



Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Farmacji Fizycznej i Bioanalizy
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

dr hab. n. farm. Dariusz Maciej Pisklak

Tel.: (+48 22) 57 20 950

E-mail: dpisklak@wum.edu.pl

Warszawa, 24.01.2026 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Dariusza Boczara zatytułowanej
"Otrzymywanie formy leku o polepszonych właściwościach fizykochemicznych
na przykładzie antybiotyku z grupy cefalosporyn V generacji"**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Narodowym Instytucie Leków, której promotorem pracy jest dr hab. n. farm. Katarzyna Michalska. Stanowi ona spójny i monotematyczny cykl czterech przedstawionych poniżej publikacji:

1. **D. Boczar**, K. Michalska*. Cyclodextrin Inclusion Complexes with Antibiotics and Antibacterial Agents as Drug-Delivery Systems—A Pharmaceutical Perspective. *Pharmaceutics* 2022, 14, 1389.
2. **D. Boczar**, K. Bus, K. Michalska*. Study of Degradation Kinetics and Structural Analysis of Related Substances of Ceftobiprole by HPLC with UV and MS/MS Detection. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15252.
3. **D. Boczar**, K. Michalska*, Investigation of the Affinity of Ceftobiprole for Selected Cyclodextrins Using Molecular Dynamics Simulations and HPLC. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 16644.
4. **D. Boczar***, W. Bocian, J. Sitkowski, K. Pioruńska, K. Michalska*. Development of a Cyclodextrin-Based Drug Delivery System to Improve the Physicochemical Properties of Ceftobiprole as a Model Antibiotic. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 5953.

Prace te zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, indeksowanych w bazie JCR. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) publikacji wchodzących w skład cyklu wynosi 20,8, co odpowiada 520 punktom MNiSW. We wszystkich pracach doktorant jest pierwszym autorem, zaś w ostatniej z nich również jest autorem korespondencyjnym. Świadczy to o kluczowej roli doktoranta w realizacji cyklu badawczego.

Narastająca oporność bakterii na antybiotyki stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Szczególnym problemem są patogeny wielolekooporne, takie jak *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę (MRSA) czy *Streptococcus pneumoniae* o obniżonej wrażliwości na penicyliny. W odpowiedzi na to zagrożenie opracowano nowe cefalosporyny o poszerzonym spektrum działania, wśród których szczególne miejsce zajmuje ceftobiprol. Ceftobiprol jest antybiotykiem β -laktamowym V generacji, zaprojektowanym tak, aby łączyć skuteczność wobec bakterii Gram-dodatnich opornych na leczenie oraz zachować aktywność wobec wybranych patogenów Gram-ujemnych. Niestety ze względu na ograniczoną rozpuszczalność oraz stabilność lek ten stosowany jest wyłącznie w postaci podania donaczyniowego w formie proleku. Celem pracy było otrzymanie nowej formy leku dla cefobiprołu jako substancji modelowej; jednak w mojej ocenie zakres badawczy zrealizowany w ramach dysertacji znacznie przekracza ten zadeklarowany w doktoracie. W ramach realizowanego projektu badawczego doktorant opracował również nową metodę oznaczania ceftobiprołu oraz jego produktów rozpadu z wykorzystaniem techniki HPLC/UV. Dodatkowo oznaczył stabilność ceftobiprołu w aspekcie hydrolizy kwasowo-zasadowej oraz degradacji oksydacyjnej i fotodegradacji, jak również zidentyfikował i określił struktury jego poszczególnych produktów rozpadu.

Przedstawiona do oceny rozprawa złożona jest ze składającego się z 70 stron autoreferatu oraz załączonego do niego cyklu czterech prac, w tym trzech prac oryginalnych i jednej przeglądowej. We wstępie autor przedstawiał problem narastającej oporności bakterii na antybiotyki oraz ograniczenia terapeutyczne wynikające z niekorzystnych właściwości fizykochemicznych substancji czynnych. Omówił znaczenie cyklodekstryn jako nośników leków oraz mechanizm tworzenia kompleksów inkluzyjnych. Uzasadnił również wybór ceftobiprołu, jako substancji modelowej wynikającej z jego wysokiej aktywności biologicznej a utrudniającą jego zastosowanie niską rozpuszczalnością oraz ograniczoną stabilnością. Rozdział trzeci zawiera opisy zastosowanych metod badawczych, obejmujących chromatografię cieczową HPLC/UV, spektrometrię mas LC-MS/MS oraz techniki spektroskopowe NMR i ATR-FTIR. Przedstawiono również metody badań stabilności chemicznej ceftobiprołu oraz procedury otrzymywania kompleksów metodą liofilizacji. Opisano również zastosowane metody obliczeniowe, w tym dokowanie molekularne i symulacje MD. Główna część autoreferatu to rozdziały czwarty i piąty stanowiące omówienie i dyskusję wyników oraz podsumowanie cyklu publikacji, w których w sposób bardzo spójny i klarowny zostały przedstawione wyniki oraz wnioski wynikające z poszczególnych prac wchodzących w skład dysertacji. Wstępem do cyklu prac wchodzących w skład niniejszej dysertacji jest wyjątkowo rozbudowana i rzetelnie napisana publikacja przeglądowa (1), gdzie autorzy przeanalizowali ponad 200 publikacji naukowych dotyczących

otrzymanych kompleksów cyklodekstryn z antybiotykami. Liczba ta świadczy o ogromnym nakładzie pracy jak również gruntownym przygotowaniu literaturowym doktoranta do realizacji podjętej tematyki. Pozwoliło to na odpowiedni wybór API - cefobiprołu dla której nie było prowadzonych wcześniej tego typu badań. W kolejnej publikacji (2) doktorant opracował i zwalidował selektywną metodę HPLC/UV oraz przeprowadził szczegółowe badania stabilności chemicznej ceftobiprołu, identyfikując trzynaście dotąd nieopisanych produktów degradacji i produktów ubocznych syntezy, z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS. W ramach badania stabilności wykazał wysoką podatność ceftobiprołu na degradację w środowisku zasadowym, utleniającym i pod wpływem promieniowania UV oraz względnie wysoką stabilność w środowisku kwasowym. Wyniki te wskazały, że względu na stabilność API, wybór środowiska kwaśnego jako najbardziej korzystnego dla tworzenia kompleksów z β -cyklodekstryną. W ramach kontynuacji badań (publikacja 3) doktorant zastosował metody symulacji MD do oceny struktury oraz stabilności kompleksów API z wybranymi cyklodekstrynami i na tej podstawie wyselekcjonował sulfobutylowy eter β -cyklodekstryny (SBE- β -CD) jako optymalną cząsteczkę gospodarza. Uwieńczeniem cyklu jest praca 4 w której doktorant otrzymał kompleksy oraz potwierdził ich obecność technikami spektroskopowym DOSY NMR oraz FTIR. W kolejnym etapie zbadał ich rozpuszczalność oraz stabilność. W ramach prowadzonych syntez autor wykorzystał pięć różnych kwasów w celu uzyskania odpowiedniej wartości pH roztworu, przy czym tylko w przypadku zastosowania kwasu maleinowego uzyskany kompleks charakteryzował się wymaganą stabilnością oraz odpowiednią rozpuszczalnością. W ocenie całościowej cyklu publikacji na szczególne podkreślenie zasługuje konsekwentne, wieloetapowe podejście badawcze, łączące analizę literaturową, badania eksperymentalne i metody obliczeniowe a zakończone otrzymaniem nowej formy leku, co bez wątplenia świadczy o dojrzałości naukowej doktoranta.

Z obowiązku recenzenta chciałbym również przedstawić pytania, uwagi oraz sugestie natury merytorycznej które nasunęły mi się w trakcie czytania dysertacji:

- Analizując zamieszczone w dysertacji publikacje nasunęło mi się pytanie dotyczące publikacji 2, w przypadku degradacji zasadowej zidentyfikowano trzy produkty rozpadu, jednak na rysunku 6 (wykresie kinetyki degradacji zasadowej ceftobiprołu) sumaryczne stężenie analizowanych składowych w czasie nie jest zachowane, czy jest to wynik obecności jakiegoś nie zidentyfikowanego produktu rozpadu lub może jest to efekt wytracania się w analizowanym roztworze któregoś z tych produktów. Podobną sytuację można zauważyć w przypadku analizy produktów degradacji oksydacyjnej (ODP - Fig 8).

- W przypadku prowadzonych symulacji MD warto by rozważyć czy kompleks CBP-CD nie może tworzyć układów o stosunku molowym 1:2, o ile w przypadku kompleksów z podstawionymi cyklodekstrynami rozbudowana struktura podstawników utrudniać może powstawanie tego typu układów, o tyle warto przeanalizować taka możliwość w przypadku niepodstawionych cyklodekstryn.

- Czy w odniesieniu do oceny stabilności prowadzonych symulacji MD doktorant wyznaczał parametry RMSD i RMSF?

- W przypadku oceny wkładu entropowego, ze względu na wysoką dynamikę konformacyjną cyklodekstryny, a tym bardziej jej podstawionych pochodnych, zamiast podejścia NMA warto by zastosować metody PMF lub TI/FEP.

- W publikacji 4 w załączniku na rysunku S3 zostało zamieszczone widma ROESY NMR kompleksu, jest to jedna z podstawowych technik stosowanych do określenia struktury typu host-guest, czy ich interpretacja pozwoliła na określenie budowy kompleksu CBP-SBE- β -CD?

- Czy w uzyskanej w etapie końcowym formie leku badana była zawartość kwasu maleinowego, ponieważ w widmie ^1H NMR występuje sygnał pochodzący od tego kwasu?

- W celu oceny możliwości potencjalnego zastosowania otrzymanych kompleksów w farmakoterapii warto by ocenić ich aktywność przeciwbakteryjną.

W mojej ocenie przedstawione powyżej uwagi nie wpływają w sposób istotny na wysoki poziom badań naukowych przedstawionych w niniejszej dysertacji.

Autoreferat został napisany poprawnym językiem naukowym. Styl rozprawy jest klarowny i spójny, a wywód prowadzony w sposób logiczny i uporządkowany. Doktorant właściwie posługuje się terminologią specjalistyczną, zachowując jednocześnie wysoką przejrzystość tekstu. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo dobra redakcja językowa, jak i również edytorska pracy. W trakcie lektury autoreferatu napotkałem drobne błędy o charakterze technicznym oraz pewne nieścisłości językowe, które przedstawiam poniżej:

- Na rysunku 2 w podpisie angielskie sformułowanie „or” zamienione powinno być na polskie „lub”

- Sformułowanie „Aby reakcja chemiczna przebiegała z rozsądną szybkością, temperatura układu powinna być odpowiednio wysoka” (str. 21) - nie bardzo wiadomo co oznacza rozsądna szybkość reakcji.

- Sformułowanie „ich odpowiedzi w UV są zbliżone” (str. 36) wydaje się że lepiej by było zastąpić np. charakteryzują się podobnym kształtem linii w widmie UV.

- Sformułowanie „substancji pokrewnych” (str. 43) warto zamienić na np. związków będących produktami degradacji.

W autoreferacie zabrakło mi informacji na temat pozostałej aktywności naukowej doktoranta, jak uczestnictwo w konferencjach, wygłoszone wykłady czy pozostałe publikacje, które nie zostały włączone w cykl dysertacji. Analiza w bazie Research Gate wykazała, że doktorant jest również współautorem 5 publikacji naukowych nie wchodzących w skład cyklu, opublikowanych w czasopismach indeksowanych w bazie JCR w latach 2020 - 2025, co potwierdza jego wysokie zaangażowanie naukowe. Co warto podkreślić, jedną z nich (Boczarski, D.; Bocian, W.; Małek, K.; Milczarek, M.; Laudy, A.E.; Michalska, K. *Physicochemical Characterisation of Ceftobiprole and Investigation of the Biological Properties of Its Cyclodextrin-Based Delivery System*. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 12108) opublikowaną w grudniu 2025r. bez wątpienia można uznać za kontynuację tematyki podjętej w doktoracie, w której między innymi zostały opublikowane wyniki dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz cytotoksyczności kompleksu ceftobiproflu z SBE- β -CD i potwierdziły zbliżoną aktywność przeciwbakteryjną do ceftobiproflu co świadczy, że uzyskany w ramach pracy doktorskiej kompleks inkluzyjny z powodzeniem może znaleźć zastosowanie w farmakoterapii.

Podsumowując, recenzowaną rozprawę wyróżnia spójna, jak i również istotna z punktu widzenia naukowego, tematyka badawcza. Jednocześnie otrzymana w pracy nowa forma farmaceutyczna ceftobiproflu charakteryzuje się potencjałem do zastosowania w farmakoterapii co stwarza możliwości aplikacyjne uzyskanej formułacji. Zawarte w recenzji uwagi oraz drobne błędy techniczne i językowe nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy. W mojej opinii rozprawa doktorska Pana mgr. Dariusza Boczarskiego spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim przez właściwą ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym. Dlatego też wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Leków o dopuszczenie mgra Dariusza Boczarskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wysoki poziom zrealizowanych badań oraz wysokie wartości współczynników naukometrycznych prac opublikowanych w ramach dysertacji prac wnoszę o wyróżnienie rozprawy.



Pisklak Dariusz Maciej

