

Gliwice, 13.12.2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Klebko  
pt. „Amino acid ionic liquids as carrier systems for non-steroidal anti-inflammatory drugs”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pt. „Amino acid ionic liquids as carrier systems for non-steroidal anti-inflammatory drugs”, została wykonana na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego (ZUT) w Szczecinie, pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Janus, prof. ZUT oraz Promotor Pomocniczej dr hab. inż. Pauli Ossowicz-Rupniewskiej, prof. ZUT. Podstawą do wykonania recenzji była Uchwała Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna ZUT z dnia 15.10.2024 r. oraz pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna ZUT, prof. dr hab. inż. Zofii Lenzion-Bieluń (nr ZUT/RDICH/53/2024).

Praca dotyczy kompleksowych, interdyscyplinarnych badań mających na celu otrzymanie i charakterystykę pochodnych wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ; w pracy w *j.ang.* NSAIDs) o zwiększonej biodostępności i przenikalności przez skórę. Mgr inż. Joanna Klebko poruszyła bardzo ważne i aktualne zagadnienia, zarówno z punktu widzenia naukowego jak i praktycznego. Wielkość światowego rynku niesteroidowych leków przeciwzapalnych szacuje się w 2024 r. na około 23 mld USD i prognozuje się roczną stopę wzrostu na poziomie 7,3%. Leki te są szeroko dostępne i często można je kupić bez recepty. Stosowane są w wielu schorzeniach i w różnych formach: tabletek, kapsułek, maści, żeli, czopków oraz preparatów do stosowania dożylnego. Dzięki różnym postaciom preparatów łatwo je dostosować do potrzeb pacjenta. Chociaż NLPZ są skuteczne i łatwo dostępne, ich stosowanie może się wiązać z poważnymi skutkami ubocznymi, między innymi z uszkodzeniem przewodu pokarmowego, w przypadku podania doustnego. Dlatego też bardzo istotne jest opracowanie skutecznych i mniej szkodliwych preparatów o szybkim działaniu, w tym leków podawanych miejscowo i transdermalnych systemów terapeutycznych. W tym świetle praca p. mgr Joanny Klebko stanowi cenne źródło informacji na temat nowoczesnych rozwiązań, pozwalających na opracowanie bardziej skutecznych środków przeciwzapalnych i przeciwbólowych oraz obniżenie dawki leku, a co za tym idzie również poziomu skutków ubocznych.

*Ocena układu pracy:*

Rozprawa doktorska liczy 244 strony, jest napisana w języku angielskim, z zachowaniem prawidłowych proporcji poszczególnych rozdziałów. Układ pracy jest typowy i zawiera streszczenie



w języku polskim i angielskim, słowa kluczowe, wyjaśnienie symboli i skrótów, wprowadzenie, cel pracy i zadania badawcze, część literaturową (28 stron), omówienie wyników (64 strony), wnioski (3 strony), część doświadczalną (10 stron), bibliografię oraz załączniki (łącznie 95 stron), a także spis publikacji i osiągnięć Doktorantki. Cytowanych jest 296 pozycji literaturowych, w dużej części opublikowanych w ostatnich kilku latach.

#### *Ocena merytoryczna pracy:*

Pracę rozpoczyna krótki wstęp („Introduction”), w którym Doktorantka nakreśliła sytuację panującą w dziedzinie niesteroidowych leków przeciwzapalnych, w tym kwestie rozpuszczalności w środowisku wodnym, biodostępności i transportu przez błony biologiczne oraz problem efektów ubocznych ich stosowania. Podkreśliła również konieczność ciągłego poszukiwania nowych form leków bardziej skutecznych i mniej szkodliwych dla pacjentów. Wstęp ten bardzo dobrze wprowadza czytelnika w rozdział „Objective and scope of the thesis”, w którym mgr inż. Joanna Klebeko jasno przedstawiła ambitny cel swojej pracy oraz założone etapy realizacji. Celem pracy było otrzymanie i charakterystyka nowych pochodnych, należących do cieczy jonowych, wybranych leków niesteroidowych, o zwiększonej rozpuszczalności w płynach ustrojowych oraz lepszej przenikalności przez błony biologiczne. Doktorantka wytypowała ibuprofen, naproksen, ketoprofen oraz kwas salicylowy jako kwasy z grupy NLPZ i modyfikowała je estrami wybranych aminokwasów. Wybór aminokwasów został jasno uzasadniony, zarówno ich budową, jak i rolą, jaką pełnią w organizmie.

Bardzo dobrze napisana jest kolejna część „*Theoretical framework*”, gdzie na podstawie najnowszej literatury, przedstawiony został stan wiedzy z dziedziny leków z grupy NLPZ. Na początku Autorka podała klasyfikację leków z tej grupy oraz mechanizm ich działania. Następnie określone zostały wady i zalety leków w postaci stałej oraz kierunki ich modyfikacji. Mając na uwadze wady dostępnych na rynku doustnych preparatów przeciwzapalnych, Doktorantka wskazała na nowe formy leków oraz alternatywne drogi ich podania, w tym miejscowe i przezskórne. Podkreśliła również, że opracowanie takich formułacji wymaga uwzględnienia wielu aspektów, takich jak aktywność i stabilność leku przez cały okres trwałości produktu, łatwe przenikanie przez skórę oraz uzyskanie określonego stężenia we krwi. W tym świetle przedstawiła możliwość zastosowania nowoczesnej metody dostarczania leków w postaci cieczy jonowych (Active Pharmaceutical Ingredient – Ionic Liquids; API-ILs). Autorka przeprowadziła szczegółową dyskusję dotychczasowych osiągnięć w tym zakresie, przedstawiając metody otrzymywania, budowę i zalety API-ILs. Szczególną uwagę poświęciła nowym metodom dostarczania leków z grupy NLPZ, bazującym na cieczach jonowych.

Dyskusja poszczególnych wątków związanych z lekami z grupy NLPZ poparta została licznymi rysunkami i schematami, które ułatwiły zapoznanie się z najważniejszymi aspektami tego szerokiego zakresu tematycznego. Dobór literatury i wnikliwa analiza stanu wiedzy, świadczą o bardzo dobrym rozeznaniu Autorki zarówno w tematyce dostępnych niesteroidowych leków przeciwzapalnych, problemów związanych z ich otrzymywaniem, stabilnością, skutkami ubocznymi, jak i nowoczesnych

rozwiązań w tej dziedzinie. Należy podkreślić, że przegląd literatury stanowi bardzo dobry wstęp do części badawczej.

Rozdział „Results and discussions” zawiera omówienie ogromnej ilości uzyskanych wyników. W kolejnych rozdziałach Doktorantka bardzo dobrze i jasno przedyskutowała poszczególne grupy zagadnień, a najważniejsze wyniki przedstawiła w postaci rysunków. Komplet wszystkich uzyskanych wyników został umieszczony w postaci tabel i rysunków w Załącznikach. Na podkreślenie zasługuje również to, że każda część dyskusji kończy się krótkim podsumowaniem, co daje możliwość szybkiego zapoznania się z najważniejszymi wnioskami. Autorka najpierw przedstawiła wyniki uzyskane na etapie otrzymywania i charakterystyki estrów wybranych aminokwasów, a następnie odpowiednich soli czterech NLPZ: ibuprofenu (mieszanki racemicznej R,S, jak również czystego enancjomeru S), naproksenu, ketoprofenu i kwasu salicylowego. Wszystkie otrzymane związki zostały bardzo dokładnie scharakteryzowane (m.in. metodami  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -NMR, FT-IR, analizy elementarnej, potencjometryczną, dyfrakcji rentgenowskiej XRD, polarymetryczną, UV-Vis), a dane umieszczone w Załącznikach mogą posłużyć przyszłym badaczom jako gotowa baza informacji na temat tych pochodnych. Autorka podała, że w ramach pracy otrzymała 24 estry aminokwasów w postaci chlorowodorków (z wydajnościami 75-95%), które następnie przekształciła w liczne sole niesteroidowych środków przeciwzapalnych. Bardzo cenne jest, że Doktorantka jasno wskazała, które związki zostały otrzymane w ramach pracy doktorskiej, a które otrzymała wcześniej. Pani mgr Klebko podkreśliła również, że główną nowością w pracy jest szczegółowe określenie właściwości badanych związków pod kątem ich zastosowania jako leki, w tym testy rozpuszczalności, przenikalności przez skórę, akumulacji w skórze, aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwutleniającej, biodegradowalności oraz stabilności w różnych warunkach przechowywania. Dlatego też w kolejnym rozdziale Autorka przedstawiła właściwości fizykochemiczne badanych związków, takie jak rozpuszczalność w wodzie, w buforach o różnym pH, rozpuszczalnikach organicznych, a także lipofilowość, degradację termiczną oraz stabilność termiczną. Tutaj również przedstawiła szczegółowe dane w postaci licznych tabel w załączniku II, natomiast w tekście umieściła rysunki przedstawiające najważniejsze zależności badanych parametrów od budowy badanych związków. Wykazała między innymi, że otrzymane sole charakteryzowały się lepszą rozpuszczalnością w wodzie i buforach o pH 5,4 i 7,4 oraz niższą lipofilowością niż wyjściowe kwasy. Na podstawie kolejnych badań doktorantka dowiodła również, że wiele z otrzymanych pochodnych ma niższą stabilność termiczną, a zwiększając długość łańcucha alkilowego w części będącej kationem cieczy jonowej, można zwiększyć stabilność termiczną i obniżyć temperaturę topnienia otrzymanych soli. Wykazała również, że większość z otrzymanych pochodnych ketoprofenu, ibuprofenu i kwasu salicylowego oraz niektóre pochodne naproksenu, można na podstawie uzyskanych wyników zaliczyć do cieczy jonowych. Bardzo ważnym fragmentem pracy jest opis właściwości takich jak przenikalność przez skórę, akumulacji w warstwie skóry, dających możliwość określenia przydatności danych pochodnych jako substancji aktywnych w preparatach do stosowania miejscowego lub w transdermalnych systemach terapeutycznych. Doktorantka wykazała, że przenikanie przez skórę zależy od struktury anionu i kationu w badanej cieczy jonowej, ale generalnie obserwuje się znaczną poprawę tego parametru w porównaniu z klasycznymi NLPZ.

Najlepsze wyniki Autorka uzyskała dla soli złożonych z estrów propylowych/izopropylowych treoniny oraz badanych NLPZ. Badane sole znacznie gorzej akumulowały się w skórze, w porównaniu z wyjściowymi kwasami. Moja drobna sugestia dotyczy używanych w tej części licznych symboli, skrótów i parametrów. Dobrze byłoby zebrać w jednym miejscu wszystkie skróty i symbole oznaczanych wielkości, wraz z wyjaśnieniem ich znaczenia. W niektórych fragmentach pracy używane są tylko symbole, a wyjaśnienia trzeba szukać w innych częściach pracy.

Pani mgr Klebeko określiła także właściwości przeciwutleniające badanych soli podkreślając, że formułacje o działaniu miejscowym i przezskórnym, opracowane na bazie tych najbardziej aktywnych, mogą dodatkowo chronić skórę przed stresem oksydacyjnym. Uzyskane wyniki pokazały, że wszystkie związki redukowały rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowy. Największą poprawę właściwości przeciwutleniających Autorka obserwowała dla soli ibuprofenu z estrami propylowym i izopropylowym izoleucyny. Ważnym aspektem w opracowaniu nowych postaci leków jest również ich wpływ na środowisko naturalne. Doktorantka zajęła się również tym tematem, wykazując, że pochodne kwasu salicylowego i estrów propylowych metioniny i waliny oraz pochodne ibuprofenu i estru propylowego treoniny były najlepiej biodegradowane. Autorka wskazała również zależność pomiędzy lipofilowym charakterem związków a stopniem degradacji. Ostatni podrozdział w tej części dotyczył badań właściwości przeciwbakteryjnych w stosunku do trzech szczepów bakterii zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Tutaj także Autorka wykazała przewagę wielu otrzymanych związków nad wyjściowymi lekami. Badane pochodne wykazywały podobne lub lepsze właściwości antybakteryjne w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, natomiast w przypadku Gram-ujemnej *Escherichia coli* najlepsze były pochodne wszystkich NLPZ z estrem izopropylowym metioniny.

W części „Conclusions” Autorka podsumowała najważniejsze rezultaty uzyskane w trakcie realizacji postawionego na początku celu oraz omówiła wynikające z nich wnioski. Potwierdziła raz jeszcze, że przekształcając powszechnie znane niesteroidowe związki przeciwzapalne do soli na bazie estrów alkilowych aminokwasów, można znacznie poprawić ich właściwości niezbędne do otrzymania skutecznych preparatów farmaceutycznych o zwiększonej biodostępności i przenikalności przez skórę.

Część eksperymentalna (*Experimental section*) jest napisana poprawnie i zawiera opis licznych procedur i technik analitycznych stosowanych w pracy. Pragnę jednak zaznaczyć, że moim zdaniem korzystniej byłoby umieścić spis materiałów i odczynników w części eksperymentalnej (rozdział IV), a nie w załączniku II. Nie mogłam również znaleźć pochodzenia kilku materiałów (np. skąd wzięto skórę do badań przenikalności otrzymanych związków przez skórę).

Strona merytoryczna pracy nie budzi zastrzeżeń, jednak przy tak obszernym zakresie badań nieuniknione są pewne niedopatrzenia, czy błędy edytorskie. Z obowiązku recenzenta podaję wybrane uwagi oraz nieścisłości, które zauważyłam podczas analizy rozprawy oraz pytania, które mi się nasunęły, z prośbą o komentarz/odpowiedź:

1. Str.30 – odnośnik [81] nie bardzo odpowiada rysunkowi 6.

2. Jak się ma dobór rozpuszczalników w badaniach rozpuszczalności do ich toksyczności (np. dichlorometan, chloroform). Skoro otrzymane sole mają być stosowane jako leki, jest to ważny aspekt.
3. Str. 61, Rys. 19. Na wykresach przydałyby się dane dotyczące rozpuszczalności niemodyfikowanych NSAID, żeby łatwiej było określić jak zmieniły się te wartości w otrzymanych solach.
4. Str. 61. Rys. 19. Nie do końca zgadzają się wartości rozpuszczalności pochodnych ibuprofenu w pH 7,4 przedstawione na wykresie 19 A, z tymi podanymi w tabeli A3 (załącznik II); ta sama uwaga dotyczy pochodnych waliny i izoleucyny oraz kwasu salicylowego w pH 5,4 (rys. 19 D).
5. Str. 86 – nie wszystkie punkty na wykresie 31 zgadzają się z wartościami podanymi na poprzednich wykresach (np. wartości CUM dla pochodnych: ThrOiPr i ThrOPr ibuprofenu oraz ThrOiPr i ThrOBu kwasu salicylowego inne na rys. 29 i 31).
6. Str. 100, Rys. 41 – Właściwości przeciwutleniające pochodnych ibuprofenu, ketoprofenu i kwasu salicylowego z estrami izopropylowym, propylowym i butylowym aminokwasów były porównywalne lub nieznacznie się różniły. W przypadku tych samych pochodnych naproksenu, obserwujemy znaczną różnicę pomiędzy estrami propylowym i butylowym izoleucyny. Czy można to jakoś wyjaśnić?
7. Czy zastanawiała się Pani jakie może być wytłumaczenie tak znacznych różnic w przenikaniu przez skórę kwasu salicylowego i jego pochodnych, w porównaniu z innymi NSAID i ich pochodnymi. (np. na rys. 33, dla pochodnych IBU, NAP, KETO uzyskano porównywalne lub maksymalnie około 1,5 razy wyższe wartości współczynnika przepływu stałego  $J_{ss}$ , w porównaniu z wyjściowymi kwasami. Tymczasem w przypadku pochodnych kwasu salicylowego (SA) są to wartości prawie 6 krotnie wyższe (dla [ThrOiPr][SA]) w porównaniu z samym SA.
8. Bardzo proszę o wskazanie w spisie dorobku, które publikacje i patenty są wynikiem realizacji pracy doktorskiej. Wprawdzie w dyskusji wyników można znaleźć informacje na ten temat, jednak przydałoby się jasno wskazać to również w części, gdzie znajduje się spis licznych osiągnięć Doktorantki.

Wybrane drobne błędy, w tym edytorskie i skróty myślowe (nie wymagające komentarza Doktorantki):

1. Str. 16 Fig. 1 nazwy aminokwasów nie odpowiadają przedstawionym strukturom (zamienione wzory waliny i treoniny)
2. Str. 19, Fig. 2. Jest: acetylalicylic acid, powinno być acetylsalicylic acid; wzór też jest błędny.
3. Str. 20 – pierwsze zdanie jest niedokończone.
4. Str. 28 Fig.5. Jest: fluribuprofen – powinno być: flurbiprofen; We wzorze NO-NSAIDs (diclofenac ester with benzofuroxan as NO donor)–jest jedna nadmiarowa grupa  $-CH_2$  w części 2,6-dichlorofenylowej wzoru.

5. Str. 38 Fig. 8 – ranitidine hydrochloride i ranitidinium docusate – brakuje grupy  $-CH_2$  we wzorze.
6. Str. 43. Fig. 11. We wzorze przedstawiającym diklofenak brakuje dwóch  $-Cl$ ; nazwa 1-(2-hydroxyethyl)-pyrrolidine nie zgadza się ze wzorem przedstawiającym 1-(2-Hydroxyethyl)-2-pyrrolidone.
7. Numeracja i kolejność tabel i rysunków w Appendix II nie zawsze odpowiada kolejności omówienia ich w tekście (np. tabele A7-A12 omówione przed tabelami A2-A6; tab. A38 omówiona przed tab. A18-A37; Fig. A4-A23 omówione przed Fig. A1-A3).

Pragnę podkreślić, że przedstawione powyżej uwagi nie wpływają na moją ostateczną bardzo wysoką ocenę pracy.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera bardzo wiele cennych wyników kompleksowych badań interdyscyplinarnych, dotyczących nowych pochodnych niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Szeroki zakres bardzo dobrze zaplanowanych i udokumentowanych badań i analiz, popartych wnikliwą analizą wyników i konkretnymi wnioskami, potwierdzają ogromny nakład pracy włożonej w realizację założonego na początku celu oraz zdolności i dojrzałość naukową pani mgr inż. Joanny Klebeko. Doktorantka wykazała się nie tylko znajomością problematyki związanej z realizowaną pracą, ale także wysokimi umiejętnościami posługiwania się szeroką gamą metod badawczych, wykazując się przy tym niezwykłą dokładnością i wnikliwością.

Dorobek Doktorantki jest również ponadprzeciętny i bardzo imponujący. Obejmuje on współautorstwo aż 22 publikacji z listy JCR (w 4 Doktorantka jest pierwszym autorem) oraz 12 patentów i 3 zgłoszeń patentowych. Dodatkowo pani Klebeko jest współautorką 6 rozdziałów w monografiach, 16 opracowań w wydawnictwach pokonferencyjnych, 2 wystąpień ustnych na konferencjach naukowych oraz 9 posterów. Odbiła 2 staże zagraniczne oraz brała udział w 4 projektach naukowych jako wykonawca i uzyskała badawczy grant Rektora Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Uważam, że rozprawa doktorska pt. „Amino acid ionic liquids as carrier systems for non-steroidal anti-inflammatory drugs” spełnia wszystkie wymogi merytoryczne i formalne określone w art.187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz. U.2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami, w związku z czym zwracam się do Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, z prośbą o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Joanny Klebeko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Wniosek o wyróżnienie:**

**Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy i osiągnięcia Doktorantki, w tym szczególnie:**

- stworzenie biblioteki licznych, nowych soli niesteroidowych leków przeciwzapalnych i estrów alkilowych aminokwasów,
- bardzo dobrze udokumentowaną i wszechstronną charakterystykę otrzymanych związków, z wykorzystaniem licznych metod analitycznych; szczegółowe określenie ich właściwości pod kątem zastosowania jako leki (m.in. określenie rozpuszczalności w różnych rozpuszczalnikach, przenikalności przez skórę, akumulacji w skórze, aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwutleniającej, biodegradowalności oraz stabilności w różnych warunkach przechowywania),
- potencjał aplikacyjny niektórych z omawianych pochodnych,
- ponadprzeciętny dorobek naukowy Doktorantki,

zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z prośbą o wyróżnienie przedstawionej mi rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Joanny Klebeko.

*Dariusz Gilber*