

Bydgoszcz, 22.01.2026 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Elżbiety Okły** pt.

**„Właściwości biologiczne nanocząstek złota modyfikowanych  
polietylenoglikolem i ich zastosowanie jako potencjalnych nośników  
lecniczego siRNA w badaniach in vitro.”**

wykonanej w Katedrze Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki Wydziału Biologii i Ochrony  
Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego  
pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Maksima Ionova.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie i logicznie zaplanowany cykl badań dotyczących charakterystyki pegylowanych nanocząstek złota oraz oceny ich potencjalnego wykorzystania jako nośników terapeutycznego siRNA ukierunkowanego na gen *apoE4*, istotny w patogenezie choroby Alzheimera. Tematyka pracy jest niezwykle aktualna, a jednocześnie wpisuje się w szeroki nurt badań nad nanomateriałami o zastosowaniu biomedycznym, w szczególności w obszarze terapii genowych i dostarczania materiału genetycznego do komórek układu nerwowego.

Wyzwania związane z leczeniem chorób neurodegeneracyjnych, w tym ograniczona skuteczność farmakoterapii, trudności w przekraczaniu bariery krew–mózg oraz brak efektywnych metod dostarczania siRNA do komórek docelowych, sprawiają, że poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych jest jednym z kluczowych kierunków współczesnej medycyny. W tym kontekście podjęta przez Autorkę problematyka ma duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne. Zastosowane modele badawcze oraz szeroki zakres metod wskazują na nowatorski charakter przeprowadzonych badań.

Układ edytorski rozprawy oceniam bardzo pozytywnie. Praca została przygotowana starannie i zawiera wszystkie niezbędne elementy, takie jak: spis treści, wykaz skrótów, wprowadzenie, hipotezę badawczą, cele pracy oraz szczegółowy opis metod. Autorka przedstawiła również syntetyczne omówienie wyników, zakończone wnioskami, a całość uzupełnia streszczenie w języku polskim i angielskim oraz obszernie piśmiennictwo obejmujące aktualne pozycje literaturowe. W opracowaniu zamieszczono również dorobek naukowy doktorantki oraz oświadczenia współautorów dotyczące udziału w powstawaniu publikacji.

Celem rozprawy była ocena możliwości wykorzystania pegylowanych nanocząstek złota jako nośników terapeutycznego siRNA oraz określenie ich właściwości biologicznych, w tym cytotoksyczności, immunotoksyczności, zdolności do tworzenia kompleksów z siRNA oraz interakcji z modelem bariery krew–mózg. Cele szczegółowe obejmowały m.in. charakterystykę fizykochemiczną nanocząstek, ocenę ich oddziaływania z białkami osocza,

badania wpływu na błony lipidowe, analizę internalizacji przez komórki oraz ocenę odpowiedzi cytokinowej.

Model badawczy obejmował dwie grupy nanocząstek różniących się stosunkiem PEG:dendron (AuNP14a i AuNP14b), co pozwoliło na analizę wpływu struktury powierzchniowej na właściwości biologiczne. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem szerokiego spektrum technik biofizycznych, biologii komórki i immunologii, co świadczy o wysokim poziomie warsztatu metodologicznego Autorki.

Część eksperymentalna oraz omówienie wyników została zawarta w trzech pracach eksperymentalnych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Łączna punktacja publikacji wg MEN wynosi 380 punktów, a łączny IF = 12,7. Zamieszczone w rozprawie prace były cytowane łącznie 20 razy. Doktorantka obszernie omówiła zawarte w poszczególnych pracach tezy, procedury badawcze, wyniki oraz wnioski z nich wynikające. Prace badawcze stanowiące cykl prezentowanej rozprawy doktorskiej zostały wcześniej pozytywnie ocenione przez zespoły redakcyjne i niezależnych recenzentów prestiżowych czasopism naukowych, co potwierdza, że podjęte badania były prawidłowo zaplanowane i właściwie zrealizowane.

Publikacje tworzą spójny tematycznie cykl badań dotyczących właściwości pegylowanych nanocząstek złota oraz ich zastosowania jako nośników terapeutycznego siRNA. Każdy z artykułów wnosi odrębny, istotny element do całości pracy, a łącznie stanowią one pełny obraz właściwości fizykochemicznych, biologicznych i aplikacyjnych badanych nanocząstek.

Pierwszy artykuł obejmuje charakterystykę biofizyczną kompleksów AuNP/siRNA oraz ocenę ich cytotoksyczności. Wykazano, że stosunek PEG:dendron istotnie wpływa na zdolność nanocząstek do wiązania siRNA, a kompleksy charakteryzują się wysoką stabilnością i zwiększoną biokompatybilnością w porównaniu z wolnymi nanocząstkami. Praca ta stanowi fundament dla dalszych badań nad dostarczaniem siRNA.

Drugi artykuł dotyczy interakcji nanocząstek z białkami osocza oraz modelowymi błonami lipidowymi. Wykazano, że nanocząstki wpływają na strukturę i ładunek albuminy oraz transferyny, a także usztywniają błony lipidowe, co ma kluczowe znaczenie dla przewidywania ich zachowania w środowisku biologicznym. Wyniki te dostarczają ważnych informacji dotyczących tworzenia korony białkowej oraz oddziaływań z błonami komórkowymi.

Trzeci artykuł koncentruje się na ocenie internalizacji kompleksów AuNP/siRNA oraz ich wpływu na model bariery krew-mózg. Wykazano wysoką efektywność wnikania kompleksów do komórek oraz względne bezpieczeństwo nanocząstek w kontakcie z modelem BBB, a także umiarkowaną odpowiedź cytokinową PBMC. Artykuł ten ma najbardziej aplikacyjny charakter i wskazuje na potencjał badanych nanocząstek jako nośników terapeutycznego siRNA w kontekście choroby Alzheimera.

Podsumowując, wszystkie trzy artykuły prezentują wysoki poziom merytoryczny, są spójne tematycznie i metodologicznie, a uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój badań nad nanocząstkami złota jako nośnikami materiału genetycznego. Publikacje

potwierdzają samodzielność badawczą Autorki oraz jej biegłość w stosowaniu zaawansowanych technik eksperymentalnych.

Wyniki nieopublikowane stanowią uzupełnienie badań przedstawionych w publikacjach i dotyczą oceny bezpieczeństwa oraz funkcjonalności pegylowanych nanocząstek złota i ich kompleksów z siRNA w warunkach bardziej złożonych modeli biologicznych. W szczególności przeprowadzono analizę wpływu nanocząstek na integralność trójkomórkowego modelu bariery krew–mózg (BBB), ocenę cytotoksyczności w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem systemu RTCA oraz badania odpowiedzi immunologicznej komórek PBMC.

W badaniach TEER oraz przepuszczalności dekstranu wykazano, że większość badanych formułacji nie zaburza integralności modelu BBB, a jedynie wyższe stężenia AuNP14a prowadzą do zwiększenia przepuszczalności bariery. Wyniki te potwierdzają względne bezpieczeństwo nanocząstek w kontakcie z komórkami śródbłonka. Analiza impedancji komórkowej (RTCA) wykazała, że AuNP14a w wyższych stężeniach powoduje spadek indeksu komórkowego, natomiast kompleksacja z siRNA łagodzi ten efekt, co wskazuje na ochronny wpływ siRNA. Nanocząstki AuNP14b wykazywały znacznie łagodniejszy profil cytotoksyczności.

W badaniach odpowiedzi immunologicznej PBMC stwierdzono umiarkowaną indukcję cytokin prozapalnych, z dominującą rolą IL-8. Profil odpowiedzi zależał zarówno od rodzaju nanocząstki, jak i od obecności osocza, co podkreśla znaczenie środowiska biologicznego w ocenie immunotoksyczności. Wyniki te są zgodne z obserwacjami dotyczącymi interakcji nanocząstek z białkami osocza oraz ich wpływu na błony komórkowe.

Podsumowując, wyniki nieopublikowane potwierdzają, że pegylowane nanocząstki złota oraz ich kompleksy z siRNA charakteryzują się korzystnym profilem bezpieczeństwa w modelach *in vitro*, a ich właściwości biologiczne zależą od struktury powierzchniowej oraz stężenia. Dane te stanowią istotne uzupełnienie badań opublikowanych i wzmacniają wniosek o potencjale badanych nanocząstek jako nośników terapeutycznego siRNA.

W oparciu o przeprowadzone badania sformułowano sześć podstawowych wniosków:

- *Pegylowane nanocząstki złota AuNP14a i AuNP14b tworzą stabilne kompleksy z siRNA.*
- *Nanocząstki złota wchodzi w interakcje z modelowymi i biologicznymi błonami lipidowymi, a także z albuminą i transferyną, nie zmieniając w sposób znaczący ich struktury.*
- *Nanocząstki złota wykazują niską cytotoksyczność wobec komórek śródbłonka, astrocytów i perycytów wchodzących w skład modelu bariery krew–mózg.*
- *Kompleksy AuNP/siRNA wnikają do komórek śródbłonka, lokalizując się głównie w cytoplazmie i nie wywołują istotnych efektów genotoksycznych.*
- *Kompleksy nanocząstek złota z siRNA nie zaburzą integralności komórek hodowli stanowiącej model bariery krew–mózg *in vitro*.*
- *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.*

Wnioski sformułowane przez Autorkę są logiczne, spójne i wynikają bezpośrednio z przeprowadzonych badań. Są one odpowiedzią na postawione pytania w celach pracy, a jednocześnie wskazują na potencjalne zastosowanie wyników badań w praktyce. Dają podstawę do wdrażania nowych rozwiązań terapeutycznych w chorobach neurodegeneracyjnych.

Rozprawa napisana jest ładnym językiem, z zachowaniem dobrego stylu; czyta się ją z przyjemnością. Choć rozprawa prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny, kilka elementów wymaga bardziej pogłębionego omówienia. Analiza odpowiedzi immunologicznej, choć wartościowa, pozostawia pewien niedosyt — szczególnie w zakresie odniesienia do bogatej literatury dotyczącej reakcji immunologicznych wywoływanych przez PEG oraz mechanizmów aktywacji PBMC. W pracy brakuje również oceny funkcjonalnej siRNA poprzez analizę poziomu białka kodowanego przez gen *apoE4*, co ogranicza możliwość pełnej oceny skuteczności terapeutycznej kompleksów AuNP/siRNA. Model bariery krew–mózg, mimo swojej wartości, nie uwzględnia warunków dynamicznych, takich jak shear stress, które w istotny sposób wpływają na właściwości śródbłonna i translację wyników do warunków *in vivo*. Różnice między nanocząstkami AuNP14a i AuNP14b zostały opisane, jednak ich interpretacja mogłaby zostać pogłębiona o bardziej szczegółową analizę mechanistyczną.

Należy podkreślić, że ciekawe obserwacje z prowadzonych badań naturalnie wskazują na nowe kierunki ich rozwoju. Ograniczenia dotyczące linii komórkowych zawsze spotykają się z krytyką i brakiem bezpośredniego przełożenia na model kliniczny. Choć nie jest to wymóg formalny, warto byłoby szerzej omówić potencjalne kierunki badań *in vivo*, które stanowiłyby naturalne rozszerzenie uzyskanych wyników i pozwoliły na pełniejszą ocenę aplikacyjnego potencjału badanych nanocząstek.

Analizując przedstawione publikacje oraz określone udziały poszczególnych autorów w ich powstanie, należy stwierdzić, że Doktorantka opanowała bardzo dobrze warsztat metodyczny, począwszy od podstawowych technik laboratoryjnych, poprzez techniki biofizyczne, aż po wyrafinowane techniki z zakresu biologii molekularnej. Wieloautorskie prace, w których mgr Elżbieta Okła jest wiodącym autorem, wskazują na umiejętności Doktorantki w zakresie współpracy w zespołach badawczych, co niewątpliwie świadczy o jej dojrzałości naukowej. W dorobku naukowym Doktorantki znajdują się ponadto: pięć artykułów w indeksowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz udział w pięciu konferencjach naukowych. Należy podkreślić, że mgr Okła swoje doświadczenie wzbogaciła również poprzez cztery krótkie staże naukowe w ośrodkach zagranicznych. Była również wykonawcą w trzech projektach naukowych.

Podsumowując, w oparciu o ocenę zbioru prac stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz całkowitego dorobku naukowego stwierdzam, że mgr Elżbieta Okła spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (z późn. zm.). Badania, których efektem są publikacje zawarte w rozprawie doktorskiej, stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologicznej. Wnoszę zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologicznej o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Okły i dopuszczenie jej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dodatkowo, wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Okły. Jako uzasadnienie pragnę podkreślić:

- bardzo wysoką wartość merytoryczną pracy,
- nowatorski charakter badań,
- publikację wyników w renomowanych czasopismach,
- znaczący potencjał aplikacyjny badań,
- cytowania prac Autorki (trzech prac stanowiących osiągnięcie naukowe — wg bazy Web of Science: 20 cytowań),
- biegłość w stosowaniu zaawansowanych technik badawczych.

KIEROWNIK  
Katedra Biochemii Klinicznej  
  
dr hab. Marek Foksiński, prof. UMK