

prof. dr hab. Marzena Dzida
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Instytut Chemii
ul. Szkolna 9
40-006 Katowice

Katowice, dnia 15 września 2025 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej magister inżynier Agnieszki Śliwińskiej,
zatułowanej „Właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczna
pochodnych chinolonów z cieciami jonowymi w postaci API-IL”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Śliwińskiej została wykonana w Katedrze Chemii Fizycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Promotorem rozprawy doktorskiej jest dr hab. inż. Aneta Pobudkowska-Mirecka, prof. PW.

W recenzowanej pracy Pani mgr inż. Agnieszka Śliwińska wyznaczyła sobie za cel analizę wpływu modyfikacji chemicznej substancji biologicznie czynnych, z wykorzystaniem cieczy jonowych, na ich rozpuszczalność w wodzie, etanolu oraz 1-oktanolu. Wybór rozpuszczalników nie jest przypadkowy, gdyż woda jest środowiskiem płynów ustrojowych, natomiast 1-oktanol jest traktowany jako modelowy lipid, będący składnikiem błon komórkowych. Z kolei etanol został wybrany gdyż jest częstym rozpuszczalnikiem leków, o właściwościach pośrednich pomiędzy właściwościami wody i 1-oktanolu. Pani mgr inż. Agnieszka Śliwińska wyznaczyła sobie również za cel analizę wpływu zaproponowanej modyfikacji chemicznej substancji biologicznie czynnych na właściwości cytotoksyczne, aktywność przeciwbakteryjną oraz profil uwalniania substancji czynnej. Do realizacji postawionego sobie celu jako przedmiot badań Doktorantka wybrała chinolony, a spośród nich chemioterapeutyki charakteryzujące się słabą rozpuszczalnością w wodzie, w badanym przedziale temperatury, takie jak chlorowoderek lomefloksacyny, cynoksacyna, cyprofloksacyna, flumechina, kwas nalidyksowy, norfloksacyna, ofloksacyna oraz sparfloksacyna. Do modyfikacji chinolonów Doktorantka wybrała bromek

Dzida

trietyloheksyloamoniowy, bromek trietylodecyloamoniowy, bromek trietylo-(6-hydroksy-heksylo)amoniowy oraz bromek trietylo-(10-hydroksydecylo)amoniowy. Są to ciecz jonowe charakteryzujące się dobrą rozpuszczalnością w wodzie w temperaturze bliskiej temperatury otoczenia oraz wskazywanej jako standardowa, wynoszącej 298,2 K oraz w temperaturze ciała ludzkiego 310,2 K. Kwas nalidyksowy oraz sparfloksacynę, czyli związki o najslabszej rozpuszczalności w wodzie, Doktorantka zmodyfikowała cieczami jonowymi, przeprowadzając reakcje cieczy jonowej z chemioterapeutykami, otrzymując odpowiednie sole. Jako układy referencyjne Doktorantka otrzymała sole sodowe kwasu nalidyksowego oraz sparfloksacyny.

Praca doktorska posiada klasyczny układ stosowany w tego typu opracowaniach i zawiera *Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim* oraz *Słowa kluczowe w języku polskim i angielskim*, *Wstęp*, *Wprowadzenie*, *Podstawy teoretyczne*, *Zastosowane metody badawcze i procedury eksperymentalne*, *Prezentację wyników badań*, *Dyskusję* oraz *wnioski*, *Podsumowanie*, *Materiały uzupełniające*, *Bibliografię* liczącą 136 pozycji, *Wykaz skrótów*, *Spis schematów*, *Spis tabel*, *Spis wykresów*. Materiał ten został zaprezentowany na 217 numerowanych stronicach. Część literaturowa została podzielona na 3 części, których celem jest wprowadzenie w przedmiot badań stanowiących rozprawę. O ile zasadniczo zastrzeżeń nie budzą treści zawarte we *Wstępie*, zawierającym hipotezy badawcze oraz cel pracy oraz we *Wprowadzeniu*, zawierającym krótki opis zagadnienia rozpuszczalności farmaceutyków w wodzie, zwięźłą charakterystykę chemioterapeutyków, cieczy jonowych oraz połączeń substancji biologicznie czynnych z cieczami jonowym. To część *III. Podstawy teoretyczne* została potraktowana przez mgr inż. Agnieszkę Śliwińską dość pobieżnie. W tej części Doktorantka ograniczyła się do przedstawienia ciągu wzorów, gdzie w wielu przypadkach brakuje opisu symboli. Wyprowadzenia przedstawione w rozdziale 1. *Równowagi fazowe* oraz podrozdziale 1.1. *Równania korelacyjne w oparciu o teorię stężenia lokalnego* są niejasne. Dla przykładu przejście od równania (1), określającego warunek izotermiczno-izobarycznej równowagi w układzie n -składnikowym γ -fazowym, do równania (2), określającego warunek równowagi w układzie, w którym zachodzi reakcja chemiczna, jest zaskakujący. Proszę zatem, aby na obronie Doktorantka omówiła zależności od (1) do (7) przedstawione w rozdziale 1. *Równowagi fazowe*. Z kolei stosując modele

Riole

warto przedstawić ich założenia oraz zakres stosowalności. Proszę zatem, aby na obronie Doktorantka w zwięzły sposób przedstawiła założenia modeli Wilsona, NRTL (ang. Nonrandom, Two-Liquid), UNIQUAC (ang. Universal Quasi-Chemical) z odniesieniem do przedstawionych w dysertacji wzorów oraz przedmiotu badań. Dlaczego wybrane zostały te modele? Proszę podać kryterium wyboru. W części IV. *Zastosowane metody badawcze i procedury eksperymentalne*, w rozdziałach 1. *Reagenty oraz odczynniki chemiczne* oraz 2. *Zsyntezowane substancje - zestawienie* Doktorantka w formie tablic zestawiała odczynniki chemiczne wykorzystywane w badaniach oraz zsyntezowane związki. Podała informacje na temat metod syntezy, oczyszczania oraz potwierdzania struktury otrzymanych związków. W nagłówku Tabeli 1 (str. 36) Doktorantka wyraziła stopień czystości badanych związków w procentach. Z jednej strony Doktorantka nie uściśliła o jakie „procenty” chodzi, z drugiej strony większość wartości liczbowych wskazuje, że stopień czystości badanych związków nie został podany w procentach. W części VIII. *Materiały uzupełniające* w rozdziale 1. *Synteza* Doktorantka zraportowała wyniki uzyskane dla każdej syntezy. W rozdziałach 3. *Analiza fizykochemiczna* oraz 4. *Badania biologiczne* Doktorantka opisała metody i procedury badawcze wykorzystane do realizacji założonego celu. Część V. *Prezentacja wyników badań*, która powiązana z częścią VIII. *Materiały uzupełniające* stanowi bardzo obszerną prezentację materiału doświadczalnego. Obie części zawierają szereg tablic z wynikami oraz wykresów i korelacji, co pokazuje benedyktyńskie zacięcie Doktorantki w pracy. Dla wszystkich badanych związków Doktorantka wyznaczyła podstawowe właściwości termofizyczne, mające wpływ na ich rozpuszczalność, takie jak temperatura topnienia, temperatura zeszklenia oraz entalpie tych przemian. Na obronie prosiłabym o analizę termogramu zaprezentowanego na Wykresie 12 (str. 56). Doktorantka dużo uwagi poświęciła analizie stabilności termicznej badanych związków. Wyjaśniła, że wysokie temperatury topnienia chinolonów przekraczające 490 K wynikają z obecności sprzężonych układów aromatycznych stabilizujących strukturę cząsteczki oraz występujących wiązań wodorowych. Pokazała, że dla norfloksacyny, kwasu nalidyksowego i flumechiny proces topnienia przebiega bez degradacji. Ponadto dla norfloksacyny Doktorantka zaobserwowała przemiany polimorficzne. Autorka wykazała, że pozostałe związki ulegają rozkładowi termicznemu, który rozpoczyna się podczas lub tuż po

Dida

topnieniu. Pierwszym etapem rozkładu jest dekarboksylacja zachodząca w przedziale temperatury od 533 do 553 K, po której w temperaturach od 573 do 693 K następuje rozpad łańcuchów alkilowych oraz częściowy rozpad pierścienia piperazynowego, natomiast w temperaturach od 623 do 773 K dochodzi do rozpadu struktur aromatycznych. Produktami rozkładu termicznego w zależności od etapu są m.in. tlenek węgla(IV), alkeny, fluorowodor, cyjanowodor. Doktorantka pokazała, że amoniowe ciecze jonowe mają znacznie niższe temperatury topnienia od badanych chinolonów, poniżej 373 K, co wiąże się z ich strukturą ograniczającą tworzenie uporządkowanej sieci krystalicznej. Wykazała, że bromek trietylodecyloamoniowy tworzy dodatkowo fazę ciekłokrystaliczną. Doktorantka zaobserwowała, że sole amoniowe kwasu nalidyksowego oraz sparfloksacyny topiły się w temperaturach niższych niż niemodyfikowane chinolony, lecz wyższych niż amoniowe ciecze jonowe, a obecność grupy hydroksylowej w kationie powodowała wzrost temperatury przemian fazowych. Doktorantka podjęła również próbę otrzymania monokryształów badanych soli amoniowych. Jednak nie uzyskała próbek o jakości spełniającej wymogi konieczne do analizy strukturalnej metodą dyfrakcji rentgenowskiej na pojedynczym kryształ. Doktorantka wskazała na konieczność dalszej optymalizacji warunków badań nad mechanizmami samoorganizacji tych związków. Pani mgr inż. Agnieszka Śliwińska określiła wpływ temperatury na rozpuszczalność cieczy jonowych, badanych chinolonów oraz ich soli w wodzie, etanolu oraz 1-oktanolu. W sumie Doktorantka wyznaczyła 65 diagramów fazowych ciało stałe – ciecz. Wartości liczbowe stężenia i temperatury oraz obliczone współczynniki aktywności zestawiała w formie tablic w *Materiałach uzupełniających* w podrozdziale 3.2. *Punkty eksperymentalne równowag fazowych ciało stałe - ciecz w układach dwuskładnikowych*. Doktorantka pokazała, że nie uzyskała wiarygodnych danych pozwalających na wyznaczenie krzywych rozpuszczalności układów chlorowoderek lomefloksacyny + 1-oktanol oraz norfloksacyna + etanol. Doktorantka zwróciła również uwagę na nietypowy przebieg krzywej liquidus układu norfloksacyna + 1-oktanol, gdzie wzrost temperatury o 5 K skutkował 230-krotnym zwiększeniem stężenia rozpuszczonej norfloksacyny, podczas gdy dla pozostałych układów wzrost stężenia nie przekraczał trzykrotności. Efekt ten krytycznie wyjaśniła powolną sedimentacją fazy stałej, co może wskazywać na niedostateczne rozdzielanie faz

i prowadzenie pomiarów w obecności zawiesiny, a nie roztworu nasyconego. Wskazała na konieczność weryfikacji uzyskanych wyników. Nasuwa się pytanie dlaczego Doktorantka tego nie zrobiła? Do opisu gałęzi likwidusu Autorka zastosowała równanie Apelblata oraz modele oparte na teorii lokalnego składu: Wilsona, NRTL oraz UNIQUAC. W tym miejscu, szczególnie należy docenić trudne i żmudne pomiary równowag fazowych ciało stałe – ciecz układów, w których badane substancje lecznicze takie jak kwas nalidyksowy, norfloksacyna oraz sparfloksacyna charakteryzują się bardzo słabą rozpuszczalnością w wodzie. Słabą rozpuszczalność chinolonów w wodzie Doktorantka wyjaśniła obecnością hydrofobowego układu pierścieniowego w cząsteczkach, z oddziaływaniami π - π między pierścieniami aromatycznymi, tworzeniem wiązań wodorowych w obrębie grup karboksylowych i aminowych oraz zdolnością tworzenia słabo rozpuszczalnych form zwitterjonowych przy pH zbliżonym do fizjologicznego. Podkreśliła, że istotnym czynnikiem jest również zależność rozpuszczalności chinonów od pH, ponieważ w środowisku kwasowym lub zasadowym cząsteczki ulegają jonizacji, co sprzyja oddziaływaniom jon-dipol i prowadzi do wyraźnego wzrostu rozpuszczalności w wodzie i rozpuszczalnikach polarnych. Od charakteru hydrofilowo-lipofilowego leku zależy między innymi sposób jego aplikowania, tak aby odpowiednio dotarł do miejsca działania. Równowaga pomiędzy formą zjonizowaną a niezjonizowaną związku zapewnia odpowiednio rozpuszczalność związku w wodzie i w tłuszczach. Wartość stałej kwasowości pK_a związku pozwala przewidzieć jaka forma będzie dominowała w danym środowisku, gdzie pH zmienia się w zależności np. od części przewodu pokarmowego. Stałe kwasowości pK_a badanych chinolonów wyznaczone zostały w temperaturze 298,2 K oraz 310,2 K metodą Batesa-Schwarzenbacha. W oparciu o dane literaturowe i badania własne Doktorantka pokazała, że pochodne chinolonów z podstawnikiem piperazynowym, takie jak lomefloksacyna, cyprofloksacyna, ofloksacyna i norfloksacyna, charakteryzują trzy etapy dysocjacji kwasowo-zasadowej w roztworach wodnych. Istnieją zatem cztery formy jonowe w zależności od pH: podwójnie protonowana, monoprotionowana, zwitterjonowa oraz całkowicie zdeprotonowana. Wartości pK_{a1} i pK_{a3} odpowiadają kolejnym etapom deprotonacji atomów azotu w grupie piperazynowej, natomiast pK_{a2} zazwyczaj przypisywana jest deprotonacji grupy karboksylowej. Natomiast cynoksacyna oraz flumechina nieposiadające podstawnika piperazynowego charakteryzują

*Ride*

się jedną stałą kwasowości, przypisywaną deprotonacji grupy karboksylowej. Charakteryzując badane związki pod kątem ich potencjalnej aplikacyjności farmaceutycznej Doktorantka woltamperometrycznie określiła profile uwalniania sparfloksacyny i jej 4 pochodnych z matryc lipidowych, scharakteryzowanych metodą niskokątowego rozpraszania rentgenowskiego. Dla bromku trietyloheksyloamoniowego, bromku trietylodecyloamoniowego jak również dla kwasu nalidyksowego i sparfloksacyny oraz wybranych ich soli wyznaczone zostały również wartości stężenia hamującego względem *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 oraz *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Porównując pochodne sparfloksacyny oraz kwasu nalidyksowego, Doktorantka zaobserwowała wyższą aktywność przeciwbakteryjną oraz większą cytotoksyczność pochodnych sparfloksacyny wobec komórek eukariotycznych. Efekt ten wyjaśniła obecnością atomu fluoru w strukturze sparfloksacyny, który zwiększa lipofilowość cząsteczki i ułatwia jej przenikanie przez błony komórkowe. Zbadana została również żywotność linii komórkowej Vero po inkubacji przez 24 h z dodatkiem cieczy jonowych, soli kwasu nalidyksowego lub soli sparfloksacyny. Nie została jednak określona dawka dla której spadek przeżywalności komórek nabłonkowych nerki małpy zielonej *Cercopithecus aethiops* wyniósłby poniżej 50%, co uniemożliwiło wyznaczenie wartości parametru EC50. W części V. *Prezentacja wyników badań*, w każdym podrozdziale zabrakło narracji, która pozwoliłaby łatwiej śledzić zasadność wyboru do badań takich a nie innych związków oraz przeprowadzenia takich a nie innych eksperymentów. Część VI. *Dyskusja oraz wnioski* stanowi 9-stronicowe omówienie najważniejszych wyników uzyskanych w toku realizacji tej niniejszej rozprawy. W kontekście treści zawartych w części VI, część VII. *Podsumowanie* wydaje się być zbyteczna.

Za najważniejsze osiągnięcie należy uznać wybór strategii modyfikacji chinolonów, polegającej na tworzeniu soli z amoniowymi cieczami jonowymi, co skutkuje znacznym zwiększeniem ich rozpuszczalności. W przypadku modyfikacji cieczami jonowymi bez grup hydroksylowych w kationie rozpuszczalność otrzymanych soli amoniowych w wodzie, w temperaturach 298,2 K oraz 310,2 K, wzrosła średnio aż 10 000 razy, w etanolu około 300 razy, a w 1-oktanolu 150 razy w porównaniu do odpowiadających im

Diok

niemodyfikowanych chinolonów. Z kolei sole amoniowe z grupą hydroksylową w kationie charakteryzowały się średnio ponad 20-krotnym wzrostem rozpuszczalności we wszystkich analizowanych rozpuszczalnikach, w temperaturach 298,2 K oraz 310,2 K. Ich rozpuszczalność przewyższała także tę uzyskaną dla odpowiednich soli sodowych. Badania mikrobiologiczne wykazały, że wybrane chinolony po modyfikacji do formy soli amoniowych zachowały, a w niektórych przypadkach wykazały wyższą aktywność przeciwbakteryjną przy jednoczesnym braku wzrostu cytotoksyczności. Zatem, dzięki możliwości celowej modyfikacji struktury cieczy jonowej, możliwe jest zaprojektowanie odpowiednich właściwości substancji biologicznie czynnej do określonych zastosowań terapeutycznych, zarówno w kontekście drogi podania, jak i parametrów kontrolowanego uwalniania leku. Doktorantka dowiodła zatem, że strategia modyfikacji chemicznej substancji biologicznie czynnych, z wykorzystaniem cieczy jonowych, może stanowić obiecującą alternatywę w formulacjach leków nowej generacji, szczególnie w przypadkach, gdzie dotychczasowe strategie poprawy rozpuszczalności okazują się być niewystarczające. Lektura niniejszej dysertacji nasunęła kilka pytań natury ogólnej. Dlaczego jako przedmiot badań wybrane zostały chinolony? Dlaczego do badań biologicznych wybrane zostały *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 oraz linia komórkowa Vero? Na str. 23 czytamy, że do cieczy jonowych II generacji zaliczane są te, cytuję, „o potencjale energetycznym”. Co znaczy „potencjał energetyczny” cieczy jonowych, proszę rozwinąć ten wątek.

Autorka wykazała się starannością przy opracowywaniu tej pracy, wiadomo jednak, że w tak obszernym tekście nie można uniknąć błędów, a jednym z obowiązków recenzenta jest je wskazać. Pozwolę sobie zwrócić uwagę na kilka z nich. Dla przykładu na stronie str. 42 oraz na str. 43 można przeczytać: „Reakcję przeprowadzono... w temperaturze pokojowej...”, w obu przypadkach brakuje informacji w jakiej dokładnie temperaturze. W pracy można znaleźć kilka „literówek”, w tekście pozostawione zostały „sierotki”, a wykresy ilustrujące diagramy fazowe są mało czytelne. Powyższe uwagi nie mają żadnego wpływu na wartość merytoryczną ocenianej rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Śliwińskiej.

Bide



Warta podkreślenia jest krytyczna analiza uzyskanych wyników, jasny opis czego nie udało się zrobić lub wiarygodność których wyników należy zweryfikować. Takie podejście do badań należy stawiać za wzór, gdyż cytując Feynmana: „... jeżeli stworzyliście jakąś teorię i chcecie ją opublikować, powinniście przedstawić ją jak najwszechstronniej, a nie dobierać wyniki w ten sposób, żeby wyglądała korzystnie. Musicie podać wszystkie wyniki.”.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr inż. Agnieszki Śliwińskiej stwierdzam, że postawiony cel pracy został zrealizowany, a uzyskane wyniki mają wartość zarówno poznawczą jak i użyteczną. Zaprezentowane przez mgr inż. Agnieszkę Śliwińską rezultaty stanowią ważny wkład do badań nad projektowaniem związków, w tym leków, o pożądanych właściwościach.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Agnieszki Śliwińskiej stanowi „...oryginalne rozwiązanie problemu naukowego...”, spełniając stawiane pracom doktorskim wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 ze zmianami). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Śliwińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Małgorzata Dziobek

