



Prof. dr hab. Halina Kleszczyńska

Wrocław, 30 listopada 2015 r.

Ocena
rozprawy doktorskiej mgr Olgi Nowackiej
pt.: "Modyfikacja procesu agregacji i fibrylacji insuliny przez dendrymery"

Podjęte w ramach pracy doktorskiej badania uważam za ważne, ponieważ mogą przyczynić się do poprawy, jakości leczenia diabetyków insulino-zależnych. Cukrzyca jest uznana za chorobę cywilizacyjną, na którą choruje coraz więcej osób i jak wykazują liczne badania, jej przyczyną są nie tylko zaburzenia układu trawiennego, w tym zaburzenie pracy trzustki, czy skłonności do jej dziedziczenia, ale ważną przyczyną rozwoju cukrzycy jest stres. Odpowiednie, skuteczne leczenie cukrzycy, której nie można wyleczyć, ma duże znaczenie dla poprawy, jakości życia ponad 300 milionów ludzi na świecie, w tym około dwa i pół miliona osób w Polsce.

Doktorantka w swojej pracy doktorskiej zwraca uwagę na ważny fakt, dotyczący diabetyków insulino-zależnych, których leczenie polega na iniekcyjnym wprowadzeniu do organizmu insuliny. Może ona nie spełniać swojej roli z dwóch powodów. Po pierwsze może stracić swoje właściwości, tym samym aktywność biologiczną, w wyniku agregacji i fibrylacji, a po drugie z powodu powstawania złogów amyloidowych w miejscach iniekcji, może w mniejszych ilościach wnikać do organizmu. W związku z tym mgr Olga Nowacka w swojej pracy doktorskiej podjęła się zbadać, czy nanocząstki, jakimi są dendrymery poliamidoaminowe mogą mieć wpływ na proces agregacji i fibrylacji cząsteczek insuliny, ograniczając go, lub zapobiegając jego powstawaniu.

Celem rozprawy doktorskiej pt.: "Modyfikacja procesu agregacji i fibrylacji insuliny przez „dendrymery”, pani mgr Olgi Nowackiej jest zbadanie wpływu dendrymerów na insulinę, oraz na procesy jej agregacji i fibrylacji.

Rozprawę doktorską stanowią cztery, wymienione niżej publikacje, do których dołączyłam krótki opis badań w nich zawartych. Są to oryginalne prace twórcze o charakterze doświadczalnym, które zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się na liście „A” Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i ujęte w Journal Citation Reports.

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU

KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław

tel. /fax (071) 320 51 67

e-mail: fizyka@up.wroc.pl

1. Nowacka O., Milowska K., Belica-Pacha S., Palecz B., Siposova K., Gazova Z., Bryszewska M. (2015) Generation-dependent effect of PAMAM dendrimers on human insulin fibrillation and thermal stability. *Int. J. Biol. Macromol.* DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.029.

W pracy tej zbadano wpływ dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) różnych generacji na stabilność termiczną i fibrylację ludzkiej insuliny. Przy użyciu różnicowej kalorymetrii skaningowej zbadano wpływ temperatury na stabilność tej insuliny. Technika ta pozwoliła wyznaczyć dwa przejścia fazowe insuliny, zachodzące w temperaturach 60 °C i 82 °C. W obecności dendrymerów o stężeniu 0,6 μmol/l, zaobserwowano tylko drugie, ale intensywniejsze przejście fazowe. Otrzymane wyniki pozwoliły wywnioskować, że w obecności dendrymerów dimery insuliny w roztworze przekształciły się w heksamery. W pracy tej określono też wpływ dendrymerów poliamidoaminowych na fibrylację insuliny na podstawie badań fluorymetrycznych z użyciem sondy ThT, oraz przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego, a także mikroskopu sił atomowych dokonano wizualizacji fibryli insuliny. Wyniki tych badań wykazały, że dendrymery modyfikują fibrylację insuliny, która silnie zależy od generacji dendrymerów i od ich stężenia w odniesieniu do insuliny, a także zapobiegają tworzeniu się złogów amyloidowych.

2. Nowacka O., Milowska K., Bryszewska M. (2015) Interaction of PAMAM dendrimers with bovine insulin depends on nanoparticle end-groups. *J. Lumin.* 162, 87–91.

Przeprowadzone w tej publikacji badania dotyczą oddziaływań między dendrymerami (PAMAM) z różnymi grupami funkcyjnymi znajdującymi się na ich powierzchni (-COOH, -NH₂, -OH) a insuliną wołową. Badania zostały wykonane metodą fluorymetryczną, poprzez monitorowanie procesu gaszenia emitowanej fluorescencji oraz pomiar potencjału zeta. Wpływ dendrymerów na drugorzędową strukturę insuliny zbadano metodą dichroizmu kołowego. Wyniki spektrofotometryczne podsumowano następująco: dendrymery nie wywołują agregacji insuliny, natomiast hamują ten proces indukowany przez ditiotreitol, ponadto gaszą fluorescencję insuliny, ale nie zmieniają jej drugorzędowej struktury. Na podstawie wartości potencjału zeta insuliny w obecności dendrymerów posiadających na powierzchni różne grupy funkcyjne (karboksylowe, aminowe lub hydroksylowe), można sądzić, że oddziaływania między insuliną a dendrymerami mają charakter elektrostatyczny.

3. Nowacka O., Shcharbin D., Klajnert-Maculewicz B., Bryszewska M., Stabilizing effect of small concentrations of PAMAM dendrimers at the insulin aggregation. *Colloids Surf., B* (2014) 116, 757–760.

W pracy tej zbadano wpływ małych stężeń (do wartości 1.4 µg/ml) poliamidoaminowych dendrymerów kationowych, neutralnych i anionowych generacji 3 i 4 na agregację insuliny, wywołanej przez dithiotreitol. W badaniach zastosowano metodę dichroizmu kołowego i fluorymetryczną z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej ANS. Wyniki wykazały, że, kationowe dendrymery powodują spadek agregacji insuliny, natomiast dendrymery anionowe i neutralne nie mają wpływu na ten proces. Nie zaobserwowano także destabilizującego wpływu dendrymerów na strukturę insuliny. Wyciągnięto zatem wniosek, że małe stężenia dendrymerów mogą zapobiegać lub zmniejszać liczbę powstających struktur złożonych z cząsteczek insuliny.

4. Owczarek K., Nowacka O., Klajnert B., Kujawa J., Bryszewska M., Interaction between polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and bovine insulin. *Neuroendocrinol. Lett.* (2013) 34, 573–578.

Badania zawarte w tej pracy dotyczą wpływu dendrymerów na insulinę bydlęcą, na podstawie widm fluoroscencyjnych emitowanych przez reszty tyrozynowe insuliny, dla różnych stężeń dendrymerów, oraz na podstawie stopnia gaszenia fluorescencji. Gaszenie emitowanej fluorescencji zbadano stosując klasyczne jonowe wygaszacze oraz w obecności dendrymerów, których cząsteczki posiadały na powierzchni różne grupy funkcyjne. Wyniki badań wykazały, że oddziaływania dendrymerów z insuliną bydlęcą mają charakter elektrostatyczny, ponieważ zależą od ładunku grup powierzchniowych i prawdopodobnie są odpowiedzialne za zmiany konformacyjne zachodzące w cząsteczce insuliny.

Wymienione wyżej publikacje stanowią monotematyczny cykl prac doświadczalnych, dotyczących wpływu dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) na proces agregacji i fibrylacji cząsteczek insuliny. O udziale Doktorantki w tym cyklu świadczy po pierwsze fakt, że w trzech pracach jest Ona na pierwszym miejscu, a w jednej na drugim, a po drugie z oświadczeń współautorów wynika, że udział pani mgr Olgi Nowackiej w tych pracach, w podanej wyżej kolejności wynosi odpowiednio: 60%, 70%, 65% i 40%.

W badaniach, przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej, pani mgr Olga Nowacka wykorzystwała insulinę ludzką i wołową oraz nanocząstki, jakimi są dendrymery poliamidoaminowe, o różnej strukturze chemicznej cząsteczek (różnej generacji), które

ponadto zawierały, obdarzone ładunkiem lub obojętne, grupy funkcyjne na powierzchni. W swoich badaniach Doktorantka zastosowała również ditiotretitol (DTT), który jest klasycznym związkiem tiolowym, stosowanym w redukcji wiązań disiarczkowych w białkach, w związku z tym powodował on agregację insuliny. Insulina jest, bowiem hormonem polipeptydowym zbudowanym z aminokwasów wchodzących w skład dwóch łańcuchów A i B, połączonych ze sobą za pomocą dwóch mostków disiarczkowych.

W celu osiągnięcia postawionego celu Doktorantka zastosowała szereg nowoczesnych technik badawczych. W szczególności wykorzystwała skaningową kalorymetrię różnicową, spektrofluorymetrię z użyciem sond fluorescencyjnych ANS i tioflawiny T (ThT), mikroskopię elektronową i sił atomowych oraz spektropolarymetrię dichroizmu kołowego i spektrofotometrię.

Szczegółowa analiza badań zawartych w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską, pozwala mi z pełnym przekonaniem stwierdzić, że Doktorantka osiągnęła określony w rozprawie cel badań. Wykazała w nich, że dendrymery poliamidoaminowe praktycznie nie zmieniają struktury cząsteczek insuliny, natomiast niektóre z nich mogą przeciwdziałać procesowi jej agregacji i fibrylacji, w ten sposób zapobiegać niekorzystnym modyfikacjom jej struktury, podczas przechowywania. Cząsteczki dendrymerów, mogą także przy długotrwałym leczeniu insuliną, zapobiegać tworzeniu się złogów amyloidowych w miejscach iniekcji.

Podkreślić należy, zarówno wysoki poziom przeprowadzonych badań, jak również dużą aktywność naukową Doktorantki, która oprócz czterech prac stanowiących rozprawę doktorską, jest współautorką trzech prac opublikowanych w dobrych czasopismach, także należących do listy „A” MNiSW oraz sześciu komunikatów z konferencji krajowych i międzynarodowych, które stanowią dorobek naukowy pani mgr Olgi Nowackiej.

Całkowity impact faktor (IF) wszystkich prac Doktorantki jest wysoki i wynosi 20,723, w tym publikacji stanowiących pracę doktorską wynosi 10,528. Liczba punktów MNiSW wszystkich publikacji wynosi 195, zaś stanowiących pracę doktorską 110.

Oceniając wartość naukową rozprawy, należy podkreślić, że badania w niej zawarte są nowatorskie, wzbogacają, bowiem wiedzę biofizyczną i biologiczną, dotyczącą wykorzystania dendrymerów poliamidoaminowych, jako stabilizatorów struktury insuliny, a tym samym chroniąc ją przed utratą aktywności biologicznej.

Jestem przekonana, że wyniki tych badań oprócz wniesionych wartości poznawczych, mogą mieć w medycynie znaczenie aplikacyjne, poprawiając skuteczność leczenia diabetyków insuliną. Zanim jednak, będzie można wyciągnąć jednoznaczne wnioski, należy badania te kontynuować, skupiając się nad poszukiwaniem zarówno odpowiedniej generacji

dendrymerów, jak i takich grup funkcyjnych do nich dołączonych, które będą chroniły insulinę przed szkodliwymi modyfikacjami jej struktury.

Mam w zasadzie jedną uwagę formalną do Doktorantki, dotyczącą streszczenia dołączonego do publikacji, która nie ma żadnego wpływu, na jakość merytoryczną rozprawy. Nie ma w nim, przy omawianiu poszczególnych badań, odniesienia do poszczególnych publikacji, stanowiących pracę doktorską. Pani mgr Olga Nowacka używa też w nim pojęć „generacje połówkowe i całkowite dendrymerów”, nie wyjaśniając ich, podobnie jak „dendrymery generacji 2, 3 i 4”. Oczywiście informacje te znajdują się w publikacjach, ale myślę, że krótkie wyjaśnienia w streszczeniu poprawiłyby jasność przekazu.

Przedstawiona mi do oceny praca w pełni spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku, o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 z późniejszymi zmianami).

W związku z powyższym, zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczeniem mgr Olgi Nowackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w celu uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biofizyka.

KIEROWNIK
Katedry Fizyki i Biofizyki

Prof. dr hab. Halina Klejczyńska