

Bydgoszcz, 12.09.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr **Marcina Hołoty** pt.

„Karbokrzemowe dendrymery z atomami miedzi jako nośniki leków i materiału genetycznego w terapii przeciwnowotworowej.”

wykonanej w Katedrze Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Maksima Ionova oraz dr Sylwii Michlewskiej w roli promotora pomocniczego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech publikacji dotyczących charakterystyki karbokrzemowych dendrymerów zawierających atomy miedzi z ligandami azotowymi i chlorkowymi, oraz badań dotyczących ich potencjalnego wykorzystania jako nośniki chemioterapeutyków oraz siRNA.

Powszechność chorób nowotworowych oraz problemy terapeutyczne, z jakimi borykamy się na co dzień, sprawiają, że wiele zespołów badawczych poszukuje nowych strategii walki z nowotworami. Różnorodność genetyczna, biologiczna oraz różnice osobnicze obserwowane w przebiegu różnych typów nowotworów powodują, że nie ma dobrego rozwiązania systemowego. Skuteczne względem komórek nowotworowych cytostatyki, często oddziałują również na komórki zdrowe. Strategie terapii genowej napotykać na problemy zmian, nad którymi nie jesteśmy w stanie zapanować. Poszukiwanie nowych leków, nowych terapii genowych, często ograniczone jest poprzez niewłaściwą dystrybucję, nadmierne oddziaływanie na komórki zdrowe, zbyt duże dawki terapeutyczne i szereg innych problemów, które skłoniły badaczy do poszukiwania rozwiązań prowadzących do powstania „inteligentnych” leków oraz rozwiązań ułatwiających ich dystrybucję do komórek nowotworowych. Wobec powyższego, temat pracy doktorskiej jest bardzo aktualny, a zastosowane modele badawcze wskazują na dużą nowatorskość przeprowadzonych badań.

Układ edytorski rozprawy doktorskiej ocenia bardzo pozytywnie. Praca przygotowana bardzo starannie zawiera podstawowe elementy, takie jak: spis treści, skróty, krótkie wprowadzenie oraz postawione hipotezę i cele badawcze. Dodatkowo Autor przedstawił krótkie informacje na temat przedmiotu badań oraz metodyki, a następnie zamieścił omówienie trzech prac wchodzących w skład rozprawy zakończone Wnioskami. Część opisową kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo w liczbie 43 pozycji. Jest to literatura w większości z ostatnich 5 lat, poprawnie zacytowana we Wprowadzeniu. Kolejnym elementem opracowania jest zamieszczony dorobek naukowy i informacje o działalności naukowej i organizacyjnej oraz publikacje z oświadczeniami współautorów na temat udziału w powstawaniu tych publikacji.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena możliwości wykorzystania karbokrzemowych dendrymerów z atomami miedzi jako nośników proapoptotycznego siRNA oraz leków przeciwnowotworowych do komórek nowotworowych. Wyznaczono szczegółowe cele, które dotyczyły biofizycznej charakterystyki karbokrzemowych metalodendrymerów zawierających atomy miedzi oraz określenie ich właściwości hemolitycznych i cytotoksycznych. Ponadto, przeprowadzono ocenę zdolności metalodendrymerów do tworzenia kompleksów z kwasami nukleinowymi oraz lekami przeciwnowotworowymi, oraz ocenę terapeutycznego działania uzyskanych kompleksów z wykorzystaniem hodowli komórkowych.

Model badawczy zakładał dwie grupy karbokrzemowych dendrymerów zawierających atomy miedzi różniące się ligandem powierzchniowym (w pierwszej - ligand chlorkowy, w drugiej – azotanowy) oraz w obu grupach rozpatrywano dendrymery zerowej, pierwszej oraz drugiej generacji.

Część eksperymentalna oraz omówienie wyników została zawarta w 3 pracach eksperymentalnych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym o łącznej punktacji zamieszczonych publikacji wg. MEN to 340 punktów i łączny IF = 16,611. Zamieszczone w rozprawie prace były cytowane łącznie już 38 razy. Doktorant obszernie omówił zawarte w poszczególnych pracach tezy, procedury badawcze, wyniki oraz wnioski z nich wynikające. Prace badawcze stanowiące cykl prezentowanej rozprawy doktorskiej zostały już wcześniej pozytywnie ocenione przez zespoły redakcyjne i niezależnych recenzentów prestiżowych czasopism naukowych, co potwierdza, że podjęte badania były prawidłowo zaplanowane i właściwie zrealizowane.

Do najciekawszych wyników z przeprowadzonych badań zamieszczonych w pracy nr 1 niewątpliwie należą obserwacje dotyczące szczegółowych danych na temat biofizycznych właściwości dendrymerów w zależności od podstawników i generacji. Wykazano, że wszystkie metalodendrymery cechowały się znacznie wyższą toksycznością wobec komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Dodatkowo wykazano, że nanocząstki z ligandem azotanowym były bardziej cytotoksyczne niż z ligandem chlorkowym. W pracy nr 2 podjęto próbę określenia zdolności dendrymerów zawierających miedź do tworzenia kompleksów z proapoptotycznymi siRNA oraz ocena zdolności wnikania do komórek nowotworowych z określeniem cytotoksyczności względem komórek linii MCF-7. Wykazano, że dendrymery drugiej generacji wydajniej wprowadzają kwas nukleinowy do komórek w porównaniu do dendrymerów pierwszej generacji, a dendrymery zerowej generacji nie kompleksują siRNA. Cytotoksyczność utworzonych kompleksów w stosunku do komórek nowotworu piersi MCF-7 była znacząco wyższa w porównaniu do samych dendrymerów. Praca nr 3 zawiera wyniki badań dotyczących kompleksowania z lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak: doksorubicyna, metotreksat i 5-fluorouracyl. Modelem badawczym były linie komórek nowotworowych (MCF-7 i HepG2). Wykazano, że zastosowanie dendrymerów i leków przeciwnowotworowych połączonych w jednym nanokompleksie przynosi pożądane efekty cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych już przy niższych stężeniach komponentów, co może promować tego typu rozwiązania w praktyce klinicznej.

W oparciu o przeprowadzone badania sformułowano cztery podstawowe wnioski:

1. Karbokrzemowe dendrymery z atomami miedzi są bardziej cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych niż komórek prawidłowych.

2. *Badane metalodendrymery tworzą kompleksy z proapoptotycznymi siRNA i lekami przeciwnowotworowymi.*

3. *Dendrymery CCD skutecznie wprowadzają lecznicze siRNA do komórek, chroniąc je przed degradacją w obecności nukleaz.*

4. *Utworzone kompleksy Dendrymer/Lek-(DOX, MTX lub 5-Fu) w zastosowanych stężeniach są bardziej cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych niż nieskompleksowane komponenty.*

Są one odpowiedzią na postawione pytania w celach pracy, ale i wskazują na potencjalne zastosowanie wyników badań w praktyce. Dają podstawę do wdrażania nowych rozwiązań terapeutycznych w chorobach nowotworowych. Wpisuje się to w nurt badań dotyczących poszukiwania leków, rozwiązań terapeutycznych, skutecznie eliminujących komórki nowotworowe, ale i bardziej bezpiecznych i łagodnych w stosunku do komórek prawidłowych.

Co do drobnych niedociągnięć to muszę przyznać, że nie wiele mogłem tu znaleźć. Rozprawa napisana ładnym językiem z zachowaniem dobrego stylu, czyta się z przyjemnością. Sprokowany wnioskami wynikającymi z przeprowadzonych badań, chciałem dopytać Doktoranta odnośnie wniosku nr 1, czy zna opracowania porównujące właściwości, cytotoksyczność karbokrzemowych dendrymerów bez atomów metali? Nie wynika jasno wybór modelu badawczego z przeglądu literaturowego a jedynym rzeczowym wskazaniem jest dostępność dendrymerów zawierających miedź w ramach współpracy z zespołem Prof. de la Maty z Uniwersytetu w Alcalá de Henares (Hiszpania).

We wniosku nr 3, bardzo cenna informacja dotycząca skuteczności wprowadzania siRNA do komórek, nie jest równoznaczna z oceną skuteczności wprowadzonego siRNA przez pryzmat spadku stężenia białek, którego mRNA było celem. Czy nie warto by pokusić się na ocenę różnic w ilości tych białek w komórkach traktowanych badanym nanokompleksem z siRNA i bez. To dałoby możliwość wyjaśnienia mechanizmu prowadzącego do większej podatności na apoptozę w badanych modelach.

Oczywiście, bardzo ciekawe obserwacje z prowadzonych badań, zawsze powodują dostrzeżenie nowych kierunków ich rozwoju. Ograniczenia dotyczące linii komórkowych zawsze spotykają się z krytyką i brakiem bezpośredniego przełożenia na model kliniczny. Czy w przyszłości planowane są dalsze badania z wykorzystaniem chociażby modelu zwierzęcego?

Analizując przedstawione publikacje oraz określone udziały poszczególnych autorów w ich powstaniu, należy stwierdzić, że Doktorant opanował bardzo dobrze warsztat metodyczny, począwszy od podstawowych technik laboratoryjnych poprzez techniki biofizyczne aż po wyrafinowane techniki z zakresu biologii molekularnej. Wieloautorskie prace, w których mgr Marcin Hołota jest wiodącym autorem, wskazują na umiejętności Doktoranta współpracy w zespołach badawczych, co niewątpliwie świadczy o Jego dojrzałości naukowej. W skład całkowitego dorobku naukowego Doktoranta wchodzi dodatkowo 5 artykułów w indeksowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz udział w pięciu konferencjach naukowych. Należy podkreślić, że mgr Hołota swoje doświadczenie wzbogacił również w zakresie trzech dwutygodniowych staży naukowych w ośrodkach zagranicznych. Był również stypendystą w ramach projektu M-ERA NET 2 finansowanym przez NCN.

Podsumowując, w oparciu o ocenę zbioru prac stanowiących osiągnięcie naukowe, przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz całkowitego dorobku naukowego stwierdzam, że mgr Marcin Hołota spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (z późn. zm.). Badania, których efektem są publikacje zawarte w rozprawie doktorskiej, stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne. Wnoszę zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Marcina Hołoty i dopuszczenie do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dodatkowo, wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marcina Hołoty.

Jako uzasadnienie pragnę podkreślić bardzo wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej oraz fakt, że wyniki badań przeprowadzonych w doktoracie w całości zostały opublikowane w renomowanych czasopiśmie naukowych o zasięgu międzynarodowym. Nowatorskość badań oraz ich rangę podkreślają cytowania tych prac przez innych autorów. Na dzień dzisiejszy jest to już wg. bazy Scopus 38 cytowania. Badania przeprowadzone przez Doktoranta wykonane zostały przy użyciu wyrafinowanych technik biologii molekularnej, które są powszechnie akceptowane przez naukowców zajmujących się tą tematyką. Sformułowane wnioski z przeprowadzonych badań wskazują na wysoki potencjał zastosowania uzyskanych informacji w opracowywaniu strategii terapeutycznych.

KIEROWNIK
Katedra Biochemii Klinicznej

dr hab. Marek Foksiński, prof. UMK