

*Dr hab. Maria Zabłocka*  
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych  
Polskiej Akademii Nauk  
Łódź, Sienkiewicza 112  
e-mail [zabloc@cbmm.lodz.pl](mailto:zabloc@cbmm.lodz.pl)

Łódź 2015-12-07

## Recenzja pracy doktorskiej

mgr Olgi Nowackiej

### Modyfikacja procesu agregacji i fibrylacji insuliny przez dendrymery

Promotor prof. dr hab. Maria Bryszewska

Recenzję wykonano dla Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Insulina jest anabolicznym hormonem peptydowym o działaniu ogólnoustrojowym, który odgrywa zasadniczą rolę w metabolizmie węglowodanów, a także białek i tłuszczów. Reguluje ona poziom glukozy we krwi. Najważniejszym bodźcem do produkcji insuliny jest po posiłkowe zwiększenie stężenia glukozy we krwi. Wytwarzana w trzustce insulina jest transportowana do wnętrza komórek, co obniża poziom glukozy we krwi. Zaburzenia w produkcji lub działaniu insuliny prowadzą do wzrostu poziomu stężenia glukozy we krwi i w konsekwencji do rozwoju chorób metabolicznych charakteryzujących się hiperglikemią co wiąże się z zaburzeniem czynności i niewydolnością różnych narządów, szczególnie oczu, nerek, nerwów, serca i naczyń krwionośnych. Jedynym znanym lekiem który pozwala funkcjonowanie osobom chorym na cukrzycę jest insulina jednakże pomimo upływu wielu lat od czasu jej odkrycia w 1921 roku, leczenie cukrzycy, która jest jedną z najpoważniejszych i najczęściej występujących chorób cywilizacyjnych wciąż stanowi duże wyzwanie. Trudności związane z leczeniem cukrzycy wynikają między innymi ze zmian zachodzących wewnątrz struktury insuliny a także jej agregacji i fibrylacji.

#### **Cel i zakres pracy**

Wyzwaniem, jakie postawiła sobie Doktorantka było sprawdzenie, czy dendrymery mają wpływ na natywną cząsteczkę insuliny, a także czy mają wpływ na proces jej agregacji i fibrylacji.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska pani mgr Olgi Nowackiej wykonana została pod kierunkiem Prof. dr hab. Marii Bryszewskiej, która z dużym powodzeniem zajmuje się zastosowaniem dendrymerów w medycynie jako nośników leków przeciwnowotworowych, czynników rozbijających białkowe agregaty występujące w chorobach neurodegeneracyjnych. Praca doktorska mgr Olgi Nowackiej znakomicie wpisuje się w tę tematykę a opublikowane

wyniki badań wnoszą nowe cenne informacje dotyczące poszukiwań nowych rozwiązań w leczeniu cukrzycy.

Na rozprawę doktorską składają się 4 publikacje, z których każda stanowi oryginalną pracę doświadczalną. Tworzą one zwarty cykl zagadnień związanych z realizacją założonych celów doktoratu.

1. Generation-dependent effect of PAMAM dendrimers on human insulin fibrillation and thermal stability. *Int. J. Biol. Macromol.* (2015) DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.029 (IF 2,858 MNiSW 25)

*Praca współautorska z mgr Olgą Nowacką na pierwszym miejscu - 60% udziału autorki.*

2. Interaction of PAMAM dendrimers with bovine insulin depends on nanoparticle end-groups. *J. Lumin.* (2015) 162, 87–91. (IF 2,719; MNiSW 35)

*Praca współautorska z mgr Olgą Nowacką na pierwszym miejscu - 75% udziału autorki.*

3. Stabilizing effect of small concentrations of PAMAM dendrimers at the insulin aggregation. *Colloids Surf., B*(2014) 116, 757–760. (IF 4,152; MNiSW 35)

*Praca współautorska z mgr Olgą Nowacką na pierwszym miejscu - 65% udziału autorki.*

4. Interaction between polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and bovine insulin aggregation *Neuroendocrinol. Lett.* (2013) 34, 573-578 (IF 0,799; MNiSW 15)

*Praca współautorska z mgr Olgą Nowacką na drugim miejscu - 35% udziału autorki.*

Sumaryczny współczynnik *impact factor* (IF) publikacji stanowiących rozprawę doktorską jest wysoki i wynosi **10,528**, czemu odpowiada **110** punktów MNiSW.

W dostarczonej dokumentacji znajdują się oświadczenia współautorów, deklarujących swój udział intelektualny w powstawaniu poszczególnych publikacji.

W skład całego dorobku naukowego wchodzi jeszcze trzy publikacje oraz sześć komunikatów zjazdowych przedstawionych w formie plakatów, które były prezentowane przez Doktorantkę w kraju i za granicą.

Warto podkreślić, że sumaryczny współczynnik *impact factor* (IF) publikacji stanowiących dorobek naukowy Doktorantki wynosi **20,723** a liczba punktów według listy czasopism punktowanych MNiSW - **195**.

W badaniach Doktorantka wykorzystwała dwa rodzaje insuliny – wołową i ludzką - oraz dendrymery PAMAM o zdefiniowanej strukturze:

- a) anionowe z grupami karboksylowymi na zewnętrznych sferach cząsteczek,
- b) kationowe z grupami aminowymi na zewnętrznych sferach cząsteczek,
- c) obojętne z grupami hydroksylowymi na zewnętrznych sferach cząsteczek.

Pierwszym zadaniem, jakie postawiła sobie Doktorantka było sprawdzenie czy istnieją oddziaływania pomiędzy insuliną a wybranymi do badań dendrymerami, jeżeli tak to jakiego rodzaju.

Wyniki badań przedstawione w publikacji 2 pozwoliły stwierdzić, że takie oddziaływania występują i mają charakter elektrostatyczny. Świadczą o tym szczególnie znaczące zmiany potencjału elektrokinetycznego (Zeta) zarejestrowane dla roztworu mieszaniny insuliny i dendrymerów obdarzonych ładunkami dodatnimi. Wyniki te potwierdzone zostały także znacznymi zmianami w widmach fluorescencji oraz przy zastosowaniu dichroizmu kołowego. Technika skaningowej kalorymetrii różnicowej pozwoliła Doktorantce na zbadanie stabilności insuliny w podwyższonej temperaturze. Uzyskane termogramy wskazują, że insulina wraz ze wzrostem temperatury podlega dwóm przejściom fazowym w temperaturze 60 i 82 °C. Dodanie do próbki insuliny dendrymerów generacji 3 i 4 z grupami aminowymi na powierzchni spowodowało zanik pierwszego przejścia fazowego i wzrost drugiego. Otrzymane w pracy wyniki pozwalają przypuszczać, że dodanie dendrymerów do próbki insuliny powoduje tworzenie się heksamerów z dimerów.

Dodanie czynnika redukującego - ditiotreitolu (DTT) - do cząsteczki insuliny powoduje jej agregację. Obecność dendrymerów obdarzonych ładunkiem dodatnim na powierzchni powoduje zmiany w procesie agregacji.

Zbadano wpływ dendrymerów na kinetykę procesu agregacji w obecności odczynnika redukującego (DTT). Obecność dendrymerów obdarzonych ładunkiem dodatnim na powierzchni powodowała osłabienie procesu agregacji. Najlepszy wynik uzyskano przy zastosowaniu dendrymerów o stężeniu 0,01  $\mu\text{mol/l}$ .

W pracy badany był także proces fibrylacji insuliny w obecności dendrymerów generacji 2, 3 i 4 z grupami aminowymi na powierzchni. Dendrymery generacji 2 nieznacznie przyspieszały proces fibrylacji insuliny niezależnie od ich stężenia, zaś najniższe stężenia dendrymerów generacji 3 i 4 spowolniły ten proces, co więcej, częściowo zapobiegały tworzeniu się złogów. Zauważono również, że dendrymery opłaszczają powstałe fibryle.

W nawiązaniu do opracowania doktoratu mam kilka pytań.

- 1) Z pomiaru potencjału Zeta zmierzonego dla roztworu insuliny zasocjowanej z dendrymerami PAMAM trzeciej generacji wiadomo, że 10 cząsteczek insuliny jest związanych jest z jedną cząsteczką dendrymeru. Masa atomowa insuliny wynosi 5807 Daltonów, natomiast dendrymeru PAMAM-G<sub>3</sub> 6908 Daltonów, czyli nie ma między nimi bardzo dużej różnicy. Czy sugeruje to, że oddziaływania elektrostatyczne między cząsteczkami pochodzą od terminalnych grup karboksylowych insuliny i znajdują się one wyłącznie na powierzchni dendrymeru ?.
- 2) Dendrymer G<sub>3</sub> PAMAM-NH<sub>2</sub> nie powoduje agregacji cząsteczek insuliny. Jeżeli dobrze zrozumiałam, w mieszaninie INSULINA + DTT + DENDRYMER przy stężeniu 0,01mmola dendrymeru obserwuje się obniżenie procesu agregacji cząsteczek insuliny. Przy stężeniu 0,1mmola dendrymeru obserwuje się podwyższenie procesu agregacji Czy mogłaby Pani skomentować to zjawisko?
- 3) Do swoich badań używa Pani insuliny ludzkiej i wołowej. Jakie są różnice dotyczące budowy cząsteczek obydwu insulin, czy dotyczy to tylko ilości mostków siarczkowych, czy może są jeszcze inne różnice?

- 4) Ditiotreitól (DTT), odczynnik redukujący, powoduje rozrywanie wiązań disiarczkowych łączących łańcuchy A i B w cząsteczce insuliny, tym samym powoduje uwolnienie łańcucha A podczas gdy łańcuch B ulega agregacji.

Moje pytanie jest następujące:

- a) co powoduje rozrywanie wiązań disiarczkowych w organizmie człowieka i w konsekwencji agregację insuliny?
  - b) Jaka jest natura czynnika powodującego rozerwanie wiązań disiarczkowych?
  - c) Czy agregacja dotyczy tylko łańcucha B?
  - d) Jaką rolę odgrywa łańcuch A?
- 5) Kolejne pytanie dotyczy struktury dimerów i heksamerów insuliny:  
Czy powstają one w wyniku oddziaływań elektrostatycznych, czy może w wyniku tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami A i B, czy też są inne przyczyny?
- 6) Czy tworzenie się heksamerów jest pierwszym etapem w procesie agregacji insuliny?

Podsumowując rozumiem, że z badań dotyczących oddziaływań polikationonowych dendrymerów z fibrylami obserwuje Pani takie samo zjawisko jak dla oddziaływań insulina + DTT +dendrymer, czyli wysokie stężenie dendrymeru G<sub>4</sub> powoduje przyspieszenie tworzenia się fibryli, podczas gdy niskie stężenie dendrymeru hamuje proces ich tworzenia. Czy zgadza się Pani z taką interpretacją?

Rozprawa prezentowana w formie tzw. "zszywki" nie daje dużych możliwości edytorskich. Chcę jednak podkreślić, że formalne części rozprawy zostały zredagowane jasno i starannie. Mam jednak kilka uwag, które w żadnym stopniu nie umniejszają wartości pracy.

- 1) Jakkolwiek nie mam wątpliwości, że badania przedstawione w doktoracie wykonane były przez autorkę (świadczą o tym oświadczenia współautorów publikacji) oczekiwałabym prezentacji w pierwszej osobie. Forma bezosobowa prezentacji w streszczeniu nieco razi np. Str. 7 odpowiednio 4, 5, 32 wiersz od góry „sprawdzono, zastosowano, zaobserwowano”.
- 2) Str. 7 w. 20 “Miareczkowanie insuliny dendrymerami PAMAM“ powiedziałabym raczej miareczkowanie roztworu insuliny roztworami dendrymerów.
- 3) Str, 8 w.22 “W pracy obserwowany był także process fibrylacji insuliny”
- 4) str. 9 w. 4 sformułowanie “zastosowanie różnych metod badawczych pozwoliło zaobserwować brak efektu stężeniowego” jest niezręczne.

Podsumowując chciałabym stwierdzić, że jakkolwiek uzyskane wyniki badań nie przyniosły jednoznacznego rozstrzygnięcia postawionych celów, to rozprawa doktorska przedstawiona przez panią mgr Olgę Nowacką ma duży potencjał poznawczy. Wnosi ona wiele nowych informacji dotyczących zastosowania dendrymerów w medycynie opartych na przeprowadzonych przez nią badaniach naukowych.

Doktorantka zastosowała wiele metod badawczych: spektrometrię dichroizmu kołowego(CD), spektrofluorometrię, technikę mikroskopii sił atomowych, skaningową kolorymetrię różnicową, transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) i kilka innych, bardziej

powszechnych metod pomiarowych. Wymagało to od niej zapoznania się z niełatwymi podstawami fizycznymi stosowanych technik a następnie ich prawidłowego zastosowania, opisu i interpretacji uzyskanych wyników, co z sukcesem uczyniła.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Olgi Nowackiej „Modyfikacja procesu agregacji i fibrylacji insuliny przez dendrymery” spełnia warunki określone w art.13 ust.1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595, z późniejszymi zmianami). Zwracam się do Rady Wydziału Biologii i Ochrony i Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o jej przyjęcie i dopuszczenie pani mgr Olgi Nowackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Maria Zabłocka