



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, 11.02.2026

Recenzja pracy doktorskiej mgr Elżbiety Okły pt. „Właściwości biologiczne nanocząstek złota modyfikowanych polietylenoglikolem i ich zastosowanie jako potencjalnych nośników leczniczego siRNA w badaniach *in vitro*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Elżbiety Okły została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Maksima Ionova pełniącego rolę promotora. Praca została wykonana w Katedrze Biofizyki Ogólnej 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 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki oraz europejski program Horizon 2020

Ocena formalna i metodologiczna pracy

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Elżbiety Okły stanowi zbiór trzech oryginalnych powiązanych tematycznie artykułów naukowych wysoko punktowanych o zasięgu międzynarodowym opublikowanych w prestiżowych czasopismach w latach 2023-2025. Wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są opracowaniami zbiorowymi, w których Pani mgr Elżbieta Okła jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 12,7, a punktacja MEiN wynosi 380 pkt.

W rozprawie doktorskiej zawarto także pozostały dorobek publikacyjny Doktorantki, który składa się z dwóch publikacji o zasięgu międzynarodowym, dwóch publikacji pokonferencyjnych z IF, pięciu komunikatów zjazdowych oraz dwóch manuskryptów współautorskich będących w procesie redakcyjnym. Ponadto Doktorantka uczestniczyła w realizacji trzech projektów badawczych, a w latach 2021-2023 odbyła cztery krótkoterminowe zagraniczne staże naukowe. Doktorantka posiada również dorobek w zakresie działalności

organizacyjnej i promocyjnej. Całkowity dorobek naukowy Pani mgr Elżbiety Okły jest ogromny biorąc pod uwagę wczesny etap kariery naukowej Doktorantki.

W rozprawie doktorskiej zawarto również oświadczenia współautorów artykułów wchodzących w skład doktoratu, które jednoznacznie wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w realizacji prac badawczych. Udział Doktorantki we wszystkich przedstawionych pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest wysoki. Wkład pracy mgr Elżbiety Okły został określony w każdej z prac w zakresie od 53% do 61%. Tak duży udział Doktorantki 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, Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wykaz pozostałych publikacji, Wykaz komunikatów zjazdowych, Udział w projektach badawczych, Działalność organizacyjna i promocyjna, Staże naukowe, Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Hipoteza badawcza, Materiały, Metody, Omówienie wyników, Wyniki nieopublikowane, Wnioski, Literatura, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim. W pracy załączono również publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Rozdział Wstęp stanowi ogólną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat wykorzystania nanocząsteczek złota jako nośników dostarczania substancji terapeutycznych do komórek mózgu poprzez barierę krew-mózg. W rozdziale tym przedstawiono przykładowe zastosowania nanocząstek złota w medycynie oraz opisano różne sposoby ich funkcjonalizacji. Szczególnie ciekawa jest idea zastosowania nanocząsteczek złota jako nośników substancji leczniczych opartych na cząsteczkach siRNA wyciszających ekspresję genu targetowego APOE ϵ 4, które mogłyby w przyszłości być wykorzystane w terapii postaci sporadycznej choroby Alzheimera. Jest to bardzo ważne zagadnienie ze względu na to, że obecnie nie istnieje skuteczna terapia dla pacjentów z chorobą Alzheimera.

Obecność genotypu APOE ϵ 4 jest związana ze zwiększonym ryzykiem choroby Alzheimera o późnym początku (> 65 r.ż.). 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. Białko APOE4 utrudnia oczyszczanie mózgu z blaszek amyloidowych, co prowadzi do ich szybszego gromadzenia się w porównaniu do wariantów APOE3 lub APOE2. Dlatego założenie przyjęte

w pracy doktorskiej, że wyciszenie genu *APOE4* może ograniczyć ryzyko choroby, jest bardzo nowatorskim i obiecującym kierunkiem w badaniach nad terapią pacjentów z chorobą Alzheimera. Należy pamiętać, że genotyp *APOE4* stanowi najistotniejszy genetyczny czynnik ryzyka zachorowania, jednak nie jest wystarczający do rozwoju choroby Alzheimera. Na rozwój choroby Alzheimera wpływ mają również czynniki środowiskowe, styl życia (dieta, aktywność fizyczna) oraz inne choroby współistniejące.

W tym miejscu należy zauważyć, że we Wstępie pracy doktorskiej zabrakło opisu jakie są ograniczenia techniczne i biologiczne zastosowania kompleksów nanocząstek złota z siRNA anty-*APOE4* jako potencjalnej terapii u pacjentów z chorobą Alzheimera. Konieczne jest wyjaśnienie następujących kwestii:

1. sposobu dostarczania kompleksów do mózgu z ominięciem wątroby (w której *APOE* ulega również ekspresji);
2. ryzyko utraty fizjologicznej funkcji *APOE*: białko *APOE* (w tym izoforma E4) pełni w mózgu funkcje transportowe dla lipidów i wspiera naprawę neuronów;
3. ryzyko wywołania reakcji zapalnej związanej z immunogennością organizmu;
4. problemu precyzyjnego wyciszenia *APOE4* w przypadku osób z genotypem heterozygotycznym (np. *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 4$).

Kluczowym czynnikiem w patogenezie choroby Alzheimera jest akumulacja w mózgu blaszek amyloidowych, składających się głównie z peptydów pochodzących z białka prekursorowego amyloidu (*APP*), co prowadzi do neurodegeneracji i rozwoju objawów otępiennych.

Dlatego nasuwa mi się pytanie do Doktorantki: czy zna przykłady zastosowania strategii terapeutycznej w chorobie Alzheimera opartej na kompleksach nanocząsteczek z siRNA anty-*APP*? Jakie będą ograniczenia takiej strategii?

W następnym rozdziale przedstawiono w sposób prawidłowy cele prowadzonych badań i główne założenia rozprawy doktorskiej. Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy opłaszczony PEG nanocząstki złota, AuNP14a i AuNP14b, różniące się stosunkiem dendronów karbokrzemowych do PEG, będą zdolne do tworzenia kompleksów z siRNA i wnikania do komórek modelu bariery krew-mózg. W kolejnym rozdziale wyszczególniono zastosowane materiały i metody badawcze. W pracy wykorzystano szereg nowoczesnych technik m.in. spektroskopię fluorescencyjną, transmisyjną mikroskopię elektronową, izotermiczną kalymetrię miareczkową, cytometrię przepływową, mikroskopię konfokalną, testy oparte na systemie MAGPIX.

W kolejnych rozdziałach Doktorantka sprawozdaje w sposób klarowny uzyskane wyniki badań i prawidłowo formułuje wnioski w czterech punktach. W pracy doktorskiej omówiono również nieopublikowane wyniki dotyczące przebadania pegylowanych nanocząstek złota pod kątem ich potencjału do przenoszenia terapeutycznego siRNA oraz zdolności przekroczenia modelowej bariery krew-mózg, utworzonej z trzech różnych typów komórek, w tym komórek śródbłonna. W nieopublikowanych badaniach sprawdzono wpływ nanocząstek na integralność utworzonej bariery oraz przeżywalność zastosowanych komórek w hodowli *in vitro*.

W ramach realizacji pracy doktorskiej potwierdzono możliwość kompleksowania AuNP z siRNA (siApoE). Ponadto, wykazano, że badane nanocząstki oddziałują z białkami osocza bez istotnych zaburzeń ich struktury drugorzędowej oraz wchodzą w interakcje z błonami lipidowymi. Zaobserwowano również efektywnie wnikanie kompleksów AuNPs/siRNA do komórek śródbłonna oraz ich akumulację w komórkach, głównie w cytoplazmie. Co więcej, wykazano niską cytotoksyczność badanych nanocząstek wobec komórek śródbłonna, astrocytów i perycytów. Genotoksyczność AuNP i ich kompleksów z siRNA była stosunkowo niska, a obserwowane zmiany poziomu reaktywnych form tlenu i potencjału błony mitochondrialnej ulegały normalizacji w ciągu 24 godzin. Otrzymane wyniki stanowią podstawę do dalszych etapów badań, w celu opracowania skutecznych systemów dostarczania siRNA przez barierę krew-mózg.

Do pracy załączono kopie trzech 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 znajdują 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

Doktorantka precyzuje założenia i cele pracy w prawidłowy sposób. W pracy doktorskiej postawiono hipotezę stanowiącą, że nanocząstki złota funkcjonalizowane PEG stanowią bezpieczne i skuteczne narzędzie do dostarczania siRNA do komórek docelowych. Cele pracy osiągnięto poprzez realizację następujących zadań badawczych: 1. Ocena zdolności nanocząstek złota AuNP14a i AuNP14b do tworzenia kompleksów z siRNA oraz biofizyczna charakterystyka powstałych kompleksów; 2. Określenie charakteru interakcji

AuNP14a i AuNP14b z białkami osocza oraz błonami lipidowymi; 3. Określenie cytotoksyczności i genotoksyczności badanych nanocząstek złota oraz ich kompleksów z siRNA; 4. Ocenę zdolności kompleksów AuNP/siRNA do wnikania do komórek oraz wpływu tych kompleksów na przepuszczalność modelu bariery krew-mózg; 5. Weryfikację poziomu przeciwzapalnych i prozapalnych cytokin wydzielanych przez komórki PBMC po podaniu nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA.

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. „Pegylated Gold Nanoparticles Conjugated with siRNA: Complexes Formation and Cytotoxicity” opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences w 2023 roku określono optymalne stężenia, w których nanocząstki AuNP14a i AuNP14b tworzą kompleksy z siRNA, a następnie scharakteryzowano właściwości biofizyczne i biologiczne powstałych kompleksów oraz określono cytotoksyczność nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA z użyciem linii komórkowej śródbłonna mikronaczyń mózgowych wyizolowanych z kory mózgowej (HBEC-5i) i komórkach PBMC. Za pomocą szeregu technik tj. polaryzacji fluorescencji, dichroizmu kołowego, dynamicznego rozpraszania światła, pomiarów potencjału zeta i elektroforezy żelowej wykazano, że AuNP tworzą stabilne kompleksy z siRNA. Ponadto, z zastosowaniem testów cytotoksyczności (MTT, LDH i Alamar Blue) potwierdzono bezpieczeństwo biologiczne utworzonych kompleksów. W pracy określono efektywne stężenia nanocząsteczek złota, w których kompleksy są stabilne i nietoksyczne dla zdrowych komórek. Jedną z badanych nanocząstek - AuNP14b, skompleksowana z siRNA nie wykazywała cytotoksyczności.

Druga praca pt: „ Pegylated gold nanoparticles interact with lipid bilayer and human serum albumin and transferrin” opublikowanej w Scientific Report w 2024 roku dotyczyła analiz interakcji badanych nanocząstek AuNP14a i AuNP14b z białkami surowicy krwi ludzkiej –

albuminą (HSA) i transferyną (Tf) oraz błonami lipidowymi. W pracy tej zastosowano następujące metody: dichroizmu kołowego, dynamicznego rozpraszania światła, pomiarów potencjału zeta, transmisyjnej mikroskopii elektronowej, testu wygaszania fluorescencji tryptofanu, izotermicznej kalorymetrii miareczkowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Wykazano, że AuNP14a/b oddziałuje z HSA i Tf, zmieniając ich właściwości elektryczne, termodynamiczne i strukturalne. Badane nanocząstki przeniknęły również przez liposomy DMPC, co sugeruje ich zdolność do docierania do celu wewnątrz komórki. W większości badań AuNP14b okazał się być skuteczniejszy niż AuNP14a, co może wynikać z jego bardziej dodatniego ładunku.

W trzeciej pracy pt: „Crossing Barriers: PEGylated Gold Nanoparticles as Promising Delivery Vehicles for siRNA Delivery in Alzheimer’s Disease” opublikowanej w *Biomedicines* 2025 roku oceniono zdolności utworzonych kompleksów AuNP/siRNA do wnikania do komórek śródbłonna oraz określono efekty biologiczne wywołane przez badane nanocząstki. W pracy tej z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wykazano, że wydajność wnikania badanych kompleksów AuNP/siRNA do komórek linii HBEC-5i jest na wysokim poziomie. Za pomocą mikroskopii konfokalnej zaobserwowano obecność kompleksów AuNPs/siRNA w cytoplazmie badanych komórek. Ponadto, w pracy tej za pomocą testu kometowego wykazano, że nanocząstka AuNP14b nie wywoływała efektu genotoksycznego zarówno w stanie wolnym, jak i w kompleksie z siRNA. Badanie poziomu reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem fluorescencyjnego znacznika H₂DCF-DA oraz badanie zmian potencjału mitochondrialnego za pomocą sondy JC-1 wskazały, że po 30 minutach komórki reagowały gwałtownym wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu, a efekt ten był najbardziej zauważalny w obecności kompleksu AuNP14b/siRNA. W pracy tej wykazano również, że nanocząsteczki AuNP14a wobec dwóch dodatkowych linii komórkowych: astrocytów (HA) i perycytów (HBVP) wywoływały zależny od stężenia efekt cytotoksyczny, który był łagodzony przez tworzenie kompleksów z siRNA. Natomiast nanocząstki AuNP14b wykazywały bardziej cytotoksyczny efekt w małych dawkach, szczególnie dla komórek HBVP.

Badania, które nie zostały opublikowane pozwoliły na wykazanie, że pegylowane karbokrzemowe nanocząstki złota AuNP14a i AuNP14b skoniugowane z siRNA nie zaburzają integralności modelowej bariery krew-mózg i nie wywołują istotnych efektów cytotoksycznych. Ponadto wykazano że, nanocząstka AuNP14a i jej kompleksy z siRNA indukują wyraźniejszą odpowiedź immunologiczną w porównaniu z nanocząstką AuNP14b.

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

Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano wnioski końcowe, stanowiące, że: 1. Pegylowane nanocząstki złota AuNP14a i AuNP14b tworzą stabilne kompleksy z siRNA; 2. Nanocząstki złota wchodzi w interakcje z modelowymi i biologicznymi błonami lipidowymi, a także z albuminą i transferyną, nie zmieniając w sposób znaczący ich struktury; 3. Nanocząstki złota wykazują niską cytotoksyczność wobec komórek śródbłonna, astrocytów i perycytów wchodzących w skład modelu bariery krew-mózg; 4. Kompleksy AuNP/siRNA wnikają do komórek śródbłonna, lokalizując się głównie w cytoplazmie i nie wywołują istotnych efektów genotoksycznych; 5. Kompleksy nanocząstek złota z siRNA nie zaburzają integralności komórek hodowli stanowiącej model bariery krew-mózg in vitro; 6. Nanocząstka złota AuNP14a, w porównaniu do AuNP14b, cechuje się wyższą skutecznością w dostarczaniu siRNA oraz wyraźniejszym potencjałem immunomodulującym, co czyni ją bardziej obiecującym nośnikiem terapeutycznym.

Trafność problematyki badawczej i jej oryginalność

Problem badawczy podjęty przez Doktorantkę jest niezwykle istotny 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 (farmakoterapia i fizjoterapia), które mogą opóźnić postęp choroby. Strategia zastosowana w pracy doktorskiej opiera się na niezwykle oryginalnym i nowatorskim podejściu polegającym na zastosowaniu nanocząsteczek złota jako nośników substancji leczniczych opartych na cząsteczkach siRNA wyciszających ekspresję genu targetowego APOE4. W ramach realizacji pracy doktorskiej wykazano, że pegylowane nanocząstki złota AuNP14a i AuNP14b spełniają kluczowe kryteria kandydatów na nośniki siApoE. Podjęty w pracy doktorskiej kierunek badań wydaje się być obiecujący; w przyszłości może mieć znaczenie dla opracowania terapii w chorobach neurodegeneracyjnych pod warunkiem przezwyciężenia ograniczeń technologicznych i biologicznych.

Znaczenie uzyskanych wyników dla nauki i praktyki

Uzyskane w ramach realizacji wyniki stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę naukową dotyczącą poznania właściwości biologicznych nanocząstek złota modyfikowanych polietylenoglikolem i ich zastosowania jako potencjalnych nośników siRNA ukierunkowanego na wyciszenie genu *APOE*, 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 Doktorantki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i prezentuje ogromną wiedzę teoretyczną Doktorantki we wskazanej dyscyplinie naukowej oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska pt. „Właściwości biologiczne nanocząstek złota modyfikowanych polietylenoglikolem i ich zastosowanie jako potencjalnych nośników leczniczego siRNA w badaniach *in vitro*” 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 Pani mgr Elżbiety Okły 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