aXonnite®	<i>Candida albicans</i>				
		20 ppm	10 ppm	7,5 ppm	5 ppm	2,5 ppm
Gliceryna 1%	AgNPs	0	0	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Gliceryna 5%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
DMSO 1%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	0	0	+	+	+
DMSO 5%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Hydroksyacetonfenon 0,5%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Eter dimetylowy izosorbidu 5%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+

0 - brak wzrostu, co jest jednoznaczne z wrażliwością na nanocząstki
 + wzrost mikroorganizmów

Tabela 14. Oznaczenie skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji na bazie Nanosilver aXonnite® z wybranymi promotorami przenikania przez błony biologiczne.

FORMULACJA	MIC µg/ml (ppm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 50%	3,125	3,125	3,125
Nanosilver aXonnite® (2 ppm) DMSO 50%	1	1	6,25
Nanosilver aXonnite® (10 ppm) DMSO 50%	2,5	1,25	6,25
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 10%	3,125	3,125	6,25
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 5%	3,125	3,125	6,25
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 50% Hydroksyacetofenon 0,5%	3,125	3,125	3,125
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 10% Hydroksyacetofenon 0,5%	3,125	3,125	3,125
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 5% Hydroksyacetofenon 0,5%	3,125	3,125	6,25
Woda DMSO 50% Hydroksyacetofenon 0,5% Próba „0”	25	25	6,25
Woda DMSO 10% Hydroksyacetofenon 0,5% Próba „0”	25	25	6,25
Woda DMSO 5% Hydroksyacetofenon 0,5% Próba „0”	25	25	6,25

1.3. Wyznaczenie aktywności badanych formułacji z wybranymi przetworami pochodzenia roślinnego

Uwzględniając fakt, że preparaty rynkowe poza cząstkami nanometali powinny zawierać także ekstrakty roślinne lub olejki eteryczne podnoszące skuteczność i atrakcyjność gotowego produktu, celem przeprowadzonego badania było ustalenie ich wpływu na aktywność mikrobiologiczną badanych formułacji. W ich tworzeniu wykorzystano: ekstrakt z porostu islandzkiego oraz olejek z drzewa herbacianego, eukaliptusowy, oregano, szalwii i tymianku. Jednakże wprowadzenie ich do formułacji bazowej zawierającej nanosrebro oraz promotory przenikania wymagało zastosowania solubilizatora (Polisorbatu-80), który umożliwił wytworzenie stabilnego fizykochemicznie preparatu opartego na roztworze wodnym z dodatkowymi substancjami roślinnymi (ekstrakty i olejki eteryczne). Solubilizator to substancja, której celem jest rozpuszczanie lub rozproszenie substancji trudno rozpuszczalnych w wodzie. Utworzenie roztworu lub jednorodnej, stabilnej mieszaniny zapewnia przede wszystkim precyzyjne aplikowanie a przez to niweluje błędy pomiarowe. W przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym najczęściej stosowanymi solubilizatorami są polisorbaty - mieszanina polioksyetylenowych pochodnych sorbitanu i kwasu oleinowego oraz olejek rycynowy etoksylogowany (PEG-40).

1.3.1. Materiały wykorzystane w badaniach

1.3.1.1. Substancje chemiczne stosowane w badaniach

1. Nanosilver aXonnite® (INCI: aqua, silver (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-22-4, roztwór koloidalny srebra w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Srebro metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 5 – 50 μS.
Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.
2. Eter dimetylowy izosorbidu, DMI (INCI: Dimethyl Isosorbide), CAS: 5306-85-4, postać płynna stężenie 100%.
Producent: Salicyles and Chemicals.
3. 4-Hydroksyacetofenon, HA, (INCI: Hydroxyacetophenone), CAS: 99-93-4, postać stała, kryształy, białe, stężenie 100%.
Producent: Aromat Vertex.

4. Polisorbat-80 (INCI: Polysorbate - 80), CAS: 9005-65-6, postać płynna, stężenie 100%.
Producent: Donauchem.
5. Ekstrakt z porostu islandzkiego, olejki eteryczne z tymianku, drzewa herbacianego, oregano i szalwii.
Producent Provital Group.

1.3.1.2. Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach

Patogenne szczepy *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* wykorzystane w oznaczeniu aktywności mikrobiologicznej pochodziły z kolekcji własnej Zakładu Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego.

1.3.1.3. Formułacje użyte do badań i ich przygotowanie

W celu oceny skuteczności mikrobiologicznej wykonano formułacje zawierające Nanosilver aXonnite® z Polisorbatem-80, promotorami przenikania przez błony biologiczne: hydroksyacetonem, eterem dimetylowym izosorbidu oraz przetworami pochodzenia roślinnego w stężeniach przedstawionych w tabeli 15. Formułacje przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt 1.1.3.1.

1.3.2. Wykonanie oznaczenia

Wyznaczenie wartości MIC badanych formułacji wobec *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz *Candida albicans* przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożach płynnych zgodnie ze standardową procedurą opisaną w pkt 1.1.4. a uzyskane rezultaty przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Oznaczenie wartości MIC ($\mu\text{g/ml}$), skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji na bazie Nanosilver aXonnite® z przetworami pochodzenia roślinnego.

FORMULACJA	MIC $\mu\text{g/ml}$ (ppm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA „0”	6,25	6,25	6,25
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Ekstrakt z porostu islandzkiego (0,5%)	1,56	1,56	1,56
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z drzewa herbacianego (0,5%)	1,56	1,56	1,56
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek eukaliptusowy (0,5%)	1,56	1,56	1,56
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenone (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) 1% Polisorbat-80 (1%) Olejek z oregano (0,5%)	1,56	1,56	1,56

Tabela 15. cd.

FORMULACJA	MIC $\mu\text{g/ml}$ (ppm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenone (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z szałwii (0,5%)	1,56	1,56	1,56
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenone (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z tymianku (0,5%)	1,56	3,125	3,125

1.3.3. Omówienie wyników

Uzyskane rezultaty wskazywały na synergizm działania Nanosilver aXonnite® i promotorów przenikania przez błony biologiczne z przetworami pochodzenia roślinnego. W badaniu wykorzystano wcześniej zbadany promotor przenikania - eter dimetylowy izosorbidu, którego właściwości wspierające działanie mikrobiologiczne a przy tym dobry profil toksyczności wydawał się najlepszym wyborem. Najsilniejszą aktywność mikrobiologiczną wykazała formuła zawierająca obok Nanosilver aXonnite®, promotorów przenikania oraz solubilizatora przetwory pochodzenia roślinnego w postaci olejków z szałwii, oregano, eukaliptusa i drzewa herbacianego. Można także zaobserwować, że uzyskana wartość minimalnego stężenia hamującego MIC = 1,56 $\mu\text{g/ml}$ jest w większości przypadków niezależna od zastosowanego przetworu roślinnego. Minimalne stężenie hamujące jest jedynie wyższe wobec szczepów *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i wynosi 3,125 $\mu\text{g/ml}$ dla formuacji z olejkiem z tymianku.

1.4. Wyznaczenie aktywności badanych formuacji z wybranymi substancjami łagodzącymi

Substancje wykazujące działanie łagodzące tworzą barierę ochronną, co w przypadku infekcji nosa ma na celu złagodzenie objawów podrażnienia, przynosząc ulgę i zmniejszając przy

tym dyskomfort pacjenta. Nawilżanie i stosowanie substancji powlekających śluzówkę nosa choć nie jest bezpośrednim działaniem zwalczającym infekcję pomaga łagodzić suchość, pieczenie czy swędzenie, a prawidłowe nawilżenie może również ułatwić oddychanie poprzez nos i wspomóc naturalne funkcje obronne śluzówki nosa.

1.4.1. Materiały wykorzystane w badaniach

1.4.1.1. Substancje chemiczne stosowane w badaniach

1. Nanosilver aXonnite® (INCI: aqua, silver (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-22-4, roztwór koloidalny srebra w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Srebro metaliczne Ag4N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 5 – 50 μ S.
Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.
2. Dimetylosulfotlenek (INCI: dimethyl sulfoxide, DMSO), CAS: 67-68-5 postać płynna.
Producent: Chempur.
3. Eter dimetylowy izosorbidu (INCI: Dimethyl Isosorbide, DMI), CAS: 5306-85-4, postać płynna stężenie 100%.
Producent: Salicyles and Chemicals.
4. 4-Hydroksyacetofenon (INCI: Hydroxyacetophenone, HA), CAS: 99-93-4, postać stała, kryształy, białe, stężenie 100%.
Producent: Aromat Vertex.
5. Polisorbat (INCI: Polysorbate - 80), CAS: 9005-65-6, postać płynna, stężenie 100%.
Producent: Donauchem.
6. Dekspantenol (INCI: Panthenol), CAS: 81-13-0 / 16485-10-2, postać płynna, roztwór wodny 75%, bezbarwny.
Producent: Brenntag.
7. Laktoferyna (INCI: Lactoferrin), CAS: -, postać stała, proszek, biały do lekko żółtego, stężenie 100%.
Producent: CQM.

1.4.1.2. Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach

Patogenne szczepy *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* wykorzystane w oznaczeniu aktywności mikrobiologicznej pochodziły z kolekcji własnej Zakładu Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego.

1.4.1.3. Formułacje użyte do badań i ich przygotowanie

W celu oceny skuteczności antydrobnoustrojowej wykonano analizę formułacji zawierających Nanosilver aXonnite® z hydroksyacetonem i eterem dimetylowym izosorbidu (promotorami przenikania) oraz z substancjami łagodzącymi – laktoferyną i pantenolem. Jako solubilizator w tworzeniu formułacji zastosowano Polisorbat-80. Użyte stężenia zostały przedstawione w tabeli 16-17. Formułacje przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt 1.1.3.1.

1.4.2. Wykonanie oznaczenia

Wyznaczenie wartości MIC badanych formułacji wobec *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz *Candida albicans* przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym, zgodnie ze standardową procedurą opisaną w pkt 1.1.4. a u uzyskane rezultaty przedstawiono w tabelach 16-17.

1.4.3. Omówienie wyników

W eksperymencie potwierdzono, iż dodatek substancji łagodzących takich jak pantenol czy laktoferyna nawet w obecności bardzo silnego promotora przenikania jakim jest DMSO nie zmniejsza w stopniu znaczącym aktywności Nanosilver aXonnite®. Zaobserwowano także, że dodatek solubilizatora (Polisorbat-80) wpływa korzystnie na działanie antydrobnoustrojowe.

W przypadku formułacji zawierającej laktoferynę i Nanosilver aXonnite® podobny poziom aktywności mikrobiologicznej uzyskano stosując zamiast solubilizatora DMSO. Użycie obu substancji jednocześnie (tj. DMSO i Polisorbatu-80) albo stosowanie zamienne pozostawia wartość MIC na podobnym poziomie, jednak brak promotora przejścia lub solubilizatora obniża aktywność Nanosilver aXonnite® w formułacji z laktoferyną.

Tabela 16. Oznaczenie wartości MIC ($\mu\text{g/ml}$) skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji na bazie Nanosilver aXonnite® z przykładowymi substancjami łągodzącymi.

FORMULACJA	MIC $\mu\text{g/ml}$ (ppm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA „0”	6,25	6,25	6,25
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Pantenol (0,5%)	6,25	6,25	6,25
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Laktoferyny (0,5%)	6,25	6,25	6,25
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Laktoferyna (0,5%)	6,25	brak zahamowania	brak zahamowania

Ze względu na fakt, iż obecność substancji łągodzących jak pantenol i laktoferyna w produktach stosowanych u ludzi w infekcjach nosogardzieli jest niewątpliwie korzystna, choć nie wpływa spektakularnie na działanie antydrobnoustrojowe wobec badanych szczepów wykonano jeszcze jeden test, w którym przenikanie przez błony biologiczne zostało wsparte dodatkiem promotora przenikania w postaci DMSO.

Tabela 17. Oznaczenie wartości MIC ($\mu\text{g/ml}$) skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji na bazie Nanosilver aXonnite® z przykładowymi substancjami łagodzącymi oraz DMSO.

FORMULACJA	MIC $\mu\text{g/ml}$ (ppm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetyfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%), 10% DMSO (10%) Próba „0”	12,5	1,56	12,5
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetyfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) DMSO (10%) Laktoferyna (0,5%)	6,25	6,25	12,5
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetyfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) DMSO (10%) Laktoferyna (0,5%)	6,25	6,25	12,5

1.5. Wyznaczenie aktywności badanych formułacji z wybranymi substancjami poprawiającymi właściwości fizykochemiczne poprzez zwiększenie lepkości

Substancje poprawiające konsystencję wprowadza się do wyrobu w celu uzyskania zamierzonej, właściwej formułacji. Przeprowadzona analiza miała więc na celu sprawdzenie, czy standardowo stosowane substancje, obecne w gotowym produkcie takie jak: zagęstniki, polimery czy układy emulsyjne będą miały wpływ na efekt mikrobiologiczny AgNPs i AuNPs.

1.5.1. Materiały wykorzystane w badaniach

1.5.1.1. Substancje chemiczne stosowane w badaniach

1. Nanosilver aXonnite® INCI: Aqua, Silver (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-22-4, roztwór koloidalny srebra w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Srebro metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 5 – 50 μS.
Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.
2. Nanogold aXonnite® INCI: Aqua, Gold (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-57-5, roztwór koloidalny złota w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Złoto metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 2 – 50 μS.
Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.
3. Silikon, XIAMETERTM PMX-200 Silicone Fluid 350 cSt, INCI: Dimethicone, CAS: 63148-62-9, postać płynna, stężenie 100%.
Producent: Dow Chemical Company Limited.
4. Glikol polietylenowy, Polyox™ WSR-301, INCI: PEG-90M, CAS: 25852-47-5, postać płynna, stężenie 100%.
Producent: Dow Chemical Company Limited.
5. Karbomer, Carbopol® ETD 2020 Polymer, INCI: Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, CAS: -, stężenie 100%.
Producent: Lubrizol.
6. Emulsja (INCI: Aqua, Glycerin, Hexyl Laurate, Octyldodecanol, Glyceryl Stearate, Cetearth-20, Cetearth-12, Cetearyl Alcohol, Cetyl Palmitate).
Producent: Emulsja przygotowana własnoręcznie w laboratorium ACC Chemicals
Glycerin; Brenntag,
Hexyl Laurate; Amitahc,
Octododecanol; Evonik
Glyceryl Stearate; Evonik
Cetearth – 20; Brenntag
Cetearth – 12; Brenntag

Cetearyl Alcohol; Oquema

Cetyl Palmitate; Oquema

1.5.1.2. Przygotowanie emulsji

Ogrzano do temperatury 65°C w jednym naczyniu składniki fazy wodnej (woda, gliceryna), w drugim - składniki fazy olejowej i emulgatory (Hexyl Laurate, Octyldodecanol, Gliceryl Sterate, Cetareth-20, Cetareth-12, Cetearyl Alcohol, Cetyl Palmitate). Po osiągnięciu tej samej temperatury przez obie części mieszaniny dodano do fazy wodnej składniki fazy olejowej, intensywnie mieszając przy użyciu homogenizatora przy obrotach 500 ob./min. Emulsję i przed wykorzystaniem schłodzono.

1.5.1.3. Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach

Patogenne szczepy *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* wykorzystane w oznaczeniu aktywności mikrobiologicznej pochodziły z kolekcji własnej Zakładu Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego.

1.5.1.4. Formułacje użyte do badań i ich przygotowanie

W celu oceny skuteczności antydrobnoustrojowej wykonano analizę formułacji zawierającej Nanosilver aXonnite® oraz Nanogold aXonnite® z wybranymi dodatkami poprawiającymi konsystencję. Do wykonania formułacji obok nanometali wykorzystano: silikon, glikol polietylenowy, emulsję oraz karbomer. Użyte stężenia zostały przedstawione w tabelach 18-20. Formułacje przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt 1.1.3.1.

1.5.2. Wykonanie oznaczenia

Wyznaczenie wartości MIC badanych formułacji wobec *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz *Candida albicans* przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym zgodnie ze standardową procedurą opisaną w pkt 1.1.4. a u uzyskane rezultaty przedstawiono w tabelach 18-20.

Tabela 18. Aktywności nanocząstek w badanych formulacjach z użyciem dodatków poprawiających konsystencję wobec szczepów *Escherichia coli*.

SUBSTANCJA	NPs aXonnite®	<i>Escherichia coli</i>				
		20 ppm	10 ppm	7,5 ppm	5 ppm	2,5 ppm
Silikon 1%	AgNPs	0	+	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Silikon 5%	AgNPs	0	0	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Glikol polietylenowy 1%	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Glikol polietylenowy 5%	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Emulsja	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Karbomer 0,2%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	0
	AuNPs	+	+	+	+	+
Karbomer 0,8%	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+

0 - brak wzrostu co jest jednoznaczne z wrażliwością na nanocząstki
 + wzrost mikroorganizmów

Tabela 19. Aktywności nanocząstek w badanych formuacjach z użyciem substancji poprawiających konsystencję wobec szczepów *Staphylococcus aureus*.

SUBSTANCJA	NPs aXonnite®	<i>Staphylococcus aureus</i>				
		20 ppm	10 ppm	7,5 ppm	5 ppm	2,5 ppm
Silikon 1%	AgNPs	+	+	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Silikon 5%	AgNPs	0	+	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Glikol polietylenowy 1%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Glikol polietylenowy 5%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Emulsja	AgNPs	0	0	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	+	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Karbomer 0,2 %	AgNPs	0	0	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	+	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Karbomer 0,8%	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+

0 - brak wzrostu co jest jednoznaczne z wrażliwością na nanocząstki
 + wzrost mikroorganizmów

Tabela 20. Aktywności nanocząstek w badanych formułacjach z użyciem substancji poprawiających konsystencję wobec szczepów *Candida albicans*.

DODATEK	NPs aXonnite®	<i>Candida albicans</i>				
		20 ppm	10 ppm	7,5 ppm	5 ppm	2,5 ppm
Silikon 1%	AgNPs	0	0	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Silikon 5%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	+	+	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Glikol polietylenowy 1%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Glikol polietylenowy 5%	AgNPs	0	0	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Emulsja	AgNPs	0	0	+	+	+
	AgNPs/AuNPs	+	+	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+
Karbomer 0,2 %	AgNPs	0	0	0	0	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	0	-	+
	AuNPs	0	+	+	+	+
Karbomer 0,8%	AgNPs	0	0	0	+	+
	AgNPs/AuNPs	0	0	+	+	+
	AuNPs	+	+	+	+	+

0 - brak wzrostu co jest jednoznaczne z wrażliwością na nanocząstki
 + wzrost mikroorganizmów

1.5.3. Omówienie wyników

Prezentowane dla szczepu *Escherichia coli* wyniki wskazują, że zarówno dodanie do formułacji 1% jak i 5% silikonu ma wpływ na obniżenie skuteczności AgNPs oraz AuNPs, wyrażone poprzez strefę zahamowania wzrostu bakterii. W mniejszym stopniu wpływa to na aktywność formułacji AgNPs/AuNPs. Z kolei dołączenie glikolu polietylenowego (w obu stężeniach)

zmniejsza efektywność formułacji z AgNPs i AgNPs/AuNPs, nieznacznie tylko zmniejszając skuteczność formułacji z AuNPs. W przypadku dołączenia emulsji największą aktywność wykazywała formułacja z AgNPs, co potwierdza wcześniejsze badania oraz dane z piśmiennictwa mówiące, iż najskuteczniejsze działanie antybakteryjne wykazuje nanosrebro. Dodanie karbomeru obniżało skuteczność formułacji AgNPs i AgNPs/AuNPs, natomiast nie miało znaczącego wpływu na formułacje z AuNPs.

Wyniki oparte o strefy zahamowania wzrostu szczepów *Staphylococcus aureus* wskazują, iż każdy z dodatków reologicznych obniża skuteczność nanocząstek. Niekorzystny efekt mikrobiologiczny formułacji z AgNPs i AuNPs był szczególnie widoczny po dodaniu silikonu. Nieco lepsze wyniki uzyskano po dołączeniu do formułacji glikolu polietylenowego, który wyraźnie obniżał tylko skuteczność AuNPs. W przypadku zastosowania emulsji, największą efektywność wykazywała formułacja z AgNPs. I podobnie jak w przypadku karbomeru nie wykazano korzystnego wpływu na hamowanie wzrostu drobnoustrojów przez formułacje z AuNPs. Dodanie do formułacji karbomeru powodowało (wraz ze wzrostem stężenia) spadek aktywności mikrobiologicznej nanocząstek i podobnie jak w przypadku dodatku glikolu polietylenowego najlepszą skuteczność wykazywała formułacja z AgNPs.

Aktywność nanocząstek w badanych formułacjach wobec szczepu *Candida albicans* była zależna od dodanej substancji reologicznej. We wszystkich przypadkach obserwowano brak aktywności formułacji z AuNPs wobec wzrostu grzyba. Najkorzystniejsze rezultaty, wyrażone dobrą skutecznością formułacji z AgNPs uzyskano stosując karbomer.

Dostosowując preparat do wymagań rynkowych konieczne jest zwiększenie lepkości poprzez modyfikację reologii produktu. Badanie to wykazało, iż zastosowane substancje poprawiające konsystencję formułacji, choć wpływają na obniżenie skuteczności nanocząstek, wciąż pozwalają na zachowanie skutecznego, niskiego stężenia antydrobnoustrojowego, wynoszącego 7,5-10 ppm, co w przeliczeniu zawartości nanometali w formułacji stanowi 0,00075-0,001% w badanej próbce.

Podsumowując, najlepsze rezultaty osiągały formułacje zagęszczone karbomerem. Dodatek silikonu wpływał na zmniejszenie aktywności antydrobnoustrojowej badanych formułacji.

2. Określanie wartości MIC badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową

Aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych formułacji potwierdzono także alternatywną metodą wyznaczania wartości MIC - metodą dyfuzyjno-krażkową, zgodną z rekomendacjami EUCAST (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) oraz KORLD (*Krajowym Ośrodkiem Referencyjnym ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów*).

2.1. Wyznaczenie aktywności badanych formułacji z wybranymi promotorami przenikania wobec reprezentatywnych drobnoustrojów

2.1.1. Materiały wykorzystane w badaniach

2.1.1.1. Substancje chemiczne stosowane w badaniach

1. Nanosilver aXonnite® (INCI: aqua, silver (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-22-4, roztwór koloidalny srebra w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Srebro metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 5 – 50 μS.
Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.
2. Dimetylosulfotlenek (INCI: dimethyl sulfoxide, DMSO), CAS: 67-68-5 postać płynna.
Producent: Chempur.
3. Eter dimetylowy izosorbidu, DMI (INCI: Dimethyl Isosorbide), CAS: 5306-85-4, postać płynna stężenie 100%.
Producent: Salicyles and Chemicals.
4. 4-Hydroksyacetofenon, HA, (INCI: Hydroxyacetophenone), CAS: 99-93-4, postać stała, kryształy, białe, stężenie 100%.
Producent: Aromat Vertex.

5. Glikol heksylenowy, (INCI: Hexylene Glycol), CAS: 107-41-5, postać płynna, bezbarwny, stężenie 100%.
Producent: Sigma-Aldrich.
6. Polisorbat-80 (INCI: Polysorbate - 80), CAS: 9005-65-6, postać płynna, stężenie 100%.
Producent: Donauchem.
7. Dekspantenol (INCI: Panthenol), CAS: 81-13-0 / 16485-10-2, postać płynna, roztwór wodny 75%, bezbarwny.
Producent: Brenntag.
8. Laktoferyna (INCI: Lactoferrin), CAS: -, postać stała, proszek, biały do lekko żółtego, stężenie 100%.
Producent: CQM.
9. Ekstrakt z porostu islandzkiego, olejki eteryczne z tymianku, drzewa herbacianego, oregano i szałwii.
Producent Provital Group.

2.1.1.2. *Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach*

Patogenne szczepy *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* wykorzystane w oznaczeniu aktywności mikrobiologicznej pochodziły z kolekcji własnej Zakładu Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego.

2.1.1.3. *Formulacje użyte do badań i ich przygotowanie*

W celu oceny skuteczności antydrobnoustrojowej wykonano analizę 31 formulacji zawierających Nanosilver aXonnite® w stężeniach 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3 ppm z:

- promotorami przenikania przez błony biologiczne,
- substancjami łagodzącymi,
- Polisorbatem-80,
- wybranymi przetworami pochodzenia roślinnego.

Użyte stężenia zostały przedstawione w tabeli 21-29. Formulacje przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt 1.1.3.1.

2.1.2. Wykonanie oznaczenia

Metoda dyfuzyjno-krażkowa badana na Uniwersytecie Warszawskim na Wydział Biologii w Zakładzie Genetyki Bakterii metodą EUCAST oparta jest na zasadach określonych w

raporcie International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing z roku 1972²²¹

W celu oznaczenia wartości MIC metodą dyfuzyjno-krażkową zastosowano standaryzowane podłoże Mueller-Hinton (MH) oraz suplementację bakterii wg zaleceń standardów metody Eucast.

Przygotowano podłoże agarowe na suchych płytkach Petriego o głębokość $4 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$, następnie w temperaturze pokojowej sterylną wymazówką zostało wprowadzone w postaci zawiesiny innokulum do podłoża hodowlanego. Przed nałożeniem zawiesiny bakterii Gram-ujemnych usuwano nadmiar płynu z wymazówki przez odciśnięcie jej o wnętrze próbówki. Zawiesinę rozprowadzono równomiernie na powierzchni agaru. Krażki z nasączonym płynem badawczym zostały nałożone bezpośrednio po przygotowaniu płytki i nie później niż w ciągu 15 minut od inkubacji, zapobiega to przed zbyt intensywnym namnażaniem się drobnoustrojów, które to w ten sposób zaniżają średnicę strefy zahamowania wzrostu. Płytki zostały odwrócone podłożem do góry uważając, aby krażki nie spadły z powierzchni agaru. Inkubację rozpoczęto w ciągu 15 min w warunkach określonych dla poszczególnych szczepów i opisanych w wytycznych Eucast. Po czasie wskazanym w zaleceniu Eucast obserwuje się wynik przygotowania odpowiedniej zawiesiny w którym to badaniu i prawidłowym inokulowaniu płytki jest wzrost zlewny. Jeśli widoczne są poszczególne kolonie, oznacza to, że innokulum było zbyt małe, a badanie jest powtarzane. Pomiar średnic stref zahamowania wzrostu wykonuje się z dokładnością do milimetra za pomocą linijki lub suwmiarki.

Uzyskane rezultaty przedstawiono w Tabelach 21-29.

Tabela 21. Oznaczenie skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Escherichii coli*.

FORMULACJA	<i>Escherichia coli</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (2 ppm) DMSO (50%)					0 mm
Nanosilver aXonnite® (10 ppm) DMSO (50%)			H 2 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (50%)	H 3 mm	H 1 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%)	H 4-5 mm	H 2-3 mm	H 1-1,5 mm	H <1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (5%)	H 3-4 mm	H 1-2 mm	H 1 mm	~ 0 mm	0 mm
Woda DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Woda DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Woda DMSO (5%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	H 2-2,5 mm	H 1-1,5 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	H 2 mm	H 1-1,5 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (5%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	H 2 mm	H 1 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm

H strefa zahamowania wzrostu wykraczająca poza obręb krążka 9 mm
0 mm brak zahamowania wzrostu

Tabela 22. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Escherichii coli*.

FORMULACJA	<i>Escherichia coli</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 2 mm	H 1 mm	H <1 mm	~ 0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (50%) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 3-4 mm	H 1-2 mm	H <1 mm	H 1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (2 ppm) DMSO (50%) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)					0 mm
Nanosilver aXonnite® (10 ppm) DMSO (50%) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)			H 1,5-2 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 3 mm	H 1 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (5%) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 2 -2,5 mm	H 1 mm	H < 1 mm	H <1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyaceton (0,5%) Glikol heksylenowy (5%)	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

H strefa zahamowania wzrostu wykraczająca poza obręb krążka 9 mm

0 mm brak zahamowania wzrostu

Tabela 23. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Escherichii coli*.

FORMULACJA	<i>Escherichia coli</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	H 3 mm	H 1 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	H 2 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Laktoferyna (0,5%)	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Pantenol (0,5%)	H 2 mm	H 1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Ekstrakt z porostu islandzkiego (0,5%)	H 3 mm	1 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z drzewa herbacianego (0,5%)	H 3 mm	1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z eukaliptusa (0,5%)	H 2 mm	1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm

Tabela 23. cd.

FORMULACJA	<i>Escherichia coli</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z oregano (0,5%)	H 2 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z szalwii (0,5%)	H 2 mm	H 1 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z tymianku (0,5%)	H 2,5 mm	H 1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm

Tabela 24. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Staphylococcus aureus*.

FORMULACJA	<i>Staphylococcus aureus</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (50%)	H 2- 2,5 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (2 ppm) DMSO (50%)					0 mm
Nanosilver aXonnite® (10 ppm) DMSO (50%)			H ~1 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%)	H ~1 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (5%)	H ~1 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm
Woda DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Woda DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Woda DMSO (5%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	H 1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (5%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	H 3 -3,5 mm	H 1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm

H strefa zahamowania wzrostu wykraczająca poza obręb krążka 9 mm
0 mm brak zahamowania wzrostu

Tabela 25. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Staphylococcus aureus*.

FORMULACJA	<i>Staphylococcus aureus</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 2-3 mm	H 2-3 mm	H 2-3 mm	H 2-3 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 2-3 mm	H 1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (2 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) DMSO (50%)					0 mm
Nanosilver aXonnite® (10 ppm) DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)			H ~1 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 2-3 mm	H 2 mm	H 1 mm	H 1 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (5%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 1 -1,5 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Glikol heksylenowy (5%)	H 1 mm	H <1 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm

H strefa zahamowania wzrostu wykraczająca poza obręb krążka 9 mm

0 mm brak zahamowania wzrostu

Tabela 26. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Staphylococcus aureus*.

FORMULACJA	<i>Staphylococcus aureus</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	H <1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	H 1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Laktoferyna (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Pantenol (0,5%)	H 1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Ekstrakt z porostu islandzkiego (0,5%)	H 1,5 mm	H <1 mm	H <1 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z drzewa herbacianego (0,5%)	H 1,5 mm	H 1 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyaceton (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z eukaliptusa (0,5%)	H 1,5 mm	H 1 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Tabela 26. cd.

FORMULACJA	<i>Staphylococcus aureus</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z oregano (0,5%)	H 1,5 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z szalwii (0,5%)	H 1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z tymianku (0,5%)	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Tabela 27. Oznaczenie skuteczności antygrzybiczej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Candida albicans*.

FORMULACJA	<i>Candida albicans</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (50%)	H 6-7 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (2 ppm) DMSO (50%)					0 mm
Nanosilver aXonnite® (10 ppm) DMSO (50%)			0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%)	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (5%)	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Woda DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Woda DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Woda DMSO (5%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	H 7-8 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	przejaśnienie (3 mm)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (5%) Hydroksyacetofenon (0,5%)	przejaśnienie (2mm)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

H strefa zahamowania wzrostu wykraczająca poza obręb krążka 9 mm
0 mm brak zahamowania wzrostu

Tabela 28. Oznaczenie skuteczności antygrzybiczej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Candida albicans*.

FORMULACJA	<i>Candida albicans</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 6-7 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (2 ppm) DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)					0 mm
Nanosilver aXonnite® (10 ppm) DMSO (50%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)			0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	przejaśnienie (2 mm)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (5%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	przejaśnienie (1 mm)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Glikol heksylenowy (5%)	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

H strefa zahamowania wzrostu wykraczająca poza obręb krążka 9 mm
0 mm brak zahamowania wzrostu

Tabela 29. Oznaczenie skuteczności antygrzybiczej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Candida albicans*.

FORMULACJA	<i>Candida albicans</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO (10%) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Laktoferyna (0,5%)	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Pantenol (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Ekstrakt z porostu islandzkiego (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z drzewa herbacianego (0,5%)	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z eukaliptusa (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Tabela 29. cd.

FORMULACJA	<i>Candida albicans</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z oregano (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z szalwii (0,5%)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z tymianku (0,5%)	przjaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

2.1.3. Omówienie wyników

Uzyskane wyniki badań potwierdziły wysoką skuteczność mikrobiologiczną proponowanych formułacji oraz stabilność nanocząstek srebra. Substancje dodatkowe w postaci promotorów przenikania, zastosowane w formułacjach, nie tylko nie obniżyły skuteczności działania nanocząstek wytwarzanych w technologii aXonnite® a ułatwiły ich dostępność i migracje w gęstych mieszaninach oraz w podłożach mikrobiologicznych. Najlepsze rezultaty w stosunku do wszystkich badanych szczepów otrzymano wobec formułacji Nanosilver aXonnite® z DMSO, uzyskując przy stężeniu 50 ppm Nanosilver aXonnite® i 10% dodatku DMSO zakres redukcji 4-5 mm. Nieznacznie niższy wynik, wynoszący 3-4mm, osiągnięto z udziałem 5% DMSO. Jednak, co zaobserwowano, wzrost zawartości DMSO do 50% nie wpływał na zwiększenie obszaru działania AgNPs. Zakres redukcji pozostawał na poziomie 3 mm. Bardzo podobne wyniki uzyskano także wykorzystując formułację zawierającą Nanosilver aXonnite®, hydroksyacetofenon i eter dimetylowy izosorbidu, choć w każdym z tych eksperymentów dodatek DMSO zwiększał powierzchnię działania przecidrobnoustrojowego. Natomiast dodatek przetworów surowców roślinnych, zwłaszcza olejku oregano, tymianku, zielonej herbaty nie zmieniało obszaru redukcji mikroorganizmów przez AgNPs.

Wyniki badania potwierdzają więc, że dodatek substancji wspierających przenikanie pomaga w transporcie niemobilnych nanocząstek w badanym podłożu a tym samym rozszerza

zakres działania mikrobiologicznego srebra. Potwierdza także miejscowe działanie nanosrebra, którego aktywność jest ograniczona ze względu na brak możliwości samoistnej migracji i nie rozprzestrzenia. Pozwala to na wyciągnięcie korzystnych, z punktu widzenia farmakologicznego wniosków: w badanych formulacjach srebro nie będzie miało działania ogólnoustrojowego a tylko miejscowe.

Porównując uzyskane wyniki badań aktywności mikrobiologicznej Nanosilver aXonnite® wobec szczepów *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* można zaobserwować podobną zależność, określoną już podczas wyznaczania wartości MIC metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym, opisaną w pkt 1.1. Nanosilver aXonnite® jest najskuteczniejszy wobec w przypadku szczepów *Escherichia coli*, przedstawiciela bakterii Gram – ujemnych.

3. Określanie wartości MIC badanych formułacji wobec drobnoustrojów mikroaerofilnych oraz beztlenowych metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym oraz dyfuzyjno-krażkową

Drobnoustroje mikroaerofilne oraz beztlenowe są dominującym składnikiem flory bakteryjnej nosogardzieli i dlatego też są częstymi czynnikami etiologicznymi zakażeń górnych dróg oddechowych. Cechuje je także stosunkowo duża odporność na antybiotykoterapię. Stąd wydawało się konieczne uwzględnienie tej grupy drobnoustrojów w badaniach aktywności analizowanych formułacji.

3.1. Wyznaczenie aktywności badanych formułacji

3.1.1. Materiały wykorzystane w badaniach

3.1.1.1. Substancje chemiczne stosowane w badaniach

1. Nanosilver aXonnite® (INCI: aqua, silver (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-22-4, roztwór koloidalny srebra w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Srebro metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 5 – 50 μS.
Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.
2. Eter dimetylowy izosorbidu, DMI (INCI: Dimethyl Isosorbide), CAS: 5306-85-4, postać płynna stężenie 100%.
Producent: Salicyles and Chemicals.
3. 4-Hydroksyacetofenon, HA, (INCI: Hydroxyacetophenone), CAS: 99-93-4, postać stała, kryształy, białe, stężenie 100%.
Producent: Aromat Vertex.
4. Dimetylosulfotlenek (INCI: dimethyl sulfoxide, DMSO), CAS: 67-68-5 postać płynna.
Producent: Chempur.
5. Polisorbat (INCI: Polysorbate - 80), CAS: 9005-65-6, postać płynna, stężenie 100%.

Producent: Donauchem.

6. Olejek eteryczny z szałwii.

Producent Provital Group.

3.1.1.2. *Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach*

Patogenne szczepy *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacteroides thetaio-*
tomicron, *Peptostreptococcus anaerobicus* wykorzystane w oznaczeniu aktywności mikrobio-
logicznej pochodziły z kolekcji własnej Zakładu Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii,
Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego.

3.1.1.3. *Formulacje użyte do badań i ich przygotowanie*

W celu oceny skuteczności antydrobnoustrojowej wykonano analizę formulacji opisanych
w pkt 2.1.1.3. Są to:

1. Nanosilver aXonnite® (50 ppm) + Hydroksyacetofenon 0,5% + Eter dimetylowy izo-
sorbidu 5%
2. Nanosilver aXonnite® (5 ppm) + Hydroksyacetofenon 0,5% + Eter dimetylowy izo-
sorbidu 5% + DMSO 10%
3. Nanosilver aXonnite® (50 ppm) + 0,5% Hydroksyacetofenon + 5,0% Eter dimetylowy
izosorbidu + 1% Polisorbat-80 - PRÓBA ZEROWA
4. Nanosilver aXonnite® (50 ppm) + 0,5% Hydroksyacetofenon + 5,0% Eter dimetylowy
izosorbidu + 1% Polisorbat-80 + 0,5% olejku z szałwii

Formulacje przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt 1.1.3.1.

3.1.2. Wykonanie oznaczenia

Oznaczenie aktywności oraz wyznaczenie wartości MIC badanych formulacji przeprowa-
dzono metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym, zgodnie ze standardową procedurą
opisaną w pkt 1.1.4. oraz dyfuzyjno-krażkową zgodnie z pkt 2.1.2. Uzyskane rezultaty przed-
stawiono w tabeli 30-34.

Tabela 30. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym wobec *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacteroides thetaiotomicron*, *Peptostreptococcus anaerobicus*.

FORMULACJA	MIC µg/ml (ppm)			
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bacteroides thetaiotomicron</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobicus</i>
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	25	25	12,5	12,5
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 10% Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	25	25	> 50	12,5
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	25	25	12,5	12,5
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z szalwii (0,5%)	25	25	12,5	12,5

Tabela 31. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Streptococcus pyogenes*.

FORMULACJA	<i>Streptococcus pyogenes</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetonfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 1-1,5 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 10% Hydroksyacetonfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 1-1,51 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetonfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetonfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z szałwii (0,5%)	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Tabela 32. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Lactobacillus acidophilus*.

FORMULACJA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 1-1,5 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 10% Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	H 1-1,51 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z szalwii (0,5%)	H <1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Tabela 33. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą dyfuzyjno-krążkową wobec *Bacteroides thetaiotomicron*.

FORMULACJA	<i>Bacteroides thetaiotomicron</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	przejaśnienie	przejaśnienie	przejaśnienie	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 10% Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	przejaśnienie	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetofenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z szałwii (0,5%)	przejaśnienie	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm

Tabela 34. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec *Peptostreptococcus anaerobicus*.

FORMULACJA	<i>Peptostreptococcus anaerobicus</i>				
	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm	3 ppm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetyfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) DMSO 10% Hydroksyacetyfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%)	przejaśnienie	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetyfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) PRÓBA ZEROWA	przejaśnienie	przejaśnienie	przejaśnienie	przejaśnienie	0 mm
Nanosilver aXonnite® (50 ppm) Hydroksyacetyfenon (0,5%) Eter dimetylowy izosorbidu (5%) Polisorbat-80 (1%) Olejek z szałwii (0,5%)	przejaśnienie	przejaśnienie	przejaśnienie	przejaśnienie	0 mm

3.1.3. Omówienie wyników

Uzyskane wyniki, wykonane metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym oraz dyfuzyjno-krażkową potwierdziły wysoką skuteczność antybakteryjną wybranych formułacji, wobec drobnoustrojów.

Wartości MIC badanych formułacji wahały się od 1 do 12,5 µg/ml (w większości 1,56–6,26 µg/ml) dla szczepów *Escherichia coli*,

Wobec bakterii wartość MIC dla badanych preparatów wahała się od 1 do 12,5 µg/ml (w większości 1,56–6,26 µg/ml) wobec *Staphylococcus aureus* wartość MIC dla badanych preparatów wahała się od 1 do 6,25 µg/ml (w większości 1,56–3,125 µg/ml) wobec *Candida albicans* wartość MIC dla badanych preparatów wahała się od 1 do 12,5 µg/ml (w większości 3,125-6,25 µg/ml).

Analiza skuteczności bakteriobójczej (MBC) badanych preparatów metodą dyfuzyjno-krażkową wykazała zahamowanie strefy wzrostu bakterii średnio o 1-3 mm poza obręb krążka.

4. Określanie minimalnego stężenia hamującego rozwój biofilmu dla badanych formułacji

Biofilm to złożone struktury zbudowane z wielu komórek drobnoustrojów, zawieszonych w warstwie substancji organicznych i nieorganicznych pochodzenia bakteryjnego, otoczone warstwą polisacharydową chroniącą je przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi, w tym działaniem antybiotyków i innych substancji mikrobiologicznie aktywnych. Otoczka ta skutecznie więc blokuje dostęp środków zwalczających infekcje, przez co występujące w nim mikroorganizmy są odporniejsze na działanie chemioterapeutyków. Tworzy się on najczęściej na powierzchni żywych komórek, ale bakterie formujące biofilm mogą kolonizować także powierzchnie nieożywione, nasilając problem zakażeń wywołanych przez zainfekowane drobnoustrojami wyroby medyczne stosowane do ciała pacjenta. Dotyczy to więc także protez zębowych, implantów i aparatów ortodontycznych, których zasiedlanie bakteriami tworzącymi biofilm powoduje infekcje w obrębie nosogardzieli.

4.1. Wyznaczenie aktywności badanych formułacji

Minimalne stężenie hamujące rozwój biofilmu (ang. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*, MBIC) określa najmniejsze stężenie produktu antydrobnoustrojowego oznaczone w warunkach *in vitro* wobec biofilmów, w których obserwuje się przeżywalność 0,1% populacji w stosunku do próby kontrolnej niepoddanej działaniu substancji mikrobiologicznie aktywnej²²². Badanie to polega na hodowaniu biofilmu na odpowiedniej powierzchni a następnie testowaniu różnych stężeń substancji mikrobiologicznie aktywnej w celu określenia najniższego stężenia, które jest skuteczne w jego eliminacji. W przeprowadzonym w pracy eksperymencie poddano ocenie skuteczność AgNPs oraz AuNPs w zwalczaniu drobnoustrojów odpowiedzialnych za powstawanie biofilmu.

4.1.1. Materiały wykorzystane w badaniach

4.1.1.1. Substancje chemiczne stosowane w badaniach

1. Nanosilver aXonnite® (INCI: aqua, silver (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-22-4, roztwór koloidalny srebra w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Srebro metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 5 – 50 μS.

Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.

2. Nanogold aXonnite® (INCI: aqua, gold (nano), CAS: 7732-18-5, 7440-57-5, roztwór koloidalny złota w wodzie o stężeniu 100 ppm, czyli 100 mg/l wody. Złoto metaliczne Ag₄N uzyskane w formie prętów o czystości 99,99% rozdrobnione metodą ablacji laserowej na cząstki wielkości 2-8 nm (90%), o kształcie sferycznym do owalnego, pH - 6,5 +/- 1, Przewodność właściwa 2 – 50 μS.

Producent: Nano-tech Polska Sp z o.o. Sp.K.

4.1.1.2. Materiały mikrobiologiczne stosowane w badaniach

Badania wykonano na Uniwersytecie Warszawskim w Zakładzie Genetyki Bakterii, wykorzystując 48 wzorcowych szczepów drobnoustrojów występujących potencjalnie w biofilmie u człowieka.

4.1.1.3. Formułacje użyte do badań i ich przygotowanie

W badaniu wykorzystano mieszaniny suspensji wodnych Silver aXonnite® i Gold aXonnite® w stężeniu wyjściowym 50 ppm.

4.1.2. Wykonanie oznaczenia

Zawiesiny cząstek Silver aXonnite® i Gold aXonnite® w wodzie o stężeniu 50 ppm inkubowano w drobnoustrojami odpowiedzialnymi za powstawanie biofilmu, określając minimalne stężenie, które jest skuteczne w hamowaniu wzrostu i tworzenia się biofilmu bakteryjnego. Badanie wykonano wg standardowych procedur mikrobiologicznych w Zakładzie Genetyki Bakterii Uniwersytetu Warszawskiego. Wyniki badań zebrano w tabeli 35 i 36.

Tabela 35. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej (MBIC) Nanosilver aXonnite® i Nanogold aXonnite® wobec wybranych, wzorcowych szczepów bakteryjnych występujących w biofilmie.

SZCZEPY BAKTERYJNE	MBIC (µg/ml)	
	Nanosilver aXonnite®	Nanogold aXonnite®
<i>Bacillus subtilis</i> PCM2021	4	>32
<i>Bacillus pumilus</i> 8241 IM UW	4	>32
<i>Bacteroides fragilis</i> PCM 2819	>32	>32
<i>Bacteroides ovatum</i> PCM2820	32	>32
<i>Bacteroides Thetaiomicon</i> DSM 2079	32	>32
<i>Cronobacter sakazakii</i> IMUW	6	>32
<i>Enterobacter aerogenes</i> PCM 1836	4	>32
<i>Enterobacter cloaceae</i> PCM 533	4	>32
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	5	>32
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC14506	5	>32
<i>Enterococcus faecium</i> 27270	5	>32
<i>Escherichia coli</i> PCM 439	4	>32
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	4	>32
<i>Escherichia coli</i> ATTC 9637	4	>32
<i>Escherichia coli</i> MC 1061	4	>32
<i>Fusobacterium nucleatum</i> DSM 15643	32	>32
<i>Hacmophilus influenzae</i> IM	8	>32
<i>Klebsiella oxytoca</i> IM UW	4	>32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCM 1	4	>32
<i>Lactobacillus acidophilus</i> PCM 2499	6	>32
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4395	2	>32
<i>Lactobacillus brevis</i> PCM 488	16	>32
<i>Lactobacillus paracasei</i> PCM 2639	8	>32
<i>Lactobacillus plantarum</i> IM UW	6	>32
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	1	>32
<i>Listeria monocytogenes</i> PCM 2191	8	>32
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD IM UW	8	>32

Tabela 35. cd.

SZCZEPY BAKTERYJNE	MBIC (µg/ml)	
	Nanosilver aXonnite®	Nanogold aXonnite®
<i>Porphythomonas gingivalis</i> DSM 20706	32	32
<i>Prevotella intermedia</i> DSM 20706	32	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PCM 439	1	>32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1161	1	32
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> DSM 20357	16	>32
<i>Salmonella enterica</i> s. <i>Typhimurium</i> TT 622	6	>32
<i>Serratia marcescens</i> PCM 549	4	>32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	8	>32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 250123	8	>32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	4	>32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8	>32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	4	>32
<i>Staphylococcus mutans</i> PCM 2502	6	>32
<i>Staphylococcus</i> ATCC 35668	6	>32
<i>Staphylococcus pneumoniae</i> PCM 2389	8	>32
<i>Staphylococcus pyogenes</i> PCM 917	8	>32
<i>Staphylococcus oralis</i> ATCC 6249	16	>32
<i>Staphylococcus synguinis</i> PCM 2335	8	>32
<i>Staphylococcus synguinis</i> ATCC 10556	8	>32
<i>Tannerella forsythia</i> DSM 102835	>32	>32
<i>Yersinia enterocolitica</i> PCM 2081	4	>32

Tabela 36. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej (MBIC) Nanosilver aXonnite® i Nanogold aXonnite® wobec wybranych, wzorcowych szczepów grzybów występujących w biofilmie.

SZCZEPY GRZYBÓW	MBIC (µg/ml)	
	AgNPs	AuNPs
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	2	>32
<i>Candida parapsilosis</i> wt IM UW	6	>32
<i>Candida glabrata</i> PCM 2703-FY	4	>32
<i>Candida krusei</i> PCM 2706-FY	4	32
<i>Candida tropicalis</i> PCM 2709-FY	2	32

4.1.3. Omówienie wyników

Uzyskane rezultaty wskazują na wysoką skuteczność Nanosilver aXonnite® i Nanogold aXonnite® wobec wybranych, typowych szczepów bakterii i grzybów występujących w biofilmie, choć zdecydowanie silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wykazywało Nanosilver aXonnite®. Nie obserwowano także również różnic aktywności w przypadku bakterii Gram-ujemnych czy Gram-dodatnich.

Nanogold aXonnite® wykazywał niższą, ale podobną skuteczność w stosunku do wszystkich badanych szczepów zarówno bakteryjnych, jak i grzybów.

IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przedmiotem pracy było przygotowanie formułacji prototypowych do zastosowań w infekcjach bakteryjnych nosogardzieli opartych na układach mieszanin roztworów koloidalnych nanometali złota i srebra oraz ich zbadanie pod kontem aktywności mikrobiologicznej wobec szczepów patogennych. W tym celu przygotowano szereg receptur zawierających różne stężenie nanometali. Wstępne badania przeprowadzone w laboratorium mikrobiologicznym na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi wskazały wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową na szczepach zarówno Gram (+) jak i Gram (-). Do badań wybrano typowe bakterie kolonizujące błony śluzowe nosa, jamy ustnej, zarówno tlenowe jak również beztlenowe.

Badania na tak szeroką skalę nie były jak dotąd przeprowadzane. W pierwszej kolejności zaplanowanych eksperymentów zostały stworzone mieszaniny zawierające różne stężenia cząstek nanometali srebra (AgNPs) i złota (AuNPs), które to poddano badaniom mikrobiologicznym w celu wyznaczenia wartości MIC metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym. W badaniu wykorzystano również mieszaniny nanometali aXonnite® w połączeniu z substancjami tzw. promotorami przenikania, które wspierają penetrację nanometali przez błony biologiczne. Eksperymenty te miały na celu zbadanie czy wspieranie transportu nanometali jest uzasadnione i zwiększa skuteczność antybakteryjną srebra i złota. Eksperymenty potwierdziły synergiczne działanie promotorów przenikania z nanocząstkami i pozwoliły określić, która mieszanina jest najefektywniejsza w stosunku do badanych szczepów (pkt 1.1.5). W badaniu również wykazano, iż nanocząsteczkowe srebro jest zdecydowanie silniejszą substancją antymikrobową niż złoto, dodatek złota nie wpływa znacząco na zwiększenie efektu antybakteryjnego. W związku z tym w dalszych eksperymentach skupiono się na stworzeniu formułacji wspierających leczenie infekcji nosogardzieli, ale opartych tylko na jednym metalu - srebrze AgNPs. Przeprowadzona analiza potwierdza wcześniejsze wstępne badania, w których to największą aktywność wykazuje nanometal srebra AgNPS z dodatkiem promotorów przejścia takich jak DMSO czy alkohol alifatyczny. W badaniu zaobserwowano bardzo dobrą aktywność srebra nanocząsteczkowego zarówno na bakterie Gram-ujemne jak i Gram-dodatnie oraz drożdżaki, jednakże największa aktywność przy stężeniu już 2,5 ppm zauważono w stosunku do szczepów *Escherichia coli* – przedstawicieli bakterii Gram-ujemnych.

W kolejnym etapie badawczym stworzono prootypy formuł gdzie do mieszanin nanosrebra z promotorami przenikania dołączono przetwory roślinne (ekstrakty, olejki), znane ze swojego działania wspierającego leczenie infekcji. Uzyskanie jednorodnej i klarownej mieszaniny wymagało dodania solubilizatora wspierającego rozpuszczanie substancji nie mieszających się z wodą do formuł prototypu. Kolejnym etapem modyfikacji formuły do zastosowań we wspomaganiu leczenia infekcji nosogardzieli był dodatek substancji łagodzących podrażnioną śluzówkę czyli pantenolu lub laktoferyny. Przedmiotem zaplanowanych eksperymentów było sprawdzenie czy dodatki te nie będą miały negatywnego wpływu na aktywność nanosrebra i czy nie zahamują działania antybakteryjnego formuacji. W badaniu tym potwierdzono brak znaczącego wpływu dodatków na aktywność antymikrobową srebra aXonnite®. Wykonano również modyfikację konsystencji formuacji poprzez dodatek typowych zagęstników polimerowych (glikol polietylenowy, silikon lub karbomer) oraz formułę lekkiej emulsji (mleczka). Badania aktywności nanocząstek potwierdziły, iż dodatek substancji modyfikujących konsystencję obniża aktywność antymikrobową nanometali.

W kolejnych zaplanowanych eksperymentach badawczych wykonano badanie określające wartości MIC metodą dyfuzyjno-krażkową (pkt. 2). Badanie to miało na celu określenie promienia strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów w badanych formuacjach oraz zbadanie wpływu na aktywność antybakteryjną dodatków takich jak promotory transportu przez błony biologiczne, przetwory roślinne i substancje łagodzące.

Uzyskane wyniki, wykonane metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym oraz dyfuzyjno-krażkową potwierdziły wysoką skuteczność antybakteryjną wybranych formuacji, wobec drobnoustrojów mikroaerofilnych oraz beztlenowych kolonizujących nosogardziel.

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

Ostatnim elementem badań były testy wyznaczające wartość stężenia hamującego wzrost biofilmu (MBIC) wykonane na czystych preparatach dla nanosrebra i nanozłota aXonnite®. Badania potwierdziły wysoką skuteczność nanosrebra aXonnite® w stosunku do badanych szczepów tworzących biofilm.

Podsumowując wyżej opisane badania stwierdzono, iż uzyskane wyniki, wykonane metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym oraz metodą dyfuzyjno-krażkową potwierdziły wysoką skuteczność antybakteryjną wybranych formuacji, wobec drobnoustrojów mikroaerofilnych oraz beztlenowych. Uzyskane podczas realizacji doktoratu wyniki badanych formuacji opartych na nanometalach wykazały silne działanie bakterio- i grzybobójcze oraz

antybiofilmowe nanocząstek aXonnite®, zwłaszcza nanosrebra. Wartości MBIC były nieznacznie wyższe niż wyznaczone wartości MIC. Najsilniejsze działanie obserwowano dla nanocząstek srebra wobec bakterii tlenowych nieco słabsze wobec badanych bakterii mikroaerofilnych oraz beztlenowych. Bakterie te z klinicznego punktu widzenia są odpowiedzialne za wiele infekcji i powikłań w obrębie nosogardzieli a także groźnych infekcji w obrębie przyzębia, ogólnie jamy ustnej i błony śluzowej. Badania, w których udowodniono bardzo intensywne działanie antibakteryjne przy stężeniu w roztworze nanosrebra AgNPs na przeciętnym poziomie 0,001- 0,005% jest bardzo ważnym elementem walki z rosnącą lekoopornością. Wysoka skuteczność bakteriobójcza badanych nanocząstek srebra umożliwia ich zastosowanie w terapiach trudnych zakażeń. W porównaniu z klasycznie stosowanymi antybiotykami, które działają na bakterie w stężeniach 10-cio a nawet 100-u krotnie wyższych, na podstawie dotychczas wykonanych badań, można stwierdzić, że potencjał antibakteryjny nanocząstek aXonnite® jest bardzo wysoki.

Najsilniejsze działanie antibakteryjne, antygrzybiczne i przeciwbiofilmowe, jak już wspomniano, wykazywały nanocząstki srebra, które to silne działanie bójcze wykazywały w bardzo niskich stężeniach wobec wolnożyjących bakterii tlenowych, mikroaerofilnych oraz grzybów. Nieznacznie słabszą aktywność wykazywały one wobec badanych bakterii beztlenowych, jednak ich skuteczność antybiofilmowa była wobec nich równie wysoka jak w stosunku do pozostałych badanych mikroorganizmów. Dodatkowe substancje hydroksyacetonfenon oraz izosorbiniian dimetylu zastosowane w badanej mieszance ułatwiły dostępność i migrację w gęstych mieszaninach oraz w stałych podłożach mikrobiologicznych co zostało potwierdzone badaniami. Najsukuteczniejsze działanie wykazują mieszaniny z zawartością DMSO jako promotora przejścia przez błony biologiczne, jednakże użycie go pomimo wysokiej skuteczności obciążone jest ryzykiem. Dimetylosulfotlenek jest substancją dość niestabilną, ulega szybko utlenieniu przy złym przechowywaniu co skutkuje nieprzyjemną wonią czosnku, w przypadku preparatów do nosogardzieli nie jest to porządany efekt. Dlatego do badań zostały włączone również inne promotory przenikania, aby efekt ich działania porównać między innymi z DMSO. Analiza skuteczności bakterio- i grzybobójczej wykazała wysoką skuteczność mieszanin nanocząstek wzbogaconych o wspomniane związki (gliceryna, izosorbiniian dimetylu, hydroksyacetonfenon). Wobec *Escherichia coli* wartość MIC dla badanych preparatów wahała się od 1 do 12,5 µg/ml (w większości 1,56–6,26 µg/ml) wobec *Staphylococcus aureus* wartość MIC dla badanych preparatów wahała się od 1 do 6,25 µg/ml (w większości 1,56–3,125 µg/ml) wobec *Candida albicans* wartość MIC dla badanych preparatów wahała się od 1 do 12,5 µg/ml (w większości 3,125–6,25 µg/ml). Analiza skuteczności bakteriobójczej badanych preparatów

metodą dyfuzyjno-krażkową wykazała zahamowanie strefy wzrostu bakterii średnio o 1-3 mm a w niektórych przypadkach nawet 4-5 mm (srebro i DMSO 50%) poza obręb krążka wynik ten bezpośrednio potwierdza zwiększoną migrację cząstek w środowiskach o większej gęstości, czyste preparaty nanocząstek nie penetrowały poza obręb krążka nimi nasączonego. Działanie takie jest związane ze wsparciem transportu niemobilnych nanocząstek przez chemiczne promotory przenikania

Efektom badań jest opracowanie produktowe na bazie nanocząstek aXonnite®, o wysokiej skuteczności antybakteryjnej oraz antygrzybiczej wobec bakterii i grzybów kolonizujących błony śluzowe, dodatkowo posiadająca wysoki potencjał hamujący tworzenie struktury biofilmów. Stworzone mieszaniny zawierały nanocząstki srebra w stężeniu wyjściowym 50 ppm do stosowania rekomendowane jest stężenie 3-25 ppm w których zachowują one silne właściwości biobójcze. Do zastosowania zarekomendowano następujące składy mieszanin:

- (1) Ag (50ppm) + Hydroksyacetofenon 0,5% + Dimethyl Isosorbide 5%
- (2) Ag (50ppm) + Hydroksyacetofenon 0,5% + Dimethyl Isosorbide 5% + DMSO 10%
- (3) Ag (50 ppm) + 0,5% Hydroxyacetophenone + 5,0% Dimethyl Isosorbide + 1% Polysorbate-80 (*próba wyjściowa*)

Stanowią one bazę, która może być wzbogacana o dodatkowe substancje o działaniu łagodzącym i nawilżającym jak np laktoferyna, pantenol, oraz ekstrakt roślinne wykazujące działanie synergiczne do cząstek srebra. Zastosowane substancje wspierające to ekstrakt z porostu islandzkiego, olejek z drzewa herbacianego, olejek eukaliptusowy, olejek z oregano, olejek z szalwii oraz olejek z tymianku które nadają mieszaninie dodatkowych właściwości poprawiających odczucia podczas aplikacji. Do roztworu powinien być dodawany wówczas solubilizator w postaci polisorbatu. Po uzupełnieniu dodatkowymi substancjami nanocząstki srebra aXonnite® zachowują nadal wysoką skuteczności i stabilność.

Preparaty na bazie nanocząstek srebra aXonnite® wspomagają proces leczniczy, ale również są doskonałymi preparatami profilaktycznymi. Końcowe mieszaniny zawierające AgNPs (50 ppm) we wszystkich analizowanych wariantach przeszły pozytywne testy, wykonane w Zakładzie Genetyki Bakterii UW, potwierdzające ich skuteczność antybakteryjną i przeciwgrzybiczą dzięki wyznaczeniu minimalnych stężeń hamujących wzrost bakterii i grzybów.

W badaniach wykazano wysoką skuteczność antybakteryjną, antygrzybiczą i przeciw biofilmową nanocząstek wytwarzanych w technologii aXonnite®. Nanocząstki metali, takie jak srebro i złoto, wykazują silne właściwości antybakteryjne i są skuteczne w walce z infekcjami wywołanymi przez patogeny bakteryjne, takie jak *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.

W celu skutecznego leczenia infekcji gardła i nosa, konieczne jest, aby nanocząstki metali były dostarczone do odpowiednich miejsc w organizmie, co może wymagać wsparcia transportu przez błony biologiczne. Zwiększając skuteczność działania zastosowano w formulacjach substancje zwiększające penetrację przez błony biologiczne, takie jak alkohole alifatyczne i wieloworotlenowe a także przykładowe substancje naturalne zaliczane do roślin wspierających działanie przeciw infekcyjne jak zielona herbata, imbir, tymianek czy olejek eukaliptusowy. Dodatkowo substancje te mogą poprawić stabilność nanocząstek metali, zapobiec ich aglomeracji i ułatwić ich transport przez błony biologiczne, zwiększając tym samym ich skuteczność. Wybrane substancje zarówno promujące transport przez nabłonkowy jak i ekstrakty roślinne wykazały działanie synergiczne co zdecydowanie przyspieszało proces niwelowania patogenów ze środowiska.

Nanocząstki srebra wykazują silne właściwości antybakteryjne co czyni je skutecznym narzędziem w walce z infekcjami gardła i nosa wywołanymi przez patogeny bakteryjne. Trudność w leczeniu infekcji bakteryjnych stwarza wytworzony biofilm bakteryjny tworzonych przez patogeny gardła i nosa, takie jak *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Nanocząstki metali ze względu na ich małe rozmiary mają możliwość wnikania w struktury biofilmu i niszczenie rozwijających patogenów.

Nanocząstki metali mogą działać szybciej niż tradycyjne antybiotyki, co umożliwia szybsze złagodzenie objawów infekcji i skrócenie czasu potrzebnego do pełnego wyleczenia.

Badania wykazały, iż stworzone formulacje wykazały nieznacznie większą skuteczność w stosunku do bakterii Gram ujemnych (-). Bakterie takie charakteryzują się dodatkową błoną komórkową i zmniejszoną ogólną objętością ściany komórkowej w stosunku do bakterii Gram dodatnich (+). Skuteczność i absorpcja nanometali na ścianie komórkowej związana jest z obecności peptydoglikanu – mureiny, która to wiąże nanometale i wspiera ich „zagłębianie w ścianie komórkowej bakterii, większa przestrzeń ściany komórkowej to większa ilość cząsteczek mureiny i silniejsze oddziaływanie z nanometaliami. W badaniach wykorzystanie substancji wspierających przenikanie przez błonę komórkową i mniejsza ogólna grubość ściany komórkowej wpłynęły na dobre parametry biobójczości w stosunku do bakterii Gram- ujemnych .

V. STRESZCZENIE

1. Wersja Polska

W części teoretycznej pracy zawarto podstawowe informacje związane z powstawaniem stanów zapalnych nosogardzieli, w tym szczepy najczęściej występujące w tych schorzeniach. Przedstawiono również problemy w zwalczaniu infekcji nosogardzieli takie jak słaba dostępność substancji bakteriobójczych w przypadku powstania kolonii bakterii w wytworzonym biofilmie. Ze względu na trudności ze wciąż rosnącą lekoopornością poszukiwanie nowych możliwości stosowania skutecznych terapii jest jednym z ważniejszych elementów zapewnienia bezpiecznego leczenia pacjentów.

Dane literaturowe potwierdzają wysoka skuteczność bakteriobójcza srebra i nanosrebra co daje szansę w leczeniu nie tylko infekcji nosogardzieli, ale również możliwości w terapiach trudnych zakażeń. Nanosrebro, czyli koloidalne srebro w postaci nanocząstek, jest stosowane jako naturalny antybiotyk i antyseptyk. Działa na wiele patogenów, w tym na bakterie, wirusy i grzyby, może pomóc w zwalczaniu infekcji nosa i gardła. Nanosrebro, czyli koloidalne srebro w postaci nanocząstek, jest stosowane jako naturalny antybiotyk i antyseptyk. Działa na wiele patogenów, w tym na bakterie, wirusy i grzyby, może pomóc w zwalczaniu infekcji między innymi nosa i gardła. Nanocząstki metali mają znaczący wpływ na rozwój nowych terapii antybakteryjnych, ponieważ patogeny nie wykazują oporności na ten rodzaj substancji, w przeciwieństwie do tradycyjnych antybiotyków. Należy jednak zauważyć, że skuteczność nanosrebra może być zależna od wielu czynników, takich jak rozmiar cząstek, koncentracja, czas ekspozycji oraz sposób przygotowania i zastosowania produktu zawierającego nanosrebro. Ponadto, niektóre szczepy bakterii mogą wykazywać różną wrażliwość na nanosrebro, co oznacza, że nie wszystkie bakterie będą równie podatne na jego działanie.

Nanosrebro wykazuje skuteczność przeciwko różnym szczepom bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, jednak skuteczność może się różnić w zależności od konkretnego szczepu bakterii oraz warunków testowych. Nanometale hamują wzrost bakterii poprzez uszkodzenie błony komórkowej, hamowanie metabolizmu w tym zaburzenie procesów łańcucha oddechowego lub interferowanie z procesami replikacji DNA.

W dalszej części pracy scharakteryzowano planowane nanometale srebra (pkt. 2.1.1) i złota (pkt. 2.1.2) opisano ich mechanizm działania wykorzystanie w medycynie oraz bezpieczeństwo stosowania. Ponieważ w terapii stanów zapalnych nosogardzieli od dawna stosowane były surowce i przetwory roślinne, opisano właściwości i zastosowanie takich surowców jak: babka lancetowata, brzoza brodawkowata, olejek drzewa herbacianego, kłącze imbiru, tymianek, porost islandzki, olejek eukaliptusowy, olejek szalwiowy oraz oregano.

Preparaty stosowane w infekcjach nosogardzieli na bazie nanometali i ziół mogą zawierać kombinację składników aktywnych, które pomagają walczyć z infekcjami bakteryjnymi i łagodzą objawy zapalne gardła i nosa. Preparaty takie stosowane w formie wodno-rozcieńczalnych kropli do nosa lub płukanek do gardła, korzystnie wpływają na zmniejszenie stanów zapalnych. Zioła takie jak eukaliptus, imbir, zielona herbata wykazują najsilniejsze działanie przeciwzapalne i przeciwbakteryjne, co może pomóc w łagodzeniu objawów infekcji.

Następnie scharakteryzowano wykorzystane promotorów przenikania przez błony biologiczne takie jak: eter dimetylowi izosorbidu (pkt. 3.1), 4-hydroksyaceton (pkt.3.2), dimetylosulfotlenek (pkt. 3.3), glikol kaprylowy (pkt. 3.4), etyloheksyloglicerynę (pkt. 3.5), glicerynę (pkt. 3.6), glikol heksylenowy (pkt.3.7). Dla tych substancji podano ich właściwości, informacje toksykologiczne, oraz zastosowanie i działanie. W pracy skupiono się na badaniach wpływu tych substancji na wzrost aktywności antymikrobowej srebra w stosunku do formułacji niezawierających tych substancji. Zastosowanie promotorów transportu przez naskórkowego jak DMSO czy glikol heksylenowy pomagają w dostarczeniu składników aktywnych na miejsce infekcji i zwiększają skuteczność. Badania wykazały najlepsze działanie srebra w połączeniu z dimetylosulfotlenkiem (DMSO), jednakże również zadowalające wyniki otrzymano przy zastosowaniu hydroksyacetonu oraz izosorbiny dimetylu.

W kolejnym rozdziale pracy opisano dwie substancje wykazujące działanie ochronne i łagodzące w stosunku do śluzówki nosa; laktoferynę (pkt. 2.3.1) oraz dekspantenol (pkt. 2.3.2). Dla tych substancji podano ich właściwości, informacje toksykologiczne, oraz zastosowanie i działanie. W pracy oceniono wpływ dodatku do formułacji tych substancji na aktywności antymikrobowej srebra w stosunku do formułacji niezawierających tych substancji. Badania wykazały, iż dodatek tych substancji nie wpłynął na obniżenie aktywności antybakteryjnej, jednakże dodatek substancji wpływających na zmianę konsystencji preparatów takich jak karbomer, silikon czy glikol polietylenowy obniżają aktywność antybakteryjną formułacji (pkt. 1.5.2)

W kolejnych rozdziałach pracy opisano wyniki badań mikrobiologicznych wraz z wyznaczeniem wartości MIC, MBIC oraz badaniu metodą dyfuzyjno-krażkową gdzie potwierdzono, że nanocząstki srebra, wykazują silne właściwości antybakteryjne, co czyni je skutecznym narzędziem do walki z infekcjami wywoływanymi przez patogeny bakteryjne.

Badania wykazały, że nanocząstki srebra mogą hamować wzrost bakterii Gram dodatnich (+) i Gram ujemnych (-) oraz zmniejszać stan zapalny spowodowany przez infekcje bakteryjne gardła i nosa (Rozdz. III)

Srebra aXonnite® (AgNPs) wykazuje działanie antybakteryjne, które może pomóc w zwalczaniu lub hamowaniu wzrostu bakterii w nosogardzieli. Mogą być szczególnie skuteczne w przypadku bakterii opornych na tradycyjne antybiotyki.

W ostatniej części pracy badawczej wykonano oznaczenie skuteczności antybakteryjnej (MBIC) nanosrebra i nanozłota wobec 48 wybranych, wzorcowych szczepów bakteryjnych występujących w biofilmie (pkt. 4.1.2). Uzyskane rezultaty wskazują na wysoką skuteczność nanosrebra aXonnite® i nanozłota aXonnite® wobec wybranych, typowych szczepów bakterii i grzybów występujących w biofilmie, choć zdecydowanie silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wykazywało srebro AgNPs to nie obserwowano znaczących różnic aktywności w przypadku bakterii Gram-ujemnych czy Gram-dodatnich.

Preparaty oparte na nanosrebrze wspierają łagodzeniu stanów zapalnych błony śluzowej nosa, takich jak zapalenie zatok czy przewlekłe zapalenie błony śluzowej nosa.

2. English version

The theoretical part of the paper contains basic information related to the development of inflammatory conditions of the nasopharynx, including the strains most commonly found in these diseases. Problems in the control of nasopharyngeal infections, such as the poor availability of bactericidal substances in the case of the formation of bacterial colonies in the formed biofilm, are also presented. Due to the difficulties associated with increasing drug resistance, the search for new ways of using effective therapies is one of the most important elements in ensuring the safe treatment of patients.

Literature data confirm the high bactericidal efficacy of silver and nanosilver, which offers an opportunity not only in the treatment of nasopharyngeal infections, but also in the treatment

of difficult infections. Nanosilver, or colloidal silver in the form of nanoparticles, is used as a natural antibiotic and antiseptic. It is effective against many pathogens, including bacteria, viruses and fungi, and can help fight nasopharyngeal infections. Nanosilver, or colloidal silver in nanoparticle form, is used as a natural antibiotic and antiseptic. It acts against many pathogens, including bacteria, viruses and fungi, and can help fight infections of the nose and throat, among other things. Metal nanoparticles have a significant impact on the development of new antibacterial therapies, as pathogens do not develop resistance to this type of substance, unlike traditional antibiotics. However, it should be noted that the efficacy of nanosilver may depend on a number of factors, such as particle size, concentration, exposure time, and the way the nanosilver product is prepared and applied. In addition, some bacterial strains may have different sensitivities to nanosilver, meaning that not all bacteria will be equally susceptible to its effects.

Nanosilver has shown efficacy against various strains of gram-positive and gram-negative bacteria, but efficacy may vary depending on the specific bacterial strain and test conditions. Nanometals inhibit bacterial growth by damaging the cell membrane, inhibiting metabolism including disruption of respiratory chain processes, or interfering with DNA replication processes.

In the following part of the paper, the proposed silver (section 2.1.1) and gold (section 2.1.2) nanomaterials are characterized and their mechanism of action, medical use, and safety of use are described. As raw materials and plant preparations have long been used in the treatment of nasopharyngeal inflammation, the properties and use of such raw materials as lanceolate plantain, papillary birch, tea tree oil, imbir rhizome, thyme, Iceland lichen, eucalyptus oil, sage oil, and oregano are described.

Nanometallic and herbal preparations for nasopharyngeal infections may contain a combination of active ingredients that help fight bacterial infections and relieve inflammatory symptoms of the throat and nose. Such preparations, used in the form of water-soluble nasal drops or throat rinses, are beneficial in reducing inflammation. Herbs such as eucalyptus, ginger, and green tea have the strongest anti-inflammatory and antibacterial effects, which can help relieve symptoms of infection.

Next, we have characterized the promoters used for permeation through biological membranes, such as dimethyl isosorbide ether (Section 3.1), 4-hydroxyacetone (Section 3.2), dimethyl sulfoxide (Section 3.3), caprylyl glycol (Section 3.4), ethylhexyl glycerin (Section 3.5), glycerin (Section 3.6), hexylene glycol (Section 3.7). For these substances, their properties, toxicological information, use and effect are given. This paper focuses on the study of the effect

of these substances on increasing the antimicrobial activity of silver compared to formulations without these substances.

The use of transepidermal transport promoters, such as DMSO and hexylene glycol, helps deliver active ingredients to the site of infection and increases efficacy. Studies have shown the best efficacy of silver in combination with dimethyl sulfoxide (DMSO), but satisfactory results have also been obtained with hydroxyacetophenone and dimethyl isosorbate.

The next section of the paper describes two substances that have protective and soothing effects on the nasal mucosa: lactoferrin (section 2.3.1) and dexpanthenol (section 2.3.2). For these substances, their properties, toxicological information and uses, as well as their effects. The study evaluated the effect of adding these substances to formulations on the antimicrobial activity of silver compared to formulations without these substances. The study showed that the addition of these substances did not reduce the antimicrobial activity, but the addition of substances that affect the consistency of formulations, such as carbomer, silicone or polyethylene glycol, reduced the antimicrobial activity of the formulations (Section 1.5.2).

The following sections of the paper describe the results of microbiological tests with the determination of MIC values, MBIC and the diffusion-circulation method test, where it was confirmed that silver nanoparticles have strong antibacterial properties, making them an effective tool against infections caused by bacterial pathogens.

Studies have shown that silver nanoparticles can inhibit the growth of Gram-positive (+) and Gram-negative (-) bacteria and reduce inflammation caused by bacterial infections of the throat and nose (Chapter III).

Silver aXonnite® (AgNPs) have antimicrobial activity that can help fight or inhibit bacterial growth in the nasopharynx. They can be particularly effective against bacteria that have become resistant to traditional antibiotics. In the final part of the research, the antibacterial efficacy (MBIC) of nanosilver and nanogold was determined against 48 selected model bacterial strains present in the biofilm (Section 4.1.2). The results indicate that Xonnite® nanosilver and Xonnite® nanogold are highly effective against selected typical bacterial and fungal strains present in the biofilm, although by far the stronger antimicrobial activity was shown by silver AgNPs, no significant differences in activity were observed for Gram-negative or Gram-positive bacteria.

Preparations based on nanosilver support the relief of inflammation of the nasal mucosa, such as sinusitis and chronic rhinosinusitis.

VI. ZAŁĄCZNIKI

1. Wykaz rycin

Rycina 1.	Przekrój nosogardzieli.	4
Rycina 2.	Kolejne stadia tworzenia biofilmów bakteryjnych ¹⁷	8
Rycina 3.	Działanie nanocząstek srebra na komórkę bakterii ¹⁷	11
Rycina 4.	Wzór strukturalny eteru dimetylowego izosorbidu.	28
Rycina 5.	Wzór strukturalny hydroksyacetofenonu.	30
Rycina 6.	Wzór strukturalny dimetylosulfotlenku.	31
Rycina 7.	Wzór strukturalny glikolu kaprylowego.	32
Rycina 8.	Wzór strukturalny etyloheksylogliceryny.	34
Rycina 9.	Wzór strukturalny gliceryny.	35
Rycina 10.	Wzór strukturalny glikolu heksylowego.	36

2. Wykaz tabel

Tabela 1.	Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739. ...	42
Tabela 2.	Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739. W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych.	43
Tabela 3.	Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.	44
Tabela 4.	Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027. W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych. 45	
Tabela 5.	Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	46
Tabela 6.	Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538. W tabeli podano stężenia składników	

poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych.

47

- Tabela 7. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Candida albicans* ATCC 10231.48
- Tabela 8. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Candida albicans* ATCC 16404. W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych.49
- Tabela 9. Wpływ badanych formułacji na wzrost szczepu *Aspergillus brasiliensis* ATCC1640.....50
- Tabela 10. Wyznaczone wartości MIC i MBC badanych formułacji w stosunku do *Aspergillus brasiliensis* ATCC 10231. W tabeli podano stężenia składników poszczególnych formułacji wyrażonych w ppm albo w stężeniach procentowych.51
- Tabela 11. Aktywności nanocząstek w badanych formułacjach wobec szczepów *Escherichia coli*.....55
- Tabela 12. Aktywności nanocząstek w badanych formułacjach wobec szczepów *Staphylococcus aureus*.....56
- Tabela 13. Aktywności nanocząstek w badanych formułacjach wobec szczepów *Candida albicans*.57
- Tabela 14. Oznaczenie skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji na bazie Nanosilver aXonnite® z wybranymi promotorami przenikania przez błony biologiczne.....58
- Tabela 15. Oznaczenie wartości MIC ($\mu\text{g/ml}$), skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji na bazie Nanosilver aXonnite® z przetworami pochodzenia roślinnego.

61

- Tabela 16. Oznaczenie wartości MIC ($\mu\text{g/ml}$) skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji na bazie Nanosilver aXonnite® z przykładowymi substancjami łagodzącymi.65
- Tabela 17. Oznaczenie wartości MIC ($\mu\text{g/ml}$) skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji na bazie Nanosilver aXonnite® z przykładowymi substancjami łagodzącymi oraz DMSO.....66
- Tabela 18. Aktywności nanocząstek w badanych formułacjach z użyciem dodatków poprawiających konsystencję wobec szczepów *Escherichia coli*.69
- Tabela 19. Aktywności nanocząstek w badanych formułacjach z użyciem substancji poprawiających konsystencję wobec szczepów *Staphylococcus aureus*.70

Tabela 20. Aktywności nanocząstek w badanych formułacjach z użyciem substancji poprawiających konsystencję wobec szczepów <i>Candida albicans</i>	71
Tabela 21. Oznaczenie skuteczności mikrobiologicznej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Escherichii coli</i>	76
Tabela 22. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Escherichii coli</i>	77
Tabela 23. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Escherichii coli</i>	78
Tabela 24. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Staphylococcus aureus</i>	80
Tabela 25. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Staphylococcus aureus</i>	81
Tabela 26. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Staphylococcus aureus</i>	82
Tabela 27. Oznaczenie skuteczności antygrzybiczej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Candida albicans</i>	84
Tabela 28. Oznaczenie skuteczności antygrzybiczej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Candida albicans</i>	85
Tabela 29. Oznaczenie skuteczności antygrzybiczej badanych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Candida albicans</i>	86
Tabela 30. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym wobec <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bacteroides thetaiotomicron</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobicus</i>	91
Tabela 31. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Streptococcus pyogenes</i>	92
Tabela 32. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Lactobacillus acidophilus</i>	93
Tabela 33. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Bacteroides thetaiotomicron</i>	94
Tabela 34. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej wybranych formułacji metodą dyfuzyjno-krażkową wobec <i>Peptostreptococcus anaerobicus</i>	95
Tabela 35. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej (MBIC) Nanosilver aXonnite® i Nanogold aXonnite® wobec wybranych, wzorcowych szczepów bakteryjnych występujących w biofilmie.	99

Tabela 36. Oznaczenie skuteczności antybakteryjnej (MBIC) Nanosilver aXonnite® i Nanogold aXonnite® wobec wybranych, wzorcowych szczepów grzybów występujących w biofilmie.	101
--	-----

VII. PIŚMIENNICTWO

1. Paster B.J., Olsen I., Aas J.A., Dewhirst F.E., „The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites” *Periodontol.* 2000, 2006, 42, 80-87
2. Strużycka I., „Biofilm – współczesne spojrzenie na etiologię próchnicy” *Dent. Forum*, 2010, 38, 73-79.
3. Marsh P.D., Moter A., Devine D.A., „Dental plaque biofilms: communities, conflict and control” *Periodontol.* 2000, 2011, 55, 16-35.
4. He X.S., Shi W.Y., „Oral microbiology: past, present and future” *Int. J. Oral Sci.*, 2009, 1, 47-58.
5. Kowalik K., Krzeski A. „Zapalenie tkanek nosogardzieli” *Mag. ORL*, 2021, 77, XX, 4–14.
6. Drake R.L., Vogl A.W., Mitchell A.W.M., „Gray's Anatomy for Students” 2015, Oxford: Elsevier.
7. Bollinger R. i in. „Biofilms in the large bowel suggest an apparent function of the human vermiform appendix”, *J. Theoretical Biol.* 2007, 4, 826-831.
8. Hrehorów E.; Reich A.; Szepietowski J., „Jakość życia chorych na łuszczycę: zależność od świądu, stresu i objawów depresyjnych” *Clinical Dermatology / Dermatologia Kliniczna*, 2007, 9, 1, 19-23.
9. Romańska-Gocka K. „Terapia i leki Farmakoterapia łuszczycy” 2009, 65, 9.
10. Bronikowska-Kolasa A., Wojnowska D., Borzęcki A., Wdowiak L., Chodorowska G., Urban J., Krochmalska E., „Łuszczycy błony śluzowej jamy ustnej i narządów płciowych”, *Nowa Medycyna* 2006, 1, 6-13.
11. Mahony J.B., Petrich A., Smieja M., „Molecular diagnosis of respiratory virus infections” *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2011, 5, 217-249.
12. Fokkens W.J. i in. „European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps” *Rhinology supplement* 2012, 50, 1-298.
13. Fokkens W.J. i in. „A summary for otorhinolaryngologists”, *Rhinology* 2020, 50, 1, 1-12.
14. [www.forumzdrowia.pl/arttykul/jama-nosowa;504153.html#prettyPhoto\[gallery\]/0/](http://www.forumzdrowia.pl/arttykul/jama-nosowa;504153.html#prettyPhoto[gallery]/0/), dostępne maj 2023r.

15. Passiotti M. i in. „The common cold: Potential for future prevention or cure” *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2014, 2, 413.
16. Nalewajek T., Echolc B., Klekotka R., Ziora D., Czuba Z., Mazur B., „Udział szczepów chorobotwórczych Gram (+) wraz z profilami lekooporności występujących w zakażeniach bakteryjnych u pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Płuc i Gruźlicy w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach” *Ann. Acad. Med. Siles.*, 2018, 72, 273–279.
17. Gromulska M., Zieliński A., Gładysz K., „Structured sanitary preparation to mass gatherings” *Epidemiological Review* 2010, 64, 1-145.
18. Glatthaar-Saalmuller B. i in. „Antiviral activity in vitro of two preparations of the herbal medicinal product Sinupret® against viruses causing respiratory infections” *Phytomedicine* 2011, 1, 1-7.
19. Buname G., Kiwale A.G., Mushi M. F., Silago V., Rambau P., „Bacteria Patterns on Tonsillar Surface and Tonsillar Core Tissue among Patients Scheduled for Tonsillectomy at Bugando Medical Centre” *Pathogens.* 2021,12, 1560.
20. Anderson J., Paterek E., „Tonsillitis” *StatPearls Publishing*: 2023
21. Smith K. L., Hughes R., Myrex P. , „Tonsillitis and Tonsilloliths: Diagnosis and Management“, *American Family Physician* 2023, 107, 34-41.
22. Percival S. L., Malic S., Cruz H., Williams D.W., „Biofilms and veterinary medicine. Springer series on biofilms” *Introduction to biofilms* Springer, Berlin, Heidelberg, 2011, 41-68.
23. Markowska K., "Antybakteryjne działanie nanocząstek srebra – wpływ na strukturę i funkcje komórek bakteryjnych” 2016. Praca doktorska, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii.
24. Mah T.-F.C., O’Toole G.A., „Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents” *Trends Microbiol.*, 2001, 9, 34-9.
25. Balcazar J.L., Subirats J., Borrego C.M., „The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance” *Front. Microbiol.*, 2015, 6, 1-9.
26. Rendueles O., Ghigo J.-M., „Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS” Microbiol. Rev.*, 2012, 36, 972-989.
27. Wolska K.I. i in. „Nanocząstki srebra, synteza i biologiczna aktywność” *Kosmos* 2017, 1, 125–138.

28. Wolny-Koładka K., Sikora A., Malina M., „Ocena toksyczności nanocząstek srebra w stosunku do lekoopornych szczepów *Escherichia coli* izolowanych z odpadów komunalnych” *INFRAECO*, 2018, 1, 1-10.
29. Fayaz A.M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P.T., Venketesan R., „Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria” *Nanomedicine* 2010, 6, 103-109.
30. Silver S., Phung le T., Silver G., „Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds“ *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 7, 627-634.
31. Raj, S., Jose S., „Nanotechnology in Cosmetic: Opportunities and Challenges” *J. Pharm. Bioal. Sci.*, 2012 4, 186-193.
32. Kim K.-J., „Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on Dermatophytes” *J. Micro. Biot.*, 2008, 18, 1482-1484.
33. Kim J.S., et al. „Antimicrobial Effect of Silver Nanoparticles” *J. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, 3, 95-101.
34. Jain J., Arora S., Rajwade J.M., Omray P., Khandelwal S., and Paknikar K.M., „Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use” *Molecular Pharmaceutics*, 2009, 6, 1388-1401.
35. Chai C., „Silver Nanoparticles Help Cure Hard-to-Treat Mouth Infections” *Wiley* 2012.
36. Bansod S.D., Bawaskar M.S., Gade A.K., and Rai M.K., „Development of Shampoo, Soap and Ointment Formulated by Green Synthesised Silver Nanoparticles Functionalised with Antimicrobial Plants Oils in Veterinary” *Dermatology: Treatment and Prevention Strategies. IET-Nanobiotechnology*, 2015, 9, 165-171.
37. Sondi I., Salopek-Sondi B.J., „Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria” *Coll. Int. Sci.* 2004, 275, 177-182.
38. Fresta M., Puglisi G., Giammona G., Cavallaro G., Micali N., Furneri P.M., „Pefloxacin Mesilate- and Ofloxacin-Loaded Polyethylcyanoacrylate Nanoparticles: Characterization of the Colloidal Drug Carrier Formulation” *J. Pharm. Sci.* 1995, 84, 895.
39. Gong P. and co-workers „A Novel Surfactant Nanoemulsion with Broad-Spectrum Sporocidal Activity against *Bacillus* Species” *J. Infect. Dis* 1999, 180, 1939.
40. Gong P., Li H., He X., Wang K., Hu J., Tan W., „Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@ Ag nanoparticles” *Nanotechnology* 2007; 18, 604-611.

41. Chen X., Schluesener H.J., „Nanosilver: a nanoproduct in medical application” *Toxicol. Lett*, 2008, 176, 1-12.
42. Deborah K., Riley M.D., David C., Classen M.S., Lane E., Stevens M.D., John P., Burke „A large randomized clinical trial of a silver-impregnated urinary catheter: Lack of efficacy and staphylococcal superinfection” *Am. J. Med.* 1995, 98, 349-356.
43. Everaert E.P.J.M., Van de Belt-Gritter B., Van Der Mei H.C., Busscher H.J., Verkerke G.J., Dijk F., Mahieu H.F., „In vitro and in vivo microbial adhesion and growth on argon plasma-treated silicone rubber voice prostheses” *J. Mat. Sci-Mat in Med.* 1998, 9, 147-157.
44. Furno F., „Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?” *J. Antimicrob. Chemother* 2004, 54, 1019-1024.
45. Liao S., Furr Jr., Russell A.D., „Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions” *Lett. Appl. Microbiol.* 1997, 4, 279-283.
46. Buehler M.J., „Molecular nanomechanics of nascent bone: fibrillar toughening by mineralization” *Nanotechnology* 2007, 18, 225.
47. Esteban-Tejeda L., Malpartida F., Esteban-Cubillo A., Pecharrómán C., Moy J.S., „The antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing silver nanoparticles” *Nanotechnology* 2009, 20, 85-102.
48. Dos Santos C.A., Seckler M.M., Rai M., „Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety” *J. Pharm. Sci* 2014, 6, 1931-1944
49. Jun Sung Kim DVM „, Antimicrobial effects of silver nanoparticles” *Nanomed: Nanotechnol. Biol. Med* 2007, 3, 95-101.
50. Feng Q.L., „A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*” *J. Biomed. Mater.* 2000,4, 662-668.
51. Sondi A., Salopek-Sondi B.J., „Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria” *Colloid. Interface* 2007, 275, 177-182.
52. *Nanotechnology* 2005,16, 2346-2353.
53. Song H.Y., „Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms” *Eur. Cells Mater* 2006, 11, 58-65
54. Raimondi F., „Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis” *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 2190-2209.

55. Pal S., „Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*” *Appl. Environ Microbiol* 2007, 6, 1712-1720.
56. Zhang M., Zhang K., De Gusseme B., Verstraete W., Field R., „The antibacterial and anti-biofouling performance of biogenic silver nanoparticles by *Lactobacillus fermentum*” 2014, 3, 347–357.
57. Franci G., Falanga A., Galdiero S., Galdiero M., „Silver nanoparticles as potential antibacterial agents” *Molecules* 2015, 5, 8856–8874
58. Jaya J., Sumit A., „Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use” *Mol. Pharm.* 2009, 6, 1388-1401
59. Ashavani K.A., Praveen K.V., Pulickel M., George J., „Nat Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil.” *Mater* 2008, 7, 236-241.
60. Samuel U., „Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter” *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2004, 23, 75-78.
61. Roe D., „Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles” *J. Antimicrob. Chemother*, 2008, 61, 869-876.
62. Chaloupka K., Malam Y., Seifalian M.A., „Nanosilver as a new generation of nanoprod-uct in biomedical applications” *Trends in Biotechnology*, 2010, 11, 580-588.
63. Langauer-Lewowicka H., Pawlas K., „Silver nanoparticles – applications and the impact on health and the environment” *Med Srod.* 2015, 3, 3–11.
64. Silvestri L., Van Saene H.K.F., Milanese M., Gregori D., Gullo A., „Selective decontamination of the digestive tract reduces bacterial bloodstream infection and mortality in critically ill patients. Systematic review of randomized, controlled trials” *J. Hosp. Infect.* 2007, 65, 187-203.
65. Orsi G.B., and co-workers „Hospital-acquired infection surveillance in a neurosurgical intensive care unit” *J. Hosp. Infect.* 2006, 64, 23-29.
66. Lackne P., and co-workers „Efficacy of Silver Nanoparticles-Impregnated External Ven-tricular Drain Catheters in Patients with Acute Occlusive Hydrocephalus” *Neurocrit. Care* 2008, 8, 360-365.
67. Galiano K., and co-workers „Silver segregation and bacterial growth of intraventricular catheters impregnated with silver nanoparticles in cerebrospinal fluid drainages” *Neurol. Res.* 2008, 30, 285-287.

68. Chaloupka K., Malam Y., Seifalian A.M., „Nanosilver as a new generation of nanoprod-
uct in biomedical applications” Trends in biotechnology. 2010, 11, 580-588.
69. Samuel U., Guggenbichler J.P., „Prevention of catheter-related infections: the potential
of a new nano-silver impregnated catheter” Int. J. Antimicrob. Agents 2004, 23, 75-78.
70. Roe D., Karandikar B., Bonn-Savage N., Gibbins B., Roullet B.J., „Antimicrobial surface
functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles” J. Antimicrob. Chemother.
2008, 61, 869-876.
71. Alt V., and co-workers „An in vitro assessment of the antibacterial properties and cyto-
toxicity of nanoparticulate silver bone cement” Biomaterials 2004, 25, 4383-4391.
72. Alt V., „An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nano-
particulate silver bone cement” Biomaterials, 2004, 25, 4383-4391.
73. Jiranek W.A., and co-workers „Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis
in total joint replacement” J. Bone Jt. Surg. Am. 2006, 88, 2487-2500.
74. Durner J., and co-workers „Influence of silver nano-particles on monomer elution from
light-cured composites” Dent Mater. 2011, 37, 631-636.
75. Magalhaes A.P., Rodrigues P., et al. „Nanosilver application in dental cements” Interna-
tional Scholarly Research Notices 2012 (2012). ISRN Nanotechnology, 2012, 7, 1-7.
76. Tan L.-Y., and co-workers „A review of Antimicrobial Fabric Containing Nanostructure
Metal-Based Compound” J. Vinyl Additive Tech. 2017, 1-25.
77. Zhang B., „Large-Area Silver-Coated Silicon Nanowire Arrays for Molecular Sensing
Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy” Adv. Funct. Mater. 2008, 18, 2348–
2355.
78. Shapey S., and co-workers „Activity of a dry mist hydrogen peroxide system against en-
vironmental Clostridium difficile contamination in elderly care wards” J. Hosp. Infect.
2008,62, 149-155.
79. Rai M., Yadav A., Gade A., „Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobals”
Biotechnology Adv. 2009, 27, 76-83.
80. Braydich-Stolle L., „In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline
Stem Cells” ToxicolSci 2005, 88, 412-419.
81. Leaper D. J., „Silver dressings: their role in wound management” Int. Wound J. 2006, 3,
282-294.

82. Chen X., Schluesener H.J., „Nanosilver: A nanoparticle in medical application” *Toxicol. Lett.* 2008, 176, 1-12.
83. Impellitteri C.A., Tolaymat T.M., Scheckel K.G., „The Speciation of Silver Nanoparticles in Antimicrobial Fabric Before and After Exposure to a Hypochlorite/Detergent Solution” *J. Environ. Qual.* 2009, 38, 1528-1530.
84. Reijnder L., „Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles” *J. Cleaner Prod.* 2006, 14, 124-133.
85. Moiemmen N.S., and co-workers „The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: A study of systemic silver absorption” *Burns* 2007, 33, 979-985.
86. Foglia R.P., „Treatment of toxic epidermal necrolysis in a pediatric patient with a nanocrystalline silver dressing” *J. Pediatr. Surg.* 2006, 41, e9-e12.
87. Sibbald R., „Bacteriology, Inflammation, and Healing a Study of Nanocrystalline Silver Dressings in Chronic Venous Leg Ulcers” *Adv. Skin Wound Care* 2007, 20, 549-558.
88. SCENIHR opinion of 12 grudnia 2013.
89. Singh R., Singh N.H., „Medical Applications of Nanoparticles in Biological Imaging, Cell Labeling, Antimicrobial Agents, and Anticancer Nanodrugs” *J. Biomedical Nanotechnology*, 2011, 7, 489-503.
90. Sheree E. Cross and co-workers „Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation” *Skin Pharmacol Physiol* 2007, 20, 148-154.
91. Chueh P.J., and co-workers „The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells” *Toxicol. Lett.* 2008, 179, 130-139.
92. Sung J.H., and co-workers „Lung Function Changes in Sprague-Dawley Rats After Prolonged Inhalation Exposure to Silver Nanoparticles” *Inhal. Toxicol.* 2008, 20, 567-574.
93. Carlson C., and co-workers „Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species” *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 13608-13619.
94. Samberg M.E., Orndorff P.E., Monteiro-Riviere N.A., „Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods” *Nanotoxicology* 2011, 5, 244-253.

95. Kim W.Y., and co-workers „Histological Study of Gender Differences in Accumulation of Silver Nanoparticles in Kidneys of Fischer 344 Rats” *J. Toxicol Environ Health A*, 2009, 72, 1279-1284.
96. Ge L., „Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity” *Int. J. Nanomedicine*. 2014, 9, 2399–2407
97. Asghari S., „Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*” *Journal of Nanobiotechnology* 2012, 10, 1-12.
98. Asare N., and co-workers „Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells.”, *Toxicology* 2012, 27, 65-72.
99. OECD Test guideline 413.
100. Connor E.E., and co-workers „Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity” *Small* 2005, 1, 325-327.
101. Bar-Ilan O., Albrecht R.M., Fako V.E., Furgeson D.Y., „ Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos” *Small* 2009, 5, 1897-1910.
102. Lasagna-Reeves C., and co-workers „Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice” *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393, 649-655.
103. Merchant B., „Gold, the noble metal and the paradoxes of its toxicology” *Biologicals* 1998, 26, 49-59.
104. Balcer E., Mazur M., „Nanocząstki złota w diagnostyce i terapii nowotworów – wybrane zastosowania” *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2020, 1, 1-9.
105. Pitak-Arnnop P., and co-workers „Gold for Facial Skin Care: Fact or Fiction?” *Aesthetic Plastic Surgery* 2011, 35, 1184-1188.
106. Złoto koloidalne w medycynie i kosmetologii, Borucka Natalia, Praca magisterska 2013, Wydział Farmaceutyczny UJ.
107. Rothan H.A., „The FDA-approved gold drug auranofin inhibits novel coronavirus (SARS-COV-2) replication and attenuates inflammation in human cells” *Virology*, 2020, 8, 547, 7-11.
108. Remaliah N., and co-workers „Multifunctional Gold Nanoparticles for Improved Diagnostic and Therapeutic Applications: A Review” *Nanoscale Research Letters* 2021, 16, 174, 1-27.

109. Hostetler M.J., „Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size” *Langmuir* 1998, 14, 17-30.
110. Gibson J. D., Khanal B.P., Zubarev E.R., „Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles” *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 11653-11661.
111. Hainfeld J.F., Slatkin D.N., Focella T.M., Smilowitz H.M., „Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent” *British Journal of Radiology* 2006, 79, 248-253.
112. Kim C.K., and co-workers „Multimodal drug delivery using gold nanoparticles” *Nanoscale*, 2009, 1, 61–67.
113. Giljohann D.A., and co-workers „Gold Nanoparticles for Biology and Medicine” *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 3280-3294.
114. Cogley C.M., and co-workers „Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications” *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 44–56.
115. Alanazi F.K., Radwan A.A., Alsarra I.A., „Biopharmaceutical applications of nanogol” *Saudi Pharmaceutical J.* 2010, 18, 179-193.
116. Tsoli M., and co-workers „Cellular Uptake and Toxicity of Au55 Clusters” *Small* 2005, 1, 841-844.
117. Gagosz F., „Recent Developments in Gold Catalysis” *Tetrahedron* 2009, 65, 1758-1766.
118. Wang M., and co-workers „Application of impedance spectroscopy for monitoring colloid Au-enhanced antibody immobilization and antibody–antigen reactions” *Biosensors and Bioelectronics* 2004, 19, 575-582.
119. Caruthers S.D., Wickline S.A., Lanza G.M., „ Nanotechnological applications in medicine” *Curr. Opin. Biotechnol* 2007, 18, 26-30.
120. El-Sayed I.H., Huang X., El-Sayed M.A., „Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles” *Cancer Lett.* 2006, 239, 129-135.
121. Kogan M.J., and co-workers „ Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation” *Nano Lett.* 2006, 6, 110-115.
122. Zharov V.P., „Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles” *Biophys. J.* 2006, 90, 619-627.
123. Sung J.H., and co-workers „ Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles” *Particle and Fibre Toxicology* 2011, 8, 16.

124. Johnston H.J., and co-workers „A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity” *Critical reviews In Toxicology* 2010, 40(4), 328-346.
125. Sonavane G., Tomoda K., Makino K., „Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2008, 66, 274-280.
126. Sonavane G., Tomoda K., Sano A., „In vitro, permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size” *Coll Surf Biointerfaces* 2008, 65, 1-10.
127. Żelazowska R., Pasternak K., „Metale szlachetne: srebro (Ag), złoto (Au), platyna (Pt) w biologii i medycynie” *Bromat. Chem Toksykol.* 2007, 2, 205-209.
128. Kwoka P., Schusterb M., Bochb K., Jacoba P., Gleicha O., Strut J., „Safety of gold in stapes surgery” *Biomaterials* 2005, 26, 7132–7135.
129. Helinor J. J., and co-workers „ A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity” *Critical Reviews in Toxicology* 2010, 40, 328-346.
130. Hirn S., and co-workers „ Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011, 77, 407-416.
131. Villiers C.L., and co-workers „ Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions” *J. Nanopart Res.* 2010, 12, 55-60.
132. Pan Y., and co-workers „Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles” *Small* 2007, 3, 1941-1049.
133. Schmid G., „The relevance of shape and size of Au55 clusters” *Chemical Society Rev.* 2008, 37, 1909-1930.
134. Linklater D.P., Le Guével X., Bryant G., Baulin V.A., Pereiro E., Perera P.G.T., Wandiyanto J.V., Juodkasis S., Ivanova E.P., „Lethal Interactions of Atomically Precise Gold Nanoclusters and *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Bacterial Cells” *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 1-21.
135. Linklater D.P., and co-workers „Lethal Interactions of Atomically Precise Gold Nanoclusters and *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Bacterial Cells” *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022, 28, 32634-32645.

136. Borris R.P., „Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company” J. Ethnopharmacology, 1996, 51, 29–38.
137. <https://www.czytelniamedyczna.pl/3556,babka-lancetowata-plantago-lanceolata-l-wlasciwosci-lecznicze.html> (dostęp dnia 19.11.2022 r.).
138. Smullen J., Koutsou G.A., Foster H.A., Zumbé A., Storey D.M., „The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*” Caries Research, 2007, 342–349.
139. Beara I.N., Lesjak M.M., Orčić D.Z., et al., „Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L” LWT—Food Science and Technology 2012, 1, 64–70.
140. Smullen J., Koutsou G.A., Foster H.A., Zumbé A., Storey D.M., Caries Research, 2007, 350-354.
141. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), Community herbal monograph on *Plantago lanceolata* L., folium, Tech. Rep., EMA/HMPC/437858/2010 Corr., 2014, 1, 1-8.
142. Samuelsen A.B., „The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L A review” Journal of Ethnopharmacology 2000, 71, 1–21.
143. Reina E., Al – Shibani N., Allam E., Gregson K.S., Kowolik M., Windsor L.J., „The Effects of *Plantago major* on the Activation of the Neutrophil Respiratory Burst” J. Traditional and Complementary Medicine 2013, 3, 268–272.
144. Malinowska M., Sikora E., Ogonowski J., Ekstrakt z brzozy jako źródło substancji biologicznie czynnych, „Przemysł Chemiczny”, 2014, 9, 1548-1551.
145. Kamińska P., Gawron – Gzella A., „Znaczenie wyciągów z liści i kory brzozy w medycynie i kosmetologii” Postępy Biologii Komórki, 2019, 46, 225–234.
146. Malinowska M., Sikora E., Ogonowski J., „Ekstrakt z brzozy brodawkowatej *Cortex Betulae* jako źródło substancji aktywnych biologicznie” Herbalism 2019, 1, 17-31.
147. Prinsley R., „Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC), Tea Tree Oil – In support of an iconic Australian industry” Barton ACT, Australia 2013, 1-20.
148. Molski M., „Podział substancji ze względu na budowę i funkcje” Chemia Piękna, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2021.

149. Ashkani – Esfahani S., Khoshneviszadeh M., Noorafshan A., Miri R., Rafiee S., Hemyari K., Kardeh S., Koochi Hosseinabadi S., Fani D., Faridi E., „The Healing Effect of Plantago Major and Aloe Vera Mixture in Excisional Full Thickness Skin Wounds: Stereological Study” *World Journal of Plastic Surgery*, 2019, 8, 51-57.
150. Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V., „Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties” *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, 19, 50–62.
151. <https://www.vichy.pl/blog/10-zastosowan-olejku-herbacianego/vmag64841.aspx> (dostęp dnia 20.11.2022 r.).
152. <http://www.przyprawowy.pl/imbir.html> (dostęp dnia 20.11.2022 r.).
153. Wang X., Shen Y., Thakur K., Han J., Zhang J.G., Hu F., Wei Z.J., „Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus” *Molecules* 2020, 25, 3955-3965.
154. Glinka R., *Receptura Kosmetyczna*, MA Oficyna Wydawnicza, Łódź 2003, str. 317.
155. Kowalczyk A., Przychodna M., Sopata S., Bodalska A., Fecka I., „Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications” *Molecules*, 2020, 25, 4125.
156. Studzińska-Sroka E., Bylka W., „Porost islandzki – związki czynne, aktywność biologiczna” *Farmaceutyczny Przegląd Naukowy*, 2010, 7, 23–27.
157. Dudziec A., Zielińska-Pisklak M., „Właściwości farmakologiczne i zastosowanie porostu islandzkiego (*Lichen islandicus*) w medycynie” *Terapia*, 2015, 9, 67-70.
158. Krajewska J., „Właściwości lecznicze porostu islandzkiego” *Lek w Polsce*, 2015, 1, 52–56.
159. Studzińska-Sroka E., „Aktywność przeciw-drobnoustrojowa metabolitów wtórnych porostów” *Postępy Fitoterapii*, 2010, 1, 23–29.
160. Backlir R.G., Bengali M., „Antibacterial activity of leaf essentials oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*” *Afr. J Pharm Pharmacol* 2008, 2, 211-215.
161. Sadlon A.E., Lamson D.W., „Immune-modifying and antimicrobial effects of eucalyptus oil and simple inhalation devices” *Altern Med Rev* 2010, 15, 1, 33-46.
162. Salari M.H., Amine G., Shirazi M.H., and co-workers „Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders” *Clin Microbiol Infect.*, 2006, 12, 194-6.

163. Fit I.N., Rapuntean G., Rapuntean S., and co-workers „Antibacterial effect of essential vegetal extracts on *Staphylococcus aureus* compared to antibiotics” *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 2009, 37, 117-23.
164. Karpanen T.J., Worthington T., Hendry E.R., and co-workers „Antimicrobial efficacy of chlorhexidine alone and with combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*” *J Antimicrobial Chemother* 2008, 62, 1031-1036.
165. Kianbakht S., Abasi B., Perham M., Hashem Dabaghian F., „Antihyperlipidemic effects of *Salvia officinalis* L. leaf extract in patients with hyperlipidemia: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial” *Phytother Res.* 2011, 25, 1849– 1853.
166. Keshavarz M., Mostafaie A., Mansouri K., Bidmeshkipour A., Motlagh H.R., Parvaneh S., „In vitro and ex vivo antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*” *Phytother Res* 2010, 24, 1526– 1531.
167. Rodrigues M.R., Kanazawa L.K., das Neves T.L., da Silva C.F., Horst H., Pizzolatti M.G., et al. „Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice” *J. Ethnopharmacol* 2012, 139, 519– 526.
168. Škrovánková S., Mišurcová L., Machů L., „Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants” *Adv Food Nutr Res.*, 2012, 67, 75– 139.
169. Lixandru B.E., Drăcea N.O., Dragomirescu C.C., Drăgulescu E.C., Coldea I.L., Anton L., et al. „Antimicrobial activity of plant essential oils against bacterial and fungal species involved in food poisoning and/or food decay” *Roum Arch Microbiol Immunol* 2010, 69, 224– 230.
170. Haffajee A.D., Yaskell T., Socransky S.S., „Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse” *J Am Dent Assoc* 2008, 139, 606– 611.
171. Bouajaj S., Benyamna A., Bouamama H., Romane A., Falconieri D., Piras A., et al. „Antibacterial, allelopathic and antioxidant activities of essential oil of *Salvia officinalis* L. growing wild in the Atlas Mountains of Morocco.” *Nat. Prod. Res.* 2013, 27, 1673– 1676.
172. Matalon S., Weiss E.I., Gorfil C., Noy D., Slutzky H., „In vitro antibacterial evaluation of flowable restorative materials” *Quintessence Int* 2009, 40, 327– 332.

173. Beheshti-Rouy M., and co-workers „The antibacterial effect of sage extract (*Salvia officinalis*) mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque: a randomized clinical trial” *J. Microbiol.* 2015, 7, 3, 173–177.
174. Sadowska B., Różalska B., and co-workers „New pharmacological properties of *Medicago sativa* and *Saponaria officinalis* saponin rich fractions, addressed to *Candida albicans*” *J. Med. Micro.* 2014, 5, 1-14.
175. P. Veenstra J.P., Johnson J.J., „Oregano (*Origanum vulgare*) extract for food preservation and improvement in gastrointestinal health“. *Int J Nutr.* 2019; 3, 4, 43–52.
176. Vujicic M., Nikolic I., Kontogianni V.G., et al. „Methanolic extract of *Origanum vulgare* ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity” *The British Journal of nutrition.* 2015, 113, 5, 770–82.
177. Teixeira B., Marques A., Ramos C., et al. „Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil” *J. Sci. Food and Agriculture.* 2013, 93, 11, 2707–2714.
178. Al-Dhabi N.A., Arasu M.V., Park C.H., Park S.U., „Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities” *EXCLI Journal.*, 2014, 13, 1192–1195.
179. Hać-Szymańczuk E., Lipińska E., Grzegorzówka O., „Ocena aktywności przeciwbakteryjnej oregano” *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012, 3, 308–314.
180. Malczewska J., Rotkiewicz Z., „Laktoferyna-białko multipotencjalne” *Medycyna Wet.*, 2007, 63, 136-139.
181. Siqueiros-Cendón T., and co-workers „Immunomodulatory effects of lactoferrin” *Acta Pharmacol Sin.* 2014, 5, 557–566.
182. Bilgic Y., Akbulut S., Aksungur Z., Erdemli M.E., Ozhan O., Parlakpınar H., Vardi N., Turkoz Y., „Protective effect of dexpanthenol against cisplatin-induced hepatotoxicity” *Exp Ther Med.* 2018, 11, 4049-4057.
183. Butko Y., Ulanova V., Tkacheva O., Mishchenko O., „Histological evaluation of therapeutic effects of dexpanthenol composition with ceramides in rats with skin burn injury” *Georgian Med News.* 2018, 282, 134-139.
184. Kramer A., Assadian O., Koburger-Janssen T., „Antimicrobial efficacy of the combination of chlorhexidine digluconate and dexpanthe-nol” *GMS Hyg Infect Control.* 2016, 12, 11-14.

185. Björklund S., Pham Q.D., Jensen L.B., Knudsen N.Ø., Nielsen L.D., Ekelund K., Ruzgas T., Engblom J., Sparr E., „The effects of polar excipients transcitol and dexpanthenol on molecular mobility, permeability, and electrical impedance of the skin barrier” *J Colloid Interface Sci.* 2016, 10, 207-220.
186. ECHA <https://echa.europa.eu/pl/substance-information> (dostęp 28.03.2023)
187. Lipp R., Gunther C., Riedl J., Tauber U., „Transdermal therapeutic systems that contain sex steroids and dimethyl isosorbide” 2000 (patent)
188. Otto A., Wiechers J.W., Kelly C.L., „Effect of Penetration Modifiers on the Dermal and Transdermal Delivery of Drugs and Cosmetic Active Ingredients“ *Pharmacology and Physiology* 2008, 21, 326-34.
189. FDA: DMI=Dimethyl Isosorbide Application Guide Technical Publication: DMI Application Guide with Formulations, Revision Date: May 2010.
190. <https://www.fda.gov>, (dostęp 28.03.2023)
191. Chandler M. „Reducing Irritation and Increasing Efficacy in Acne Care With Dimethyl Isosorbide” *Cosmetics & Toiletries*, 2013, 3, 1-3.
192. Surcel A., Schiffhauer E. S., and co-workers „Targeting mechanoresponsive proteins in pancreatic cancer: 4-hydroxyacetophenone blocks dissemination and invasion by activating MYH14” *Cancer Res.* 2019, 79, 1-14.
193. <https://www.fao.org> (dostęp 3 .04.2023)
194. Bibi Y., Nisa S., Fayyaz M., Chaudhary & Muhammad Zia., Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan, *BMC Complementary and Alternative Medicine* volume 2011, 52, 1-7.
195. ECHA <https://echa.europa.eu/pl/substance-information> (dostęp 28.03.2023)
196. Marren K., „Dimethyl sulfoxide: an effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs. ” *Phys Sportsmed.* 2011, 39, 75–82.
197. Pawlak M., „DMSO - działanie, właściwości, przeciwwskazania” *Medonet* 2019
198. Thassia D´Arc Senna, „In Vitro and In Vivo Evaluation of DMSO and Azone as Penetration Enhancers for Cutaneous Application of Celecoxib” *Curr Drug Deliv*, 2017, 14, 992-1004.
199. Swanson B.N., Mojaverian P., Boppana V. K., Dudash M.R., „Effect of dimethyl sulfoxide on sulindac disposition in rats” *Drug Metab Dispos*, 1981, 9, 499-502.

200. Capriotti K., Capriotti J.A., Dimethyl Sulfoxide History, Chemistry, and Clinical Utility in Dermatology, *J Clin Aesthet Dermatol.* 2012, 5, 24–26.
201. Swanson B.N., „Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO)” *Rev. Clin. Basic Pharm,* 1985, 5, 1-33.
202. Makoto Yono M., and co-workers „Phase I study of KRP-116D, a 50% w/w dimethyl sulfoxide aqueous solution, on the systemic absorption from bladder by intravesical instillation in healthy” *Low Urin Tract Symptoms* 2020, 5, 150–154.
203. AlOkda A., Van.Raamsdonk J.M., „Effect of DMSO on lifespan and physiology in *C. elegans*: Implications for use of DMSO as a solvent for compound delivery” *MicroPubl Biol.*, 2022, 7, 20-22.
204. Stape T.H., Tezvergil-Mutluay A., Mutluay M.M., Martins L.R., et al., „Influence of dimethyl sulfoxide used as a solvent on the physical properties and long-term dentin bonding of hydrophilic resins” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2016, 64, 220–228.
205. Tjäderhane L., Mehtälä P., Scaffa P., Vidal C., Pääkkönen V., Breschi L., et al., „The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on dentin bonding and nanoleakage of etch-and-rinse adhesives” *Dent Mater.* 2013, 29, 1055–1062.
206. Mehtälä P., Agee K., Breschi L., Pashley D.H., Tjäderhane L., „Proprietary solvent enhances wettability” *Dental Materials.* 2010, 26, 12–13.
207. Stape T.H.S., Tjäderhane L., Marques M.R., Aguiar F.H.B., Martins L.R.M., „Effect of dimethyl sulfoxide wet-bonding technique on hybrid layer quality and dentin bond strength” *Dental Materials.* 2015, 31, 676–83.
208. Fiume M. M., „Safety assessment of alkyl PEG ethers as used in cosmetics” *Int J Toxicol,* 2012, 31, 147-168.
209. Komitet UE ds. Substancji chemicznych, <https://echa.europa.eu/pl/home> (dostęp 15.05.2023)
210. Langsrud S., and co-workrs „Ethylhexylglycerin Impairs Membrane Integrity and Enhances the Lethal Effect of Phenoxyethanol” *PLoS One*, 2016, 26;11-15.
211. Farmakopea Polska VIII, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, 2008, tom II, s. 1873.
212. Kluk A., Sznitowska M., „Substancje pomocnicze w lekach do oczu” *Farmacja Polska,* 2010, 66, 567-572.
213. Becker L.C., and co-workers „Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics” *International Journal of Toxicology*, 2019, 38, 6S-22S.

214. OECD SIDS „Initial Assessment Report for Glycerol” 2002, 3, 26-28.
215. Tourtellotte W.W., Reinglass J., Newkirk T., „Cerebral dehydration action of glycerol. Historical aspects with emphasis on the toxicity and intravenous administration” *Clin Pharm Ther.* 1972, 13, 159-171.
216. Lin E.C., „Glycerol utilization and its regulations in mammals” *Ann Rev Biochem.* 1977, 46, 765-795.
217. Nelson J.L., Harmon M., Robergs R., „Identifying plasma glycerol concentration associated with urinary glycerol excretion in train humans” *J Analyt Toxicol.* 2011, 35, 617-623.
218. OECD SIDS, „Initial Assessment Report For Hexylene Glycol” 2001, 11, 1-133.
219. Fischer, A.J.G., et al. „Burn coma due to dressings impregnated with hexylene glycol” *Medical Journal* 1968, 975-976.
220. POIR.02.03.02-14-0125/17 kierownik projektu: pod kierownictwem Pani dr hab. Anny Grudniak, „Opracowanie optymalnego składu roztworu koloidalnego nanocząstek produkowanych przez Nano-Tech Polska w oparciu o technologię aXonnite o dużej skuteczności antybakteryjnej i przeciwgrzybiczej, wobec typowej mikroflory występującej na błonach śluzowych”
221. Wartości granicznych MIC dostępne na EUCAST, 15.05.2023 r, (<http://www.eucast.org>).
222. Prost M.E., Prost R., „Podstawowe wskaźniki oceniające skuteczność antybiotykoterapii” 2017, *Ophthatherapy* 4,16, 233-236.