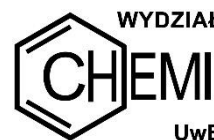




UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU

Wydział Chemii



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎/ fax (+48-85) 738-8086; e-mail: pwalejko@uwb.edu.pl

Dr hab. Piotr Wałęjko, Prof. UwB
Wydział Chemii
Uniwersytet w Białymstoku
ul. K. Ciołkowskiego 1K
15-245 Białystok

Białystok, 30.12.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Mehrnaz Khalaji
„DESIGN, SYNTHESIS, AND PROPERTIES OF BINARY SYSTEMS COMPRISING
LINEZOLID”

(PROJEKTOWANIE, SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI UKŁADÓW BINARNYCH
ZAWIERAJĄCYCH LINEZOLID)

Przedłożona do recenzji rozprawa Pani Mehrnaz Khalaji została wykonana w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem dr hab. Marty Dudek, prof. CBMM, w bardzo dobrym laboratorium, przygotowanym do prowadzenia zaawansowanych badań z wykorzystaniem wysoko rozdzielczej spektroskopii NMR w fazie stałej, oraz metod obliczeniowych dedykowanych do tzw. wirtualnego przewidywania struktur krystalicznych CSP (ang. *Crystal Structure Prediction*). **Praca Doktorantki dobrze wpisuje się w ww. tematykę, ponieważ dotyczy projektowania, charakteryzowania oraz otrzymywania kokryształów Linezolidu (LIN) - antybiotyku o szerokim spektrum działania przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, jak też ich potencjalnym zastosowaniu w systemach dostarczania leków opartych na mezoporowatych nanocząstkach krzemionki MSN (ang. *Mesoporous Silica Nanoparticles*).** Chciałby zaznaczyć, że praca wpisuje się w szerszy kontekst badań związanych z antybiotykoodpornością, pojawiającą się coraz częściej w procesie zwalczania zakażeń bakteryjnych. Problem ten indukuje szereg nowych obszarów badań czy to w zakresie projektowania nowych substancji aktywnych API (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*) jak też w obszarach innowacyjnych systemów dostarczania leków.

Wymieniony w tytule pracy Linezolid jest nowym antybiotykiem z grupy oksazolidonów opracowanym jako alternatywa w leczeniu niektórych rodzajów zakażeń bakteryjnych, które stały się odporne na inne powszechnie stosowane antybiotyki. Znajduje on zastosowanie w leczeniu infekcji wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie takie jak: opornego na metycylinę gronkowca złocistego

MRSA (ang. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*) lub na wankomycynę enterokoki VRE (ang. *Vancomycin-Resistant Enterococci*) oraz powodowane przez bakterie gruźlicy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. W zależności od rodzaju i nasilenia infekcji Linezolid podawany jest w formie tabletek, zawiesin doustnych lub infuzji dożylnych. Zasadniczo jest lekiem dość dobrze tolerowanym. Może jednak powodować problemy żołądkowo-jelitowe, bóle głowy, zmniejszenie liczby płytek krwi, uszkodzenie nerwów poza mózgiem i rdzeniem kręgowym oraz nagromadzenie kwasu mlekowego.

Ograniczona rozpuszczalność w płynach ustrojowych substancji czynnych (API) niejednokrotnie prowadzi do obniżonej biodostępności oraz konieczności stosowania bardzo wysokich dawek. Z uwagi na powyższe prowadzone są badania nad optymalizacją strategii dawkowania, w tym nad formami ciągłego wprowadzania API do organizmu również z wykorzystaniem stosowanych przez Doktorantkę mezoporowatych nanocząstek krzemionki MSN (ang. *Mesoporous Silica Nanoparticles*).

Kluczowym aspektem dysertacji jest zastosowanie kompleksowego podejścia do otrzymywania kokryształów zawierających Linezolid. Autorka w umiejętny sposób połączyła wyniki eksperymentalne (mechaniczna kokrysztalizacja) z metodami obliczeniowymi CSP (ang. *Crystal Structure Prediction*). Ponadto uzyskane kokryształy w wyczerpujący sposób scharakteryzowała metodami dyfrakcji rentgenowskiej, spektroskopii NMR w ciele stałym oraz za pomocą analiz termicznych. Warto podkreślić wykorzystanie innowacyjnego podejścia w analizie faz mikrokryształicznych łączącego techniki NMR i CSP. W końcowej fazie badań Autorka opracowała strategię wprowadzania Linezolidu i jego kokryształów do krzemionki sugerując, że modyfikacja leku poprzez kokrysztalizację może zwiększyć efektywność dostarczania samego Linezolidu. **Z uwagi na powyższe podjęty przez Doktorantkę temat badawczy uważam za uzasadniony zarówno z perspektywy badań podstawowych, jak i zastosowań praktycznych.**

Recenzowana praca została przygotowana w języku angielskim i jest oparta na cyklu publikacji (prace T1-T4) oraz nieopublikowanych danych eksperymentalnych (rozdział 4.5) dotyczących prac nad wbudowywaniem Linezolidu i jego kokryształów do MSN (ang. *Mesoporous Silica Nanoparticles*). **Na podkreślenie zasługuje fakt, że jest to spójny zbiór tematyczny całościowo opisujący problemy pojawiające się podczas otrzymywania kokryształów jak też w procesie ich upakowywania.**

Pomimo że rozprawa została przygotowana w postaci zbioru publikacji, jest ona dość obszerna i liczy 126 stron. Pracę poprzedza krótkie streszczenie nakreślające obszary badań i cele pracy. Wstęp literaturowy liczy 50 stron (rozdział 2.xx) i w zwięzły sposób opisuje metody otrzymywania kokryształów w tym wykorzystywane przez Doktorantkę metody *Neat Grinding* oraz *Solvent-Drop*

Grinding. Przedstawiono najważniejsze z narzędzi predykcyjnych stosowanych do przewidywania struktur kokryształów, wyboru koformeru i identyfikacji potencjalnych czynników mogących wpływać na właściwości docelowej cząsteczki leku. Następnie Autorka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące projektowania „inteligentnych” systemów dostarczania leków DDS (ang. *Drug Delivery System*), podkreślając znaczenie i istotę tego typu badań. Część teoretyczną zamyka rozdział 2.6 zawierający krótki opis różnorodnych metod stosowanych do charakterystyki otrzymywanych kokryształów w tym: pomiarów X-ray, eksperymentów 1D i 2D SSNMR, analiz termicznych oraz technik łączących pomiary NMR z CSP (ang. *Crystal Structure Prediction*).

Następna część rozprawy (rozdział 4.x, 43 str.), w której Autorka omawia wyniki badań własnych, jest podzielona zgodnie z materiałem umieszczonym w artykułach T1- T4 opublikowanych w lata 2020 - 2023. Ta część badań to przykład przemysłanego, dobrze zaplanowanego i konsekwentnie zrealizowanego projektu naukowego. Systematyczne i kompleksowe badania przeprowadzone przez Autorkę pozwoliły na uzyskanie założonego celu – otrzymanie kokryształów Linezolidu oraz ich lokowania w mezoporowym materiale krzemionkowym. Całość pracy uzupełniona obszerny spis literaturowy (289 pozycji) oraz opis działalności naukowej doktorantki, która oprócz wspomnianych czterech prac (T1-T4) jest jeszcze pierwszym autorem w trzech innych, niewchodzących w skład rozprawy. Dodatkowo wyniki prac związanych z tematem pracy doktorskiej prezentowała na sześciu konferencjach.

Przedstawione w pracy wyniki badań oceniam bardzo wysoko. Opracowane metodologie otrzymywania kokryształów oraz przewidywania ich składu i właściwości wnoszą znaczący wkład w ten obszar wiedzy. Chciałem podkreślić, że publikacje T1-T4 publikacje zostały już poddane szczegółowej ocenie recenzentów i wydawców w renomowanych wydawnictwach (T1 - *Crystal Growth and Design*; T2 - *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*; T3 – *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*; T4 – *ChemPhysChem*) co już jest samym w sobie dobrą rekomendacją co do jakości przedstawionych w pracy badań. Można jedynie dyskutować nad deklarowaną jako nieopublikowaną pracą T5 zawierającą dane dotyczące doboru odpowiednich warunków do wbudowywania Linezolidu i jego kokryształu z kwasem 2,3-dihydroksybenzoesowym w mezoporowych materiałach krzemionkowych.

Wiodącą rolę Doktorantki w prowadzonych badaniach potwierdzają załączone do dysertacji stosowne oświadczenia. Na ich podstawie mogę jednoznacznie stwierdzić, że była ona współtwórcą koncepcji badań, wykonywała większość eksperymentów oraz analiz. Odpowiadała również za przygotowanie materiałów uzupełniających do publikacji oraz przygotowanie wybranych części manuskryptów T1-T4.

Z obowiązku recenzenckiego, chciałbym się jedynie odnieść do stopnia realizacji założonych celów oraz zaproponować jako temat do dyskusji pewne przemyślenia, które nasunęły mi się podczas lektury pracy. Co do celów pracy to były one dość szerokie i zakładały między innymi: ocenę i porównanie użyteczności trzech metod obliczeniowych w wyborze koformerów dla Linezolidu tj. metody komplementarności molekularnej (MC), skłonności do tworzenia wiązań wodorowych (HBP) oraz map elektrostatycznego potencjału molekularnego (MEP). Ponadto opanowanie procesu mechanochemicznej syntezy wybranych kokryształów Linezolidu oraz zbadanie zachowania układów modelowych podczas wprowadzania do porów krzemionki (MSN).

Należy podkreślić, że Autorka musiała przeprowadzić bardzo systematycznie badania, uzyskując dużą liczbę danych eksperymentalnych. Dzięki czemu określiła wpływ na proces krystalizacji czasu mielenia oraz rodzaju i ilości dodanego rozpuszczalnika. W przypadku analizy kokryształów polikrystalicznych Doktorantka zastosowała nowatorskie podejście do określania struktury – metodę hybrydową, łączącą wysokorozdzielczą spektroskopię NMR w ciele stałym z metodami obliczeniowymi pozwalającymi na przewidywanie struktur krystalicznych CSP (ang. *Crystal Structure Prediction*). Uzyskane dane, zostały dodatkowo skonfrontowane z wynikami syntez mechanochemicznych, co pozwoliło na oszacowanie ich precyzji oraz opracowanie szerszej strategii wyboru odpowiedniego koformeru spośród strukturalnie podobnych związków.

Co do treści pracy chciałbym jedynie przedyskutować takie kwestie jak:

1. Dane literaturowe wskazują, że tylko co czwarty z przebadanych kokryształów (27,7%) wykazuje niższą temp. topnienia w porównaniu do temp. topnienia czystych składników. Czy opracowane przez Doktorantkę podejście podnosi znacznie „współczynnik sukcesu”? O ile się nie mylę, badano 19 koformerów, z czego otrzymano 11 a w 8 przypadkach temp. topnienia była niższe od temp. przejścia fazowego obserwowanego dla Linezolidu z formy ortorombicznej (II) do metastabilnej trójskośnej (III). Natomiast co do rozpuszczalności w wodzie to znaczący jej wzrost o 43% obserwowano tylko dla jednego kokryształu (LIN: kwas 3,4-dihydroksy benzoesowy: H₂O) i 10% dla LIN z kwasem benzoesowym. Zatem jaka jest efektywność stosowanego podejścia?

2. Analizując doniesienia patentowe, napotkałem sporo informacji na temat różnych krystalicznych form Linezolidu: forma I, II i III (US7718799B2, *Crystalline form of linezolid*), forma IV (US20060142283A1, *Crystalline form IV of linezolid*) jak też o jego formach amorficznych i hydratách. Co prawda Autorka wskazuje na pewne zamieszanie co do nomenklatury form Linezolidu, ale czy nie byłoby celowym wykorzystanie w badaniach jego innych form? Niekiedy formy amorficzne API wykazują lepszą biodostępność. Zastanawiam się, czy ładowanie termiczne

(ang. *Thermal Solvent Free*) z wykorzystaniem innych form prowadziłyby do równie ciekawych rezultatów, jak opisane w pracy?

3. Uważam, że zastosowana metoda syntezy kokryształów może mieć problemy ze skalowalnością. Metoda mielenia na sucho (ang. *Neat Grinding*), jak i wspomagana cieczerw (ang. *Liquid Assisted Grinding*) to mało skalowalne, energochłonne metody dające niejednokrotnie produkty o niskiej czystości. Ponadto otrzymywanie kokryształów do pomiarów X-Ray wymagało zarodkowania, a niestechiometryczna hydratacja wydaje się dość trudna do kontrolowania (np.: LIN: kwas 3,4-dihydroksy benzoowy: H₂O zawierał od 0,45 do 1,25 H₂O na molekułę LIN). Czy przy ewentualnym zwiększaniu skali nie należałoby wykorzystać metody takie jak: suszenie rozpyłowe (ang. *Spray Drying*) lub wersji „eko” z wykorzystaniem ciekłego CO₂?

4. W odniesieniu do efektywności metody MC (ang. *Molecular Complementarity*) zauważyłem, że pomimo niedopasowania np.: pomiędzy Linezolidem a kwasem 3,4-dihydroksy benzoowym odpowiednie kokryształy powstają. Natomiast w przypadku u Ibuprofenu mamy sytuację odwrotną wyniki MC są obiecujące, a kryształów nie otrzymano. Co może być tego przyczyną?

5. Podobnie zastanawiający jest brak korelacji pomiędzy energią stabilizacji a rozpuszczalnością. Przykładowo kokryształy LIN: kwas 2,6-dihydroksy benzoowy nie były lepiej rozpuszczalne pomimo posiadania najwyższej energii stabilizacji. Wydaje się, zatem że nie wszystkie istotne czynniki zostały uwzględnione. Przykładowo podczas krystalizacji zmienia się dynamika pierścienia Linezolidu, co wpływa na energie stabilizacji. Czy nie należałoby w obliczeniach uwzględnić np.: zmian entropii układu?

6. W odniesieniu do dalszych perspektyw badań to zabrakło mi informacji o ewentualnych badaniach dotyczących uwalniania Linezolidu z kokryształów osadzonych w nośnikach krzemionkowych. Czy tego typu badania były prowadzone, czy są dopiero planowane?

7. Co do aspektów edytorskich pracy to z mojego punktu widzenia śledzenie tekstu ułatwiłoby umieszczenie we wstępie czytelnego schematu ze wzorami opisywanych w tekście kwasów benzoowych i ich symbolami (podobnego do znajdującego się w pracy T1, Tabela 1). Poza tym zgodnie z zaleceniami IUPAC przedrostki orto-, meta- para- powinny być pisane kursywą.

Przedstawione uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy. Uważam, że Autorka z powodzeniem zrealizowała cele pracy. Na zakończenie chciałbym podkreślić, że praca

stanowi spójne, wieloetapowe podejście do przedstawionego problemu badawczego, które łączy zaawansowane modelowanie komputerowe (opisane w pracy T1), inżynierię materiałową w stanie stałym (mechanochemia, prace T1-T3) oraz nanotechnologię (MSN, prace T4-T5). **Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Z pełnym przekonaniem składam do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie mgr. Mehrnaz Khalaji do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**