

Kielce, 30.07.2026

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
PANA MGR SERAFINA ALEXANDRA ZAWADZKIEGO
*CHARAKTERYSTYKA I OCENA POTENCJAŁU DENDRYMERÓW KARBOKRZEMOWYCH
JAKO NOŚNIKÓW siRNA PRZEZ MODELOWĄ BARIERĘ KREW-MÓZG*

Tematyka badawcza rozprawy doktorskiej mgr S. Zawadzkiego wpisuje się w podejście terapeutyczne, które koncentruje się na modulowaniu procesów biologicznych odpowiedzialnych za rozwój choroby (DMT). Współczesna medycyna coraz wyraźniej odchodzi od modelu leczenia skoncentrowanego wyłącznie na kontroli objawów. Zamiast tego dąży do ingerencji w kluczowe mechanizmy patofizjologiczne, takie jak przewlekłe zapalenie, nieprawidłowa aktywacja układu odpornościowego czy procesy neurodegeneracyjne. Takie podejście pozwala realnie zmieniać przebieg choroby, a nie tylko poprawiać komfort pacjenta w krótkiej perspektywie. Terapia oparta na siRNA stanowi przykład terapii modyfikującej przebieg choroby (DMT) i umożliwia precyzyjne i kontrolowane obniżanie ekspresji wybranych genów, prowadząc do redukcji syntezy białek kluczowych dla procesów patologicznych. Interwencja na poziomie mRNA pozwala ingerować w patogenezę chorób na bardzo wczesnym etapie, co ma szczególne znaczenie w przypadku schorzeń neurodegeneracyjnych, nowotworów, chorób zapalnych i wirusowych, czy hipercholesterolemii. Coraz większą rolę w rozwoju takich terapii odgrywają nowoczesne, wysoko modyfikowane nanocząstki dendrytyczne, które stanowią jedne z najbardziej obiecujących i innowacyjnych nośników siRNA. Ich precyzyjnie kontrolowana, wielokrotnie rozgałęziona struktura umożliwia stabilizację materiału genetycznego, ochronę przed degradacją enzymatyczną, zwiększenie biodostępności oraz celowane dostarczanie do wybranych komórek. Dzięki możliwości funkcjonalizacji powierzchni dendrymery tworzą zaawansowane platformy nanotechnologiczne, pozwalające na kontrolowane uwalnianie siRNA i znaczące zwiększenie efektywności terapii DMT.

W tym kontekście prezentowana praca doskonale wpisuje się w aktualną tematykę badań nad potencjalnymi terapiami opartymi na siRNA i nanonośnikach dendrytycznych, a uzyskane wyniki wnoszą nową, wartościową wiedzę w kierunku opracowania bardziej efektywnych, molekularnie ukierunkowanych strategii leczenia. Celem pracy była kompleksowa ocena właściwości fizykochemicznych, biofizycznych, biokompatybilności oraz funkcjonalności nanosystemu dendrymer-siRNA w modelach o narastającej złożoności biologicznej, a realizacja odpowiednio dobranych celów szczegółowych, bezpośrednio wynikających z założonej hipotezy badawczej, umożliwiła jej pełną weryfikację i potwierdziła osiągnięcie założonego celu głównego.

Praca doktorska została zrealizowana na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki pod kierunkiem Pani dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ.

Badania były prowadzone w ramach prestiżowych projektów badawczych, obejmujących M-ERA.NET 2019–2023 *Nanoparticle transfer through endothelial barrier*, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki oraz Komisję Europejską w programie Horizon 2020, a także międzynarodowy projekt NAWA realizowany we współpracy między Rzeczpospolitą Polską a Republiką Słowacką *Dendrymery fosforowe jako potencjalne czynniki wspomagające proces gojenia ran*, co dodatkowo podkreśla uznanie i znaczenie międzynarodowej współpracy naukowej w realizacji tych badań.

Szczególnie należy podkreślić szeroki zakres współprac naukowych, zarówno krajowych, jak i zagranicznych, które świadczą o wysokich kompetencjach Doktoranta w pracy w międzynarodowym zespole badawczym; współpraca obejmowała m.in. Katedrę Chemii Organicznej i Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu w Alcalá de Henares (Hiszpania), Katedrę Fizyki Jądrowej i Biofizyki Uniwersytetu Komeńskiego w Bratysławie (Słowacja), Zakład Cytobiologii i Proteomiki Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Katedrę Neuromedycyny i Neuronauki Wydziału Medycyny i Nauk o Życiu Uniwersytetu Łotwy w Rydze, Łotewskie Centrum Badań i Studiów Biomedycznych w Rydze, Katedrę Chemii Fizycznej, Zakład Chemii Biofizycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, Zespół Struktury Powierzchni Materii Miękkiej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi oraz Uniwersyteckie Laboratorium Naukowe CoreLab Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Doktorant w pracy badawczej zastosował szeroki wachlarz metod, świadczących o dojrzałości naukowej i kompleksowym podejściu do tematyki tj. charakterystyka fizykochemiczna i biofizyczna dendrymerów karbokrzemowych, analiza ich oddziaływań z białkami osocza, profilowanie biokompatybilności komórkowej oraz badania integralności bariery krew-mózg. Procedury badań *in vivo* przeprowadzono zgodnie z Europejską konwencją o ochronie zwierząt kręgowych wykorzystywanych do celów naukowych (Strasburg, 1986) oraz za zgodą Komisji Etycznej Łotewskiej Służby Żywności i Weterynarii (nr 142/2023).

Podstawą do nadania stopnia doktora są wyniki prac badawczych opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych, w których Doktorant wykazał wyraźny, udokumentowany i znaczący wkład autorski. Prace te tworzą spójną, konsekwentnie rozwijaną tematykę badawczą, obejmującą projektowanie, syntezę oraz badania nowoczesnych układów dendrymerowych przeznaczonych do bezpiecznego i efektywnego transportu terapeutycznego siRNA, a także ich oddziaływanie z kluczowymi biomolekułami i barierami fizjologicznymi. Dorobek Doktoranta będący podstawą do nadania stopnia doktora obejmuje trzy publikacje w wysoko punktowanych czasopismach z listy JCR, o łącznej punktacji 480 pkt. MNiSW oraz sumarycznym IF (2-letnim) 16,0 i IF (5-letnim) 17,1:

1. Zawadzki S., Martín-Serrano Á., Okła E., Kędzierska M., Garcia-Gallego S., López P.O., de la Mata F.J., Michlewska S., Makowski T., Ionov M., Pędziwiatr-Werbicka E.,

- Bryszewska M., Miłowska K. *Synthesis and biophysical evaluation of carbosilane dendrimers as therapeutic siRNA carriers*. *Scientific Reports*, 2024, 14, 1615.
2. Zawadzki S., Okła E., Michlewska S., Makowski T., Buczkowski A., López P.O., de la Mata F.J., Ionov M., Bryszewska M., Miłowska K. *Structural and conformational rearrangements of human serum albumin, transferrin, and blood plasma induced by carbosilane dendrimer therapeutic delivery system*. *Scientific Reports*, 2025, 15, 39650.
 3. Zawadzki S., Sutý S., Okła E., Ortega López P., de la Mata F.J., Waczulikova I., Ionov M., Bryszewska M., Miłowska K. *Hemocompatibility of Carbosilane Dendrimers as a Therapeutic siRNA Delivery System across Blood–Brain Barrier*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2026, 18, 11671–11686.

oraz dwa manuskrypty przesłane do recenzji w czasopiśmie ACS Applied Materials & Interfaces:

4. Zawadzki S., Okła E., Ortega López P., de la Mata F.J., Ionov M., Jansons J., Skrastiņa D., Kreišmane M., Bryszewska M., Miłowska K. *Multilevel Assessment of Carbosilane Dendrimer–siRNA Nanoplatfrom: Cellular Compatibility, Blood–Brain Barrier Model Integrity, and Murine Model Biodistribution*.
5. Zawadzki S., Okła E., Michlewska S., Bednarek R., Jansons J., Skrastiņa D., Kreišmane M., Piļipenko V., Jansone B., Ortega López P., de la Mata F.J., Ionov M., Bryszewska M., Miłowska K. *Tiered Evaluation of Carbosilane–siRNA Nanoplatfrom from Single-Cell Biocompatibility to Blood–Brain Barrier Model Dynamics, and Murine Alzheimer Model Behavior Assessment*.

Należy podkreślić zastosowanie przez Doktoranta nowatorskiej strategii projektowania badań w obszarze toksykologii nanometriałów tj. ITS/IATA (*Intelligent Testing Strategy / Integrated Approaches to Testing and Assessment*), która minimalizuje niepewność i ogranicza potrzebę klasycznych testów *in vivo*, wykorzystując sekwencyjne, coraz bardziej złożone modele oraz łączenie dowodów (*weight of evidence*). Podejście to jest oficjalnie włączone do wytycznych OECD i ISO, co oznacza, że stanowi uznany standard toksykologiczny. Mam pytanie o charakterze ogólnym dotyczące systemu ITS/IATA oraz jego praktycznego zastosowania w badaniach toksykologicznych. W szczególności interesuje mnie, na ile według Doktoranta wystarczająco reprezentatywne jest poleganie głównie na modelach *in vitro* i *in silico*, biorąc pod uwagę ich ograniczoną zdolność do odzwierciedlania pełnej złożoności biochemicznej i fizjologicznej organizmów.

W trakcie działalności badawczej związanej z realizacją rozprawy Doktorant scharakteryzował cztery kationowe dendrymery karbokrzemowe o różnej budowie, analizując ich stabilność, właściwości powierzchniowe oraz zdolność tworzenia kompleksów z siRNA. DLS i potencjałem zeta określił wielkość i elektrostatykę układów, a TEM/AFM – morfologię. Proces kompleksowania opisano metodami fluorescencji, dichroizmu kołowego i elektroforezy, wyznaczając optymalny stosunek dendrymer:siRNA (1:2,5). Test MTT w komórkach HBEC-5i zastosowano do oceny właściwości cytotoksycznych. Na podstawie danych biofizycznych i biologicznych wybrał dendrymer G3Si-PEG6000 jako najbardziej stabilny, najmniej toksyczny i najlepiej wiążący siRNA, stanowiący optymalny nośnik do dalszych etapów badań. W

kolejnym etapie Doktorant skoncentrował się na analizie właściwości biologicznych wybranego układu, modyfikowanych w kontakcie z krwią. Zastosowano szeroki wachlarz metod biofizycznych i biochemicznych, umożliwiających rzetelną weryfikację planowanych aktywności biologicznych kompleksu siRNA-dendrymer w kontekście tworzącej się korony biomolekularnej. Tak złożony układ w sposób zasadniczy wpływa na biodystrybucję badanego nośnika, jego hemokompatybilność oraz aktywność biologiczną. Efekt działania dendrymerów *in vivo* determinuje dynamiczna równowaga pomiędzy ich zdolnością do koncentracji białek, a potencjałem do ich sekwestracji i stabilizacji, co szczegółowo wyjaśnia Doktorant. Równowaga ta może być modulowana zarówno przez właściwości chemiczne kompleksu siRNA-dendrymer, jak również towarzyszące im oddziaływania o charakterze fizycznym. Nowa funkcjonalność dendrymeru, uzyskana przez Doktoranta dzięki jego modyfikacji jako nośnika siRNA, istotnie poprawiła hemokompatybilność układu w porównaniu z formą natywną dendrymeru. Kompleksowanie siRNA zmieniło profil oddziaływań powierzchniowych nano-nośnika, ograniczając jego skłonność do nadmiernej sekwestracji białek osocza i stabilizacji niepożądanych kompleksów, co w efekcie przełożyło się na bardziej korzystne i bezpieczne zachowanie w środowisku krwi. Do tej części pracy mam pytanie na ile obserwowany mechanizm poprawy hemokompatybilności po kompleksowaniu siRNA można uznać za uniwersalny dla dendrymerów kationowych o różnej generacji i różnym stopniu funkcjonalizacji powierzchni.

Kolejny etap badań dotyczył analizy właściwości cytotoksycznych wybranego układu. Perycyty okazały się najbardziej wrażliwe na działanie dendrymeru i kompleksu siRNA-dendrymer, podczas gdy astrocyty wykazywały najwyższą tolerancję. Jakie według Doktoranta są przyczyny tej różnicy we wrażliwości obu typów komórek, może ma ona związek z ich aktywnością metaboliczną. Już przy stężeniach subcytotoksycznych Doktorant zaobserwował depolaryzację mitochondriów jako wczesny sygnał stresu komórkowego. Mimo podobnego poziomu ROS, tylko wolny dendrymer wywoływał wyraźniejszą genotoksyczność, którą kompleksacja z siRNA istotnie ograniczała. Poprzez zastosowanie mikroskopii konfokalnej Doktorant potwierdził, że kompleksy siRNA-dendrymer akumulują się w cytoplazmie, a wolny dendrymer lokalizuje się w pobliżu jądra, co sprzyja pęknięciom DNA. W efekcie kompleks dendrymeru z siRNA nie tylko poprawia dostarczanie siRNA, lecz także ogranicza kontakt nośnika ze strukturami jądrowymi, zmniejszając ryzyko indukowania uszkodzeń genomu.

Cenna pod kątem praktycznym jest wykonana przez Doktoranta ocena integralności modelu bariery krew-mózg, odtwarzającego architekturę jednostki neuronaczyniowej, co umożliwiło analizę zmian jej przepuszczalności pod wpływem badanych związków, w układzie dawka-efekt. Ponadto badania *in vivo* wskazały, że podanie siRNA w formie kompleksy z dendrymerem znacząco wydłuża jego obecność w krążeniu, zwiększając prawdopodobieństwo kontaktu z mikrokrążeniem mózgowym i potencjalnej interakcji z barierą krew-mózg. Dodatkowo, badania o charakterze behawioralnym na modelu mysim, pokazują, że poprawa funkcji poznawczych, nieobecna przy podaniu wolnego siRNA, związana jest z jego kompleksowaniem z dendrymerem. Opracowany układ badawczy, wzbogacony o analizy molekularne, stanowi wartościowe narzędzie do oceny terapeutycznej przydatności

kompleksów siRNA–dendrymer. Potrzebę uzupełnienia powyższego wnioskowania o ocenę wyciszania ekspresji genów na poziomie molekularnym wskazuje Doktorat w planach na przyszłość, co świadczy o obiektywnym i krytycznym podejściu Doktoranta do prowadzonych badań.

Podsumowując, publikacje składające się na rozprawę doktorską Pana mgr Serafina Zawadzkiego stanowi spójną tematycznie, interdyscyplinarną pracę badawczą, która wnosi nową wiedzę dotyczącą właściwości biologicznych karbokrzemowych dendrymerów jako nośników siRNA przenikających przez modelową barierę krew–mózg. Wnioskowanie oparte na uzyskanych wynikach jest poprawne i świadczy o wysokiej dojrzałości naukowej Doktoranta. Zaprezentowane rezultaty badań zestawiono z najnowszymi publikacjami dotyczącymi tej tematyki, pochodzącymi z prestiżowych czasopism naukowych.

Ponadto, na całkowity dorobek naukowy Doktoranta składają się publikacje naukowe o łączny IF wynoszącym 31,8 (860 pkt. MNiSW). Dorobek naukowy obejmuje 11 komunikatów międzynarodowych, 8 krajowych, 3 staże naukowe, w tym 2 zagraniczne bezpośrednio związane z tematyką realizowanej rozprawy doktorskiej, liczne szkolenia oraz dwa stypendia wyjazdowe (PROM NAWA oraz udział w 48 Konferencji FEBS). Całość potwierdza konsekwentną aktywność naukową, obejmującą zarówno udział w prestiżowych wydarzeniach międzynarodowych, jak i rozwój kompetencji badawczych w ramach specjalistycznych staży. Doktorant prowadził jednocześnie działalność popularyzatorską, obejmującą warsztaty dla dzieci i młodzieży, aktywność w ramach Festiwalu Nauki i Techniki, wywiad ekspercki dla portalu branżowego oraz regularne prowadzenie zajęć w Instytucie Kreatywnej Biologii i podczas Nocy Biologów. Działania te świadczą o zaangażowaniu Doktoranta w upowszechnianie wiedzy biologicznej i promocję nauki w środowisku akademickim oraz poza nim.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Serafina Zawadzkiego *Charakterystyka i ocena potencjału dendrymerów karbokrzemowych jako nośników siRNA przez modelową barierę krew–mózg* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Uwzględniając udokumentowaną zdolność Doktoranta do samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz jego wysokie przygotowanie merytoryczne w dyscyplinie nauki biologicznej, wnoszę do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr Serafina Zawadzkiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



Signed by /
Podpisano przez:

Michał Stanisław
Arabski

Date / Data: 2026-
07-30 15:08