



Dr hab. Teresa Kral

Wrocław, 10.09.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Mgr Marcina Holoty zatytułowanej:

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

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem promotora Pana Prof. dr hab. Maksima Ivanova oraz promotora pomocniczego Pani dr Sylwii Michlewskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z trzech prac:

1. **Holota, M.**; Magiera, J.; Michlewska, S.; Kubczak, M.; Sanz del Olmo, N.; García-Gallego, S.; Ortega, P.; de la Mata, F.J.; Ionov, M.; Bryszewska, M. In Vitro Anticancer Properties of Copper Metallodendrimers. *Biomolecules* 2019, 9, 155. <https://doi.org/10.3390/biom9040155>
2. Sanz del Olmo, N.; **Holota, M.**; Michlewska, S.; Gómez, R.; Ortega, P.; Ionov, M.; de la Mata, F.J.; Bryszewska, M. Copper (II) Metallodendrimers Combined with Pro-Apoptotic siRNAs as a Promising Strategy Against Breast Cancer Cells. *Pharmaceutics* 2020, 12, 727. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080727>
3. **Holota, M.**; Michlewska, S.; García-Gallego, S.; del Olmo, N.S.; Ortega, P.; Bryszewska, M.; de la Mata, F.J.; Ionov, M. Combination of Copper Metallodendrimers with Conventional Antitumor Drugs to Combat Cancer in In Vitro Models. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 4076. <https://doi.org/10.3390/ijms24044076>

Wszystkie trzy prace to oryginalne prace badawcze w języku angielskim i zostały opublikowane w latach 2019-2023, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z sumarycznym Impact Factor (IF) wynoszącym **16,611** co odpowiadało **340 punktom** MNiSW w latach publikacji.



Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mają charakter współautorski a udział Pana Mgr Marcina Hołoty zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów, jest wyraźnie określony na 53%, 30% oraz na 50%. Udział Doktoranta obejmuje wszystkie etapy pracy naukowej, począwszy od wykonania części eksperymentów dotyczących min. pomiarów rozmiarów hydrodynamicznych, potencjału zeta, pomiarów aktywności hemolitycznej oraz cytotoksyczności dendrymerów, pomiarów anizotropii oraz polaryzacji fluorescencji, pomiarów widm dichroizmu kołowego, pomiarów internalizacji z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz pomiarów reaktywnych form tlenu w komórkach. Pan Mgr Marcin Hołota współuczestniczył w opracowaniu wyników, ich analizie statystycznej i interpretacji oraz był współtwórcą manuskryptów każdej z prac wchodzących w rozprawę doktorską co świadczy o jego dojrzałości i samodzielności naukowej.

Do cyklu publikacji Pan Mgr Marcin Hołota dołączył 23 stron opracowania autorskiego w języku polskim. Opracowanie zawiera następujące rozdziały: wprowadzenie, określenie celu pracy, zdefiniowanie hipotezy badawczej, zwięzłe przedstawienie dwu grup testowanych dendrymetów karbokrzemowych oraz opis materiałów i metod, które były wykorzystane przez Doktoranta w badaniach. W dalszej części opracowania Pana Mgr Marcina Hołoty znajdziemy omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej ich podsumowanie i wnioski końcowe. Całość opracowania autorskiego Pana Mgr Marcina Hołoty zamyka streszczenie w języku polskim i angielskim oraz zestawienie całości dorobku naukowego. Opracowanie autorskie Doktoranta jest udokumentowane odniesieniami do 43 pozycji literaturowych, w przeważającej większości, z lat 2014-2023. Opracowanie autorskie jest napisane w sposób bardzo zwięzły i rzeczowy. Bardzo dobrze opracowany jest wstęp, jasno zdefiniowane są cele i wnioski.

Doktorant, poza publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, jest współautorem 5 prac które były opublikowane w czasopiśmie z listy JCR. Pan Mgr Marcin Hołota jest też współautorem 5 komunikatów zaprezentowanych na 1 zagranicznej i 4 krajowych konferencjach naukowych. W ramach działalności naukowej w okresie styczeń-grudzień 2022, Pan Mgr Marcin Hołota brał udział w międzynarodowym projekcie badawczym w ramach konkursu M-ERA NET 2 pt.: "Transfer nanocząstek przez barierę śród błonkową". W latach 2017-2019, Doktorant odbył w sumie trzy, dwutygodniowe staże naukowe w dwu różnych ośrodkach



naukowych w Hiszpanii oraz jednym na Słowacji. Przedstawione osiągnięcia naukowe Pana Mgr Marcina Hołoty, świadczą o ciągłym i wszechstronnym pogłębianiu doświadczenia naukowego w tym warsztatu badawczego i metodologicznego.

W latach 2016-2019 w ramach działalności organizacyjnej i promocyjnej Pan Mgr Marcin Hołota prowadził zajęcia w ramach Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki, Nocy Biologów, był członkiem komitetu organizacyjnego V Ogólnopolskiej konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen a także sprawował opiekę nad magistrantem Pana Prof. Maksima Ivanova, Panem Jakubem Magierą oraz wyzytującymi gośćmi zagranicznymi.

Przechodząc do mierzutu oceny rozprawy doktorskiej pragnę podkreślić, że jej główny cel, hipoteza badawcza oraz poszczególne etapy realizacji, zostały bardzo precyzyjnie określone i omówione. Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania dendrymerów karbokrzemowych z atomami krzemu jako nośników apoptotycznego siRNA oraz leków przeciwnowotworowych. Pan Mgr Marcin Hołota podjął bardzo istotną tematykę z punktu widzenia strategii leczenia nowotworów. Pomimo ogromnego postępu w opracowywaniu nowych leków przeciwnowotworowych, główną przyczyną wysokiej śmiertelności jest niemożność podania środków terapeutycznych tylko do miejsca nowotworu bez wywołania poważnych działań niepożądanych w zdrowych tkankach i narządach. Z tego powodu jak najbardziej celowe jest opracowanie platform nośników, które poprawiają skuteczność i zmniejszają toksyczność leczenia raka przez specyficzne dostarczanie środków terapeutycznych do miejsc guza. W tym podejściu dendrymery odgrywają ważną rolę. W porównaniu z tradycyjnymi polimerami liniowymi dendrymery wykazują znacznie lepsze właściwości fizyczne i chemiczne. Główne zalety dendrymerów wynikają z ich odpowiednich parametrów strukturalnych uwzględniających fizykochemiczne ograniczenia klasycznych leków (np. interakcje, penetracja komórek itp.). W tym kontekście, badania dotyczące charakterystyki nowo zsyntetyzowanych dendrymerów jako środków przeciwnowotworowych stanowią o nowatorstwie i oryginalności przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. W ramach rozprawy doktorskiej Pan Mgr Marcin Hołota przedstawił wyniki badań dla serii metaloorganicznych dendrymerów karbokrzemowych funkcjonalizowanych na powierzchni kompleksem miedzi(II) w oddziaływaniach z proapoptotycznym siRNA (siBcl-2 i siMcl-1) oraz lekami przeciwnowotworowymi (doksorubicyną, metotreksem i 5-fluorouracylem).



Trzy, współautorskie prace Pana Mgr Marcina Holoty podlegały już procesowi recenzowania naukowego zatem skupię się na analizie ich doboru w kontekście realizacji głównego celu zaprezentowanej rozprawy doktorskiej. Załączone prace dokumentują kolejne etapy pracy naukowej Doktoranta, na które składały się:

1. Biofizyczna charakterystyka nowo zsyntetyzowanych metaloorganicznych dendrymerów karbokrzemowych oraz określenie ich właściwości hemolitycznych i cytotoksycznych. Wyniki tych badań wskazują, że wszystkie badane dendrymery silnie oddziałują z błonami komórkowymi, wykazując też znacznie wyższą toksyczność dla komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Cytotoksyczność poszczególnych dendrymerów była zależna zarówno od ich stężenia jak i generacji.
2. Ocena zdolności nowo zsyntetyzowanych metaloorganicznych dendrymerów karbokrzemowych do tworzenia kompleksów zarówno z proapoptotycznym siRNA (siBel-2 i siMcl-1) jak i lekami przeciwnowotworowymi (doksorubicyną, metotreksem i 5-fluorouracylem). Wyniki tych badań wskazują że badane dendrymery tworzą silne kompleksy zarówno z siRNA jak i badanymi lekami.
3. Określenie aktywności przeciwnowotworowej powstałych kompleksów nowo zsyntetyzowanych metaloorganicznych dendrymerów karbokrzemowych z proapoptotycznym siRNA (siBel-2 i siMcl-1) jak i lekami przeciwnowotworowymi (doksorubicyną, metotreksem i 5-fluorouracylem). Wyniki tych badań wskazują, że żywotność komórek nowotworowych w obecności badanych układów dendrymer/siRNA oraz dendrymer/lek znacząco spadała.
4. Ocena terapeutycznego działania powstałych kompleksów dendrymer/siRNA oraz dendrymer/lek w warunkach *in vitro*. Wyniki tych badań wskazują, że pożądane efekty cytotoksyczne kompleksów dendrymer/lek uzyskiwano dla stężeń dużo niższych niż w przypadku ich składowych co może być silnym argumentem w prowadzeniu dalszych badań z wykorzystaniem nowo zsyntetyzowanych metaloorganicznych dendrymerów karbokrzemowych.



Wszystkie aspekty prowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań są godne podkreślenia, w tym ich konsekwencja i przejrzystość, dzięki czemu udało się uzyskać potwierdzenie hipotezy badawczej dotyczącej możliwości potencjalnego wykorzystania karbokrzemowych metalodendrymerów zawierających atomy miedzi jako nośników leków oraz siRNA do komórek nowotworowych.

Podczas lektury prac wchodzących w rozprawę doktorską nasunęły mi się następujące pytania dotyczące pracy nr 1.

Holota, M.; Magiera, J.; Michlewska, S.; Kubezak, M.; Sanz del Olmo, N.; Garcia-Gallego, S.; Ortega, P.; de la Mata, F.J.; Ionov, M.; Bryszewska, M. In Vitro Anticancer Properties of Copper Metallodendrimers. Biomolecules 2019, 9, 155.

Wszystkie pomiary średnicy hydrodynamicznej testowanych dendrymerów przeprowadzono w wodzie destylowanej. Jest to zrozumiałe z punktu widzenia zastosowania dendrymerów w badaniach prezentowanych w rozprawie doktorskiej. Jednakże wg opisu w tabeli nr 1 w tej pracy (także Tabela 1 autorskiego opracowania), wszystkie z badanych dendrymerów były rozpuszczalne bądź w MeOH/DMF/DMSO, lub też DMF/DMSO/CHCl₃/CH₂Cl₂.

Moje pytania brzmią:

1. Czy określano rozmiary hydrodynamiczne ww. dendrymerów w tych mediach? Jeśli tak, to jakie wyniki uzyskano w porównaniu z tymi mierzonymi w wodzie?
2. W przypadku badań w wodzie problemem była agregacja, w szczególności dla generacji G₀, czy ewentualnie obserwowano ten efekt w przypadku MeOH/DMF/DMSO bądź też DMF/DMSO/CHCl₃/CH₂Cl₂?

Nie mam uwag do strony edytorskiej opracowania autorskiego Pana Mgr Marcina Holoty. Przejrzysta i estetyczna forma rozprawy, zarówno tekstu jak i rysunków sprawia, że całość czyta się bardzo dobrze.



Reasumując, rozprawa doktorska prezentuje szeroką wiedzę Pana Mgr Marcina Hołoty w zakresie medycyny, biologii i biochemii oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej, począwszy od wykonania zadań badawczych, aż do opracowania i interpretacji wyników. Rozprawa doktorska składa się z trzech publikacji, z których wszystkie ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Rozprawa doktorska jest spójna pod względem merytorycznym i redakcyjnym. Całość badań zaprezentowanych w trzech pracach wchodzących w rozprawę doktorską stanowi istotny wkład w głębsze poznanie i zrozumienie mechanizmu w wyniku którego generowane są efekty synergiczne w układach dendrymer/siRNA oraz dendrymer/lek, co w perspektywie otwiera nowe możliwości potencjalnego wykorzystania karbokrzemowych metalodendrymerów zawierające atomy miedzi w leczeniu nowotworów w warunkach badań klinicznych.

Mając na uwadze powyższe stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawa o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

Zwracam się zatem uprzejmie do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana Mgr Marcina Hołoty do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Wrocław, 10.09.2023

Dr hab. Teresa Kral