



Wrocław, 29 grudnia 2025 r.

Dr hab. Katarzyna Ślepokura

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Mehrnaz Khalaji zatytułowanej
„Design, synthesis, and properties of binary systems comprising linezolid”

(tytuł pracy w języku polskim: *„Projektowanie, synteza i właściwości układów binarnych zawierających linezolid”*)

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Dziale Chemii Strukturalnej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi pod kierunkiem dr hab. Marty Dudek, prof. CBMiM. Przedmiotem rozprawy jest inżynieria kokrystalicznych połączeń antybiotyku oksazolidynonowego, linezolidu (LIN). Zakres prac obejmował projektowanie, syntezę i badania strukturalne kokryształów linezolidu, a także badania możliwości ich zastosowania w mezoporowatych krzemionkowych systemach dostarczania leków. W badaniach wykorzystano m.in. rentgenowskie metody dyfrakcyjne, metody jądrowego rezonansu magnetycznego w ciele stałym, obliczenia i metody analizy termicznej. Określanie tendencji supramolekularnych materiałów, w tym farmaceutyków, poprzez otrzymywanie i badanie szeregu ich różnych połączeń krystalicznych, projektowanie i kontrola struktury i właściwości fizykochemicznych, również na drodze kokrystalizacji, są jednymi z najważniejszych zadań współczesnej chemii supramolekularnej i inżynierii kryształu. W ten nurt badań wpisuje się praca doktorska mgr Khalaji, wypełniając lukę w badaniach strukturalnych linezolidu; do roku 2020 w bazie krystalograficznej Cambridge Structural Database zdeponowane były jedynie trzy struktury krystaliczne tego antybiotyku.

Praca doktorska została napisana w języku angielskim. Główna część pracy obejmuje 98 stron tekstu (rozdziały 1-5) i 15 stron spisu prac cytowanych (289 pozycji; rozdział 15). Jednostronicowe rozdziały 6-8 nie są ściśle związane z pracą, dotyczą projektów pobocznych, w które Doktorantka była zaangażowana, i prezentują perspektywy dalszych badań. Rozprawę uzupełniają trójstronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim, podziękowania, spis rysunków (rozdział 9), wykaz dorobku i działalności naukowej (w tym spis publikacji naukowych, wystąpień konferencyjnych, biografia naukowa; rozdziały 10-13), wykaz skrótów stosowanych w pracy (rozdział 14) oraz kopie powiązanych z nią artykułów naukowych (dodatek I) i oświadczenia współautorów tych prac (dodatek II). W pracy nie wydzielono części eksperymentalnej. Rozprawa została napisana w sposób mało zwięzły i ma nieco niestandardowy podział treści w obrębie trzonu pracy. Ponieważ większość wyników uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej została już opublikowana (w artykułach T1-T4), a ich prezentacja w dysertacji ma formę przewodnika po tych publikacjach, proporcje między częścią literaturową a pozostałymi częściami pracy, w tym dyskusją wyników, są nieco zaburzone.

Zasadnicza część pracy podzielona jest na pięć rozdziałów. Pierwszy stanowi pięciostronicowe wprowadzenie (*Introduction*).

Kolejna, najobszerniejsza część pracy (*State of knowledge*; 51 stron) to szczegółowy opis wybranych zagadnień z zakresu kokryształów farmaceutycznych i zastosowania kokrystalizacji

w poszukiwaniu nowych, bardziej efektywnych form znanych leków. Autorka przedstawia tu m.in. (a) metody doboru koformerów, (b) metody otrzymywania kokryształów (w tym odparowanie rozpuszczalnika, krystalizację z zastosowaniem antyrozpuszczalnika, syntezę zawieszinową, mechanochemiczną, krystalizację z cieczy nadkrytycznych, suszenie rozpyłowe i metody wykorzystujące fale akustyczne) oraz (c) metody charakterystyki fizykochemicznej kokryształów (rentgenografię strukturalną monokryształów i dyfrakcyjne metody proszkowe, SC-XRD i PXRD, metody jądrowego rezonansu magnetycznego w ciele stałym, ssNMR, spektroskopię Ramana, metody analizy termicznej – różnicową kalorymetrię skaningową i termogravimetrię, DSC i TG, oraz obliczeniowe). Dyskutuje wpływ kokryształizacji na podstawowe właściwości fizykochemiczne leków, takie jak temperatura topnienia i trwałość, a także na rozpuszczalność i przenikalność przez błony biologiczne, które decydują o dostępności farmaceutycznej leku i – ostatecznie – jego biodostępności. W tej części pracy Autorka omawia też systemy dostarczania leków, ze szczególnym uwzględnieniem mezoporowatych nanocząsteczek krzemionki (MSNs) i sposobów ładowania leków do tych nośników. Za wyjątkowo wartościowe w tej części pracy uważam liczne i ciekawe przykłady zastosowania poszczególnych metod w badaniach układów lek–MSNs, a w szczególności wykorzystania jedno- i dwuwymiarowych technik ssNMR do analizy konformacji, oddziaływań międzycząsteczkowych, stopnia jonizacji, sposobu koordynacji do jonów metali, polimorfizmu, dynamiki molekuł farmaceutyków. Choć ta część pracy stanowi wyczerpujące opracowanie większości zagadnień ułatwiających dalszą lekturę, uważam, że ze względu na tematykę, cel i zakres pracy zabrakło w niej szerszego omówienia:

1. Krystalochemii linezolidu z uwzględnieniem stereochemii, konformacji, oddziaływań międzycząsteczkowych i tendencji supramolekularnych. Ma to szczególne znaczenie w kontekście dwuznaczności względem form III i IV antybiotyku (odmiana trójskośna, grupa przestrzenna *P1*, kody CSD TIYQAU i TIYQAU02; te same zredukowane komórki sieciowe). Ze wstępu dowiadujemy się, że odmiany te, początkowo uważane za różne, ostatecznie okazały się być tożsame. Konformacje dwóch krystalograficznie niezależnych cząsteczek LIN w strukturach TIYQAU i TIYQAU02 są jednak znacząco różne, szczególnie w zakresie orientacji pierścienia morfolinowego względem aromatycznego. Mając na uwadze różne metody, którymi wyznaczono struktury form III i IV (SC-XRD vs PXRD), konieczne jest wskazanie tej właściwej struktury.
2. Przemian form stałych linezolidu, w szczególności charakteru i warunków przemiany fazowej LIN II $\rightarrow$ LIN III (topienie w 155 °C, krystalizacja w 160 °C) oraz zimnej krystalizacji (ok. 80 °C) fazy amorficznej uzyskanej w wyniku schłodzenia stopionego w 180 °C leku. (Na str. 2 podano, że przemiana LIN II $\rightarrow$ LIN III zachodzi w 120-140 °C.)
3. Rozpuszczalności linezolidu i uzasadnienia konieczności jej poprawy w świetle dawkowania i klasyfikacji leku wg systemu klasyfikacji biofarmaceutycznej, BCS. W kilku miejscach w pracy znajdziemy informację, że rozpuszczalność w wodzie LIN jest niska i że wymaga poprawy (str. 2, 59, 75, 79, 82, 93, 95, 97, praca T2), w innym – że biodostępność jest doskonała (T1).

Zaznaczam, że w części wątpliwości te zostały wyjaśnione w pracy T2.

Na kolejnych trzech stronach pracy zdefiniowany jest jej cel (*Objectives of the thesis*). W skrócie można go przedstawić jako opracowanie metod poprawy właściwości fizykochemicznych linezolidu poprzez zaprojektowanie, otrzymanie i zbadanie jego kokryształów oraz ocenę możliwości ich zastosowania w krzemionkowych systemach dostarczania leków. Aby zrealizować tak ambitny cel, przewidziano następujące zadania:

(a) przetestowanie wybranych metod selekcji koformatorów, zaprojektowanie i syntezę mechanochemiczną kokryształów linezolidu, (b) otrzymanie monokryształów uzyskanych połączeń kokrystalicznych i ich analizę strukturalną nakierowaną na opis preferencji supramolekularnych cząsteczki antybiotyku (preferowanych syntonów), (c) określanie struktury połączeń nietworzących odpowiedniej jakości monokryształów przy pomocy ssNMR i obliczeniowych metod przewidywania struktur krystalicznych (CSP) oraz (d) zbadanie możliwości wprowadzania linezolidu i jego kokryształu do nanocząstek krzemionki.

Realizacja większości celów została opisana w czterech pracach opublikowanych w latach 2020-2023 w bardzo dobrych czasopismach o renomie międzynarodowej: *Crystal Growth & Design*, *Acta Crystallographica Section B*, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* oraz *ChemPhysChem* (T1-T4). Publikacje mają od trzech do sześciu autorów, w trzech z nich mgr Khalaji jest pierwszym autorem, a autorem do korespondencji we wszystkich pracach jest Promotor, prof. M. K. Dudek (w dwóch razem z prof. M. J. Potrzebowskiem). Wkład współautorów w powstanie tych prac został udokumentowany oświadczeniami dołączonymi do pracy. Wkład mgr Khalaji, określony każdorazowo przy okazji omawiania poszczególnych publikacji i podkreślony przez pozycję Jej nazwiska na liście autorów (w szczególności w trzech pierwszych publikacjach), dowodzi Jej kompetencji do prowadzenia badań naukowych. Prace wykonane w ramach ostatniego zadania (oznaczone jako T5) nie zostały jeszcze opublikowane.

Dyskusji wyników uzyskanych w efekcie realizacji celów pracy poświęcony jest jej czwarty rozdział (*Results and discussion*). Na 35 stronach krótko omówione są rezultaty badań opisane w pracach T1-T4 oraz szczegółowo przedstawiony jest materiał nieopublikowany (23 strony).

Publikacje T1 i T2 są ściśle ze sobą powiązane i dotyczą projektowania, syntezy mechanochemicznej, otrzymywania monokryształów, badań strukturalnych, właściwości termicznych i rozpuszczalności kokryształów linezolidu. W wyniku przetestowania 19 różnych wstępnie wyselekcjonowanych koformatorów, otrzymano i scharakteryzowano 11 faz kokrystalicznych (w tym 9 nowych) zawierających 10 różnych kwasów benzoowych: 5 bezwodnych (z kwasem benzoowym, **BA**, i z kwasami 2,3-, 2,4-, 2,6- i 3,5-dihydroksybenzoowymi, **2,3-DHBA**, **2,4-DHBA**, **2,6-DHBA** i **3,5-DHBA**) oraz 6 hydratów (z kwasem *p*-hydroksybenzoowym, **PHBA**, kwasami 2,4-, 2,5-, 3,4-dihydroksybenzoowymi, **2,4-DHBA**, **2,5-DHBA**, **3,4-DHBA**, kwasem 3,4,5-trihydroksybenzoowym, tj. galusowym, **GA**, i *p*-aminobenzoowym, **PABA**). Opisano struktury krystaliczne 5 kokryształów: **LIN:BA 1:1**, **LIN:2,6-DHBA 1:1**, **LIN:PHBA:H₂O 1:1:1**, **LIN:3,4-DHBA:H₂O 1:1:0.6** i **LIN:GA:H₂O 1:1:1**. Na ich podstawie przedstawiono typy oddziaływań międzycząsteczkowych, w które angażuje się linezolid w kokryształach, oraz ustalono hierarchię akceptorów wiązań wodorowych, wskazując grupy karbonylowe (amidową i oksazolidynonową) jako najbardziej aktywne. Między innymi, zwrócono uwagę na kontakty między układami aromatycznymi, pomimo – przynajmniej w klasycznym rozumieniu – niesprzyjającej orientacji i dużych (nawet powyżej 6 Å) odległości między środkami pierścieni. Jednocześnie znacznie mniejsze odległości między pierścieniami sąsiednich cząsteczek w kryształach roztworu stałego, opisanym w pracy T4, nie zostały uznane jako przejaw oddziaływań między tymi pierścieniami. (Na marginesie, w kryształach tym można rozważyć występowanie oddziaływań między wolną parą elektronową karboksylowego atomu tlenu a pierścieniem aromatycznym (lp⋯π).) Proszę zatem o zdefiniowanie natury tych oddziaływań, kryteriów geometrycznych ich występowania oraz ich ewentualnej roli w stabilizacji struktury w obecności innych, silnych wiązań wodorowych.

Chcę podkreślić, że pozyskiwanie faz kokrystalicznych w syntezach mechanochemicznych, a także prace przygotowawcze, np. identyfikacja i charakterystyka fizykochemiczna odmian polimorficznych koformatorów i badania ich ewentualnych przemian pod wpływem sił

mechanicznych, zostały przeprowadzone i opisane z dużą starannością. Zbadano wpływ (a) odmiany polimorficznej linezolidu (wskazując mniej trwałą formę III jako bardziej efektywną w kokryształizacji od trwałej formy II), (b) typu (woda, metanol, toluen) i (c) ilości (0.5-56 ekwiwalentów molowych) rozpuszczalnika na przebieg syntezy mechanochemicznej. Zastanawia mnie, dlaczego nie testowano (a) różnych form krystalicznych (odmian polimorficznych, hydratów) wstępnie wybranych koformerów oraz (b) innych stosunków molowych substratów niż 1:1. Postęp kokryształizacji monitorowano przy pomocy metod spektroskopowych, dyfrakcyjnych i termicznych (^{13}C CPMAS NMR, PXRD, DSC i TG). Przedyskutowano skuteczność trzech różnych metod „wirtualnego poszukiwania” kokryształów, tj. metody opartej na komplementarności molekularnej (ang. *Molecular Complementarity*, MC), skłonności do tworzenia wiązań wodorowych (ang. *Hydrogen Bond Propensity*, HBP) oraz mapach molekularnego potencjału elektrostatycznego (ang. *Molecular Electrostatic Potential*, MEP, *Maps*). Wykazano, że w rozważaniach na wstępnie zdefiniowanym zestawie koformerów (ograniczonym pod względem geometrii i tendencji do tworzenia określonych wiązań wodorowych) metoda map MEP jest najskuteczniejsza, podczas gdy metody MC i HBP wykazują większą efektywność na wstępnych etapach selekcji koformerów. W „wirtualnych poszukiwaniach” kokryształów uwzględniono jedną (w HBP) lub 5 różnych (MC i mapy MEP) konformacji linezolidu oraz jedną (MC, HBP) lub wszystkie (mapy MEP) konformacje koformerów. Rozważania uzupełniono obliczeniami, uwzględniającymi wszystkie fazy krystaliczne biorące udział w syntezach mechanochemicznych, które wskazały na energię sieci (tutaj rozumianą jako wkład energii oddziaływań międzycząsteczkowych do całkowitej energii kryształu) jako dodatkowy czynnik selekcji koformerów.

Podstawową metodą kontroli postępu reakcji i identyfikacji odmian polimorficznych koformerów wydaje się być ssNMR, co jest zrozumiałe biorąc pod uwagę tradycje, zainteresowania naukowe i ekspercką biegłość w tym zakresie Promotorki pracy. Ja z pewnością wybrałabym PXRD, szczególnie w przypadku znanych form krystalicznych, dla których istniały modele strukturalne z badań na monokryształach. Metody proszkowe okazały się być szczególnie użyteczne w identyfikacji jednej z sześciu modyfikacji izonikotynamidu czy monohydratu kwasu galusowego oraz w ustaleniu formy kwasu sulfanilowego i jego hydratacji zachodzącej podczas mielenia formy bezwodnej z dodatkiem wody. Wyjątkowo dużo wniośli dla wyjaśnienia oddziaływań składników mieszanin fizycznych BA/4-FBA i BA/PFBA z nośnikiem krzemionkowym MCM-41 oraz procesów w tych mieszaninach zachodzących (badania opisane w pracy T4). Zamiast wskazywać metody spektroskopowe lub dyfrakcyjne jako jednoznacznie lepsze w tej części badań, pragnę podkreślić wyjątkowe korzyści płynące z ich komplementarnego zastosowania w pracy mgr Khalaji. Być może nieco więcej uwagi należało poświęcić danym dyfrakcyjnym podczas identyfikacji formy PHBA. Odmiany oznaczone w bazie CSD jako JOZZIH ($P2_1/a$) i JOZZIH01 ($P2_1/c$, nie $P2_1/n$) są w rzeczywistości tą samą odmianą, dlatego ich dyfraktogramy są identyczne (z wyjątkiem różnic w położeniu linii dyfrakcyjnych wynikających z różnej temperatury pomiarów, odpowiednio 295 i 150 K). Udokładnienie dyfraktogramu eksperymentalnego metodą Rietvelda z pewnością bezsprzecznie by to potwierdziło.

Kilka z otrzymanych kokryształów charakteryzuje temperatura topnienia niższa niż temperatura przemiany fazowej LIN II $\rightarrow$ LIN III, co może stanowić przesłankę do podjęcia prób ich wykorzystania w krzemionkowych systemach dostarczania leków, opisanych w dalszej części pracy. Według Autorki pracy jest 8 takich układów, ja wskazałabym cztery; **LIN:2,6-DHBA** topi się w 162 °C, a **LIN:3,5-DHBA** w 171 °C (pomijam dwa niewielkie efekty endotermiczne na krzywej DSC w ok. 90 i 140 °C), **LIN:2,3-DHBA** i **LIN:2,4-DHBA** topią się

(z rozkładem?) w odpowiednio 142 i 150 °C (pomijam małą anomalię endo na krzywej DSC w 134 °C), dla **LIN:2,4-DHBA:H₂O**, **LIN:2,5-DHBA:H₂O** i **LIN:PABA:H₂O** na krzywych DSC widać tylko dehydratację (?), kolejnych efektów cieplnych nie widać, choć na termogramach widoczne są ubytki masy od ok. 140 °C (pomijam mały efekt endotermiczny na krzywej DSC dla **LIN:2,5-DHBA:H₂O** w 97 °C). Wspomniane niewielkie anomalie na krzywych DSC oraz brak efektów cieplnych przy jednoczesnych dużych ubytkach masy, a także ewentualny rozkład próbek **LIN:2,3-DHBA** i **LIN:2,4-DHBA** podczas topienia (lub tuż po nim) wymagają komentarza (kwestię rozkładu byłoby łatwiej oceniać, gdyby pomiary DSC i TG były wykonane do wyższych temperatur). Ma to szczególne znaczenie w przypadku kokryształu **LIN:2,3-DHBA**, który został wybrany do dalszych badań nad ładowaniem do nośników krzemionkowych. W pracy T1 brakuje dyskusji właściwości termicznych otrzymanych kokryształów (w przeciwieństwie do substratów, które zostały szczegółowo omówione w materiałach dodatkowych do pracy). Ponieważ pomiary DSC wykonano w hermetycznie zamkniętych tyglach, moje obserwacje dla hydratów mogą prowadzić do błędnych wniosków.

Ustalono, że dwa kokryształy rozpuszczają się lepiej niż linezolid, w tym **LIN:3,4-DHBA:H₂O**, którego rozpuszczalność po 24 godzinach jest aż o 43% większa. Zastanawia mnie, czy Doktorantka podjęła próbę odwodnienia tej fazy, o której pisze, że jest hydratem niestechiometrycznym? Jeśli tak, to czy spróbowała ustalić strukturę formy bezwodnej? Czy forma bezwodna ulega rehydratacji? Czy jest jeszcze lepiej rozpuszczalna?

Praca T3 stanowi uzupełnienie prac T1 i T2 w zakresie wyznaczania struktur faz, dla których nie uzyskano monokryształów odpowiednich do badań strukturalnych metodą SC-XRD. Praca prezentuje nowe, eleganckie podejście polegające na połączeniu wysokorozdzielczej spektroskopii ssNMR, dyfrakcji proszkowej (PXRD) i teoretycznego przewidywania struktur krystalicznych (krystalografii NMR) wspomaganych przez skuteczne zawężenie przestrzeni konformacyjnej, co ma szczególne znaczenie w przypadku cząsteczek wykazujących znaczną elastyczność konformacyjną, jak linezolid. Badaniom poddano dwa układy: (a) **LIN:2,3-DHBA 1:1** (strukturalnie podobny do **LIN:2,6-DHBA 1:1** – zarówno na poziomie konformacji cząsteczek, ich najbliższego otoczenia i oddziaływań międzycząsteczkowych, jak i upakowania w kryształ – co stwierdzono na podstawie jedno- i dwuwymiarowych widm NMR oraz dyfraktogramów proszkowych) oraz (b) znacznie bardziej wymagający **LIN:2,4-DHBA 1:1**.

Dla **LIN:2,3-DHBA** przetestowano dwa różne podejścia: (a) bazujące na strukturze **LIN:2,6-DHBA**, w której podstawiono koformer oraz (b) wyznaczenie struktury *de novo* przy pomocy CSP. Co ciekawe, tylko to drugie podejście doprowadziło do wyznaczenia poprawnej struktury krystalicznej, co zostało potwierdzone poprzez porównanie wysymulowanych danych spektroskopowych (w szczególności $\delta(^1\text{H})$ i $\delta(^{13}\text{C})$) i dyfrakcyjnych (położenia linii) z danymi eksperymentalnymi. Jak można wyjaśnić dość znaczne różnice w intensywnościach poszczególnych linii dyfrakcyjnych na eksperymentalnych i wysymulowanych dyfraktogramach proszkowych? Można przypuszczać, że kokryształy **LIN:2,3-DHBA 1:1** i **LIN:2,6-DHBA 1:1** są nie tylko izostrukuralne, ale też izomorficzne. Co Doktorantka sądzi o podjęciu próby wyznaczenia struktury w oparciu o wysokiej jakości dyfrakcyjne dane proszkowe?

Dla **LIN:2,4-DHBA** nie udało się ustalić struktury krystalicznej, ale zaproponowano najbardziej prawdopodobne konformery LIN w tym kokryształ. Ogólny schemat badań obejmował poszukiwanie konformerów na drodze optymalizacji geometrii w fazie gazowej z uwzględnieniem danych zdeponowanych w bazie strukturalnej CSD i więzów strukturalnych założonych na podstawie danych ssNMR (na tym etapie wytypowano 28 konformacji LIN i dwie konformacje 2,4-DHBA), optymalizację modelu, wyliczenie dla niego parametrów NMR i wysymulowanie dyfraktogramu proszkowego oraz porównanie danych NMR i PXRD

z eksperymentalnymi. Zastosowana na wstępnym etapie badań CSP analiza możliwości efektywnego upakowania poszczególnych konformerów LIN zawężyła ich liczbę do 21, znajdujących się w niskoenergetycznym obszarze zbioru przewidywanych struktur krystalicznych. Następnie przeprowadzono optymalizację DFT struktur zawierających przedstawicieli tych konformerów o najniższej energii, w najbardziej popularnych typach grup przestrzennych możliwych dla związków chiralnych ($P2_12_12_1$, $C2$, $P2_1$, $P1$) i policzono dla nich parametry NMR. Stosując dodatkowe ograniczenia, z uzyskanego w ten sposób zbioru 84 modeli o najniższej energii ostatecznie wyselekcjonowano 5 prawdopodobnych konformerów LIN. Wszystkie niskoenergetyczne struktury krystaliczne budowane przez 5 wybranych konformerów LIN (łącznie 122 struktury) zostały poddane optymalizacji geometrii metodą DFT. Ponownie biorąc pod uwagę aspekty energetyczne i zgodność eksperymentalnych i teoretycznych danych ssNMR, wytypowano dwie najbardziej prawdopodobne konformacje LIN obecne w kokryształe **LIN:2,4-DHBA** (z mocnym wskazaniem na jedną z nich), co – chociaż nie zakończyło poszukiwań struktury krystalicznej – uważam za duże osiągnięcie, w szczególności poprzez nakreślenie metodologii prowadzenia badań strukturalnych układów o podobnych właściwościach, tj. mikrokrystalicznych i konformacyjnie niesztynnych.

Ostatnie dwa projekty (praca T4 i materiał nieopublikowany T5) dotyczą badań procesów wprowadzania substancji chemicznych (różnych połączeń kwasu benzoowego, 4-fluorobenzoowego i pentafluorobenzoowego, w tym układów binarnych, kokryształu i roztworu stałego) do porowatych nośników krzemionkowych. W mojej ocenie wkład mgr Khalaji w powstanie pracy T4 był stosunkowo niewielki, dlatego traktuję ją jako projekt poza głównym nurtem pracy doktorskiej, przygotowujący jednak do realizacji dalszych zadań (T5) i dostarczający cennego doświadczenia w zakresie wprowadzania kokryształów do krzemionek. W pracy wykazano m.in., że zarówno skład wprowadzanej substancji, jak i metoda ładowania wpływają na sposób (miejsce) wiązania materiału z nośnikiem oraz sposób, stopień i tempo jego uwalniania. Przy pomocy spektroskopii ssNMR ustalono też, że oddziaływania międzycząsteczkowe obecne w układzie binarnym mogą zostać w mniejszym lub większym stopniu zachowane w nośniku krzemionkowym.

Badaniom wprowadzania linezolidu i kokryształu **LIN:2,3-DHBA 1:1** do nośników krzemionkowych (MCM-41 i SBA-15) poświęcona jest część pracy oznaczona jako T5. Metody ładowania linezolidu, tj. (a) poprzez jego stopienie (TSF, ang. *thermal solvent-free*), metody mechanochemiczne (b) na sucho (MECHANO) i (c) z dodatkiem rozpuszczalnika (MeLo), (d) metoda wspomagana dyfuzją par rozpuszczalnika (DiSupLo, ang. *diffusion-supported loading*) oraz (e, f) dwie, zaprojektowane na potrzeby tej pracy, wspomagane temperaturowo metody mokre (TW1 i TW2, ang. *thermal wet methods*), zostały tak dobrane, żeby przetestować skuteczność przyjaznych środowisku metod bezroztworowych (a, b) i wykorzystujących niewielkie ilości rozpuszczalnika (c, d) oraz metod rozpuszczalnikowych (e, f). Dla wprowadzania kokryształu **LIN:2,3-DHBA 1:1** stosowano metodę TSF. Efektywność ładowania LIN i kokryształu do porów nośnika, towarzyszące zmiany strukturalne, trwałość termiczna wprowadzonych substancji oraz sposób ich wiązania były analizowane przy pomocy PXRD, DSC, TG i spektroskopii Ramana. Choć Doktorantka sama wskazuje na konieczność kontynuacji badań nad oddziaływaniami niekowalencyjnymi, w których uczestniczy uwięziony w krzemionce linezolid, m.in. przy pomocy ssNMR, czy nad rozpuszczalnością i uwalnianiem substancji aktywnej, uważam, że dobór metod jest poprawny i umożliwia kompleksowy opis badanych procesów. Wyjaśnienia wymaga natomiast trwałość kokryształu **LIN:2,3-DHBA 1:1** w warunkach eksperymentu metodą TSF (*vide supra*).

Wykazano, że spośród TSF, MECHANO, MeLo i DiSupLo, metoda TSF jest najbardziej efektywna w stosunku do linezolidu, nie zapewnia jednak 100% wprowadzenia leku do nośnika, a LIN ulega w niej przemianie fazowej z formy II do III. Ostatecznie, według PXRD, najlepsze wyniki i 100% załadowanie leku do SBA-15 uzyskano w metodach mokrych, w szczególności w TW1. Niestety, z powodu zastosowania nieliniowej skali na pionowych osiach zestawień dyfraktogramów (Rys. 4.7-4.11 i 4.15), analiza prezentowanych na nich wyników, z powodu zafałszowania względnych intensywności linii dyfrakcyjnych, może prowadzić do błędnych wniosków. Ustalono, że metoda TW2 zapewnia niewielki wzrost stabilności termicznej LIN uwięzionego w porach nośnika SBA-15. Przebadano sposób oddziaływania resztek nieuwięzionego w porach nośnika linezolidu wprowadzanego metodą MECHANO, uznając, że jest to skuteczny sposób wprowadzania leku do krzemionki. W świetle wyników PXRD i spektroskopii Ramana trudno mi jednoznacznie zgodzić się ze stwierdzeniem, że metoda ta pozwala na skuteczne umieszczenie leku w porach nośnika.

Ponieważ o efektywności wprowadzenia linezolidu do nośnika krzemionkowego wnioskowano na podstawie oceny krystaliczności leku po załadowaniu, kluczowe wydaje się sprawdzenie, czy linezolid krystalizuje w warunkach metod TW, tzn. w wyniku odparowania etanolu z jego roztworu. Nie znalazłam odpowiedzi na to pytanie w pozycji literaturowej [285].

Opis metod TSF, TW1 i TW2 przedstawiony na str. 77 jest niejasny. Wynika z niego m.in., że zawartość linezolidu w mieszaninach LIN/SBA-15, określona jako 10% i 20%, jest na poziomie ok. 9% i 17%. W metodzie TW2 pozostawiano próbkę w temperaturze 5 °C wyższej od temperatury przemiany LIN II → LIN III (str. 77) czy od temperatury topnienia (str. 83)? Wybór temperatury dla linezolidu (7 °C powyżej przemiany fazowej) w metodzie TSF jest niezrozumiały wobec braku szczegółowych informacji o charakterze przemiany LIN II → LIN III (por. str. 2 recenzji).

Dodatkowe pytania/uwagi:

1. Jak na tle możliwości i ograniczeń rentgenowskich technik dyfrakcyjnych (SC-XRD i PXRD), Autorka widzi zastosowanie w swoich badaniach dyfrakcji elektronów?
2. Wyjątkowo problematyczny wydaje się kokryształ **LIN:PHBA:H₂O 1:1:1**. Z opisu eksperymentu w pracy T2 przypuszczam, że był on wielokrotnym bliźniakiem (niemeroedrycznym). Ponieważ, jak sądzę, zarówno zbliźniaczenie, jak i wyjątkowo duży parametr sieci **c**, są przyczyną niepoprawnych elipsoid przemieszczenia, wysokich wskaźników rozbieżności (R_{int} , $R1$, $wR2$) oraz $GooF$, $\Delta\rho_{max}$ i parametru Flacka, ciekawi mnie, czy kryształy były badane w kierunku wykluczenia nisko- i wysokotemperaturowych przemian fazowych (na krzywej DSC widoczna jest niewielka anomalia ok. 130 °C). Dodatkowo, dyfraktogram proszkowy przedstawiony na Rys. 4 w pracy T2 wskazuje na znaczną zawartość nieprzereagowanego linezolidu w formie II. Nie jest jednak widoczny na krzywych DSC (Rys. 13). Czy na Rys. 4 i 13 przedstawiono mieszaninę na tym samym etapie syntezy?
3. Wydaje się, że w kokryształach **LIN:2,6-DHBA** nie ma wiązań wodorowych O—H...O typu 2,6-DHBA...2,6-DHBA, jak pokazano na Rys. 10b w pracy T2 (H...O 2.65 Å, kąt O—H...O 111°). Nie zawarto ich też w Tabeli 2 w pracy T2. Atomy H, choć udokładniane przy użyciu modelu sztywnego unoszenia, odpowiadają maksimum na mapach różnicowych Fouriera, dlatego należy uznać przedstawioną geometrię za poprawną. Co można powiedzieć o zaangażowaniu tych atomów H w międzycząsteczkowe wiązania wodorowe na podstawie wartości przesunięć chemicznych protonów tych grup (przedstawionych w materiałach dodatkowych do pracy T3)?
4. T5: Krzywe DSC dla **LIN:2,5-DHBA:H₂O** i **LIN:PABA:H₂O** (Rys. 4.6) nie odpowiadają tym przedstawionym w pracy T1 (Fig. S12 i S14). Co jest tego powodem?

5. Wykaz skrótów – sortowanie alfabetyczne rozwinięć zamiast skrótów jest mniej przyjazne dla czytelnika.
6. W spisie literatury występują liczne błędy, np. pozycja 3 jest niekompletna, pozycje 229 i 230 są niepoprawne, formatowanie jest niejednorodne (inicjały imion przed lub po nazwiskach autorów, lista autorów pełna lub nie, numery zeszytów umieszczone lub nie, tytuły czasopism w formie pełnej lub skróconej).
7. W pracy zdarzają się niefortunne sformułowania, błędy, i omyłki pisarskie, np. „oxazolidone” zamiast „oxazolidine” albo „oxazolidinone” (str. 65 i dalej), „crystalline structure” zamiast „crystal structure” (str. 72), „...method. and...” (str. 80), „Figure 4.8” zamiast „Figure 4.9” (str. 82) „purple line” zamiast „green line” (str. 83), appendix III i appendix IV (kilkukrotnie w rozdziałach 4.3 i 4.4), „CSP-NMRX” (str. 69) vs „NMR-CPSX” (str. 67, 109), „SXR” zamiast „SCXR” (str. 110), brak spacji między wartością a „°C” (np. 150°C; nagminnie), brak numerów stron w pliku PDF pracy T1, brak konsekwencji, np. „MECHANO” i „MeLo” w T5 to odpowiednio „MeLo” i „MeLo LA” w pozostałych częściach pracy, „2,3DHBA-LIN” w T5 to „LIN:2,3-DHBA” w pozostałych częściach pracy, „nitrogen flow of 50 mL” zamiast „...50 mL/min” (str. 78 i T1), „450 Hz” zamiast „450 rpm” (str. 76), 25 kHz” zamiast „25 Hz” (T2), pominięta stereochemia na Fig. 1 w T1, T2, T3, „1.5406” zamiast „1.5418” ($\lambda_{Cu\ K\alpha}$, T1, T2), „ $P\bar{1}$ ” zamiast „P1” (dla LIN III; T2), „asymmetric unit cell” zamiast „asymmetric unit” (T1), „planes of interacting molecules” zamiast „layers...” (T2), „0.07⁻¹ Å” (T3), „2.214” zamiast „2.124” (Tabela S5, T2), „chiral space groups” o grupach przestrzennych $P2_12_12_1$ i $P2_1$ (T3), „As already mention” (T3). Biorąc pod uwagę obszerność materiału, liczba usterek jest niewielka.

Wnioski końcowe. Rozprawa doktorska Pani mgr Mehrnaz Khalaji dotyczy syntezy, badań strukturalnych, właściwości i zastosowania w krzemionkowych systemach dostarczania leków kokrystalicznych połączeń linezolidu. W zakresie badań strukturalnych, koncentrując się z jednej strony na konformacji i najbliższym otoczeniu cząsteczki, a z drugiej na uporządkowaniu dalekiego zasięgu, praca prezentuje eleganckie połączenie metod spektroskopii NMR w ciele stałym, technik dyfrakcyjnych oraz obliczeń. Praca jest wielowątkowa i interesująca, a uzyskane podczas jej realizacji wyniki zostały zawarte w czterech publikacjach niezależnie cytowanych już blisko 70 razy. Szczególnie chciałabym podkreślić zasługi i sukces Doktorantki w hodowli monokryształów nadających się do dyfrakcyjnych badań strukturalnych. Jest to istotne osiągnięcie, które umożliwiło wgląd w strukturę molekularną i różnorodność oddziaływań międzycząsteczkowych angażujących cząsteczkę linezolidu w jej kokryształach. Mgr Mehrnaz Khalaji prezentuje się jako wszechstronny i pracowity naukowiec. Wyniki badań z zakresu pracy doktorskiej prezentowała w formie referatów i plakatów na sześciu międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych. Jej zaangażowanie w badania niezwiązane bezpośrednio z pracą doktorską zaowocowały współautorstwem trzech kolejnych publikacji.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Mehrnaz Khalaji, zatytułowana „*Design, synthesis, and properties of binary systems comprising linezolid*” („*Projektowanie, synteza i właściwości układów binarnych zawierających linezolid*”) spełnia wymogi i warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* stawiane pracom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej CBMiM PAN o dopuszczenie Pani mgr Mehrnaz Khalaji do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

U. Sheguda