

Poznań, 02.09.2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Patryka Nowickiego

**pt. Gonadotropowa i immunotropowa aktywność nanodiamentów oraz ich koniugatów z *Neb-*
*kolostatyną i jej analogami u chrząszcza *Tenebrio molitor****

wykonanej

w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt UAM w Poznaniu

pod kierunkiem Prof. UAM dr hab. Elżbiety Czarniewskiej

Recenzja została przygotowana na wniosek rady naukowej dyscypliny nauki biologiczne UAM z dnia 22 maja 2020 roku.

1. Przedmiot rozprawy oraz jego naukowe znaczenie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Patryka Nowickiego dotyczy spójnego tematycznie zagadnienia obejmującego badanie wpływu peptydów pochodzenia owadziego oraz ich analogów na funkcje rozrodcze i immunologiczne chrząszcza mącznika młynarka. Prace te, choć na początku o charakterze badań podstawowych, z całą pewnością mogą mieć bezpośrednie przełożenie na projektowanie i stosowanie nowoczesnych insektycydów. Ze względu na ważną i pożyteczną rolę wielu gatunków owadów dla człowieka, poszukiwanie nowych metod zwalczania szkodników powinno koncentrować się na syntezie bioinsektycydów o specyficznym gatunkowo działaniu. Optymalnym rozwiązaniem pozwalającym uniknąć narażenia kręgowców na działanie środków o aktywności insektycydowej może być również rezygnacja z nieselektywnych neurotoksyn i zastąpienie ich cząsteczkami o działaniu narządowo specyficznymi. Takimi cząsteczkami, wykazującymi powinowactwo przede wszystkim do układu immunologicznego i rozrodczego owadów mogą być selektywne peptydy.

Poszukiwanie nowych schematów zwalczania szkodników owadzych wiąże się obecnie z licznymi działaniami niepożądanymi, jak np. brak selektywności gatunkowej, co przekłada się na niekorzystny aspekt ekologiczny, ale także z wysokimi nakładami ekonomicznymi. Dlatego też w mojej opinii badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej nad skuteczną, a zarazem selektywną metodą zwalczania szkodników owadzych wpisują się w jeden z głównych nurtów współczesnych nauk biologicznych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 140 stron i obejmuje następujące rozdziały: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię zawierającą 226 pozycji literaturowych.

Pracę otwiera „Wstęp” liczący 34 strony będący przeglądem literatury wprowadzającym do tematu rozprawy doktorskiej. Został on podzielony na 8 podrozdziałów, w którym Doktorant charakteryzuje kolejno: metody ograniczania liczebności owadów szkodliwych dla człowieka, działanie hormonów miotropowych oraz gonadotropowych owadów, *Neb*-kolostatynę i jej analogi pod względem ich struktury chemicznej i aktywności biologicznej, budowę żeńskiego układu rozrodczego i immunologicznego owadów, następnie klasyczne metody wprowadzania peptydów do wnętrza ciała owada i w końcu nanodiamenty jako przenośniki aktywnych biologicznie związków. Uważam, że ta część pracy została przygotowana przez mgr. Nowickiego bardzo starannie z wykorzystaniem bardzo dobrych źródeł literaturowych. Rozdział ten został napisany bardzo dobrym, jasnym i czytelnym językiem, a dodatkowo zilustrowany jest odpowiednimi rycinami. Opracowanie to doskonale wprowadza czytelnika w kolejne rozdziały pracy czyli Wyniki i Dyskusję.

W streszczeniu (wersji polsko- i anglojęzycznej) Doktorant zawarł podsumowanie zagadnień w omawianych publikacjach oraz wnioski z przeprowadzonych badań, które są poprawnie sformułowane.

2. Szczegółowe cele rozprawy i zastosowana metodyka badawcza

Badania prowadzone z udziałem różnorodnych peptydów regulujących procesy fizjologiczne u owadów sugerują możliwość wykorzystania tych związków lub ich odpowiednio zmodyfikowanych pochodnych w celu ograniczenia liczebności owadów szkodliwych dla człowieka. Zaletą podejścia wykorzystującego peptydy wyizolowane z różnych tkanek owadów jest ograniczenie ich działania do tej grupy bezkręgowców. Bezpieczne dla innych zwierząt i człowieka oraz dla środowiska peptydy lub ich mimetyki mogą więc w przyszłości stanowić alternatywę dla obecnie wykorzystywanych jako insektycydy trudno degradable i niespecyficznych toksyn.

Gonadoinhibicyjne i hemocytotoksyczne właściwości *Neb*-kolostatyny oraz hemocytotoksyczna aktywność jej analogów wskazują na potrzebę kompleksowych badań nad immunotropową aktywnością *Neb*-kolostatyny oraz jej wpływem na rozwój owadów, a także immunotropową i gonadotropową aktywnością hemocytotoksycznych analogów tego peptydu oraz ich wpływem na metamorfozę.

Pierwszym celem pracy było poznanie działania tych peptydów na układ immunologiczny, rozrodczy i rozwój *T. molitor*, co miało pozwolić na identyfikację najbardziej efektywnych analogów *Neb*-kolostatyny zaburzających ważne dla życia owada funkcje oraz wykazać największą podatność na działanie tych analogów w zależności od etapu rozwoju. Warunkiem zastosowania funkcjonalnych peptydów pochodzenia owadziego lub ich analogów jako bioinsektycydów jest ich efektywne wprowadzenie do wnętrza ciała owada z pominięciem drogi pokarmowej, czyli pokonanie przez te cząsteczki kutikuli owada, która jest strukturalno-funkcjonalną barierą chroniącą komórki, tkanki i narządy przed niekorzystnym działaniem różnorodnych abiotycznych i biotycznych czynników. W związku z tym, drugim celem pracy było zbadanie czy nanodiamenty przechodzą przez kutikulę do hemolimfy owada i jakie będzie ich działanie na układ immunologiczny i rozrodczy, rozwój oraz ich biodystrybucja w wybranych tkankach owada, w przypadku pokonania tej bariery. Trzecim głównym celem pracy było zbadanie biokompatybilności nanodiamentów i ich potencjału transportowego, a więc przeniesienia przez kutikulę do wnętrza ciała owada *Neb*-kolostatyny i jej analogów o najsilniejszej aktywności immunotropowej i gonadotropowej przy zachowaniu specyficznej aktywności peptydów.

Główne cele badawcze realizowano poprzez szczegółowe zadania, w których kolejno badano: 1) wpływ *Neb*-kolostatyny na liczbę hemocytów krążących w hemolimfie, komórkową (fagocytoza i nodulacja) i humoralną (aktywność oksydazy polifenolowej), 2) wpływ hemocytotoksycznych analogów *Neb*-kolostatyny na liczbę hemocytów krążących w hemolimfie, odpowiedź komórkową (fagocytoza i nodulacja) i humoralną (aktywność oksydazy polifenolowej), rozwój jajnika i proces oogenezy, składanie jaj i ich wylęgalsność oraz rozwój *T. molitor* jak również, 3) przechodzenie NDs przez kutikulę do hemolimfy *T. molitor* i ich wpływ na odpowiedź komórkową i humoralną, rozwój jajnika i proces oogenezy, składanie jaj i ich wylęgalsność oraz rozwój *T. molitor*. Badano także biodystrybucję NDs w wybranych tkankach owada, przechodzenie kompleksów NDs z *Neb*-kolostatyną lub jej analogami przez kutikulę do wnętrza ciała owada i wpływ tych kompleksów na odpowiedź komórkową i humoralną oraz regulację rozrodu i rozwój.

Aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorant zastosował szereg technik, które moim zdaniem były w pełni odpowiednie do ich realizacji. Zostały one bardzo szczegółowo opisane w rozdziale „Materiały i metody”.

3. Najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy

Rozprawa przedstawia rezultaty kilkudziesięciu obszernych doświadczeń. Najistotniejsze wyniki uzyskane w wyniku realizacji pracy to wykazanie, iż nanodiamenty:

- przenikają przez kutikulę chrząszcza *Tenebrio molitor* nie wykazują aktywności hemocytotoksycznej;

- umożliwiają wprowadzenie *Neb*-kolostatyny z powierzchni kutikuli *T. molitor* do wnętrza ciała owada przy zachowaniu hemocytotoksycznej aktywności peptydu
- nie wpływają na liczbę hemocytów krążących w hemolimfie niezależnie od sposobu aplikacji i stadium rozwojowego *T. molitor*
- nie wykazują aktywności immunotropowej ani gonadotropowej u larw, poczwerek i osobników dorosłych *T. molitor*. Powodują jedynie krótkotrwałe opóźnienie składania jaj oraz zaburzenia embriogenezy. Nie zaburzają natomiast metamorfozy *T. molitor*.

Wyniki te wyraźnie wskazują, że nanodiamenty są bezpiecznymi nośnikami nie wykazującymi właściwości cytotoksycznych i mogą być wykorzystane do wiązania czynników o aktywności biologicznej.

Doktorant wykazał, że *Neb*-kolostatyna i jej analogi niezwiązane z nanodiamentami, aplikowana na powierzchnię kutikuli nie przedostaje się do wnętrza ciała *T. molitor*, ale podawane drogą iniekcji obniżają liczbę hemocytów krążących w hemolimfie *T. molitor*, w każdym stadium rozwojowym, wykazują aktywność immunoinhibicyjną i gonadoinhibicyjną u larw, poczwerek i osobników dorosłych *T. molitor*, a także hamują składanie jaj i zaburzają embriogenezę.

W badaniach zależności struktura-aktywność wyselekcjonowano cztery analogi *Neb*-kolostatyny o silnej aktywności gonado- i immunoinhibicyjnej: [Ala¹]-, [Val¹]-, [Hyp⁴]- oraz [Ach⁴]-kolostatynę, którymi następnie funkcjonalizowano powierzchnię NDs.

W trakcie tych badań również stwierdzono, że najsilniejszy efekt działania u *T. molitor* obserwowany był w stadium poczwarki.

Realizacja założonych celów badawczych doprowadziła także do konkluzji, iż aplikacja każdego z koniugatów składających się z NDs opłaszczonych *Neb*-kolostatyną lub każdym z czterech najbardziej aktywnych analogów na powierzchnię kutikuli *T. molitor* indukowała silny efekt immunoinhibicyjny i gonadoinhibicyjny, charakterystyczny dla działania tych peptydów oraz powodowała zaburzenia metamorfozy.

W pracy wykazano więc, że NDs przenikają przez kutikulę owada oraz umożliwiają wprowadzenie *Neb*-kolostatyny z powierzchni kutikuli do wnętrza ciała chrząszcza przy zachowaniu hemocytotoksycznej aktywności peptydu, zależnej od jego dawki. Aplikacja NDs lub *Neb*-kolostatyny oddzielnie na powierzchnię kutikuli nie powoduje apoptozy hemocytów co dowodzi, że nanocząsteczki nie działają hemocytotoksycznie a peptyd bez przenośnika nie przenika tej wielowarstwowej i hydrofobowej bariery.

4. Znaczenie uzyskanych wyników

Przeprowadzone badania po raz pierwszy wykazały skuteczność wykorzystania nanotechnologicznego podejścia umożliwiającego wprowadzenie peptydu przy zachowaniu jego biologicznej aktywności przez kutikulę do wnętrza ciała owada za pomocą nanocząsteczek diamentu. Badania zależności struktura-aktywność pozwoliły zidentyfikować cztery analogi *Neb*-kolostatyny o silniejszej aktywności gonado- i immunotropowej, którą zachowują także po transkutikularnym wprowadzeniu do hemocelu w koniugacie z NDs. Uzyskane wyniki sugerują możliwość praktycznego wykorzystania koniugatów nanocząsteczek z peptydami o gonadoinhibicyjnych i immunoinhibicyjnych właściwościach w celu ograniczenia liczebności i żywotności owadów szkodliwych dla człowieka.

5. Komentarze, uwagi i pytania

1. Badanie nodulacji i fagocytozy opiera się o obserwacje mikroskopowe. Na podstawie tak uzyskanych wyników przedstawiono wykresy i określono istotność statystyczną otrzymanych danych. Opisy przeprowadzonych badań są szczegółowe, pojawia się tu jednak pytanie, dlaczego wyniki te nie zostały zilustrowane reprezentatywnymi zdjęciami mikroskopowymi?

2. Na stronie 54 mgr Nowicki pisze, że „O niezmienionej żywotności hemocytów owadów traktowanych topikalnie NDs lub peptydem świadczył brak zmian w organizacji cytoszkieletu, prawidłowy wzór chromatyny w jądrach komórkowych oraz brak aktywnych kaspaz w cytoplazmie komórek. To badanie wykazało, że NDs wprowadzone transkutikularną drogą do wnętrza ciała owada, w zastosowanej dawce, były nietoksyczne dla hemocytów, natomiast pro-apoptotyczny peptyd nie przeszedł z powierzchni kutikuli do hemolimfy owada”. Nie znajduję jednak wśród wyników przedstawionych w pracy takich, które by tę tezę w pełni potwierdzały. Dołączone zostały zdjęcia mikroskopowe pokazujące morfologię i żywotność hemocytów barwionych pod kątem obecności aktywnych kaspaz, F-aktyny czy stwierdzających stopień integralności DNA. Wspomniane zmiany, jeśli rzeczywiście nastąpiły, nie zostały niestety wskazane na zdjęciach ani nie zostały dokładnie w opisie wyników wyjaśnione. Na tej podstawie trudno stwierdzić, czy takie zmiany, w szczególności te dotyczące cytoszkieletu czy fragmentacji DNA są tutaj istotne.

3. Odnosząc się dalej do działania koniugatu ND i *Neb*-kolostatyny, Doktorant wysnuł wniosek iż depolimeryzacja F-aktyny czy zmiany w organizacji chromatyny dowodzą aktywności pro-apoptotycznej wprowadzonych koniugatów. Czy jednak badania te nie powinny być poszerzone o analizy na poziomie molekularnym? Czy brana była pod uwagę ewentualność, iż zmiany te mogą przede wszystkim wpływać na cykl komórkowy? A zmiany w polimeryzacji F-aktyny mogą także wynikać m.in. z rearanżacji macierzy zewnątrzkomórkowej?

4. Doktorant przedstawia różnice w odpowiedzi na traktowanie peptydomimetykami w zależności od stadium rozwoju owada. Czy różnice w budowie kutikuli w zależności od tego stadium mogą wpływać na lepszą penetrację peptydu i wywoływać określone zmiany w funkcjonowaniu układu immunologicznego i rozrodczego? To zagadnienie nie zostało niestety zaadresowane w dyskusji wyników.

5. Czy są znane induktory wobec których można odnieść działanie peptydomimetyków badanych w pracy? Obserwuje się tutaj szerokie spektrum działania, a odniesienie do potencjalnego znanego inhibitora rozrodu lub układu immunologicznego pozwoliłoby na wyższą ocenę organo-specyficznego działania zastosowanych peptydów i ich koniugatów.

6. Podsumowanie

W ocenianej pracy mgr. Patryka Nowickiego doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane i wykonane, a uzyskane wyniki przyczyniają się do lepszego poznania omawianej tematyki. Dlatego praca doktorska jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego, stanowiąc zarazem podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce.

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Patryka Nowickiego spełnia wszystkie ustawowe warunki i kryteria, jakim powinna odpowiadać praca na stopień doktora nauk biologicznych. Zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Patryka Nowickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 02.09.2020



Dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN