



UNIwersYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Katedra i Zakład Biofarmacji

85-089 Bydgoszcz, ul. dr. A. Jurasza 2, Poland, tel. (+48 52) 585-3900; fax: (+48 52) 585-3804

e-mail: kizbiofarmacji@cm.umk.pl



Bydgoszcz, dnia 27 lipca 2015 roku

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Renaty Pawlak-Morka

**pt.: „Wpływ struktury jednolącuchowego prekursora insuliny na proces
wytworzenia rekombinowanej insuliny ludzkiej”**

Cukrzyca jako choroba znana jest od bardzo dawna. Już starożytni Grecy i Egipcjanie zaobserwowali słodki smak moczu w przebiegu tej choroby, stąd też później wprowadzona została łacińska nazwa cukrzycy *diabetes mellitus*. Do czasu wprowadzenia do lecznictwa skutecznych leków przeciwcukrzycowych jedynym sposobem leczenia była restrykcyjna dieta bezwęglowodanowa, która razem z chorobą prowadziła do szybkiego wyniszczenia organizmu. W roku 1921 Frederick Banting i Charles Besta odkryli insulinę (za to odkrycie Banting otrzymał nagrodę Nobla). Insulinę zwierzęcą po raz pierwszy podano cukrzykowi w roku 1922. Od tego czasu insulina zwierzęca weszła do terapii. W roku 1955, przez angielskiego biochemika Fredericka Sangera (on również został uhonorowany nagrodą Nobla), została określona sekwencja aminokwasów insuliny. Trzy lata później insulinę zsyntetyzowano chemicznie, a od roku 1982 uzyskuje się ją metodami inżynierii genetycznej (jako pierwsza dokonała tego firma *E. Lilly*). Od tego czasu trzustka zwierzęca straciła znaczenie jako surowiec do produkcji insuliny. W Polsce insulina rekombinowana dostępna jest od roku 1990, a od roku 2000 jest również produkowana. Produkcja insuliny na drodze inżynierii genetycznej, zgodnie z wytycznymi Europejskiej Agencji do spraw Produktów Leczniczych (EMA - *European Medicines Agency*), to jedno z najbardziej zaawansowanych technologicznie przedsięwzięć i wymaga od producenta ustawicznego doskonalenia procesu oraz ciągłej kontroli jakości substratów, warunków produkcji, jak i produktu finalnego. Właśnie w tę tematykę świetnie wpisuje się rozprawa doktorska mgr Renaty Pawlak-Morka,

wykonana pod kierunkiem dr. hab. Wojciecha Miłyka na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Z zainteresowaniem sięgnąłem po jej wydruk.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma układ typowy dla prac eksperymentalnych w naukach farmaceutycznych. Tekst pracy został podzielony na 10 logicznie następujących po sobie części. Rozprawę, obejmującą 100 ponumerowanych kart, rozpoczynają: strona tytułowa oraz czytelny spis treści. Dalej odnajdziemy liczący 15 stron *Wstęp* wprowadzający w tematykę, której poświęcona jest rozprawa. W sposób syntetyczny przedstawiono w nim informacje na temat insuliny ludzkiej i metod jej otrzymywania. Wyraźny akcent położono na insulinę rekombinowaną. Dokładnie przedstawiono proces jej otrzymywania oparty o genetycznie zmodyfikowany szczep bakterii *Escherichia coli*, do którego wprowadzono plazmid z fragmentem DNA kodującym jednołańcuchowy prekursor insuliny ludzkiej. Ta część pracy została napisana poprawnym, starannym i łatwym w odbiorze językiem, stanowiąc kompendium wiedzy, pozwalające nawet osobie nie zajmującej się na co dzień tą złożoną problematyką, na dobre w niej rozeznanie. Świadczy też o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki.

Na dalszej stronie przedstawiono *Cel pracy*, który obejmuje szeroko zakrojoną ocenę wpływu struktury pierwszorzędowej prekursora insuliny ludzkiej na proces wytwarzania oraz charakterystykę otrzymywanego hormonu. Zaplanowano zbadanie mechanizmu reakcji deamidacji zachodzącej w procesie wytwarzania, ocenę wpływu struktury prekursora na przebieg procesu renaturacji białka liderowego, a następnie na proces konwersji enzymatycznej substancji czynnej. W ostatnim etapie badań planowano ocenę wpływu sekwencji aminokwasowej prekursora na odtwarzanie struktury przestrzennej oraz aktywność biologiczną substancji czynnej – rekombinowanej insuliny ludzkiej. Cel pracy jest przejrzysty i dobrze zredagowany.

Na kolejnych 21 stronach umiejscowiono szczegółowo napisaną część *Materiał i metody*. Materiał badawczy stanowiły: jednołańcuchowy prekursor rekombinowanej insuliny ludzkiej, rekombinowana insulina ludzka, roztwory procesowe otrzymane na etapie foldingu oraz roztwory otrzymane po etapie trawienia trypsyną. Materiał ten pochodził od firmy Bioton S.A.. Jako produkty referencyjne wykorzystane zostały produkty lecznicze wytworzone przez firmę *E. Lilly*. W tej części dysertacji znajdziemy również wykazy wszystkich stosowanych odczynników i substancji chemicznych oraz

użytą do badań aparaturę pomiarową wraz z dokładnym opisem dobranych warunków analizy HPLC użytych do oceny czystości badanego materiału na etapach foldingu i trawienia trypsyną. Analizę sekwencji aminokwasowej białka wykonano w oparciu o metodę Edmana. Do badania mechanizmu deamidacji zastosowano spektrometrię mas z technologią MALDI TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*). Przy ocenie struktury drugorzędowej rekombinowanej insuliny wykorzystano spektroskopię dichroizmu kołowego, CD (*Circular Dichroism*) i spektroskopię fourierowską, FTIR (*Fourier Transform Infrared*). Pomiar wiązania insuliny do receptorów insuliny ludzkiej IR (*Insulin Receptor*) i receptora insulinopodobnego czynnika wzrostowego I, IGF-IR (*Insulin-like Growth Factor I Receptor*) wykonano z użyciem testu radioimmunologicznego RIA (*Radioimmunoassay*). Należy podkreślić, że wszystkie wymienione analizy wykonano uwzględniając wymogi i wytyczne EMA.

Część *Wyniki* została zawarta na kolejnych 40 stronach. Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione na 43 kolorowych rycinach i zebrane w 9 tabelach. Wszystkie zawarte informacje zostały zaprezentowane w sposób czytelny, umożliwiając zainteresowanym osobom przeprowadzenie niezależnych analiz. Należy zaznaczyć, że zebrane dane wymagały przeprowadzenia wielu specjalistycznych badań. Pokazały one bardzo dobry warsztat analityczny Doktorantki.

Dyskusja, umiejscowiona na kolejnych 8 stronach, to wyważone i rzeczowe studium. Doktorantka dokonała tam dojrzałej i syntetycznej oceny przeprowadzonych badań, którą podparła właściwie dobranym piśmiennictwem. W tej części ujawnia się Jej talent i umiejętność prowadzenia krytycznej analizy i interpretacji uzyskanych wyników. Sposób przedstawienia dyskusji nie pozostawia wątpliwości co do dobrego przygotowania i predyspozycji mgr Renaty Pawlak-Morka do pracy naukowej.

Na kolejnej stronie przedstawiono *Wnioski*. Konkluzje tam wysunięte są uzasadnione i mają odzwierciedlenie w przeprowadzonych badaniach. Doktorantka w swojej pracy wykazała obecność kwasu asparginowego w pozycji 26 fragmentu zawierającego zmodyfikowaną sekwencję dysmutazy ponadtlenkowej, udowodniła, że przemiana asparginy w kwas asparginowy zachodzi w wyniku reakcji deamidacji w środowisku alkalicznym w procesie foldingu. Przeprowadzone badania potwierdziły, że struktura prekursora insuliny zapewnia prawidłowy i powtarzalny przebieg foldingu oraz konwersji enzymatycznej białka. Wykazano pełną zgodność strukturalną II rzędu

pomiędzy insuliną Bioton S.A. i wzorcem, potwierdzono jednakowy stopień powinowactwa badanej insuliny do receptorów IR oraz IGF-IR w stosunku do leków referencyjnych.

Na dalszych czterech stronach maszynopisu odnajdziemy streszczenie w języku polskim i angielskim. Należy zaznaczyć, że to ważny element pracy, wymaga bowiem takiego przedstawienia, by osobę czytającą zachęcić do dalszej lektury. W odczuciu recenzenta kryterium to zostało spełnione. Na kolejnych pięciu stronach umieszczono *Piśmiennictwo* liczące 91 pozycji. Jego dobór i zastosowanie w tekście wskazują, że Doktorantka przed przystąpieniem do badań gruntownie zapoznała się z piśmiennictwem dotyczącym poruszanej tematyki. Ostatnie dwie strony poświęcono na *Wykaz stosowanych skrótów oraz terminów*.

Zapoznając się z maszynopisem napotkałem drobne błędy, np.: w podpisie rycin 7 i 9 zdublowano wyrazy „insuliny ludzkiej”, str. 35 w czwartym wersie pod opisem ryciny 17 napisano „dokładanym” zamiast „dokładnym”, str. 55 w pierwszym zdaniu po rycinie 40 zamiast „oczekiwaniami” powinno być „oczekiwanymi”, str. 67 w zdaniu pod opisem ryciny 52 jest „inuliny” zamiast „insuliny”, w przedostatnim wersie na stronie 68 jest „izoaspraginowy” a powinno być „izoasparaginowy” (podobnie na stronie 84 w wersie 5), na stronie 84 wers 7 w słowie „foldingu” brak litery „n”. Na rycinach przedstawiających chromatogramy dostrzegłem brak opisu osi. Po dokładnej analizie maszynopisu mam kilka uwag. W tekście zabrakło szerszego odniesienia do walidacji stosowanych metod analitycznych. Co prawda, Doktorantka wspomniała w części *Material i metody*, że analizy zostały przeprowadzone zgodnie z wymaganiami i wytycznymi EMA, jednak ten wątek należałoby uszczegółowić. W rozdziale *Wyniki*, w części odnoszącej się do pomiarów biologicznych, średnie IC_{50} raz są przedstawione z dokładnością do trzeciego miejsca, a innym razem do drugiego miejsca po przecinku (odpowiednio tabele 12 i 15). Przy obliczaniu kryteriów akceptacji dla wartości IC_{50} Doktorantka oparła się o test t-Studenta, który należy do testów parametrycznych. Czy zatem badano założenia, które przy testach parametrycznych winny być uwzględnione?

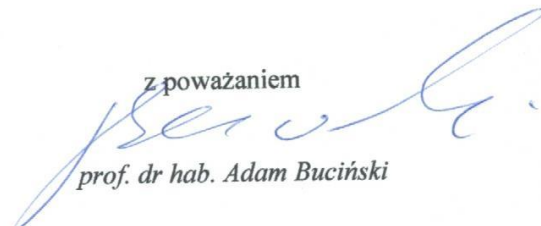
Chciałbym w tym miejscu zaznaczyć, że powyższe uwagi przytaczam z obowiązku recenzentkiego i nie wpływają one istotnie na moją całościową opinię o pracy, którą

oceniam wysoko. Mam nadzieję, że staną się one przyczynkiem do dyskusji podczas publicznej obrony.

Po dokładnej analizie tekstu stwierdzam, że rozprawa została napisana dobrym, mimo złożonej tematyki, łatwym w odbiorze językiem i stanowi oryginalne osiągnięcie Autorki, wnoszące nowe informacje do prezentowanej tematyki badawczej. Cel pracy został precyzyjnie zdefiniowany, badania prawidłowo zaplanowano i wykonano. Dyskusja jest dojrzała, świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Kandydatki ubiegającej się o stopień naukowy, poparta jest wynikami wykonanych pomiarów i aktualnym piśmiennictwem specjalistycznym.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że oceniana praca doktorska Renaty Pawlak-Morka pt.: *„Wpływ struktury jednołańcuchowego prekursora insuliny na proces wytwarzania rekombinowanej insuliny ludzkiej”* jest wartościowa i spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych. Wnoszę zatem do Pani Dziekan i Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Renaty Pawlak-Morki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

z poważaniem



prof. dr hab. Adam Buciński