

Ocena rozprawy doktorskiej

"Funkcjonalne warstwy β -laktoglobuliny wołowej jako perspektywiczne nośniki leków"

wykonanej przez mgr inż. Sylwię Świątek

w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera,
Polskiej Akademii Nauk w Krakowie



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Zaprojektowanie i wytworzenie celowanych nośników leków, czyli takich nośników, które skutecznie i wybiórczo transportowałyby substancje czynne do tkanek i narządów poddawanych leczeniu, jest wyzwaniem współczesnej farmakoterapii i medycyny spersonalizowanej. Jest wiele strategii opracowywania celowanych nośników, od poszukiwania w przyrodzie makromolekuł (cząsteczek białek, kompleksów białkowo-lipidowych), mikroksułek lipidowych i polisacharydowych, po syntezę niewystępujących w przyrodzie związków i czaścetek wykorzystywanych w nanośnikach (nanorurki grafenowe, dendrymery). Z punktu widzenia przyszłych zastosowań klinicznych, biokompatybilne i biodegradowalne nośniki leków mają największe potencjalne zastosowania, ze względu na ich kontrolowaną dystrybucję w organizmie i ograniczoną akumulację. Zatem poszukiwanie nowych zastosowań dla znanych w przyrodzie biomakromolekuł, na przykład do docelowego i kontrolowanego dostarczania leków, jest wyzwaniem dla współczesnej farmakochemii, inżynierii materiałowej i biofizyki, także innych dyscyplin naukowych. W te współczesne trendy nanomedycyny wpisuje się tematycznie i metodologicznie praca doktorska wykonana przez panią mgr inż. Sylwię Świątek pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Barbary Jachimskiej (prof. IKiFP) zatytułowana „*Funkcjonalne warstwy β -laktoglobuliny wołowej jako perspektywiczne nośniki leków*”.

Beta-laktoglobulina (β -laktoglobuliny - LGB) jest białkiem serwatkowym i stanowi 0,2-0,4% wagowych mleka odfuszczonego, co stanowi ok 10% całkowitego białka mleka. Rola biologiczna β -laktoglobuliny wynika głównie z jej właściwości wiązania czaścetek hydrofobowych takich jak retinol, wit. D₃ (choć to nie jest jej główna rola), w związku, z czym stanowi ważny składnik żywieniowy mleka. Rola biologiczna LGB nie jest do końca poznana, jedną z bardziej intrygujących właściwości jest działanie normalizujące funkcję śródbłonna naczyń peptydów pochodzących z enzymatycznej proteolizy LGB. Działanie poprzez efekt hamujący aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I, czyli ma działanie hipotensyjne. Postuluje się też właściwości antybakteryjne, antywirusowe i antynowotworowe LGB.

Biorąc pod uwagę powyższe właściwości LGB, jej potencjalne wykorzystanie, jako nośnika leków jest możliwe i bardzo pożądane.

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowski

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków



UNIWERSYTE
JAGIELLOŃSK
W KRAKOWI

Celem rozprawy doktorskiej pani **mgr inż. Sylwii Świątek** była charakterystyka fizykochemiczna LGB wołowej, optymalizacja procesu adsorpcji na powierzchni złota oraz weryfikacja układu w kontekście zastosowania LGB jako nośnika leku. Mimo, że struktura LGB i jej właściwości oligomeryzujące są znane od lat 80-tych i 90-tych, kiedy to jej fizykochemiczne właściwości w roztworach wodnych były do tej pory nieznane lub słabo opisane.

Aby zrealizować tak wyznaczone cele, Doktorantka podjęła się badań stosując odpowiednio dobrane metody i techniki badawcze: dynamicznego rozpraszania światła (DLS), ruchliwości elektroforetycznej oraz spektroskopii UV-Vis do oceny promienia hydrodynamicznego cząsteczki, potencjału Zeta oraz punktu izoelektrycznego w celu zbadania właściwości agregacyjnych i tworzenia form oligomerycznych LGB. Ponadto zastosowanie techniki mikrowagi kwarcowej z monitorowaniem dyssypacji energii (QCM-D) i pomiar napięcia powierzchniowego, co pozwoliło na charakterystykę warstw i orientacji cząsteczek LGB z uwzględnieniem stopnia hydratacji i efektywności procesu adsorpcji i desorpcji. Określono także stałą wiązania leku (chlorowoderek tetrakainy), potencjał zeta dla kompleksu z lekiem w celu optymalizacji warunków tworzenia kompleksów, z uwzględnieniem przejścia Tanforda, które decyduje o ekspozycji centrum wiązania ligandu. Ponadto Doktorantka zastosowała w swej pracy techniki modelowania struktury cząsteczki LGB w zadanych warunkach pH i porównała wyniki z danymi eksperymentalnymi.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów zostały opublikowane w 4 artykułach oryginalnych, w renomowanych czasopismach:

1. Jachimska B, **Świątek S**, Loch JI, Lewiński K, Luxbacher T. Adsorption effectiveness of β -lactoglobulin onto gold surface determined by quartz crystal microbalance. *Bioelectrochemistry*. 2018 Jun;121:95-104 (IF:3,789)
2. Kurpiewska K, Biela A, Loch JI, **Świątek S**, Jachimska B, Lewiński K. Investigation of high pressure effect on the structure and adsorption of β -lactoglobulin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018 Jan 1;161:387-393 (IF:3,997)
3. **Świątek S**, Komorek P, Jachimska B. Adsorption of β -lactoglobulin A on gold surface determined in situ by QCM-D measurements. *Food Hydrocolloids*; 2019:91:48-59. (IF:5,089)
4. **Świątek S**, Komorek P, Turner G, Jachimska B. β -Lactoglobulin as a potential carrier for bioactive molecules. *Bioelectrochemistry*. 2019 Apr;126:137-145 (IF:3,789)

o łącznym współczynniku oddziaływania IF wynoszącym **16,664**, przy czym w 2 pracach Doktorantka **mgr inż. Sylwia Świątek** jest pierwszym autorem

Do załączonych artykułów zostały przedstawione zgody odpowiednio wszystkich współautorów opisujący udział Doktorantki **mgr inż. Sylwii Świątek**

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

w publikacjach potwierdzający znaczący wkład naukowy w przygotowaniu wymienionych publikacji.

Zbiór artykułów poprzedza „Przedmowa” zawierająca spis złożonych do Rozprawy doktorskiej artykułów, „Wykaz skrótów i symboli” oraz „Komentarz do rozprawy doktorskiej” złożony z 5 części : „Celu pracy” „Tezy pracy” „Metod eksperymentalnych” „Omówienia prac wchodzących a skład rozprawy doktorskiej”. Zdaniem Recenzentki układ nie jest typowy i odbiega od przyjętych konwencji. Na przykład w treści „Przedmowy” oprócz listy załączonych publikacji powinny znaleźć się informacje dotyczące okoliczności powstania załączonych prac: miejsca wykonywania badań, opis charakteru współpracy naukowej jaka przyczyniła się do ich powstania, w tym informacje o finansowaniu badań, opiece naukowej Promotora. Co prawda, te wszystkie znajdują się w Rozprawie, jednak konwencja przedmowy wymaga takiej poszerzonej formuły. Teza pracy jest sformułowana jak cel pracy, a powinna mieć charakter twierdzenia, nie zadania badawczego, choć w treści merytorycznej oba mogą mieć wspólne odniesienie, jakim jest poznanie właściwości fizykochemicznych LBG. Te uwagi nie umniejszają wartości naukowej Rozprawy doktorskiej, której znaczenia zostało potwierdzone w załączonych do Rozprawy publikacjach.

Opis metod eksperymentalnych jest treściwy, zważywszy, że w każdej z załączonych publikacji opis metod występuje, Doktorantka uniknęła powtórzeń i skupiła się na krótkim wprowadzeniu i opisanu zasad wykorzystywanych metod. W opisie brakuje odniesienia się do ograniczeń stosowanych metod, i dostosowania ich do konkretnego przypadku oddziaływania LGB z chlorowodorkiem tetrakainy. W tej części Doktorantka wymieniła elektroforezę kapilarną jako jedną z zastosowanych metod, której recenzentka nie doszukała się z załączonych pracach. Brakuje uzasadnienia wyboru tertrakainy jako modelowego leku. W rzeczywistości tertrakaina stosowana jest jako anestetyk zewnętrzny do znieczuleń miejscowych a nie ogólnoustrojowych i wykorzystanie LGB jako nośnika powinno być tej części uzasadnione. Brak jest też w części metodycznej opisu metody modelowania



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiej

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

struktury LGB, które to stanowią istotną treść załączonych do Rozprawy prac. Te informacje podniosłyby wartość „Komentarza” jako uzupełnienia do prac.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe przedstawione w Rozprawie a zawarte w załączonych publikacjach potwierdzają właściwości LGB pokazujące wykorzystanie cząsteczki białka jako potencjalnego nowego nośnika leków i przyczyniają się do rozwoju stanu wiedzy na temat biogennych nośników leków i ich potencjalnych zastosowań:

W części publikacji 1 i 2

1. wyjaśniają na podstawie opisanych właściwości fizykochemicznych (np. efektywny ładunek cząsteczki) zdolność LGB do tworzenia różnych form oligomerycznych i agregatów;
2. opisują właściwości adsorpcyjne LGB do powierzchni złota i korelują te właściwości z siłą jonową i pH, pozwalając na określenie optymalnej orientacji LGB w zadanych warunkach;
3. opisują zmiany konformacyjne LGB w zadanych warunkach wysokiego ciśnienia, które miały wpływ na zmianę punktu izoelektrycznego cząsteczki LGB, efektywność adsorpcji i orientację na powierzchni złota bez istotnej zmiany promienia hydrodynamicznego

W części publikacji 3

4. określają orientację, cząsteczki izoformy A białka LGB na powierzchni złota, stopień hydratacji warstwy
5. opisują indukowane adsorpcją do złota zmiany konformacyjne i zmiany struktury II-rzędowej cząsteczki

W części publikacji 4

6. wyznaczają stałą wiązania kompleksu LGB-ligand, potencjału Zeta dla białka natywnego i skompleksowanego
7. opisują energię wiązania LGB-ligand w formie protonowanej i nieprotonowanej
8. opisują specyfikę wiązania ligandu do LGB do kieszeni β -baryłki dokumentując zmiany konformacyjne związane z przejściem Tanforda w pH w zakresie 7,1.

Powyższe wyniki wyjaśniają dlaczego zmiany właściwości fizykochemicznych (hydrofobowość i agregacja) determinują aktywność biologiczną LGB (wychwyt LGB przez komórki linii THP-1 makrofagów) w większym stopniu niż na przykład modyfikacja biochemiczna (glikozylacja), co zostało ostatnio opublikowane (Deng Y et al. Food Res Int. 2019;120:102-113). Szczególnie publikacja nr 4 (Świątek S et al. β -Lactoglobulin as a potential carrier for bioactive molecules. Bioelectrochemistry. 2019 Apr;126:137-145) stanowi



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Institut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Lucja Stepień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

istotny wkład w rozwój wiedzy w tym obszarze, a wiodący udział Doktorantki **mgr inż. Sylwii Świątek** w tej publikacji dowodzi o dojrzałości naukowej i opanowaniu warsztatu badawczego.

Na koniec, co jest warte podkreślenia, Doktorantka umieściła spis dorobku własnego, który obejmuje oprócz wymienionych 4 publikacji stanowiących podstawę Rozprawy doktorskiej, kolejne 5 publikacji w czasopismach ze współczynnikiem oddziaływania IF:8,978 oraz 25 doniesień konferencyjnych. W dorobku własnym Doktorantka też wymieniła wyróżnienie i 2 nagrody na konferencjach krajowych.

Podsumowując moją ocenę stwierdzam, że rozprawa stanowi cykl wartościowych i nowatorskich publikacji naukowych z zakresu biochemii fizycznej opisujących właściwości białka β -laktoglobuliny wołowej, jako potencjalnego nośnika leku.

W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera, Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani **mgr inż. Sylwii Świątek** do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplina nauki chemiczne, w myśl obowiązującej ustawy

Dr hab. n. med. Ewa Łucja Stępień

Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiej

Zakład Fizyki Medycznej

Kierownik Zakładu

Ewa Łucja Stępień
dr hab. n. med. prof. UJ
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

tel. sekr. 12 664 46 40
bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków