



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Głęba pt. „Chemiczne modyfikacje kazeiny
w kapsułkowaniu czynników aktywnych biologicznie”**

Promotor: Prof. dr hab. Janusz Boratyński

Od wielu lat obserwuje się rosnące zainteresowanie podawaniem leków oraz czynników biologicznych w postaci związanej z nośnikami. Dotyczy to na równi podawania dożylnego, naskórnego jak i doustnego. Powód takiego działania jest prosty, zamknięcie leków w nośnikach poprawia ich farmakokinetykę, zmienia biodystrybucję i zwiększa biodostępność. W przypadku podania doustnego obserwuje się zwielokrotnienie biodostępności podanej dawki leku, wydłużenie czasu wchłaniania (a tym samym wydłużenie farmakokinetyki leków) oraz ochronę wielu leków i witamin przed drastycznymi warunkami panującymi w środowisku układu pokarmowego. Wydaje się, że obecnie w przypadku większości leków stosuje się jakieś formy spowolnionego uwalniania tak aby lepiej wykorzystać potencjał związany z cząsteczkami leczniczymi.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Tomasza Głęba wpisuje się w nowoczesne trendy kapsułkowania leków i czynników biologicznych w celu uzyskania dodatkowych efektów biologicznych. W przypadku recenzowanej rozprawy zastosowano naturalną kazeinę z mleka jako czynnik tworzący matrycę, w której można zamykać różne leki, witaminy a nawet bakteriofagi. Ostatnio obserwuje się rosnące zainteresowanie białkami jako czynnikami przenoszącymi leki. Do znanych przykładów należy preparat Abraxane[®] który jest kompleksem paklitakselu oraz albuminy stosowany w leczeniu niektórych typów nowotworów. W przypadku recenzowanej rozprawy Pan mgr Tomasz Głęba wykorzystał naturalną zdolność do formowania miceli i wyższych agregatów przez kazeinę aby wytworzyć nośnik o spowolnionym uwalnianiu dla wybranych leków modelowych takich jak:

ibuprofen, paracetamol, loperamid oraz dla witamina K2, kwas alfa liponowy. Opracowano także nośnik dla bakteriofaga T4. Dla wymienionych substancji i cząstek wirusa wykonano szereg badań które stanowią większość część rozprawy.

Oceniana rozprawa liczy 107 stron. Rozprawę rozpoczyna stosunkowo obszerny „Wstęp” opisujący właściwości biologiczne i fizykochemiczne kazeiny i jej zastosowania. Dużą część „Wstępu” poświęcono przygotowaniu i produkcji nano- i mikronośników kazeinowych. Dzięki temu można dowiedzieć się w jaki sposób budowa kazeiny umożliwia wiązanie lub skompleksowanie licznych cząsteczek biologicznie aktywnych umożliwiające jej praktyczne zastosowanie. Ta część pracy zawiera sporo schematów, rycin oraz tabel ułatwiających zrozumieć potencjał kryjący się w tej wydawałoby się zwyczajnej cząsteczce. W tym rozdziale omawiane są także zastosowania nanonośników kazeinowych w dożylnym podawaniu leków przeciwnowotworowych oraz różne chemiczne modyfikacje kazeiny umożliwiające tworzenie mieszanych nośników. Przy okazji warto zauważyć, że „Wstęp” nie ogranicza się do opisu kazeiny jako nośnika leków czy witamin ale pokazuje całe (także historyczne) spektrum wykorzystania przemysłowego tego białka. Generalnie rozdział ten wskazuje na ogromny potencjał tej cząsteczki białkowej. Czytając tą część pracy widać, że doktorant porusza się bardzo dobrze w zagadnieniach związanych z biologią, biochemią, oraz technologią kazeiny. W tej części zabrakło nieco szerszego spojrzenia na zagadnienia związane z doustnym podawaniem leków i innych substancji biologicznie aktywnych – np. porównania nośnika kazeinowego z innymi nośnikami by pokazać jego zalety i potencjalne ograniczenia. Można było dokładniej przedstawić przypuszczalny proces uwalniania leków, regulacje tego procesu oraz jak proces kapsułkowania wpływa na spowolnienie ich uwalniania oraz biodostępność.

Kolejna część pracy to rozdział „Wyniki i Dyskusja”. Zdecydowano się tu na równoczesne omawianie wyników oraz ich dyskusję co nie jest częstym zwyczajem ale pozwala łatwiej oceniać uzyskiwane wyniki. Podczas pracy badawczej w pierwszej kolejności doktorant zajął się immobilizacją fagów T4 w sferach kazeinowych metodą wytrącania. Tą część badawczą rozpoczyna krótki rozdział poświęcony bakteriofagom, który mógłby stanowić część właściwego „Wstępu”. Do wytrącania kazeiny z kazeinianu sodu w celu produkcji sfer wybrano jony kilku metali ziem alkalicznych. Najsilniejszą precypitację powodował Bar, jednakże nie jest to metal który można bez obaw stosować w tego typach preparatach. Ostatecznie wybrano wapń jako czynnik strącający kazeinę, który naturalnie występuje jako składnik miceli kazeinowych. Podczas badań zoptymalizowano proces tworzenia sfer (precypitacji kazeiny) testując SDS, glicerol i etanol jako czynniki ułatwiające

stworzenie się sferycznych struktur pozbawionych pęcherzyków gazów i defektów. Badania z udziałem bakteriofagów wymagały stosowania sterylnej aparatury i materiałów, a w tym kazeiny. Aby uzyskać sterylny preparat badano warunki sterylizacji kazeiny gdyż to zagadnienie nie zostało w pełni do tej pory opracowane i brak było dostępnej wiedzy. Kazeinę poddawano działaniu promieniowania UV-C, ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego oraz łącznemu działaniu wymienionych czynników. Zastosowano również naświetlanie kazeiny wiązką przyspieszonych elektronów i sterylizację w autoklawie. W wyniku przeprowadzonych badań doktorant stwierdził, że tylko autoklawowanie próbek lub ich naświetlanie wiązką elektronową o przy dawce promieniowania ≥ 10 kGy skutkuje skuteczną sterylizacją. Metody te miały różny wpływ na kazeinę, przy czym większą stabilność zaobserwowano dla sterylizacji wiązką elektronów. Po autoklawowaniu kazeiny zaobserwowano pojawianie się w obrazie elektroforetycznym agregatów białkowych o dużej masie cząsteczkowej

Następnie przygotowano bakteriofagi, które immobilizowano w sterylnej kazeinie. Uzyskano bardzo wysoką wydajność immobilizacji, w granicach 82%. Uzyskane wyniki zostały bogato przedyskutowane, jednakże zabrakło dyskusji na temat czy zastosowanie tego typu sfer rzeczywiście zapewniłoby ochronę dla bakteriofagów biorąc pod uwagę, że w doświadczeniach nie wyprodukowano hartowanych cząstek kazeinowych zdolnych przetrwać kontakt z enzymami trawiennymi żołądka. W opisywanych badaniach zabrakło także testu trawienia w warunkach zbliżonych do spotykanych w soku żołądkowym. Pozwoliłoby to być może odpowiedzieć na pytanie jaki byłby los zimmobilizowanych fagów. Czy doktorant mógłby przedyskutować tą kwestię podczas publicznej obrony doktoratu? Należy tutaj jednak dodać, że innych w badaniach dotyczących kapsułkowania bakteriofagów wielokrotnie stosowane były polimery pochodzenia naturalnego, w tym alginian i białka serwatki. Nie stosowano natomiast jak dotąd nośników na bazie kazeiny. Jest to więc pierwsze tego typu badanie.

Kolejnym ciekawym zagadnieniem, którym zajął się doktorant było zamykanie a raczej wiązanie niskocząsteczkowych leków. Jak już napisano doktorant wybrał kilka modelowych leków takich jak przeciwzapalne paracetamol i ibuprofen oraz przeciwbiegunkowy loperamid. Wybór tych leków zapewne nie był przypadkowy a ich wiązanie w micelach kazeinowych pozwoliłoby na ich spowolnione uwalnianie i potencjalnie mniejsze działania niepożądane. Ponieważ kazeina wykazuje naturalne powinowactwo do substancji hydrofobowych spodziewano się stosunkowo wysokich wydajności kapsułkowania. W badaniach użyto również labilną i hydrofobową witaminę K2 (K2 MK-7)

oraz hydrofobowy kwas alfa liponowy. W tym przypadku na szczególne zainteresowanie zasługuje witamina K₂, która zgodnie z ostatnimi badaniami powinna być ważnym składnikiem naszej diety (ochrona przed osteoporozą, zwapnieniami naczyń krwionośnych oraz zakażeniami wirusem SARS-CoV-II) jednakże charakteryzująca się niską stabilnością w większości dostępnych preparatów czy suplementów. Z tego powodu otrzymanie jej stabilnej postaci jest ważnym zadaniem. W przypadku badań nad wymienionymi substancjami wykorzystano zarówno odtłuszczoną jak i nieodtłuszczoną kazeinę. Etanolowe roztwory leków wkrapiano do roztworu kazeiny co pozwalało na tworzenie ich kompleksów z białkiem a następnie stosując różne czynniki powodowano precypitację kazeiny i po odmyciu badano ilość związanych leków lub witamin. Zastosowana metoda pozwoliła na skuteczne skompleksowanie leków z kazeiną jednakże w przypadku ibuprofenu i paracemalolu uzyskane wyniki zdaniem recenzenta nie pozwalają na komercjalizację rozwiązania. Dużo ciekawiej sprawa wygląda dla Loperamidu, który stosowany jest w niższych, 2 miligramowych dawkach. W Przypadku tego leku zastosowanie kompleksowania z kazeiną mogłoby umożliwić wytworzenie wartościowego preparatu o przedłużonym uwalnianiu, co biorąc wskazania leku byłoby bardzo przydatne. Moim zdaniem najbardziej (z praktycznego punktu widzenia) wartościowy wynik uzyskano dla witaminy K₂ MK-7. Otrzymano tu stosunkowo wysokie wartości skompleksowana witaminy z hydrofobowymi fragmentami kazeiny, a biorąc pod uwagę jej niskie dawkowanie całkowicie wystarczające dla komercyjnego zastosowania. Co ważniejsze osiągnięto tu bardzo wysoką stabilność co jest szczególnie ważne dla tej labilnej substancji. Stabilność badano w komorach klimatycznych o różnej wilgotności powietrza (2%, 11%, 56% i 98%). Do badań wybrano różne zakresy czasowe, a na uwagę zasługuje wynik uzyskany dla 6-cio miesięcznego przechowywania dla nieodtłuszczonej kazeiny – dla sfer kazeinowych uzyskanych metodą strąceniową przez kwas cytrynowy i askorbinowy uzyskano blisko 100% stabilność tej witaminy w 40-60% wilgotności powietrza. Wynik stabilności uzyskany w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej należy traktować jako znakomity.

Ostatnim elementem badań były prace nad uzyskaniem stabilnej formy kwasu alfa liponowego w macierzy kazeinowej. W tym przypadku posłużono się chemicznym sprzężaniem kwasu z resztami bocznymi aminokwasów. W celu skoniugowania kwasu liponowego z kazeiną posłużono się reakcją acylacji opartą o użycie aktywnego estru N-hydroksysukcynoimidu (NHS). Aktywne estry NHS są elektrofilami, które mogą łatwo reagować z nukleofilowymi grupami aminowymi tworząc stabilne wiązania amidowe.

Mimo skomplikowanej analizy uzyskanych wyników trudno ostatecznie stwierdzić czy proces tworzenia koniugatów przebiegł zgodnie z przewidywaniami, choć należy stwierdzić, że prawdopodobnie zaszedł biorąc pod uwagę to, że mamy do czynienia ze stosunkowo prostą reakcją. Prawdopodobnie powstały koniugaty o bardzo wysokiej masie cząsteczkowej. Generalnie wyniki wskazują na to, że koniugacja najlepiej zachodzi w środowisku zasadowym, a jej skuteczność spada wraz z pH środowiska reakcji. W środowisku kwaśnym reakcja zachodzi tylko w przypadku stosowania wysokich stężeń aktywnego estru kwasu α -liponowego. Doktorant zauważył także, że „wyniki sugerują także, że dializa beztlenowa prowadzi do powstawania cząsteczek o masie molekularnej większej niż w przypadku dializy tlenowej. Być może warunki tlenowe promują nagłe utlenianie grup sulfhydrylowych, które prowadzi do powstawania mostków disiarczkowych między grupami zlokalizowanymi w niewielkiej odległości, czego efektem jest utworzenie się mostków wewnątrzpeptydowych. Takie mostki nie prowadzą do powstawania cząsteczek obdarzonych wysoką masą molekularną. Dializa beztlenowa z kolei mogłaby prowadzić do bardziej stabilnego utleniania grup sulfhydrylowych i rozciągnięcia tego procesu w czasie, co w konsekwencji prowadziłoby do utworzenia większej ilości mostków międzypeptydowych dając wielcząsteczkowe produkty”. Ta część pracy jest złożona i wymagałaby dalszych badań w celu bezwzględnego stwierdzenia co zostało otrzymane. Niezależnie od tego uzyskane koniugaty mogą mieć zdaniem doktoranta duże znaczenie praktyczne. Generalnie dyskusja uzyskanych wyników i ich drobiazgowo analiza świadczy o przygotowaniu merytorycznym doktoranta i zasługuje uwagę.

Na końcu pracy znajduje się krótkie podsumowanie i wnioski oraz rozdział „Materiały i Metody” w którym opisano drobiazgowo stosowane urządzenia i procedury. Ta część rozprawy została w mojej opinii dobrze opisana i przygotowana. Mam jednak kilka pytań do niektórych opisywanych eksperymentów. Podczas oceniania skuteczności sterylizacji kazeiny badano czystą kazeinę, biorąc pod uwagę fakt że do produkcji leków czy nawet suplementów diety potrzebny jest sterylny lub niemal sterylny preparat czy kompleksowane leki mogły by mieć wpływ na stabilność kazeiny podczas procesu sterylizacji? Proszę o kilka zdań komentarza.

Czy podczas badania kompleksowania leków z kazeiną nie dochodziło do precypitacji leków po mieszaniu ich etanolowych roztworów z roztworem kazeiny oraz czy podczas strącania kazeiny różnymi czynnikami mogło dochodzić do strącania mikrokryształów tych leków co pozornie zwiększałoby wydajność ich kompleksowania przez kazeinę. Czy podczas prac badano kwestię precypitacji leków oraz ich krystalizację?

Rozprawę kończy spis literatury. W pracy zacytowano 287 pozycji źródłowych. Większość to nowe lub stosunkowo nowe publikacje co dobrze świadczy o przygotowaniu doktoranta i orientowaniu się w bieżącej literaturze z badanego obszaru.

Generalnie prace oceniam dobrze. W niektórych badaniach brakuje nieco ich kontynuacji lub rozszerzenia jednakże pozwalają one na zorientowanie się czy wybrany kierunek poszukiwań naukowych jest poprawny. Uzyskane wyniki są w sporej części nowe lub nowatorskie i mogą mieć praktyczne wykorzystanie. Biorąc pod uwagę badania nad witaminą K2 można uważać, że droga do utworzenia stabilnego suplementu – a więc i komercjalizacji rozwiązania jest otwarta. W mojej opinii o wartości ocenianej pracy świadczy także dyskusja poszczególnych etapów badań. Dyskusja jest ciekawa i bogata. Doktorant zna wiele badań nad kazeiną i innymi polimerami i potrafi się w nich łatwo poruszać. Literatura z której czerpał doktorant jest bogata i w dużej części bieżąca.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wszelkie wymogi ustawowe określone w Rozporządzeniu MNiSZW z dnia 30 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r, poz. 261) oraz w świetle przepisów wprowadzających ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669), dlatego wnioskuję do wysokiej Rady ds. Nadawania Stopni Naukowych i Stopni w Zakresie Sztuki Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana Długosza w Częstochowie o dopuszczenie Pana mgr Tomasza Głęba do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

