

Kraków, 15 luty 2023 r.



RECENZJA

Dr hab. Paweł Mak, prof. UJ

Recenzja niniejsza dotyczy rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Ewy Kobylskiej pt. „Badanie właściwości fizyko-chemicznych, struktury oraz aktywności biologicznej metabolitów nowych analogów insuliny”, wykonanej pod opieką promotora, pana prof. dr hab. inż. Michała Chudego. Zgodnie z przesłanym mi zawiadomieniem Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej z dn. 26.01.2023 r., podstawą prawną do sporządzenia tej recenzji jest art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. pt. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, Dz. Ustaw 2018, poz. 1668 z późn. zm. Do recenzji otrzymałem wydrukowaną wersję rozprawy w postaci książki oraz identyczną wersję elektroniczną, w postaci pliku w formacie PDF. Do rozprawy załączono spis prac naukowych dotyczących jej dyscypliny oraz osobny spis wszystkich publikacji doktorantki. Zgodnie ze stosownymi adnotacjami w rozprawie, praca była efektem badań prowadzonych w trzech placówkach, w Instytucie Chemii Przemysłowej (IChP) im. prof. Mościckiego Sieci Badawczej Łukasiewicz oraz w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego i w Centrum CEZAMAT Pt. Warszawskiej. Realizowana była w ramach programów „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” a także „Doktorat wdrożeniowy” Ministerstwa Edukacji i Nauki. Podkreślam szczególnie ten ostatni program, bowiem słowo „wdrożeniowy” ma istotny charakter dla ocenianej rozprawy.

Zakład Biochemii Analitycznej

Wydział Biochemii, Biofizyki
i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków

pawel.mak@uj.edu.pl
www.zba.wbbib.uj.edu.pl

Recenzowanie rozpocznę od kwestii formalno-redakcyjnych. Rozprawa liczy 218 stron. Rozpoczyna się obszernym pięciostronicowym Streszczeniem, osobno w wersji polskiej i angielskiej, zawierającym merytoryczne wprowadzenie w tematykę pracy, skrótowy opis jej celów, etapów, oraz przeprowadzonych badań, listę pięciu prezentacji konferencyjnych, w których przedstawiono uzyskane wyniki, dane opublikowanego streszczenia pokonferencyjnego oraz listę trzech prac magisterskich związanych z tematem rozprawy, wykonanych pod opieką naukową doktorantki. Następnie przedstawiono liczący 34 strony Wstęp teoretyczny, wprowadzający czytelnika w zagadnienia związane z cukrzycą, jej typami i patofizjologią, z biochemią, biologią, biotechnologią oraz farmakologią insuliny i jej analogów, a także ich związkami z procesami nowotworzenia. Zwraca uwagę, że Wstęp zawiera aż 22 bardzo starannie opracowane, czytelne, estetyczne i zarazem informatywne ilustracje. Wstęp zakończony jest jego syntetycznym Podsumowaniem, liczącym 4,5 strony, pozwalającym usystematyzować i utrwalić najważniejsze informacje. Następnie doktorantka klarownie opisuje cele swojej pracy, zarówno ogólne, jak i też pięć celów szczegółowych, oraz formułuje 4 hipotezy badawcze, które chciałaby zweryfikować. Następna i najobszerniejsza część rozprawy to opis Badań własnych, liczący 134 strony. Dzieli się on na 13 podrozdziałów, kolejno omawiających przeprowadzone prace i ich wyniki. Każdy taki podrozdział zawiera starannie i metodycznie przygotowane osobne opisy badanych substancji, użytych odczynników i materiałów a także aparatury, następnie przedstawiono opis procedury badania, a także prezentację i dyskusję uzyskiwanych wyników. Wszystkie wyniki ilustrowane są aż 93 starannie opracowanymi rysunkami oraz 15 tabelami. Po Badaniach własnych zamieszczono rozdział z Wnioskami, liczący 8,5 strony, który syntetycznie

podsumowuje uzyskane wyniki, ich znaczenie poznawcze i praktyczne, bezpośrednio i klarownie odnosząc je do sformułowanych wcześniej celów badawczych oraz hipotez naukowych. Rozprawę kończą spis bibliografii, a także spisy tabel i rysunków. Sam spis bibliografii liczy 121 publikacji naukowych, źródeł internetowych, książkowych oraz materiałów różnych instytucji międzynarodowych. Źródła te w mojej opinii są dobrane celnie i prawidłowo, są także w ogromnej większości źródłami aktualnymi, pochodzącymi z ostatnich lat.

Rozprawa napisana jest bardzo staranną polszczyzną, zwracając uwagę na wysokie kompetencje językowe doktorantki, jej wyraźny talent do zrozumiałego przedstawiania skomplikowanych zagadnień oraz ich systematyzowania, do powtarzania istotnych kwestii, porządkowania a także do hierarchizowania wiedzy. Bardzo wysoko i pozytywnie oceniam także stronę redakcyjną rozprawy, wszystkie jej części są starannie opracowane, spójne stylistycznie, uporządkowane przestrzennie i estetyczne. Pieczołowicie opracowano także ilustracje, które nie tylko są informatywne (dotyczy to zwłaszcza schematów insuliny i jej analogów), ale też atrakcyjne wizualnie, podkreślić i pochwalić należy też staranne spolszczenie rysunków zaczerpniętych ze źródeł obcych.

Jeśli chodzi o moje uwagi krytyczne do strony formalnej rozprawy to istotniejsze zastrzeżenia mam dwa. Pierwsze dotyczy spisu treści, który prezentuje tylko główne rozdziały pracy, pomijając jej liczne i bogate podrozdziały oraz podpodrozdziały. Dodatkowo, orientację w treści rozprawy utrudnia niekonsekwentna, mieszana, rzymsko-arabska numeracja jej składowych części, i w efekcie wiele podrozdziałów oraz pod-podrozdziałów ma powielające się, takie same numery arabskie. Druga moja krytyczna uwaga dotyczy spisu bibliografii. O ile jest on bardzo starannie opracowany i konsekwentny stylistycznie, to brakuje w nim numeracji stron wszystkich publikacji. Jest to istotny niedostatek bo nie zamieszczono w spisie bibliografii innych danych, pomocnych w odszukaniu danej pracy, jak identyfikator DOI lub numer PMID. Jeżeli natomiast chodzi o bardziej błahе niedostatki formalne ocenianej rozprawy doktorskiej, to zaliczyłbym do nich:

- nieścisłość na stronie 9; opisywana tam publikacja, która ukazała się w piśmie *Engineering Proceedings*, i będąca efektem realizacji doktoratu, jest w rzeczywistości streszczeniem pokonferencyjnym,
 - brak odnośników bibliograficznych do treści opisywanych w niektórych miejscach tekstu rozprawy – szczególnie we Wstępie,
 - obecność kilku nieprawidłowych zapożyczeń obcojęzycznych, jak N-/C-terminalny, et. al., rpm, supernatant, medium,
 - niekonsekwencja w użyciu trybu językowego ustępów o charakterze ściśle naukowym; ich większość posiada powszechnie przyjęty w publikacjach naukowych tryb bezosobowy, lecz wybrane ustępy mają z kolei odmienną i konsekwentną formę osobową,
 - nietypowy sposób narracji w niektórych ustępach pracy, polegający na tym, że informacje wstępne lub też wprowadzające do danego podrozdziału znajdują się na końcu podrozdziału innego, poprzedzającego. Np. treści związane z rozdziałem 3 znajdują się na końcu podrozdziału 2.4.4, obszerne wprowadzenie do rozdziału 5 znajduje się na końcu podrozdziału 4.3, wprowadzenie do rozdz. 8 jest w podrozdziale 7.2, itd. Jest to nieco dezorientujące dla czytelnika.
- I na koniec:
- niektóre dane dotyczące stosowanych odczynników lub materiałów są nieścisłe; np. nr katalogowy proteazy V8 podany na str. 101 jest w rzeczywistości numerem seryjnym partii produktu, zaś numery katalogowe niektórych materiałów firmy

Beckman Coulter podane na str. 123 i 124 dotyczą prawdopodobnie numerów katalogowych materiałów z firmy Sciex.

Na tym chciałbym zakończyć komentowanie strony formalnej ocenianej rozprawy i przejść do oceny merytorycznej. W największym skrócie, rozprawa doktorska pani mgr inż. Ewy Kobyłskiej poświęcona jest badaniom biochemicznym nad wybranymi farmaceutycznymi analogami insuliny. Praca stanowi więc część jednego z najważniejszych nurtów współczesnej biotechnologii, nauk farmaceutycznych oraz badań biomedycznych, poświęconych lekom przeciwcukrzycowym. Co więcej, jest to dziedzina, w której mamy znaczące krajowe osiągnięcia, zarówno naukowe, jak i też aplikacyjne, zapoczątkowane w latach 20-tych minionego wieku wdrożeniem produkcji insuliny przez Państwowy Zakład Higieny, a później także przez inne placówki, jak Zjednoczenie Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed”, Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne/Polfa Tarchomin S.A., firmę Bioton a ostatnio także przez firmę Polfarmex. Natomiast głównym i dominującym krajowym zapleczem badawczym nad insuliną oraz jej analogami stanowił Instytut Biotechnologii i Antybiotyków – skonsolidowany niedawno ze wspomnianym wyżej IChP Sieci Badawczej Łukasiewicz. Spośród wielu zaprojektowanych i wytworzonych w tej placówce nowatorskich analogów insuliny, dwa z nich, o nazwach AKR oraz SK3R, stały się przedmiotem badań ocenianej rozprawy doktorskiej. Oba są analogami długodziałającymi i aktywność ta jest skutkiem obecności dwóch dodatkowych zasadowych aminokwasów, lizyny i argininy. Podwyższają one punkt izoelektryczny analogów, co obniża ich rozpuszczalność w fizjologicznych warunkach i wydłuża czas uwalniania aktywnych, monomerycznych cząsteczek leku. Dodatkowo, zwiększono stabilność obu analogów, sterycznie zmniejszając ich podatność na szkodliwą deamidację poprzez wstawienie po jednym dodatkowym aminokwasie, alaninie lub serynie, na C-końcach łańcuchów A. Natomiast w ramach swojej rozprawy doktorskiej, pani mgr inż. Ewa Kobyłska podjęła się opracowania oraz wdrożenia metod wytwarzania metabolitów obu badanych nowych analogów insuliny, które powstają z nich po dostaniu się do krwiobiegu, wskutek działania karboksypeptydaz osoczowych. Metabolity te nie zawierają jednej C-końcowej argininy (związki desB32Arg AKR lub desB31Arg SK3R), lub dwóch C-końcowych aminokwasów, argininy i lizyny (związki desB32Arg desB31Lys AKR). Zapewne zachęcona sukcesem, doktorantka opracowała dodatkowo także metody wytwarzania poszukiwanych na rynku metabolitów ogólnie dostępnego handlowego analogu insuliny, glarginy, a mianowicie związków desB32Arg glargina oraz desB32Arg desB31Arg glargina. We wszystkich przypadkach opracowana metoda wytwarzania obejmowała trawienie analogów karboksypeptydazą B oraz oczyszczanie powstałych produktów za pomocą preparatywnej chromatografii RP-HPLC. Kolejnym osiągnięciem pani mgr inż. Kobyłskiej było opracowanie oraz wdrożenie licznych i zróżnicowanych biochemicznych metod analitycznych dla insulin, ich analogów oraz metabolitów, umożliwiających:

- badanie przemian metabolicznych w osoczach ludzkim i króliczym za pomocą spektrometrii mas MALDI-ToF,
- badanie stabilności termicznej roztworów za pomocą mikrokalorymetrii różnicowej,
- porównawcze badanie tożsamości cząsteczek za pomocą mapowania peptydowego wykorzystującego trawienie proteazą V8 oraz analityczne rozdziały techniką RP-HPLC,

- szacowanie wielkości cząsteczek za pomocą techniki DLS,
- porównawcze badanie zmian w konformacji cząsteczek za pomocą spektrofotometrii w świetle UV-Vis oraz za pomocą techniki spektrofluorymetrycznej,
- wyznaczanie punktów izoelektrycznych cząsteczek za pomocą kapilarnego ogniskowania izoelektrycznego z detekcją spektrofotometryczną przy 280 nm,
- badanie powinowactwa cząsteczek do rekombinowanych izoform A i B zewnątrzkomórkowych domen receptorów insulinowych oraz zewnątrzkomórkowej domeny receptora IGF1 za pomocą techniki MP-SPR,
- badanie wpływu analizowanych substancji na poziom wybranych wewnątrzkomórkowych białkowych markerów szlaków metabolicznych za pomocą komórek HepG2, gotowej mikromacierzy przeciwciał oraz detekcji chemiluminescencyjnej,
- badanie potencjalnego cytotoksycznego lub proliferacyjnego wpływu analizowanych substancji na komórki Clone 9 i HepG2 przy użyciu testu MTT,
- badanie potencjalnego mutagennego wpływu analizowanych substancji na komórki bakteryjne za pomocą zminiaturyzowanego testu typu AMES, bez obecności oraz w obecności eukariotycznego ekstraktu komórkowego S9, oraz
- badanie wpływu analizowanych substancji na tempo poboru glukozy przez przekształcone w adipocyty komórki 3T3 L1 MBX za pomocą testu spektrofotometrycznego wykorzystującego 2-deoksyglukozę.

Zakres zrealizowanych prac oraz wdrożonych metod jest więc bardzo szeroki, wręcz imponujący, dobór zastosowanych technik pomiarowych jest znakomicie dobrany do specyfiki badanego materiału, ogromna większość to techniki bardzo nowoczesne i zaawansowane. Co więcej, doktorantka znakomicie zoptymalizowała warunki analiz i dowodem tego są wzorowej jakości widma MALDI-ToF (strony 58-71), wzorowe chromatogramy z preparatywnych (str. 76-92) oraz analitycznych (str. 104-107 i 126-127) rozdzielów RP-HPLC, a także pozostałe wyniki, jak przebiegi sensogramów SPR, widm absorbcyjnych i emisyjnych oraz innych. Uznanie także budzi pomysłowe i czytelne zestawienie wyników z mikromacierzy - w postaci tabelarycznych prostokątnych paneli, prezentowanych na str. 155-158.

Moje uwagi krytyczne dotyczące kwestii merytorycznych są stosunkowo błahe i przedstawię je w kolejności pojawiania się w tekście:

- W Streszczeniu (str. 5 oraz 11) użyte sformułowania mogą sugerować, że wszystkie osoby na świecie cierpiące na cukrzycę, czyli grubo ponad pół miliarda ludzi, wymagają terapii insuliną lub jej analogami. A tak oczywiście nie jest.
- Legenda do rys. 7 jest niefortunnie sformułowana, zamiast „schematu efektów biologicznych” bardziej adekwatny opis to „ścieżki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej”.
- Użyte na stronach 35, 69 i 99 określenia enzymów jako trawiennych są niefortunne, lepiej byłoby je w tym miejscu określić enzymami proteolitycznymi.
- Mam wątpliwości, odnośnie warunków proteolizy enzymatycznej opisanych na str. 74. 15 mM roztwór wodorowęglanu amonu wydaje mi się być zbyt słabym buforem aby doprowadzić 0.01 M kwas solny do optymalnego pH.
- Opisy procentowych i molowych współczynników absorbancji w tabelach 2 i 5 są sprzeczne lub niezrozumiałe dla mnie. Współczynnik procentowy dotyczy bowiem absorbancji roztworu 1 grama substancji w 100 g roztworu, podczas gdy stężenia w kolumnie z tym współczynnikiem opisano jako gram na litr oraz

równoważne miligram na ml. Analogicznie, współczynnik molowy absorpcji dotyczy stężenia 1 mola na litr, podczas gdy na dole opisu kolumny z tym współczynnikiem podano stężenie masowe 1 mg/ml.

- W procedurze preparatywnego oczyszczania metabolitów analogów insulin do odsalania zastosowano mało wydajne i nieco „staromodne” kolumnienki PD-10. Intryguje mnie, dlaczego nie użyto do tego celu znacznie efektywniejszej procedury odsalania poprzez chromatografię RP-HPLC w lotnych roztworach woda/TFA/acetonitryl a następnie liofilizację? Proszę panią doktorantkę o ustosunkowanie się do tej kwestii.
- Intryguje mnie także, jaki cel ma stosowanie opisanej na str. 83 liofilizacji w 3 różnych temperaturach? Również proszę doktorantkę o ustosunkowanie się do tej kwestii.
- Przedstawienie na rys. 46 próbki ślepej (rozpuszczalnika prób) jako próbki „placebo” jest nieprawidłowe.
- Na stronie 102 w opisie trawienia enzymatycznego na 0.25 mg insuliny zużyto aż 0.1 mg proteazy V8. Jeśli to nie jest omyłka to dlaczego w tym konkretnym przypadku zastosowano tak dużą ilość enzymu wobec białka trawionego? Proszę panią doktorantkę o ustosunkowanie się do tej kwestii.
- W podrozdziale 9.1.4 zadeklarowano, że w ramach badań wstępnych wykonano testy różnych technik immobilizacji receptora insulinowego na powierzchni sensora SPR, i optymalna okazała się bezpośrednio immobilizacja chemiczna, z użyciem crosslinkerów EDC i NHS. Otrzymane w efekcie krzywe kinetyczne SPR oraz wyniki dla różnych insulin oraz ich analogów wyszły prawidłowo, i w dużej mierze zgodnie z oczekiwaniami. Z drugiej jednak strony, do pomiarów stosowano immobilizowane osobno rekombinowane izoformy A i B zewnątrzkomórkowych domen receptorów insulinowych oraz także rekombinowaną zewnątrzkomórkową domenę receptora IGF1. Z kolei zarówno doniesienia literaturowe (np. „Structure of the insulin receptor–insulin complex by single-particle cryo-EM”, doi: 10.1038/nature26153, i wiele innych), jak i też informacje prezentowane szczegółowo w samej rozprawie (Wstęp, podrozdział 2.4.2), jasno wskazują, iż cząsteczka insuliny wiąże się z dwoma regionami dimeru receptora. Mam wątpliwości, czy w opisanych warunkach udało się taką dimeryczną strukturę odtworzyć na powierzchni sensora, nie znalazłem także w rozprawie stosownej dyskusji na ten konkretnie temat. Proszę zatem doktorantkę o komentarz w tej kwestii. Proszę także o informację, czy w opisanych doświadczeniach SPR próbowano wyznaczyć wartość stałych asocjacji/dysocjacji dla peptydu/białka kontrolnego, nie będącego insuliną ani jej analogiem?
- W podrozdziale 10.1.3., opisującym odczynniki użyte do oznaczeń na mikromacierzach, przedstawiono kilka roztworów, których nie używano w opisie adekwatnej procedury w podrozdziale 10.1.5. I odwrotnie, wspomniany opis procedury zawiera pewne roztwory, nie opisane wcześniej w rzeczonym spisie roztworów. Obawiam się więc, że mimo staranności i drobiazgowości doktorantki, odtworzenie tych konkretnie pomiarów może nastęrczać problem.
I na koniec:
- Wbrew informacji podanej na str. 161, mieszanina TrypLE Express Enzyme używana do dysocjacji komórek adherentnych nie zawiera trypsyny.

Tak jak wcześniej jednak podkreśliłem, przedstawiona wyżej lista moich zastrzeżeń merytorycznych dotyczy kwestii stosunkowo błażych, głównie o technicznym charakterze, i nie umniejsza mojej wysokiej oceny strony merytorycznej ocenianej rozprawy, a także użyteczności i wysokiej jakości opracowanych wdrożeń, zarówno tych produkcyjnych, jak i też analitycznych. Wychodząc natomiast naprzeciw zwyczajowi

przyjętemu na obronach doktorskich, proszę panią doktorantkę o ustne ustosunkowanie się, w miarę możliwości, do zamieszczonych powyżej czterech kwestii, dotyczących odsalania, liofilizacji, proporcji enzym/substrat oraz dimerów w SPR.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska bez wątpienia stanowi oryginalne i samodzielne opracowanie naukowe doktorantki, dotyczące biochemicznych własności nowo opracowanych analogów insuliny oraz ich metabolitów, a także prezentuje konkretne zastosowania uzyskanych wyników do produkcji oraz do walidacji określonych preparatów farmaceutycznych. Dowodzi także adekwatnej wiedzy teoretycznej doktorantki oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Dysertacja pani mgr inż. Kobyłskiej spełnia również pod względem formalnym kryteria pisemnej monografii naukowej, posiadając równocześnie cechy opracowania o charakterze wdrożeniowym. W mojej ocenie recenzowana praca spełnia zatem w pełni wszystkie wymagania rozprawy doktorskiej, sformułowane w punktach 1, 2, 3 i 4 art. 187 Ustawy cytowanej na wstępie niniejszej recenzji. Na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemicznej Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie pani mgr inż. Ewy Kobyłskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.