

dr hab. Radosław Pankiewicz, prof. UAM

Poznań, 27.11.2024 r.

## RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr. inż. Joanny Klebeko

pt.: „**Aminokwasowe ciecze jonowe jako nośniki dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych**”

tytuł angielski: “Amino acid ionic liquids as carrier systems for non-steroidal anti-inflammatory drugs”

wykonanej pod kierunkiem Pani Prof. ZUT dr hab. inż. Ewy Janus,  
promotor pomocniczy: Prof. ZUT dr hab. inż. Paula Ossowicz-Rupniewska,  
w Katedrze Technologii Chemicznej Organicznej i Materiałów Polimerowych,  
na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Recenzję rozprawy doktorskiej, przygotowanej w języku angielskim, pt. „Aminokwasowe ciecze jonowe jako nośniki dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych” autorstwa Pani mgr inż. Joanny Klebeko opracowałem w odpowiedzi na otrzymane pismo z dnia 16 października 2024 roku, od Pani Przewodniczącej Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie Prof. dr hab. inż. Zofii Lendzion-Bieluń. Postępowanie przewodu doktorskiego procedowane jest zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Recenzję rozprawy doktorskiej wykonałem zgodnie z wymogami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 r. poz. 1668, z późniejszymi zmianami).

Tematem dysertacji doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Klebko jest opracowanie i analiza nośników niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) opartych o aminokwasowe ciecze jonowe. Niesteroidowe leki przeciwzapalne są szeroko stosowane ze względu na swoje właściwości przeciwbólowe, przeciwzapalne i przeciwgorączkowe. Są wszechstronnymi lekami wykorzystywanymi zarówno w krótkotrwałych dolegliwościach, jak i przewlekłych chorobach zapalnych. Tak, jak większość środków farmaceutycznych, podawane są głównie doustnie w postaci stałej (tabletki, kapsułki). Niestety ich długotrwałe stosowanie obarczone jest ryzykiem działań niepożądanych w postaci problemów z układem pokarmowym oraz obciążeniem pracy wątroby i nerek. Rozwiązaniem wielu z tych problemów wydaje się być podawanie leków miejscowo lub przez skórę w postaci żeli, kremów lub plastrów. Dzięki temu, oprócz odciążenia wspomnianych narządów unika się tzw. efektu pierwszego przejścia, co umożliwia bardziej precyzyjny dobór dawki z zachowaniem jej skuteczności terapeutycznej oraz uzyskanie lepszego działania w walce z bólem miejscowym. Skuteczność takiego podania warunkowana jest spełnieniem przez lek szeregu warunków, w tym efektywnego przenikania przez skórę.

W pierwszych słowach pragnę podkreślić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, napisana w języku angielskim, autorstwa mgr inż. Joanny Klebko jest bardzo obszerna, liczy 244 stron i została podzielona na cztery główne rozdziały: I – Ramy teoretyczne (Theoretical framework) stanowiące odpowiednik opisu literaturowego, II – Rezultaty i dyskusję, III - Konkluzję, IV - Część doświadczalną, które zostały poprzedzone streszczeniem zarówno w języku polskim i angielskim, spisem skrótów i akronimów wykorzystywanych w pracy, rozdziałami gdzie Autorka przedstawia swoją motywację do zajęcia się tym tematem oraz cel swojej pracy. Pozytywne wrażenie zostaje lekko zakłócone przez błąd w Figurze 1., co stanowi zapewne tylko omyłkę pisarską, ale nie powinno mieć w tej pracy miejsca, ponieważ pomylenie struktury aminokwasów waliny z treoniną rzuca się w oczy i wpływa na odbiór pracy. Na końcu dysertacji znajduje się spis literatury oraz załączniki zawierające szczegółowe dane uzyskane w czasie badań. Całość zamyka spis dorobku naukowego Kandydatki.

Elementem pracy, który zasługuje na szczególne wyróżnienie, jest jej końcowy fragment, czyli podsumowanie bardzo bogatej działalności naukowej Doktorantki bardzo rzadko spotykanej na tym etapie kariery. Na dorobek Autorki składają się: udział w pięciu projektach badawczych, w tym w jednym jako kierownik; prezentacja 11 komunikatów konferencyjnych, w tym 2 ustnych; 22 publikacje naukowe w recenzowanych czasopismach, 16 prac w materiałach pozjazdowych oraz współautorstwo 6 monografii. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt współautorstwa 12 patentów i 3 zgłoszeń patentowych. Stanowi to więcej niż bardzo dobry wynik, jak na młodego naukowca. Doktorantka odbyła też kilka staży naukowych w ośrodkach Europejskich w ramach programu Erasmus+, w sumie 12 miesięcy. Lukę w całości stanowi brak informacji o działalności popularyzatorskiej i organizacyjnej, ważnej w rozwoju młodego naukowca, ale może po prostu nie zostały one dołączone do tej dysertacji. Wracając do oceny formalnej pracy, dziwi mnie wybór formy rozprawy doktorskiej jako monografii, a nie zbioru artykułów.

Część teoretyczna (Chapter I) opisana została z uwzględnieniem dobrze dobranych pozycji literaturowych, przez co jej lektura stanowi właściwe wprowadzenie do tematyki badań podjętych w pracy. W ramach tego, zwięźle opisanego rozdziału, czytelnik zostaje zapoznany z podstawowymi informacjami niezbędnymi do zrozumienia części badawczej dysertacji. Jest to moim zdaniem właściwe podejście, ponieważ dzięki temu tematyka przeglądu nie wykracza poza treść prowadzonych badań, a jest przygotowana rzetelnie, w oparciu o literaturę fachową, na którą składa się aż 148 pozycji. W sumie, w pracy pozycji literaturowych jest aż 296, reszta z nich jest cytowana w kolejnych rozdziałach. Stwierdzam, że Autorce prawie udało się ustrzec od błędów, nawet tych drobnych edytorskich, co zasługuje na pochwałę.

Następna część pracy, to liczący 64 strony opis rezultatów i dyskusja wyników (Chapter II). Tak jak sugeruje tytuł Autorka nie tylko przedstawia rezultaty swoich badań, ale również szeroko dyskutuje je z literaturą światową. Momentami można odnieść wrażenie, że czytamy dobrze napisaną pracę przeglądową. Rozdział ten został podzielony na kilka podrozdziałów.

W podrozdziale 1. „Synthesis and identification of NSAIDs salts with L-amino acids alkyl esters” Pani mgr inż. Joanna Klebeko przedstawia syntezę 14 chlorowodorków alkiloestrów aminokwasów otrzymanych z dobrymi wydajnościami (75–96%). Z uzyskanych alkiloestrów aminokwasów utworzono następnie szereg pochodnych z badanymi NLPZ: (R,S)-ibuprofenu, S-(+)-ibuprofenu, S-(+)-naproksenu, (R,S)-ketoprofenu oraz kwasu salicylowego. Struktury wszystkich otrzymanych związków chemicznych zostały potwierdzone za pomocą protonowej i węglowej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR) oraz spektroskopii w podczerwieni (ATR-FTIR).

W podrozdziale 2. “Physicochemical properties of salts of L-amino acids alkyl esters and selected NSAIDs moieties” Autorka przedstawia i dyskutuje wyniki badań fizykochemicznych otrzymanych soli z estrów aminokwasów i badanych NLPZ. Jako pierwsze zostały przedstawione badania rozpuszczalności otrzymanych związków w wodzie i buforach oraz w rozpuszczalnikach organicznych takich jak etanol, octan etylu chloroform, toluen i heksan itd. Stwierdzono, że modyfikacja spowodowała lepszą rozpuszczalność w wodzie demineralizowanej jak i buforach fosforanowych o  $\text{pH}=5,4$  i  $7,4$ . Wyniki dla rozpuszczalników organicznych różniły się znacząco zależnie od badanej struktury. Następnie zostały opisane, ważne ze względów na potencjalne zastosowania farmaceutyczne badania lipofilowości. Zgodnie z przewidywaniami lipofilowość badanych pochodnych zmniejsza się w stosunku do wyjściowego leku, oczywiście z wyjątkiem kwasu salicylowego, gdzie rośnie. Tylko z recenzenckiego obowiązku zauważam, że Autorka zapomniała o tym wspomnieć w podsumowaniu tego podrozdziału. Ta drobnostka nie zmienia to faktu, że w ramach tego rozdziału została zawarta szczegółowa analiza zmian lipofilowości wszystkich otrzymanych pochodnych, co stanowi bardzo ważną informację dla potencjalnego dalszego wykorzystania tych substancji.

W następnym podrozdziale Pani mgr inż. Joanna Klebeko przedstawia szczegółowo charakterystykę termiczną otrzymanych związków. Biorąc pod uwagę wysoką stabilność termiczną wyjściowych leków najważniejszą informacją jest to, że badane sole w większości nie wykazywały pogorszenia stabilności po długotrwałym przechowywaniu nawet w

temperaturze 40°C. Badania wykazały również, że większość uzyskanych pochodnych, ze względu na swoje właściwości, można zaklasyfikować jako ciecze jonowe.

W podrozdziale 3. “Biological properties of salts of L-amino acids alkyl esters and selected NSAIDs moieties” przedstawione są bardzo ważne, z praktycznego punktu widzenia, badania właściwości biologicznych otrzymanych związków. Badania przenikalności i akumulacji tych pochodnych zostały przeprowadzane *ex vivo* na świńskiej skórze. W wyniku badań Autorka stwierdziła, że struktura badanych soli wpływa istotnie na ich zdolność przenikania przez skórę, w większości przypadków znacząco ją zwiększając. Najlepsze parametry pod względem przenikania leku wykazały sole oparte na estrach alkilowych L-treoniny [ThrOPr], [ThrOiPr] i [ThrOBu]. Istotne dane zostały uzyskane również w badaniach kumulacji substancji w skórze. Generalnie stwierdzono, że sole estrów alkilowych aminokwasów kumulowały się w mniejszym stopniu niż leki wyjściowe. Ponadto związki, które wykazywały większą tendencję do akumulacji w badanym układzie, wykazywały też mniejszą przenikalność. Udało się, również ustalić, metodą DPPH, że wszystkie testowane substancje wykazywały potencjał antyoksydacyjny. Autorka stwierdziła również, że wszystkie badane związki ulegają biodegradacji, ale jej stopień silnie zależy od struktury badanej cząsteczki. W ramach pracy przeprowadzono też badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych indywidualów chemicznych. Do badań wytypowano 3 szczepy: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* i *Micrococcus luteus*. Stwierdzono, że aktywność wszystkich badanych NLPZ została poprawiona dzięki koniugacji z kationem estru izopropylowego, co sugeruje zasadnicze znaczenie tej pochodnej we właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Zauważalny jest też wpływ anionu pochodzącego od wyjściowego leku, co z kolei sugeruje możliwą aktywność synergistyczną.

Następnym rozdziałem pracy jest Podsumowanie (Chapter III). W tym miejscu Autorka podsumowuje najważniejsze wnioski wyciągnięte na podstawie analizy wyników badań opisanych w poprzednim rozdziale. Zasadniczo stwierdza, że koncepcja modyfikacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych oparta na estrach alkilowych aminokwasów wykazuje poprawę biodostępności leku. Parametry otrzymanych cząsteczek, a w

szczegółności większa przenikalność przez skórę i niższa tendencja do akumulacji umożliwiają potencjalne wykorzystanie ich w formułacjach leków podawanych miejscowo, bezpośrednio na skórę w postaci kremów, żeli czy plastrów.

W ostatnim dużym rozdziale (Chapter IV) Pani mgr inż. Joanna Klebeko przedstawia część eksperymentalną badań. Znalazły się tu opisy wszystkich technik badawczych wykorzystanych w tej pracy. Rozdział sam sobie nie jest długi (10 stron), ale w zasadzie jego integralną częścią są 2 załączniki znajdujące się na końcu pracy zawierające wszystkie dane eksperymentalne dotyczące przedstawionych badań. Jest to zbiór nadzwyczaj bogaty, zawierający dane spektroskopowe uzyskanych struktur, stabelaryzowane wyniki pomiarów fizykochemicznych oraz wykresy pochodzące bezpośrednio z aparatury badawczej. Nawet pobieżne przyjrzenie się tym załącznikom pokazuje ogrom badań i pracy, które zostały włożone w uzyskanie opisanych w pracy wyników.

W mojej opinii założony cel rozprawy doktorskiej przez Autorkę został w pełni zrealizowany.

Powierzona mi do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr inż. Joanny Klebeko, jak każda tego typu praca, zawiera kilka drobnych usterek edytorskich, oprócz wymienionego przeze mnie wcześniej błędu pomylenia nazw aminokwasów na stronie 16, głównie są to „literówki” lub omyłki takie jak np., niebieski trójkąt opisany jako „blue square” w Fig. 16 na stronie 54. W mojej ocenie praca doktorska jest opracowaniem spełniającym wysokie standardy edytorskie. Drobne nieścisłości nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę przedstawionych w rozprawie wyników naukowych ani nie umniejszają wysokiej jakości pracy, w tym jej kluczowego aspektu praktycznego. Ta obszerna i wieloaspektowa dysertacja doktorska w mojej opinii porusza wiele interesujących, a zarazem ciekawych wątków, szczerze przyznam, że wniosła ona cenne informacje i rozbudziła jednocześnie moją ciekawość naukową. Dlatego chciałem się podzielić kilkoma swoimi uwagami i pytaniami:

- str. 56, dlaczego przyjęta została właśnie taka klasyfikacja rozpuszczalności (różnica pomiędzy „rozpuszczalne” a „nierozpuszczalne” wydaje się względnie niewielka)?



- str. 58, dlaczego sole ibuprofenu i długołańcuchowych estrów waliny są lepiej rozpuszczalne w n-heksanie niż analogiczne izoleucyny?

- str. 65, Fig. 20., czy ma Pani pomysł dlaczego sól ibuprofenu z ThrOEt jest lepiej rozpuszczalna w wodzie od tej z ThrOMe?

-str. 114, w opisanej syntezie - jaka objętość roztworu została poddana działaniu ultradźwięków o mocy 180W?

Biorąc pod uwagę ogrom badań stanowiących podstawę tej pracy, w tym tych przeprowadzonych we współpracy z Pomorskim Uniwersytetem Medycznym w Szczecinie, co uważa Pani za swoje największe osobiste osiągnięcie?

Biorąc pod uwagę wartość naukową zaprezentowanej przez Panią mgr inż. Joannę Klebko rozprawy doktorskiej pt.: „Aminokwasowe ciecze jonowe jako nośniki dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych”, tytuł angielski: “Amino acid ionic liquids as carrier systems for non-steroidal anti-inflammatory drugs” stwierdzam, że spełnia ona prawne wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z przepisami art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), jak również stosowne zapisy ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668).

Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Klebko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

