

Kielce, 5.09.2023

Dr hab. Michał Arabski
Zakład Biologii Medycznej
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Jan Kochanowskiego w Kielcach

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Marcina Hołoty

Karbokrzemowe dendrymery z atomami miedzi jako nośniki leków i materiału genetycznego w terapii przeciwnowotworowej
stanowiącej podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora

Terapie wykorzystujące zjawisko interferencji RNA posiadają ogromny potencjał w leczeniu nowotworów, zaburzeń genetycznych oraz infekcji wirusowych. W okresie ostatnich lat nastąpił ogromny postęp w rozwoju tej strategii leczenia chorób opartej na wyciszaniu docelowych genów. Obecnie ponad 20 terapii opartych na siRNA znajduje się w badaniach klinicznych, na co istotny wpływ miało zatwierdzenie przez FDA w sierpniu 2018 r. leku o nazwie ONPATRO do leczenia polineuropatii wywołanej przez dziedziczną amyloidozę zależną od transtyretyny. Jednym z kluczowych elementów bezpośrednio wpływającym na skuteczność, swoistość oraz bezpieczeństwo terapii jest system efektywnego dostarczenia leku. W przypadku siRNA rozważa się szereg niewirusowych systemów jego transportu w formie koniugatów, czy z zastosowaniem polimerów. Zagadnienie to jest bardzo aktualne, a przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska w pełni wpisuje się w tą tematykę. Co istotne, w pracy zweryfikowano szeroko potencjał karboksykrzemowych dendrymerów z atomami miedzi jako nośników, nie tylko materiału genetycznego, ale również wybranych leków w kontekście przełamania oporności w terapii przeciwnowotworowej.

Cel pracy doktorskiej Pana mgr Marcina Hołoty pt. "*Karbokrzemowe dendrymery z atomami miedzi jako nośniki leków i materiału genetycznego w terapii przeciwnowotworowej*" został klarownie sformułowany oraz w ramach zrealizowanej pracy osiągnięty. Doktorant ocenił możliwość wykorzystania karboksykrzemowych dendrymerów z atomami miedzi jako nośników

proapoptycznych siRNA tj siBcl-2 i siMcl-1 oraz leków przeciwnowotworowych: doksorubicyny, metotreksatu oraz 5-fluorouracylu. Na realizację celu głównego składały się zadania szczegółowe związane z: (1) charakterystyką badanych metalodendrymerów pod kątem właściwości biofizycznych, hemolitycznych oraz cytotoksycznych, (2) oceną ich zdolności do tworzenia kompleksów z kwasami nukleinowymi oraz badanymi w pracy lekami przeciwnowotworowymi, (3) określeniem aktywności przeciwnowotworowej metalodendrymerów skompleksowanych z siRNA lub lekami oraz (4) oceną terapeutycznego działania kompleksów dendrymer/lek *in vitro*.

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Maksima Ionova (promotor) oraz dr Sylwii Michlewskiej pełniącej funkcję promotora pomocniczego, jako efekt współpracy interdyscyplinarnej z zespołem prod. F.J. de la Mata z Katedry Chemii Organicznej i Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu Alkala w Hiszpanii oraz prof. T. Hianik i prof. I. Vaczuliková z Katedry Fizyki Jądrowej i Biofizyki Uniwersytetu Komeńskiego w Bratysławie.

Na rozprawę składa się cykl spójnych tematycznie trzech publikacji naukowych o charakterze doświadczalnych o sumarycznym IF = 16.611 i 340 pkt. MEiN:

1. Hołota M, Magiera J, Michlewska S, Kubczak M, Del Olmo NS, García-Gallego S, Ortega P, de la Mata FJ, Ionov M, Bryszewska M. In Vitro Anticancer Properties of Copper Metallodendrimers. *Biomolecules*. 2019 Apr 18;9(4):155. doi: 10.3390/biom9040155. PMID: 31003561; PMCID: PMC6523220.
2. Sanz Del Olmo N, Holota M, Michlewska S, Gómez R, Ortega P, Ionov M, de la Mata FJ, Bryszewska M. Copper (II) Metallodendrimers Combined with Pro-Apoptotic siRNAs as a Promising Strategy Against Breast Cancer Cells. *Pharmaceutics*. 2020 Aug 2;12(8):727. doi: 10.3390/pharmaceutics12080727. PMID: 32748821; PMCID: PMC7464408.
3. Hołota M, Michlewska S, Garcia-Gallego S, Del Olmo NS, Ortega P, Bryszewska M, de la Mata FJ, Ionov M. Combination of Copper Metallodendrimers with Conventional Antitumor Drugs to Combat Cancer in In Vitro Models. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 17;24(4):4076. doi: 10.3390/ijms24044076. PMID: 36835489; PMCID: PMC9960994.

Udział Doktoranta w powstaniu powyższych prac jest dominujący (30%-53%) i został on bardzo precyzyjnie określony pod kątem merytorycznym w ramach stosowanych oświadczeń. Generalnie, dotyczył on zarówno przeprowadzenia części doświadczalnej pracy, analizy i interpretacji

uzyskanych wyników, jak również przygotowania manuskryptu oraz udział w jego publikacji. Tutaj chciałbym podkreślić dodatkową aktywność Doktoranta jako opiekuna dr Natalii Sanz del Olmo w nauce technik analitycznych z zakresu biofizyki oraz biologii. Ponadto, na podstawie publikacji naukowych oraz oświadczeń Doktoranta można stwierdzić o Jego szerokich umiejętnościach pracy laboratoryjnej z wykorzystaniem różnych technik biofizycznych (pomiarы średnicy hydrodynamicznej i potencjału zeta, anizotropii fluorescencji, wykonania widm dichroizmu kołowego, pomiarów polaryzacji fluorescencji, wytwarzania reaktywnych form tlenu czy mitochondrialnego potencjału błonowego), jak również technik biologicznych/immunochemicznych (cytometria przepływowa, test MTT, ocena aktywności hemolitycznej).

Przedmiotem badań w ramach rozprawy doktorskiej były dwie grupy karbokrzemowych dendrymerów zawierające atom miedzi zerowej, pierwszej oraz drugiej generacji różniące się ligandem powierzchniowym: chlorkowy lub azotowy. Tak zróżnicowane pochodne powyższych metalodendrymerów pozwoliły na szeroką ich charakterystykę aktywności biologicznej i właściwości nośnikowych określonych w celu rozprawy. Badania te wchodzące w skład **Publikacji 1**; *Anticancer Properties of Copper Metallodendrimers*) i przedstawiają charakterystykę biofizyczną powyższych dendrymerów z zastosowaniem m in. laserowej elektroforezy Dopplera, DLS oraz TEM. Pozwoliło to na ocenę wielkości i potencjału zeta oraz wskaźnika polidispersyjności. Badane dendrymery pomimo możliwości tworzenia agregatów oddziaływały z albuminą bydlęcą oraz błoną komórkową (erytrocytarną), co Doktorant analizował z zastosowaniem odpowiednio CD oraz pomiaru anizotropii fluorescencji znaczników DPH i TMA-DPH. Analiza widm CD wskazuje na drobne zmiany w drugorzędowej strukturze albuminy. Czy zmiany te są na tyle niewielkie, że nie będą miały wpływu na aktywność białek w szerszym kontekście terapeutycznym? Oddziaływanie z błoną komórkową było skorelowane z właściwościami hemolitycznymi i cytotoksycznymi dendrymerów, ich stężeniem oraz wzrostem generacji nanocząstki. Szczególnie istotnym wnioskiem jest wybiórczy efekt cytotoksyczny dendrymerów wobec komórek nowotworowych, zwłaszcza pierwszej generacji z ligandami chlorkowymi wobec komórek białaczkowych HL-60. W tej części rozprawy mam prośbę o próbę wyjaśnienia silniejszego efektu cytotoksycznego badanych metalodendrymerów wobec komórek nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych.

Publikacja 2 (*Metallo dendrimers Combined with Pro-Apoptotic siRNAs as a Promising Strategy Against Breast Cancer Cells*) przedstawia wyniki badań zarówno nad określeniem zdolności badanych metalodendrymerów do tworzenia kompleksów z proapoptycznymi siRNA, jak i efektów biologicznych utworzonych dendrykompleksów. Doktorant wykorzystując techniki DLS, pomiar

potencjału zeta oraz TEM wykazał tworzenie kompleksów dendrymerów pierwszej i drugiej generacji z siRNA Bcl-2 i siMcl-1, co chroniło je przed degradacją nukleolityczną (elektroforeza żelowa). Utworzone dendrykompleksy, zwłaszcza drugiej generacji zarówno z ligandem chlorkowym jak i azotowym, poprzez internalizację komórek nowotworowych MCF-7, wprowadzają oba badane siRNA, co jest pozytywnie skorelowane z ich wyższym efektem cytotoksycznym wobec natywnych form dendrymerów. W tej części recenzji mam pytanie dotyczące dodatkowej weryfikacji powyższego efektu na poziomie genetycznym. Na ile badania te umożliwiłyby poznanie szczegółów mechanizmu cytotoksycznego dendrykompleksów związanego z aktywnością biologiczną jego składowych.

Publikacja 3 (*Combination of Copper Metallodendrimers with Conventional Antitumor Drugs to Combat Cancer in In Vitro Models*) stanowi rozwinięcie analizy właściwości nośnikowych karbokrzemowych dendrymerów zawierających atom miedzi o możliwość transportu leków przeciwnowotworowych. Doktorant wykazał iż, badane dendrymery zwłaszcza pierwszej i drugiej generacji tworzą stabilne układy z doksorubicyną, metotreksatem oraz 5-fluorouracylem i jako dendrykompleksy mają silniejsze właściwości cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych linii MCF-7 oraz HepG2 tj. zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu oraz depolaryzacja błony mitochondrialnej skorelowana z procesem apoptozy. W tej części recenzji mam pytanie dotyczące kryteriów wyboru badanych leków przeciwnowotworowych.

Podsumowując, cykl publikacji wchodzący w skład rozprawy doktorskiej to spójna tematycznie praca badawcza o charakterze interdyscyplinarnym stanowiąca nową wiedzę w zakresie właściwości biologicznych karbokrzemowych dendrymerów w kontekście zastosowań przeciwnowotworowych, w tym terapeutycznym. Wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników badań jest prawidłowe i świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta. Uzyskane w publikacjach wyniki zestawiono z najnowszymi artykułami związanymi z realizowaną tematyką badawczą, z grupy prestiżowych czasopism naukowych.

Wyniki badań prezentowane były na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych. Ponadto, działalność naukową Doktoranta charakteryzuje udział w projekcie badawczym (M-ERA NET), trzech zagranicznych stażach naukowych w Hiszpanii i Słowacji oraz współautorstwo w pięciu prestiżowych publikacjach naukowych, poza wchodzącymi w skład rozprawy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Marcina Hołoty pt. *Karbokrzemowe dendrymery z atomami miedzi jako nośniki leków i materiału genetycznego w terapii przeciwnowotworowej* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego

i spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

Biorąc pod uwagę udokumentowaną umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktoranta oraz Jego wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne wnoszę do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr Marcina Hołoty do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Michał Audoła