



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

dr hab. inż. Ewa Wagner-Wysiecka, prof. PG
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej
Katedra Chemii i Technologii Materiałów Funkcjonalnych
e-mail: ewa.wagner-wysiecka@pg.edu.pl
tel. +48 347 23 59

Gdańsk, 21 grudnia 2024 r.

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Pani mgr inż. Joanny Klebeko

pt: "Amino acid ionic liquid as carrier systems for non-steroidal antiinflammatory drugs"
(„Aminokwasowe ciecze jonowe jako nośniki dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych”)

Recenzja pracy doktorskiej została przygotowana na podstawie pisma (ZUT/RDICH/54/2024) przewodniczącej Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie Pani prof. dr hab. inż. Zofii Lenzion-Bieluń z dnia 16 października 2024 roku, zgodnie z uchwałą podjętą w dniu 15 października 2024 r.

Tematyka rozprawy

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) to substancje o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym. Ze względu na łagodzenie szeregu objawów chorobowych mają duże znaczenie w medycynie a wiele z nich dostępnych jest w szerokim obiegu bez recepty. Do najstarszych leków z tej grupy otrzymywanych na drodze syntezy chemicznej należy kwas acetylosalicylowy. Jego działanie, jak i innych związków, określanych jako klasyczne niesteroidowe leki przeciwzapalne – np. ibuprofenu – polega na hamowaniu aktywności cyklooksygenaz. Wykazano zależność pomiędzy budową chemiczną leków zaliczanych do tej grupy a selektywnością w stosunku do enzymów COX-1 oraz COX-2. Dla klasycznych NLPZ charakterystyczna jest obecność grupy kwasowej oraz jednego, lub więcej, pierścienia (hetero)aromatycznego. Grupa karboksylowa może być połączona bezpośrednio z pierścieniem aromatycznym (pochodne kwasu 2-hydroksybenzoesowego) lub też być zlokalizowana w odległości jednego atomu węgla: profeny (pochodne kwasu 2-fenylpropionowego). Te ostatnie są chiralne i dostępne na rynku głównie, z kilkoma wyjątkami, jako racematy. Elementy strukturalne NLPZ przypominają więc grupę kwasową i obszar lipofilowy substratu COX – kwasu arachidonowego.

Wiele NLPZ dostępnych jest jako leki OTC w różnych formacjach i formach. Można je więc zakupić nie tylko w aptece, ale praktycznie w każdym sklepie, drogerii czy nawet na stacji benzynowej. Ma to dwie strony - dobrą i gorszą. Szeroka dostępność leków jest niewątpliwie zaletą przy ich prawidłowym stosowaniu. Niestety taki nieograniczony dostęp do substancji leczniczych może mieć także negatywne skutki, wynikające chociażby z przedawkowania leku (jedna i ta sama substancja, przyjmowana w formie różnych preparatów) czy też długotrwałego stosowania. Szeroki obieg NLPZ to także konsekwencje dla środowiska naturalnego – substancje te, o umiarkowanej w większości przypadków biodegradowalności, w znacznych ilościach przedostają się do ekosystemu, także w ściekach komunalnych.

Wykazano szereg efektów niepożądanych NLPZ, do których należy na przykład działanie wrzodotwórcze, uszkodzenia nerek, a również objawy ze strony o.u.n. Efekty te zależą m.in. od budowy chemicznej substancji aktywnej. Negatywny wpływ można ograniczyć na przykład zmieniając formację leku (proleki), a także drogę jego podania. Współczesna farmacja korzysta bardzo chętnie z osiągnięć inżynierii

materiałowej, dzięki czemu możliwe jest opracowywanie systemów dostarczania leków, które poprawiają nie tylko na bezpieczeństwo stosowania substancji leczniczych, ale także – co nie jest bez znaczenia – zwiększają komfort pacjenta. NLPZ poza środkami doustnymi, bardzo często stosowane są jako preparaty użytku zewnętrznego (naskórnice) jako maści, żele czy kremy. Znane są także rozwiązania, w których zaproponowano stopniowe uwalnianie tych substancji w transdermalnych systemach kontrolowanego dostarczania leków.

Projektowanie i otrzymywanie zupełnie nowych substancji o określonych właściwościach stanowi obecnie, wyzwanie, a i tak niewielki odsetek z tych nowych substancji trafia na rynek. Dla zwiększenia skuteczności terapii poszukuje się więc innych rozwiązań, np. wykorzystujących znane już substancje lecznicze. Wiele z nich stosowanych jest w formie soli, co stwarza możliwość modyfikowania ich właściwości fizykochemicznych i biofarmaceutycznych poprzez dobór odpowiedniego przeciwnionu. Tutaj ciecze jonowe stanowią jedno z aktualnych podejść. Ciecze jonowe stosowane w technologiach farmaceutyków (katalizatory, rozpuszczalniki) mogą być także wykorzystywane do otrzymywania substancji leczniczych w formie soli. Skutkuje to często poprawą właściwości takich jak rozpuszczalność substancji czynnych, co z kolei wpływa na biodostępność leku. Efektem może być również zwiększenie stabilności chemicznej i termicznej leku. Ze względu na bezpieczeństwo farmaceutyków istotne jest zastosowanie nietoksycznego przeciwnionu, który może wywodzić się na przykład od naturalnych substancji, takich jak aminokwasy.

W ten, zdecydowanie interdyscyplinarny i aktualny nurt tematyczny wpisuje się recenzowana praca doktorska, Pani mgr inż. Joanny Klebko zatytułowana: „Amino acid ionic liquid as carrier systems for non-steroidal antiinflammatory drugs/Aminokwasowe ciecze jonowe jako nośniki dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych”. Promotorem pracy jest dr hab. inż. Ewa Janus, prof. ZUT, natomiast promotorem pomocniczym dr hab. inż. Paula Ossowicz-Rupniewska, prof. ZUT.

Celem pracy było otrzymanie i zbadanie szeregu właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych soli niesteroidowych leków przeciwzapalnych i estrów alkilowych L-aminokwasów o charakterystyce cieczy jonowych. Założeniem było otrzymanie układów o zwiększonej biodostępności i przenikalności przez skórę w stosunku do macierzystych substancji aktywnych: ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu oraz kwasu salicylowego.

Opis i ocena pracy

Przedstawiona do recenzji praca została napisana w klasycznym układzie, w języku angielskim. Rozprawa zawiera streszczenie w języku angielskim oraz polskim, a także wykaz skrótów. Jest to niezwykle obszerne opracowanie (w sumie 244 strony), na które składa się część literaturowa oraz część, w której Doktorantka przedstawiła i przedyskutowała wyniki uzyskanych prac eksperymentalnych, zakończona wnioskami. W części eksperymentalnej Doktorantka przedstawiła metodykę prowadzonych badań z uwzględnieniem części preparatywnej oraz studiów nad badaniem właściwości fizykochemicznych i biofarmaceutycznych otrzymywanych układów. W pracy zostało zacytowanych 296 pozycji literaturowych. Całość zamyka dwuczęściowy, blisko stustronicowy suplement. W części końcowej pracy, Doktorantka zaprezentowała Jej osiągnięcia naukowe: wykaz publikacji, patentów oraz zgłoszeń patentowych; udokumentowała aktywność konferencyjną, a także wykazała udział w projektach naukowych. Zawarta jest także informacja o odbytych zagranicznych stażach naukowych.

Ogólną stroną edytorską i graficzną recenzowanej rozprawy doktorskiej oceniam wysoko. Konstrukcję pracy uważam za poprawną i logicznie spójną.

We wstępie Doktorantka, na tle ogólnych rozważań dotyczących niesteroidowych leków przeciwzapalnych, przedstawia założenia pracy. Hipotezę badawczą dotyczącą otrzymywania i zastosowania soli NLPZ i estrów alkilowych (o różnej długości i rozgałęzieniu łańcucha węglowego) egzogennych L-aminokwasów (L-izoleucyny, L-metioniny, L-treoniny oraz L-waliny) jako układów o charakterystyce cieczy jonowych. Plan badań dowodzących słuszności hipotezy uważam za sformułowany poprawnie.

W części literaturowej (Rozdział I), którą uważam za bardzo dobre i wyczerpujące opracowanie, Doktorantka przedstawiła aktualne problemy związane z otrzymywaniem i wykorzystaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Autorka przedstawiła klasyfikację NLPZ oraz mechanizm ich działania. Zwróciła uwagę na zalety i ograniczenia stosowania tradycyjnych form oraz innych form tych substancji z uwzględnieniem transdermalnych systemów dostarczania leków (TDDS). Doktorantka omówiła właściwości cieczy jonowych, a wskazując odpowiednie przykłady, przedstawiła możliwości otrzymywania i korzyści wynikające z zastosowania ich w formułacjach farmaceutycznych różnych generacji. Doktorantka wskazała także na istotność cieczy jonowych dla przemysłu farmaceutycznego, zarówno stosowanych w operacjach i procesach jednostkowych, jak i wpływu wprowadzenia cieczy jonowych jako strukturalnej modyfikacji leków na przebieg tychże. W aspekcie przemysłowym zwróciła także uwagę na środowiskowe konsekwencje wprowadzania do technologii farmaceutycznych substancji o charakterze cieczy jonowych. Ważne są aspekty badań podstawowych, niezbędnych do oceny właściwości nowych formułacji substancji leczniczych, co Doktorantka przedstawiła skupiając się na preparatach naskórnym oraz transdermalnym.

Część II, „Wyniki i dyskusja” to obszerne opracowanie, w którym doktorantka w systematyczny sposób zaprezentowała wyniki badań. W każdym z podrozdziałów wskazuje cel ich podjęcia. Każdy podrozdział zawiera podsumowanie. Uzyskane wyniki są zilustrowane dużą liczbą odpowiednich wykresów, co ułatwia analizę tekstu oraz wizualizuje badane zależności. Podsumowanie po każdym z podrozdziałów jest bardzo dobrym posunięciem.

W rozdziale 1 części II Autorka szczegółowo opisała syntezę serii estrów alkilowych odpowiednich aminokwasów (otrzymano 24 pochodne, w tym 14 nowych) zarówno metodami klasycznej chemii organicznej jak i z wykorzystaniem reakcji wspomaganych ultradźwiękami. Chlorowodorki estrów alkilowych aminokwasów zostały otrzymane, jak podaje Autorka, z dobrymi wydajnościami, przy czym wykazano istotny wpływ ultradźwięków na wzrost wydajności. Metoda otrzymywania chlorowodorków aminokwasów została opatentowana, a Doktorantka jest współautorką patentów.

Struktura finalnych związków została potwierdzona metodami spektroskopowymi (^1H , ^{13}C NMR, FTIR) oraz podparta wynikami analizy elementarnej. Charakterystyka spektroskopowa UV-Vis oraz podanie wartości skręcalności optycznej stanowi uzupełnienie charakterystyki. W badaniach strukturalnych została wykorzystana także spektroskopia dyfrakcji rentgenowskiej. Strukturę soli można więc uznać za wiarygodną.

Obszerną część pracy stanowi opis badań i prezentacja wyników dotyczących charakterystyki fizykochemicznej soli stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej. W pracy zostały zaprezentowane wyniki dotyczące badań takich właściwości jak: rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych oraz w wodzie i wodnych roztworach buforowanych, odzwierciedlających warunki fizjologiczne. Doktorantka wyznaczyła również ważne dla substancji rozważanych jako substancje lecznicze parametry takie jak lipofilowość, właściwości termiczne pochodnych (również stabilność termiczną), aktywność przeciwutleniająca. We współpracy z Pomorskim Uniwersytetem Medycznym w Szczecinie dla badanych soli przeprowadzono badania dotyczące ich przenikalności przez skórę oraz zdolności do akumulacji w skórze. Na podkreślenie zasługuje także fakt, przeprowadzenia badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych pochodnych i porównania jej z właściwościami macierzystych leków.

Przeprowadzone interdyscyplinarne badania, w tym uwzględniające ważny aspekt środowiskowy – badania biodegradowalności – pozwoliły na sformułowanie wniosków końcowych, wykazujących zależność: struktura soli - właściwości. To jedno z ważnych pytań na które poszukuje się odpowiedzi projektując nowe układy cechujące się aktywnością biologiczną. Doktorantka wykazała, możliwość sterowania określonymi właściwościami fizykochemicznymi oraz aktywnością biologiczną niesteroidowych

leków przeciwzapalnych poprzez dobór odpowiedniego przeciwjonu. Wykazała zależność szeregu właściwości połączeń jonowych NLPZ w zależności od rodzaju użytego aminokwasu oraz długości łańcucha alkilowego w ugrupowaniu estrowym.

Podsumowanie, zawierające wnioski stanowi treść Rozdziału III. Jest to ważna i w mojej ocenie dojrzała analiza uzyskanych wyników wskazująca na umiejętność wyciągnięcia wniosków przez Doktorantkę.

Kilka uwag i pytań, które nasunęły mi się podczas czytania recenzowanej pracy zamieszczam poniżej. Wskazuję również na (nieliczne) potknięcia edytorskie.

- Strona 15: Autorka podaje nazwy leków: ibuprofen, ketoprofen, naproksen, kwas salicylowy, którymi posługuje się konsekwentnie w pracy. Uwzględniając cel pracy i jej charakter rozumiem stosowanie takich nazw, skądinąd poprawnych. Uważam jednak, że korzystne byłoby podanie nazw systematycznych tych substancji, chociaż w jednym miejscu pracy doktorskiej. Nazwy takie pojawiają się dopiero w suplemencie, przy charakterystyce odpowiednich soli.
- Ibuprofen, naproksen oraz ketoprofen są pochodnymi określanymi jako profeny, których charakterystykę można rozważać w relacji struktura-właściwości. Jak Autorka uzasadni wybór kwasu salicylowego (2-hydroksybenzoesowego) jako obiektu badań poza przynależnością tej substancji do NLPZ?
- Rys. 1., strona 16. Na rysunku przedstawione są wzory aminokwasów. Podpisy do wzorów L-waliny i L-treoniny są zamienione miejscami.
- Rys. 5., strona 28. „diclofenac ester with benzofuroxan as NO donor” – błędnie jest podany wzór diklofenaku.
- Rys. 8., strona 38. Błędnie podany jest wzór ranitydyny.
- Rys. 11., strona 43. Wzór nie przedstawia diklofenaku jak sugeruje podpis. Podpis wskazuje, że po prawej stronie przedstawiony jest wzór 1-(2-hydroksyetylo)pirolidyny, wzór natomiast przedstawia 1-(2-hydroksyetylo)-2-pirolidon.
- Rys. 12., strona 45. Ostatni etap reakcji, jak zaznaczono na schemacie w pracy (ale również w odpowiednio cytowanych oryginalnych pracach), przebiega w ciemności. Czy Doktorantka ma pomysł dlaczego?
- Strona 47/48. Edytorskie usterki; rozsuniecie sformułowań „Step I” itd.
- Strona 50. Autorka pisze: "The characteristic reflections were shifted with respect to the diffractogram of the unmodified acid (ibuprofen (PDF 96-230-0213), naproxen (PDF 00-052-1902), ketoprofen (PDF 00-051-1988) and salicylic acid (PDF 00-014-0882)." Co oznaczają odnośniki w nawiasach?
- Materiał eksperymentalny jest niezwykle bogaty i zdaję sobie sprawę, że zamieszczanie kompletu widm wpłynęłoby znacząco na objętość pracy doktorskiej. Może podczas obrony pracy doktorskiej Doktorantka mogłaby zaprezentować przykładowe, oryginalne widma (NMR, FTIR, wyniki analizy elementarnej) na podstawie, których potwierdziła strukturę i czystość soli.
- Strona 57. Autorka pisze: „ethyl and diethyl ether”, proszę o wyjaśnienie.
- W badaniach rozpuszczalności Doktorantka wykazała zróżnicowaną rozpuszczalność określonych soli oraz badanych NLPZ w rozpuszczalnikach organicznych. Czy Doktorantka widzi zależność pomiędzy właściwościami rozpuszczalników a strukturą badanych substancji? Dlaczego kwas salicylowy jest dobrze rozpuszczalny w wodzie?
- Strona 92. Rysunek 37 nie ma odwołania w tekście.
- Strona 94-96. Doktorantka pisze: „The highest permeation rates were observed for [ThrOBu][KETO] (85.670 μgKETO/(cm²h)) – at intervals of 3–4 h, for [ThrOiPr][KETO] (86.832

$\mu\text{gKETO}/(\text{cm}^2\text{h})$) – at intervals of 4–5 h and for [ThrOPr][KETO] ($75.078 \mu\text{gKETO}/(\text{cm}^2\text{h})$) – at intervals of 5–6 h.” W tekście podany jest przedział czasowy 5-6 godzin, na wykresach zaś (rysunki 38 oraz 39) 5-8 godzin.

- Strona 99. Badanie aktywności przeciwutleniającej, Doktorantka pisze: „(...) alkyl ester salts tested showed the ability to reduce DPPH to the DPPH form” proszę o sprawdzenie poprawności tego fragmentu.
- Strona 115. W punkcie 1.3 Doktorantka opisuje sposób otrzymywania soli. W jaki sposób Doktorantka określała czystość soli, czy były to jedynie metody spektroskopowe? Czy odparowanie rozpuszczalnika było ostatnim etapem procedury czy stosowano dodatkowe metody oczyszczania, otrzymywania pożądanej formy, na przykład krystalizacji? Doktorantka podaje czas, prowadzenia reakcji jako 5-15 minut. Od czego ten czas zależał i czy różnił się dla poszczególnych soli?
- Pytanie ogólne. Biorąc pod uwagę niezwykle bogaty materiał eksperymentalny prosiłabym o informację czy wszystkie badania zostały przeprowadzone osobiście przez Doktorantkę. Z formy osobowej pracy to nie wynika.
- Nasuwa mi się pytanie czy Doktorantka porównywała właściwości otrzymanych i badanych soli z analogami, które zostały otrzymane i zbadane przez inne zespoły?
- W jakiej skali prowadzone były reakcje syntezy odpowiednich substratów i otrzymywanie soli (mg, g, kg)? Nie doszukałam się takiej informacji w pracy. Nie doszukałam się również informacji o konkretnej wydajności poszczególnych etapów, poza ogólnym określeniem zakresu wydajności na stronach 48 oraz 49. Prosiłabym, by podczas obrony pracy doktorskiej Doktorantka odniosła się do problemu zmiany skali. Jakie są, zdaniem Doktorantki, główne wyzwania związane z przeniesieniem skali dla procesu otrzymywania proponowanych form jonowych niesteroidowych leków przeciwzapalnych stanowiących przedmiot pracy?
- Wykaz literatury. W większości cytowanej literatury Doktorantka podaje pełne nazwy czasopism, w kilku przypadkach (na przykład [225], [227], [231], [245]) podane są ich skróty.

Powyższe uwagi i wynikające z nich pytania nie umniejszają wartości recenzowanej pracy doktorskiej, którą oceniam wysoko. Na podkreślenie zasługuje zaprezentowany bardzo bogaty materiał eksperymentalny i interesujące, mające wymiar praktyczny, wyniki.

pozytywnie oceniam bogaty dorobek publikacyjny Doktorantki. W bazie Scopus aktualnie (na dzień 20 grudnia 2024 r) znajdują się 24 publikacje. Doktorantka jest również współautorką patentów i zgłoszeń patentowych. Całokształt wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki i umiejętność pracy w zespole, również międzynarodowym.

Podsumowanie recenzji

Podsumowując, stwierdzam, że w mojej ocenie, praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Klebko „Amino acid ionic liquid as carrier systems for non-steroidal antiinflammatory drugs/Aminokwasowe ciecze jonowe jako nośniki dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych”, spełnia zarówno zwyczajowe jak i formalne wymogi stawiane pracom doktorskim opisane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami).

W przedstawionej do recenzji pracy została zaprezentowana ogólna wiedza teoretyczna dotycząca ważnych i aktualnych zagadnień związanych z rozwojem przemysłu farmaceutycznego, a konkretnie otrzymywania nowych form leków i badania ich właściwości. Doktorantka, przedstawiając dobrze udokumentowane wyniki zrealizowanych prac, wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań

naukowych. Wykazała się także umiejętnością konstruktywnego wyciągania wniosków na bazie różnych eksperymentów oraz krytycznej oceny uzyskiwanych rezultatów. Praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Klebko prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu naukowego o dużym znaczeniu użytkowym. Mając powyższe na uwadze, zwracam się do Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Klebko do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.