

Streszczenie w języku polskim.

Modyfikacja procesu agregacji i fibrylacji insuliny przez dendrymery

Insulina jest hormonem polipeptydowym, który reguluje poziom glukozy we krwi. Zaburzenia w produkcji lub działaniu insuliny prowadzą do wzrostu stężenia glukozy we krwi i w konsekwencji do rozwoju cukrzycy. Jedynym znanym lekiem, który pozwala na normalne funkcjonowanie osobom chorym na cukrzycę jest insulina.

Trudności związane z leczeniem cukrzycy wynikają między innymi ze zmian zachodzących wewnątrz struktur insuliny. Brak stabilności białka indukuje wiele problemów podczas jego produkcji, magazynowania, a także podawania. Zmiany zachodzące w cząsteczce insuliny mogą powodować odpowiedź immunologiczną organizmu, a także utratę funkcji biologicznych białka. W przypadku długotrwałej insulinoterapii obserwuje się również powstawanie złogów amyloidowych w miejscach iniekcji.

Dendrymery, w tym dendrymery poliamidoaminowe (PAMAM), są dobrze zdefiniowanymi polimerami o charakterystycznym kulistym kształcie i wielkości kilku nanometrów. Te nanocząsteczki mają wiele właściwości i zastosowań. Celem moich badań w ramach rozprawy doktorskiej było sprawdzenie, czy dendrymery mają wpływ na natywną cząsteczkę insuliny, a także czy mogą modyfikować proces jej agregacji i fibrylacji.

Sprawdzenia, jaki wpływ na insulinę mają dendrymery, dokonano wykorzystując takie metody jak skaningowa kalorymetria różnicowa, dynamiczne rozpraszanie światła i wygaszanie fluorescencji. Zastosowanie spektrofluorymetrii z sondą ANS (kwas 8-anilino-1-naftalenosulfonowy), spektropolarymetria dichroizmu kołowego i spektrofotometrii dało możliwość sprawdzenia czy dendrymery przeciwdziałają agregacji insuliny wywołanej ditiotreiolem redukującym mostki disiarczkowe. Sprawdzone również czy dendrymery mają wpływ na proces powstawania fibryli insulinowych. W tym celu zastosowano spektrofluorymetrię ze znacznikiem fluorescencyjnym tioflawiną T, transmisyjną mikroskopię elektronową, a także mikroskopię sił atomowych.

Wyniki badań uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

- oddziaływania pomiędzy dendrymerami i insuliną mają charakter elektrostatyczny,
- dendrymery PAMAM w badanych stężeniach nie powodowały agregacji insuliny,

- zastosowanie niskich stężeń dendrymerów PAMAM (0,001-0,1 $\mu\text{mol/l}$) tylko częściowo ochrania cząsteczkę insuliny przed agregacją i fibrylacją,
- zastosowanie różnych metod badawczych pozwoliło zaobserwować brak efektu stężeniowego, nie znaleziono jednego stężenia dendrymerów, które efektywnie chroniłoby cząsteczkę insuliny przed zmianami.

Przeprowadzone badania miały na celu sprawdzenie czy dendrymery PAMAM mogą być stosowane w charakterze czynnika zapobiegającego agregacji i fibrylacji insuliny w procesie jej przechowywania i podawania osobom chorym. Pozwoliłoby to wtedy na wykorzystanie ich w przemyśle farmaceutycznym podczas przygotowywania preparatów.

Streszczenie w języku angielskim

Modification of the insulin aggregation and fibrillation processes by dendrimers

Insulin is a polypeptide hormone which regulates level of glucose in the blood. Troubles in the production or action of insulin lead to an increase in blood glucose and, consequently, to the development of diabetes. There is only one known drug that allows for the normal functioning of people with diabetes - it is insulin. However, despite many years since its discovery, the treatment of diabetes, which has become one of the most serious and most common diseases of civilization is still a big challenge. Changes in insulin structure during administration and storage cause problems in the treatment of diabetes and storage of the drug.

Lack of stability of the protein induces a lot of problems during manufacturing, storage and administration. Changes in insulin molecule can cause immunological response in the patients. Problems also arise in case of long term insulin treatment when amyloid deposits appear in the place of injection.

Dendrimers have many properties and applications. Polyamidoamine dendrimers (PAMAM) are well defined polymers of globular shape and nanometer dimensions.

The aim of my study was to check, if dendrimers affect the native insulin molecule and whether they can protect insulin against aggregation and fibrillation.

To investigate the influence of dendrimers on insulin I used the differential scanning calorimetry (DSC), dynamic light scattering (DLS) and fluorimetric methods. I studied whether the dendrimers can protect insulin against aggregation induced by a reducing

agent dithiotreitol (DTT) which reduces insulin disulfide bridges. It was measured by the ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid) fluorescence, circular dichroism (CD) and spectrophotometric methods. I also checked the effect of dendrimers on insulin fibrillation process. Insulin fibrillation was monitored by ThT fluorescence and visualization of insulin fibrils was observed by the transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM).

The results of my work allowed to formulate several conclusions:

- interactions between dendrimers and insulin are mainly of electrostatic character,
- PAMAM dendrimers did not induce insulin aggregation in studied concentrations,
- low concentrations of PAMAM dendrimers (0.001-0.1 $\mu\text{mol/l}$) only partially protected insulin molecule from aggregation and fibrillation,
- different research methods used in this study clearly showed the absence of the dependence between dendrimers' concentrations and their protective effect against insulin structural changes.

The aim of my studies was to check if polyamidoamine dendrimers can be used as agents protecting insulin against aggregation and fibrillation which constitutes a big problem at storage and dosing. The positive answer to this question would suggest using dendrimers in pharmaceutical industry during preparation of medicaments, however the results of my work did not bring the definite solution to this problem.

Olga Nowacka