



**Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik**  
**Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej**  
**Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej**  
**Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych**  
**Kolegium Nauk Medycznych**  
**Uniwersytet Rzeszowski**

Rzeszów, 04.10.2026

**Recenzja pracy doktorskiej mgra Serafina Zawadzkiego pt. „Charakterystyka i ocena potencjału dendrymerów karbokrzemowych jako nośników siRNA przez modelową barierę krew–mózg”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Serafina Zawadzkiego została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Katarzyny Miłowskiej, prof. UŁ pełniącej rolę promotora. Praca została wykonana na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Badania zostały przeprowadzone w ramach międzynarodowego projektu badawczego M-ERA.NET 2019-2023 „Nanoparticle transfer through endothelial barrier” UMO-2018/30/Z/NZ1/00911 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz Komisję Europejską w ramach programu Horizon 2020 oraz międzynarodowego projektu badawczego realizowanego w ramach programu Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) wspólne projekty badawcze pomiędzy Rzeczpospolitą Polską a Republiką Słowacką pt. „Dendrymery fosforowe jako potencjalne czynniki wspomagające proces gojenia ran”, nr BPN/BSK/2021/1/00053/U/00001.

**Ocena formalna i metodologiczna pracy**

**Ocena formalna**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgra Serafina Zawadzkiego stanowi zbiór pięciu oryginalnych powiązanych tematycznie artykułów naukowych wysoko punktowanych o zasięgu międzynarodowym opublikowanych w prestiżowych czasopismach w latach 2024-2026. Wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są opracowaniami zbiorowymi, w których Pan mgr Serafin Zawadzki jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 17,1, a punktacja MNiSW wynosi 480 pkt.

Pozostały dorobek naukowy Doktoranta składa się z trzech publikacji o zasięgu międzynarodowym, jedenastu komunikatów zjazdowych międzynarodowych oraz ośmiu komunikatów zjazdowych krajowych. Ponadto Doktorant uczestniczył w realizacji dwóch projektów badawczych, a w latach 2022-2023 odbył trzy krótkoterminowe zagraniczne staże naukowe. Doktorant posiada również dorobek w zakresie działalności organizacyjnej i promocyjnej. Łączny IF wszystkich opublikowanych prac wynosi 31,8 oraz 860 punktów MNiSW. Całkowity dorobek naukowy Pana mgra Serafina Zawadzkiego jest ogromny biorąc pod uwagę wczesny etap kariery naukowej Doktoranta.

W rozprawie doktorskiej zawarto również oświadczenia współautorów artykułów wchodzących w skład doktoratu, które jednoznacznie wskazują na wiodącą rolę Doktoranta w realizacji prac badawczych. Udział Doktoranta we wszystkich przedstawionych pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest znaczący, co stanowi niezaprzeczalnie podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora na podstawie przedstawionego cyklu prac. Wszystkie publikacje stanowiące rozprawę doktorską mają wysoką wartość merytoryczną i metodyczną.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu zawierającego następujące rozdziały: Źródła finansowania, Współprace z krajowymi i zagranicznymi instytucjami naukowymi, Spis prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wprowadzenie, Założenia i cel pracy, Materiały, Metody, Omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Perspektywy przyszłych badań, Podsumowanie i wnioski, Streszczenie, Abstract, Literatura, Aktywność naukowa i organizacyjna. W pracy załączono również publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Wprowadzenie stanowi analizę aktualnego stanu wiedzy na temat wykorzystania nanosystemu złożonego z dendrymerów jako nośników oligonukleotydów (siRNA) w terapii choroby Alzheimerera. W rozdziale tym wskazano, że biodystrybucja nanosystemu oraz jego zdolność do przenikania do ośrodkowego układu nerwowego zależą od fizykochemicznych właściwości nośnika oraz jego interakcji ze złożoną funkcjonalnie barierą krew-mózg, która nie jest jedynie bierną przeszkodą, lecz kluczowym elementem współkształtującym farmakokinetkę i dystrybucję leku w mózgu, co należy uwzględnić przy projektowaniu terapii.

Szczególnie ciekawa w pracy doktorskiej jest koncepcja zastosowania dendrymerów jako nośników siRNA wyciszających ekspresję genu *APOE ε4*, które mogłyby w przyszłości być wykorzystane w terapii postaci sporadycznej choroby Alzheimerera. Jest to bardzo ważne zagadnienie ze względu na to, że obecnie nie istnieje skuteczna terapia dla pacjentów z chorobą Alzheimerera. Założenie przyjęte w pracy doktorskiej, że wyciszenie genu *APOE4* może

ograniczyć ryzyko choroby, jest nowatorskim i obiecującym kierunkiem w badaniach nad opracowaniem skutecznej terapii pacjentów z chorobą Alzheimera. Obecność genotypu APOE  $\epsilon 4$  jest związana ze zwiększonym ryzykiem choroby Alzheimera o późnym początku. Osoby posiadające jedną kopię tego genu (heterozygoty) mają 3-krotnie większe prawdopodobieństwo rozwoju choroby Alzheimera, natomiast posiadające dwie kopie tego genu (homozygoty) mają nawet 15-krotnie większe prawdopodobieństwo rozwoju choroby w porównaniu do osób bez tego allelu. Izoforma APOE4 utrudnia oczyszczanie mózgu z blaszek amyloidowych, co prowadzi do ich szybszego gromadzenia się w porównaniu do wariantów APOE3 lub APOE2.

W tym miejscu należy zauważyć, że we Wstępie nie odniesiono się do ograniczeń biologicznych zastosowania nanosystemu dendrymer-siRNA jako potencjalnej terapii u pacjentów z chorobą Alzheimera. Przykładowo: jakie jest ryzyko utraty fizjologicznej funkcji APOE (białko APOE, w tym izoforma E4 pełni w mózgu funkcje transportowe dla lipidów i wspiera naprawę neuronów); ograniczenie związane z precyzyjnym wyciszaniem APOE4 w przypadku osób z genotypem heterozygotycznym (np. APOE  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ). Konieczne jest wyjaśnienie tych kwestii przez Doktoranta w celu pełniejszego zrozumienia możliwości translacji wyników do praktyki klinicznej.

W następnym rozdziale przedstawiono w sposób prawidłowy cele prowadzonych badań i główne założenia rozprawy doktorskiej. Głównym celem pracy była ocena właściwości fizykochemicznych, biofizycznych, biokompatybilności oraz funkcjonalności nanosystemu dendrymer-siRNA w modelach o narastającej złożoności biologicznej ukierunkowanej na zastosowanie w terapii chorób neurodegeneracyjnych ośrodkowego układu nerwowego.

W kolejnych rozdziałach wyszczególniono materiały i metody. W badaniach wykorzystano dwa typy PEGyloanych dendrymerów karbokrzemowych oraz dwuniciowy mały interferujący RNA (siRNA) ukierunkowany przeciwko sekwencji genu apolipoproteiny E4 (APOE4), stanowiący właściwy ładunek terapeutyczny dla badanych nanosystemów dendrymerowych. Do badań *in vitro* w sposób właściwy dobrano trzy ludzkie linie komórkowe (HBEC-5i, HA, HBVP), które są powszechnie stosowane w badaniach biomedycznych jako modele naśladujące barierę krew-mózg. W ramach realizacji pracy doktorskiej wykorzystano również komórkowe składniki krwi obwodowej pochodzące od zdrowych dawców tj. erytrocyty oraz komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC). W badaniach wykorzystano ponadto dwa reprezentatywne białka surowicy ludzkiej: albuminę surowicy ludzkiej (HSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) oraz transferynę surowicy ludzkiej (Tf). Na podkreślenie zasługuje fakt, iż przyjęta koncepcja metodologiczna uwzględnia również badania *in vivo* na dwóch modelach mysich: model myszy starszej C57BL, który jest często stosowany w chorobach

związanych z wiekiem, takich jak choroba Alzheimera oraz model typu knock-in APOE4 - humanizowany model genetyczny wykorzystywany w badaniach nad chorobą Alzheimera.

W pracy wykorzystano szereg nowoczesnych technik, m.in. dynamiczne rozpraszanie światła, transmisyjną mikroskopię elektronową, mikroskopię sił atomowych, polaryzację fluorescencji, spektroskopię dichroizmu kołowego, izotermiczną kalorymetrię miareczkową, transmisyjną mikroskopię elektronową, wieloparametrowy test immunologiczny oparty na systemie Luminex MAGPIX, pomiar anizotropii fluorescencji sond DPH i TMA-DPH, test redukcji MTT, oznaczanie reaktywnych form tlenu (ROS) z użyciem sondy H2DCF-DA, mikroskopię konfokalną, monitorowanie impedancji w czasie rzeczywistym za pomocą systemu xCELLigence RTCA eSight, fluorescencyjne obrazowanie *in vivo*, fluorescencyjne obrazowanie narządów *ex vivo* metodą IVIS, test labiryntu wodnego Morrisa. Dobór metod należy uznać za prawidłowy i adekwatny do postawionych celów badawczych.

Przeprowadzona w pracy charakterystyka biofizyczna i ocena cytotoksyczności pozwoliła wskazać dendrymer G3Si PEG6000 jako optymalny nośnik spośród czterech badanych dendrymerów. Badania interakcji z białkami wykazały szybkie tworzenie się korony białkowej, kształtowanej przez wielowartościowe oddziaływania o entropowym charakterze, którym towarzyszyły zmiany konformacyjne białek osocza. Analiza hemokompatybilności wykazała, że utworzenie kompleksu z siRNA istotnie ograniczało hemolizę oraz poprawiało ogólną zgodność nanosystemu z krwią. W neuro-naczyniowych modelach komórkowych dendrypleks zwiększał akumulację siRNA w cytoplazmie oraz wykazywał niższą cytotoksyczność w porównaniu z wolnym nośnikiem. W modelu bariery krew-mózg wpływ na integralność bariery zależał od skompleksowania i stężenia, jednak zmiany te miały na ogół charakter przejściowy, a nie trwale destabilizujący. W badaniach *in vivo* dendrypleks wydłużył ogólnoustrojową ekspozycję na siRNA oraz poprawił wyniki uczenia się i pamięci przestrzennej mysiego modelu choroby Alzheimera, podczas gdy wolne siRNA nie wykazało analogicznego efektu. Uzyskane wyniki wskazują, że dendrypleksy G3Si PEG6000 stanowią obiecujący nanosystem do dostarczania terapeutycznego RNA do ośrodkowego układu nerwowego. Otrzymane wyniki stanowią podstawę do dalszych etapów badań, w celu optymalizacji terapii ukierunkowanych na choroby neurodegeneracyjne.

Do pracy załączono kopie pięciu powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Czasopisma naukowe, w których zostały opublikowane artykuły mają wysoki współczynnik oddziaływania, co potwierdza wysoką wartość poznawczą i wysoki poziom naukowy przedstawionej pracy doktorskiej. W załączonych pracach nie znajduję błędów merytorycznych, metodologicznych czy edytorskich.

Podsumowując, zaprezentowana praca doktorska z załączonym cyklem publikacji posiada wysoką wartość merytoryczną i metodyczną, co jest właściwe dla przeprowadzenia postępowania doktorskiego.

### **Ocena merytoryczna pracy**

#### **Poprawność formułowania hipotez i założeń badawczych**

Doktorant precyzuje założenia i cele pracy w prawidłowy sposób. W pracy doktorskiej postawiono hipotezę stanowiącą, że stabilny kompleks PEGylovanego dendrymeru karbokrzemowego z terapeutycznym siRNA umożliwia dostarczanie oligonukleotydu do komórek przy zachowaniu hemokompatybilności i biokompatybilności w modelu bariery krew-mozg *in vitro* oraz pozwalają na wydłużenie ekspozycji układowej i osiągnięcie poprawy wybranych parametrów behawioralnych *in vivo*. Cele pracy osiągnięto poprzez realizację następujących zadań badawczych:

1. Charakterystyka fizykochemiczna panelu kationowych dendrymerów karbokrzemowych i ich kompleksów z siRNA oraz wyłonienie nośnika o najkorzystniejszym profilu do dalszych badań.
2. Analiza oddziaływań wybranego nośnika z reprezentatywnymi białkami osocza i złożonym środowiskiem osocza oraz określenie hemokompatybilności, obejmujące parametry hemoreologiczne, immunologiczne i krzepnięcia.
3. Ocena wpływu dendrymeru i jego dendrypleksu na komórki jednostki neuronaczyniowej oraz analiza integralności i przepuszczalności modelu bariery krew–mozg.
4. Określenie profilu biodystrybucji oraz weryfikacja skuteczności terapeutycznej dendrypleksu siRNA w zakresie przywracania wybranych parametrów sprawności neurobehawioralnej w modelu mysim.

Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. Cele badawcze pracy zostały w pełni zrealizowane z zastosowaniem prawidłowo dobranych materiałów i metod badawczych. Dane biologiczno-doświadczalne zostały starannie opisane we wszystkich oryginalnych publikacjach. Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano wnioski końcowe. Piśmiennictwo jest właściwie dobrane i jest bezpośrednio związane z tematyką pracy.

#### **Trafność doboru metod oraz poprawność opisu uzyskanych wyników i sformułowania wniosków**

W pracy doktorskiej w sposób prawidłowy dobrano metody badawcze oraz prawidłowo opisano uzyskane wyniki i sformułowano wnioski. W publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz w badaniach nieopublikowanych zastosowane metody i uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane.

W pierwszej pracy wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „Synthesis and biophysical evaluation of carbosilane dendrimers as therapeutic siRNA carriers” opublikowanej w Sci. Rep. w 2024 przeanalizowano właściwości biofizyczne dendrymerów oraz ich kompleksów z siRNA skierowanym przeciwko genowi apolipoproteiny E (APOE) w celu wyłonienia odpowiedniego nanonośnika, zdolnego do bezpiecznego transportu ładunku przez barierę krew-mózg (BBB). Uzyskane wyniki dostarczyły cennych informacji na temat procesu tworzenia kompleksów, ich stabilności w czasie, mechanizmów oddziaływania, wpływu dendrymerów na strukturę przestrzenną oligonukleotydu oraz potencjalnej cytotoksyczności wobec ludzkich komórek śródbłonna naczyń włosowatych mózgu. Na podstawie przeprowadzonych analiz wskazano, że dendrymer G3Si PEG6000 jest optymalnym kandydatem do dalszych badań jako nanonośnik umożliwiający bezpieczne dostarczanie substancji terapeutycznych przez barierę krew-mózg w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Druga praca pt: „Structural and conformational rearrangements of human serum albumin, transferrin, and blood plasma induced by carbosilane dendrimer therapeutic delivery system” opublikowana w Sci. Rep. w 2025 roku dotyczyła analizy nowego dendrymeru G3Si PEG6000. W pracy tej wykorzystując szeroki wachlarz technik analitycznych dokonano charakterystyki kinetyki i termodynamiki wiązania tego dendrymeru oraz zbadano jego wpływ na strukturę albuminy surowicy ludzkiej, transferyny i złożone środowisko osocza. Uzyskane wyniki wskazują, że dendrymer ten wywołuje istotne zmiany konformacyjne zarówno na poziomie struktury trzeciorzędowej, jak i drugorzędowej, przy czym analizy termodynamiczne dowodzą, iż oddziaływania te są napędzane głównie przez korzystne zmiany entropowe oraz wiązanie wielowartościowe.

W trzeciej pracy pt: „Hemocompatibility of Carbosilane Dendrimers as a Therapeutic siRNA Delivery System across Blood-Brain Barrier” opublikowanej w ACS Appl. Mater. Interfaces w 2026 roku oceniono hemokompatybilność pegylowanego dendrymeru G3Si PEG6000 oraz tworzonego przez niego dendrypleksu, zaprojektowanego do transportu siRNA przez barierę krew-mózg. Uzyskane wyniki wskazują, że badany nanosystem wywołuje zmiany w reologii krwi oraz wewnątrzpochodnej kaskadzie krzepnięcia, jednak efekty te nie przekraczają wartości granicznych wiązanych z klinicznie istotnymi działaniami

niepożądanymi. W pracy tej nie stwierdzono niekorzystnego wpływu na parametry krwinek czerwonych i płytek krwi ani toksycznego oddziaływania na krwinki białe.

W czwartej pracy pt: „Multilevel Assessment of Carbosilane Dendrimer–siRNA Nanoplatfrom: Cellular Compatibility, Blood–Brain Barrier Model Integrity, and Murine Model Biodistribution opublikowanej w czasopiśmie ACS Appl. Mater. Interfaces w 2026 roku oceniono biokompatybilność i biodystrybucję pegylowanego dendrymeru G3Si PEG6000 oraz tworzonego przez niego dendrypleksu z siRNA celującym w APOE4. Badania prowadzono w oparciu o wieloetapową strategię, obejmującą przejście od monokultur komórkowych istotnych dla bariery krew-mózg (BBB), przez model BBB z przewagą naczyń włosowatych, aż po badania biodystrybucji *in vivo* i *ex vivo* na myszach, zgodnie z aktualnymi wytycznymi dotyczącymi testowania nanomateriałów. Analiza profilu mitochondrialnego i redoks w komórkach śródbłonna, perycytach i astrocytach pozwoliła określić zakresy tolerowanej ekspozycji. Tworzenie kompleksów z siRNA zmniejszało obserwowaną cytotoksyczność we wszystkich badanych typach komórek. Badania *in vivo* z wykorzystaniem obrazowania całego ciała wykazały przedłużoną ekspozycję ogólnoustrojową na dendrypleks oraz jego dystrybucję (potwierdzoną analizą *ex vivo*) z dominacją w nerkach i wtórną akumulacją w wątrobie. Dane te wskazują, że kompleksowanie z siRNA poszerza zakres funkcjonalny w modelu BBB, zapewniając częściowo odwracalne efekty barierowe i lepszą ekspozycję ogólnoustrojową, choć nie eliminuje w znacznym stopniu reakcji związanych ze stresem mitochondrialnym lub oksydacyjnym.

W piątej pracy pt. „Tiered Evaluation of Carbosilane–siRNA Nanoplatfrom from Single-Cell Biocompatibility to Blood-Brain Barrier Model Dynamics, and Murine Alzheimer Model Behavior Assessment” opublikowanej w czasopiśmie ACS Appl. Mater. Interfaces w 2026 roku oceniono dendrymer G3Si PEG6000 oraz tworzony przez niego dendrypleks z siRNA, stosując wieloetapową strategię badawczą obejmującą analizę internalizacji komórkowej, badania przesiewowe pod kątem uszkodzeń DNA, ocenę integralności i przepuszczalności modelu bariery krew-mózg (BBB) oraz badania *in vivo* na mysim modelu choroby Alzheimera. Na poziomie komórkowym dendrymer nasilał sygnał pochodzący od siRNA wewnątrz komórki, a tworzenie kompleksu z siRNA ograniczało genotoksyczność w porównaniu z samym nośnikiem. W modelu trójkulturowym BBB zachowano funkcję bariery bez trwałego spadku przezśródbłonkowego oporu elektrycznego (TEER), a wyniki pomiarów przepływu znaczników wykazały zmiany nieliniowe, zależne od czasu i rodzaju formulacji; zaobserwowano m.in. brak korelacji między parametrami TEER a przepuszczalnością, co wskazuje na nierównomierne zaburzenia oraz zależne od czasu zmiany w reakcjach parakomórkowych związanych z funkcjonowaniem bariery. U myszy typu knock-in APOE4 podanie dendrypleksu zwiększyło liczbę przekroczeń strefy platformy w teście pamięci przestrzennej w wodnym labiryncie

Morrisa, podczas gdy w przypadku czasu przebywania w docelowej ćwiartce basenu odnotowano jedynie niewielki, nieistotny statystycznie trend.

Podsumowując wyniki wskazują, że tworzenie kompleksu z siRNA poprawia profil bezpieczeństwa i skuteczności dendrymeru G3Si PEG6000 w kontekście bariery krew-mózg oraz uzasadnia dalsze badania, które pozwolą bezpośrednio powiązać ekspozycję mózgu i oddziaływanie na cel molekularny z efektami w zakresie funkcji poznawczych.

W pięciu załączonych publikacjach oryginalnych dyskusja została napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie Doktoranta w aktualnej literaturze dotyczącej problemu badawczego.

Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano wnioski końcowe, stanowiące, że:

1. Spośród analizowanych kationowych dendrymerów karbokrzemowych najbardziej korzystnym profilem właściwości fizykochemicznych i bezpieczeństwa charakteryzował się PEGylowany dendrymer G3Si PEG6000, który wyłoniono do dalszych etapów oceny jako nośnik terapeutycznego siRNA.
2. Wykazano, że biologiczne zachowanie badanego nośnika jest w istotnym stopniu uwarunkowane jego interakcjami z białkami osocza. Jednocześnie uzyskane wyniki wskazują, że zjawisko to wymaga ostrożnej interpretacji, ponieważ wiąże się także ze zmianami konformacyjnymi badanych białek.
3. W modelach komórkowych jednostki neuronaczyniowej oraz w modelu bariery krew-mózg in vitro dendrypleks cechował się szerszym zakresem tolerowanych stężeń niż wolny nośnik i nie powodował trwałego pogorszenia integralności bariery, chociaż obserwowano przejściowe zaburzenia wybranych parametrów przepuszczalności i utrzymujące się cechy stresu mitochondrialnego.
4. Dendrypleks wykazywał korzystniejszy profil hemokompatybilności i biokompatybilności niż wolny nośnik, jednakże poprawa profilu bezpieczeństwa nie oznacza pełnej obojętności biologicznej badanego nanosystemu, ponieważ zaobserwowano stres mitochondrialny, przejściowe zaburzenia przepuszczalności bariery oraz zmiany hemoreologiczne i koagulologiczne.
5. W badaniach in vivo wykazano, że kompleksacja siRNA z dendrymerem wydłuża okres jego obecności w układzie krążenia względem wolnego siRNA oraz częściową poprawę wybranych parametrów neurobehawioralnych w modelu mysim.

#### **Trafność problematyki badawczej i jej oryginalność**

Problem badawczy podjęty przez Doktoranta jest niezwykle ważny dla rozwoju terapii w chorobie Alzheimera, która jest nieuleczalną i postępującą chorobą neurodegeneracyjną mózgu. Obecnie nie istnieje żadna skuteczna terapia dla pacjentów z chorobą Alzheimera; stosuje się jedynie metody objawowe, które mogą opóźnić postęp choroby. Strategia zastosowana w pracy doktorskiej opiera się na niezwykle oryginalnym i nowatorskim podejściu. Podjęty w pracy doktorskiej kierunek badań wydaje się być obiecujący; w przyszłości może mieć znaczenie dla opracowania terapii w chorobach neurodegeneracyjnych pod warunkiem przewyższenia ograniczeń technologicznych i biologicznych.

Po przeczytaniu pracy, nasuwają się następujące uwagi:

1. W pracy należałoby rozszerzyć dyskusję dotyczącą możliwości translacji wyników do praktyki klinicznej. Przejście z fazy badań przedklinicznych do realnego zastosowania klinicznego u ludzi jest ogromnym wyzwaniem. Ludzka bariera krew-mózg stanowi duże wyzwanie kliniczne ponieważ jest znacznie bardziej złożona i wykazuje inną ekspresję receptorów oraz transporterów niż bariera mysia, co stanowi jedną z głównych przyczyn niepowodzeń wielu terapii neurologicznych w fazie badań klinicznych. Ponadto w chorobie Alzheimera struktura BBB jest już naturalnie uszkodzona przez angiopatię amyloidową. Należy również przedyskutować, czy pasywny transport (wynikający z właściwości biofizycznych i modyfikacji PEG) wystarczy u ludzi, czy też konieczne będzie dołączenie do dendrymeru konkretnego ligandu celującego (np. przeciwciała przeciw receptorowi transferyny), aby wymusić transcytozę receptorową.
2. W pracy można było szerzej omówić ograniczenia badań, przykładowo:
  - a) Przejściowa destabilizacja bariery krew-mózg. Badania wykazały, że wpływ nanosystemu na integralność bariery zależał od stężenia. Nawet przejściowe rozszczelnienie BBB *in vivo* niesie ryzyko niekontrolowanego przenikania toksyn z krwi do tkanki mózgowej, co w stanach neurozwyrodnieniowych może nasilać stan zapalny.
  - b) Wpływ zmian konformacyjnych białek osocza. Zmiany strukturalne białek w koronie białkowej mogą odsłaniać ukryte epitopy, co z kolei może prowadzić do nieprzewidzianych reakcji układu odpornościowego lub szybszego wychwytu nanocząstek przez makrofagi
  - c) Ograniczenia modeli mysich. Mysie modele choroby Alzheimera odtwarzają jedynie pewne aspekty patologii (np. nadekspresję amyloidu), nie oddając w pełni złożonej, wieloczynnikowej patofizjologii ludzkiego mózgu. Sukces terapeutyczny u myszy rzadko przekłada się 1:1 na skuteczność u ludzi.

d) Złożoność i powtarzalność syntezy. Dendrymery o modyfikowanej powierzchni oraz ich kompleksy z siRNA to układy wielokomponentowe. Skalowanie ich produkcji do warunków przemysłowych przy jednoczesnym zachowaniu identycznej polidispersyjności, stopnia skompleksowania i stabilności wiązań jest dużym wyzwaniem technologicznym.

e) Zjawisko "PEG-dilemma". Chociaż długa gęsta powłoka PEG6000 wydłuża czas krążenia we krwi i poprawia hemokompatybilność, to jednocześnie może utrudniać uwalnianie siRNA z endosomów już wewnątrz komórki docelowej.

3. Interesującym rozwinięciem byłoby zbadanie długoterminowej oceny toksyczności stosowanego dendrypleksu. Choroby neurodegeneracyjne wymagają terapii przewlekłej dlatego konieczne są badania oceniające wpływ wielokrotnego, długotrwałego podawania dendrypleksu na narządy wewnętrzne oraz zachowanie zwierząt po kilku miesiącach od zakończenia terapii.

Jednak należy podkreślić, że powyższe uwagi nie obniżają wartości naukowej pracy, a raczej wskazują kierunki dalszych badań i potencjalnego rozwinięcia uzyskanych wyników.

### **Znaczenie uzyskanych wyników dla nauki i praktyki**

Uzyskane w ramach realizacji wyniki stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę naukową dotyczącą poznania właściwości biofizyczne dendrymerów karbokrzemowych i ich zastosowania jako potencjalnych nośników siRNA ukierunkowanego na wyciszenie allelu *APOE4*, co stanowi nowatorską strategię w opracowaniu terapii w chorobie Alzheimera. Uzyskane w pracy wyniki są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, ponieważ otwierają możliwości praktycznego ich zastosowania w celu opracowania skutecznych systemów dostarczania siRNA przez barierę krew-mózg.

### **Wnioski końcowe**

Prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktoranta oraz opanowanie przez niego warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i prezentuje ogromną wiedzę teoretyczną Doktoranta oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka i ocena potencjału dendrymerów karbokrzemowych jako nośników siRNA przez modelową barierę krew-mózg” w pełni spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i

nauce (Dz.U.2021 poz. 478 ze zm). Wnoszę o dopuszczenie Pana mgra Serafina Zawadzkiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną prowadzonych badań pragnę przedłożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

Signature Not Verified

Dokument podpisany przez  
Izabela Zawlik  
Data: 2026.10.04 23:57:20 CEST