



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**  
Uniwersytet Łódzki

prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz  
Katedra Biofizyki Ogólnej  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki  
ul. Pomorska 141/143  
90-236 Łódź

Łódź, dn. 31 sierpnia 2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Kowolik**

pt. „*AGuIX theranostic nanoparticles for vascular-targeted interstitial  
photodynamic therapy of brain tumor*”

wykonanej pod kierunkiem Pani prof. Martyny Elas

i Pani prof. Patrycji Nowak-Śliwińskiej

na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Kowolik dotyczy zastosowania nanocząstek AGuIX z dołączonym fotouczulaczem (tetrafenylporfiryń) oraz peptydem (odpowiednio: DKPPR – wiążącym się z receptorem NRP-1, bądź niewiążącym się, kontrolnym RPKPD) w terapii fotodynamicznej glejaka. Bez wątplenia zastosowanie PDT w leczeniu glejaków jest obiecującym podejściem, a poszukiwanie nowych systemów dostarczania fotouczulaczy - uzasadnionym celem pracy.

Praca napisana jest w języku angielskim (z wyjątkiem krótkiego streszczenia w języku polskim) i ma charakter monografii. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Praca

zawiera wstęp teoretyczny, cele pracy, opis materiałów i metod, uzyskane wyniki (z których część została zamieszczona w załączniku), dyskusję i wnioski. Spis literatury obejmuje 180 pozycji – faktycznie jest ich mniej, gdyż część z nich powtarza się. W przypadku niektórych odnośników literaturowych brakuje też nazwy czasopisma.

Wstęp teoretyczny zawiera podstawowe informacje dotyczące glejaków, terapii fotodynamicznej nowotworów, angiogenezy i związanej z nią terapii fotodynamicznej nakierowanej na naczynia krwionośne. W tej części pracy bardzo brakuje rozdziału poświęconego przeglądowi literatury na temat nanocząstek AGuIX. Kilka artykułów dotyczących tych nanoukładów tematycznie pokrywa się z przedmiotem rozprawy doktorskiej – tym bardziej cenne byłoby opisanie istniejącego stanu wiedzy i wyraźne określenie, w jakim obszarze badania Doktorantki stanowią weryfikację wcześniej uzyskanych wyników, bądź są rozwinięciem wcześniejszych obserwacji, bądź też stanowią zupełnie nowatorskie podejście do tematu.

Mocną stroną przedstawionej do oceny pracy doktorskiej jest zastosowanie bardzo zróżnicowanych metod: od badań *in vitro* w modelach 2D i 3D, przez model guza rosnącego na błonie omocniowo-owodniowej zarodka kurzego (CAM), po model guza mózgu rosnącego ekotopowo na nogach myszy bezgranicznych. Wstępne badania obejmowały też myszy model ortotopowego glejaka rosnącego w mózgu.

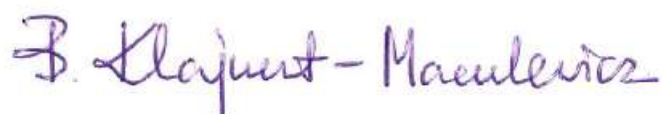
Pierwszym, nieco zaskakującym w kontekście wcześniejszych doniesień literaturowych, wynikiem był brak wpływu peptydu DKPPR nakierowującego nanocząstkę na naczynia krwionośne guza na akumulację badanego układu w komórkach glejaka ludzkiego (U87) oraz w komórkach śródbłonna (ECRF). Doktorantka dyskutując te wyniki podniosła kwestię agregacji układu z peptydem kontrolnym RPKPD (AGuIX@PS@scramble). Szkoda, że zjawisko to nie zostało udokumentowane pomiarem średnicy hydrodynamicznej tego układu. W to miejsce została zaproponowana analiza generacji tlenu singletowego (które to doświadczenie nie zostało opisane w sekcji materiały i metody). Co ciekawe, Doktorantka nie straciła wiary, że przyłączenie peptydu DKPPR ma sens (zapewne oparciu o dane literaturowe, gdyż Jej własne nie dały na to przekonującego dowodu) i w dalszych eksperymentach stosowała układ z tym peptydem (AGuIX@PS@DKPPR). Doktorantce udało się z powodzeniem wykazać, że hamuje on wzrost guza rosnącego na błonie omocniowo-owodniowej zarodka kurzego (model CAM). W przypadku modelu guza mózgu rosnącego ekotopowo na nogach myszy bezgranicznych wyniki nie były już tak jednoznaczne. Doktorantka wyodrębniła grupę reagującą i niereagującą na leczenie oraz pokusiła się o poszukanie różnic między nimi, których dopatrzyła się zawartości naczyń krwionośnych w guzie oraz jego utlenowaniu. Najmniej

wyników wniósł ostatni analizowany model, czyli model glejaka rosnącego w mózgu, który udało się jedynie zoptymalizować. Pozostaje mieć nadzieję, że badania te będą kontynuowane.

Jeśli Doktorantka planuje publikację wyników, warto zadbać o wyeliminowanie pewnych nieścisłości:

1. Doktorantka zamiennie stosuje w odniesieniu do peptydu funkcjonalnego sekwencje DKPPR i KDPPR (np. w legendzie rys. 12). Z publikacji Thomasa i wsp.<sup>1</sup> oraz Griesa i wsp.<sup>2</sup> wynika, że lizyna była dodana do peptydu DKPPR od strony N-terminalnej i w tych badaniach stosowano nomenklaturę AGuIX@PS@KDKPPR, która wydaje się poprawniejsza.
2. Nie jest wyjaśnione, czemu w przypadku modelu CAM naświetlano guz światłem o długości fali 420 nm (informacja ze strony 39), podczas, gdy we wszystkich pozostałych eksperymentach było to światło o długości fali 650 nm.
3. Analizując efekt fotodynamiczny dla dwóch badanych układów (rys. 14) warto porównać je między sobą w kontekście wnioskowania statystycznego, co mogłoby dać ciekawsze obserwacje niż statystyczna weryfikacja zjawiska stężenie-efekt.

Podsumowując, w mojej ocenie przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Ewy Kowolik do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



---

<sup>1</sup> Thomas, E. et al. Ultrasmall AGuIX theranostic nanoparticles for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of glioblastoma, *Int. J. Nanomed.* 12, 7075-7088 (2017)

<sup>2</sup> Gries, M. et al. Multiscale selectivity and in vivo biodistribution of NRP-1 targeted theranostic AGuIX nanoparticles for PDT of glioblastoma. *Int. J. Nanomed.* 15, 8739-8758 (2020)