

Dr hab. Piotr Garnuszek
Ośrodek Radioizotopów POLATOM
Narodowe Centrum Badań Jądrowych
Ul. Andrzeja Sołtana 7
05-400 Otwock
piotr.garnuszek@polatom.pl

Warszawa, dn. 23.08.2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Edyty Cędrawskiej

pt.: „Biokoniugaty nanocząstek tlenków metali jako nośniki emiterów cząstek α w celowanej terapii radionuklidowej”

Promotor: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz

Promotor pomocniczy: dr Marek Pruszyński

Rozprawa doktorska powstała dzięki możliwości wykorzystania specjalistycznej aparatury i przeprowadzeniu eksperymentów w kilku ośrodkach naukowych, w tym w macierzystej jednostce Doktorantki, Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej, na Wydziale Chemii UW (badania z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, TEM), Instytucie Wysokich Ciśnień w Warszawie (badania z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej, SEM) i w National Center for Scientific Research „NCSR” Demokritos w Atenach (badania in vivo).

W kilku eksperymentach Doktorantka korzystała z pomocy zespołów naukowych, biegłych w szczególnych technikach eksperymentalnych, co nie dziwi i nie umniejsza wartości pracy, gdyż naturalnym jest, że badania naukowe w dziedzinie nauk przyrodniczych prowadzone są współcześnie w komplementarnych, interdyscyplinarnych zespołach naukowych. Takie podejście świadczy o dojrzałości Doktorantki i otwartości na współpracę naukową z różnymi zespołami w celu jak najlepszego rozwiązania zdefiniowanego problemu naukowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa napisana jest w sposób klasyczny i składa się z przeglądu literaturowego (108 pozycji + 30 pozycji w części doświadczalnej), części eksperymentalnej, dyskusji wyników, podsumowania i wniosków. Praca liczy 119 stron, nie licząc stron zawierających streszczenia oraz spis treści. Praca zawiera 54 rysunki, wykresy i zdjęcia oraz 17 tabel z wynikami badań, które umożliwiają śledzenie i analizę treści dysertacji podnosząc w ten sposób jej wartość. Przedstawiony na stronie 118 rozprawy dorobek naukowy Doktorantki stanowi 6 publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, w tym w dwóch Doktorantka jest pierwszym autorem. Dorobek ten znacząco przewyższa ustawowe wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora i świadczy o naukowej dojrzałości Doktorantki. Prace opublikowane od 2013 do 2018 roku dotyczą zagadnień związanych z zastosowaniem różnych nanosystemów jako nośników dla szeregu radionuklidów do zastosowań medycznych. Świadczy to o dużym doświadczeniu i znajomości zagadnień, które były przedmiotem badań Doktorantki w zaprezentowanej rozprawie. Dziwi zatem, że w części przeglądu literaturowego dotyczącej systemów nanostruktur do przenoszenia radionuklidów Doktorantka nie podzieliła się swoimi opublikowanymi doświadczeniami w tym zakresie. Zacytowanie swoich prac nie przyniosło by ujemy, lecz podkreśliłoby biegłość Doktorantki w tym zakresie, a przy okazji zwiększyłoby liczbę cytowanego piśmiennictwa.

Zakres merytoryczny pracy

Celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej było zbadanie możliwości trwałej immobilizacji emitera cząstek α – ^{225}Ac i powstających w wyniku jego rozpadu radionuklidów pochodnych (^{221}Fr , ^{217}At , ^{213}Bi) na nanocząstkach tlenku tytanu(IV) (TiO_2) i magnetytu (Fe_3O_4) pod kątem zastosowania w celowanej terapii radionuklidowej. W części literaturowej (34 strony), Doktorantka przedstawiła ogólny zarys medycyny nuklearnej, stosowane radiofarmaceutyki, podstawy celowanej terapii radionuklidowej i najnowsze trendy, w tym wykorzystanie alfa emiterów do efektywnego niszczenia komórek nowotworowych. Scharakteryzowała potencjalnie użyteczne radionuklidy, w tym poświęciła szczególną uwagę radionuklidowi ^{225}Ac . Naświetliła w sposób obiektywny istotne problemy klinicznego zastosowania α emiterów oraz próby ich przewyższenia poprzez szereg koncepcji tworzenia stabilnych połączeń z cząsteczkami nośnikowymi, w tym szczególnie skoncentrowała się na nanostrukturach o potencjalnym zastosowaniu w medycynie nuklearnej.

Celowana alfa terapia (*Targeted Alpha Therapy*, TAT) przy użyciu biologicznie aktywnych cząsteczek nakierowanych na cele molekularne w tkance patologicznej (receptory, antygeny) połączonych z układem stabilnie wiążącym radionuklid emitujący cząstki alfa, stanowi perspektywiczne narzędzie medycyny nuklearnej w walce z nowotworami o charakterze rozsiałym. Wymaganiami podstawowymi dla tego typu radiofarmaceutyków trzeciej generacji opartych na alfa emiterach jest bardzo szybka depozycja radiofarmaceutyku w komórkach nowotworowych lub stabilne utrzymanie radionuklidu macierzystego i pochodnych, powstających w cyklu rozpadu w strukturze cząsteczki leczniczej. Doktorantka w sposób przejrzysty przedstawiła problem stabilności preparatów opartych na ^{225}Ac ($t_{1/2} = 9,9$ d). ^{225}Ac ulega kaskadowemu rozpadowi, w wyniku którego powstają radionuklidy pochodne będące emiterami cząstek α lub/i β^- . Ścieżka rozpadu alfa prowadzi przez radionuklid ^{221}Fr ($t_{1/2} = 4,9$ min), który emitując cząstkę alfa o energii 6,4 MeV przechodzi do ^{217}At ($t_{1/2} = 32$ ms) rozpadającego się do ^{213}Bi o $t_{1/2} = 45,6$ min. ^{213}Bi ulega przemianie alfa do ^{209}Tl i β^- do ^{213}Po , który jest emiterem cząstek alfa. Szereg rozpadu ^{225}Ac kończy się na stabilnym izotopie ^{209}Bi . ^{225}Ac ze względu na emisję 4 cząstek alfa o sumarycznej energii 28 MeV jest jednym z głównych kandydatów do TAT.

W opisanych w literaturze potencjalnych radiofarmaceutykach najczęściej ^{225}Ac chelatowany jest przez bifunkcyjne ligandy multidentne typu HEHA i DOTA, które tworzą podobnie jak w przypadku lantanowców stabilne termodynamicznie i kinetycznie połączenia. Jednak powstające w trakcie rozpadu ^{225}Ac radionuklidy pochodne zyskują bardzo wysoką energię odrzutu (105-160 keV), przewyższającą energię wiązania z chelatorem, co prowadzi do rozpadu kompleksu i uwolnienia radionuklidu pochodnego. Radionuklid ten, pozbawiony wektora, wyłapywany jest w organizmie głównie przez wątrobę i śledzionę. Niekontrolowane gromadzenie radionuklidów pochodnych w tkankach zdrowych może prowadzić do zwiększonej radiotoksyczności, przeważającej pozytywny aspekt leczniczy tego typu terapii. Inna koncepcja wiązania ^{225}Ac i jego radionuklidów pochodnych opiera się na wykorzystaniu organicznych i nieorganicznych nanostruktur. Poza funkcją wiążącą radionuklidy, nanostruktury dzięki możliwości funkcjonalizacji ich powierzchni powinny umożliwiać trwałe przyłączenie ligandów wektorowych takich jak peptydy, przeciwciała monoklonalne lub ich fragmenty.

Wymaga podkreślenia, że podjęty przez Doktorantkę problem immobilizacji radionuklidu ^{225}Ac i radionuklidów pochodnych stanowi istotny element rozwoju TAT. Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest z naukowego i praktycznego punktu widzenia aktualna i bardzo ważna. Aktualność i ważność tej tematyki związana jest szczególnie z próbami wykorzystania nowych materiałów – nanocząstek do trwałej immobilizacji radiotoksycznych alfa emiterów, zarówno macierzystego radionuklidu ^{225}Ac jak i radionuklidów pochodnych, w celu zastosowania rozwiązań w celowanej alfa terapii (TAT).

Ocena metodologiczna dysertacji

Cel pracy jest konsekwentnie realizowany, aczkolwiek dwutorowo: w badaniach radiobiokoniugatów opartych na nanocząstkach tlenku tytanu(IV) (TiO_2 , anataz) i opartych na nanocząstkach magnetytu (Fe_3O_4).

Doktorantka przedstawiła spójne wyniki funkcjonalizowania nanocząstek tlenku tytanu(IV) (TiO_2 , anataz) łańcuchami glikolu polietylenowego (PEG), do którego w kolejnym kroku został przyłączony ligand o funkcji wektora – fragment Substancji P (5-11), charakteryzujący się wysokim powinowactwem do receptorów NK_1 . Następnie sfunkcjonalizowane nanocząstki zostały wyznakowane radionuklidem ^{225}Ac . Doktorantka scharakteryzowała własności fizyko-chemiczne sfunkcjonalizowanych nanocząstek; określiła ich rozmiary, a na podstawie analizy termogravimetrycznej policzyła liczbę przyłączonych łańcuchów PEG i SP(5-11). Zbadała stabilność wyznakowanych nanocząstek w różnych mediach, w tym w surowicy ludzkiej i płynie mózgowo-rdzeniowym. Zbadała cytotoksyczność *in vitro*.

Dzięki wbudowaniu ^{225}Ac w strukturę sieci krystalicznej magnetytu, Doktorantka uzyskała stabilne połączenie, odporne na działanie surowicy ludzkiej. Stopień uwalniania radionuklidów pochodnych był niższy niż w przypadku nanocząstek TiO_2 , które wiązały radionuklid ^{225}Ac na zasadzie adsorpcji powierzchniowej. Również w przypadku immobilizacji ^{225}Ac w nanocząstkach magnetytu Doktorantka wykonała badania stabilności w różnych mediach, wykazując, że wiązanie ^{225}Ac jest trwałe, a wyciek tego radionuklidu nie przekraczał 5% we wszystkich badanych mediach, nawet po 10-ciu dniach. W przypadku radionuklidów pochodnych uwalnianie było niższe niż w przypadku powierzchniowo związanych radionuklidów na nanocząstkach TiO_2 . Nawet w surowicy ludzkiej wyciek ^{221}Fr nie przekraczał 20%, a immobilizacja ^{213}Bi utrzymywała się na poziomie ponad 70%. Szkoda, że mimo informacji przedstawionej przez Doktorantkę na stronie 103, w pracy nie przedstawiono wyników badań stabilności znakowanych nanocząstek $^{225}\text{Ac-Fe}_3\text{O}_4$ sfunkcjonalizowanych poprzez przyłączenie przeciwciała monoklonalnego Trastuzumab (Tras).

Bardzo pozytywnym aspektem prac doświadczalnych było zastosowanie szeregu nowoczesnych technik do charakterystyki otrzymanych zmodyfikowanych nanostruktur m.in.: TEM, SEM, analiza termogravimetryczna, techniki dyspersyjne, dzięki którym Doktorantka określiła rozmiary otrzymanych struktur i liczbę przyłączonych wektorów biologicznie aktywnych. Zbadała również aktywność cytotoksyczną otrzymanych znakowanych i sfunkcjonalizowanych nanocząstek z przyłączonymi ligandami wektorowymi: Substancją P (5-11) i przeciwciałem mAb Trastuzumab. Niestety, Doktorantka nie przeprowadziła analizy statystycznej wyników cytotoksyczności, wobec czego wnioski o wyższej aktywności sfunkcjonalizowanych znakowanych ^{225}Ac nanocząstek mają charakter spekulatywny, zwłaszcza że zamieszczone wykresy nie pozwalają na jednoznaczną ocenę, czy sfunkcjonalizowane nanocząstki charakteryzują się wyższą cytotoksycznością w stosunku do znakowanych niesfunkcjonalizowanych nanocząstek. W Tabeli 17 Doktorantka podaje wartości liczbowe LD_{50} dla badanych związków: ^{225}Ac , $^{225}\text{Ac-Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ i $^{225}\text{Ac-Fe}_3\text{O}_4\text{-Tras}$, ale niestety bez informacji w jaki sposób obliczyła LD_{50} i z jakim błędem. Brak jest również wyników LD_{50} dla samego przeciwciała i jego połączenia z magnetytem, a byłaby to cenna informacja w aspekcie oceny czy efekt niszczenia komórek nowotworowych jest addytywny czy może synergistyczny.

Doktorantka wykonała badania *in vivo* biodystrybucji dla sfunkcjonalizowanych nanocząstek magnetytu, stosując ^{177}Lu zamiast ^{225}Ac , co jest naturalne ze względu na podobną koordynację radionuklidów i korzystniejsze parametry detekcji promieniowania gamma emitowanego przez Lu-177. Doktorantka stwierdziła bardzo wysoki poziom gromadzenia nanocząstek $^{177}\text{Lu-Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ jak również $^{177}\text{Lu-Fe}_3\text{O}_4\text{-Tras}$ w wątrobie i śledzionie, i bardzo niskie gromadzenie w guzie ($\ll 1\% \text{ID/g}$). Na

tej podstawie i mając jednak na uwadze uwalnianie radionuklidów pochodnych, Doktorantka stwierdziła, że podanie systemowe sfunkcjonalizowanych nanocząstek znakowanych ^{225}Ac może powodować więcej szkód niż pożytku. Zgodnie z zasadą „*primum non nocere*”, Doktorantka zaproponowała bezpośrednie podanie znakowanych nanostruktur do miejsca – guza – w którym mają wywołać oczekiwany efekt terapeutyczny. Doktorantka zaplanowała i wykonała badania biodystrybucji nanocząstek $^{177}\text{Lu-Fe}_3\text{O}_4\text{-Tras}$ podanych bezpośrednio do guzów wywołanych podskórnym wszczepieniem komórek SKOV-3 u myszy o obniżonej odporności immunologicznej. Stwierdziła, że retencja nanocząstek w guzach utrzymywała się na bardzo wysokim poziomie, a po 24h trwania eksperymentu zaobserwowano nieznaczną aktywność w śledzionie i wątrobie (odpowiednio 3.8%ID/g i 1.2%ID/g). Do krwi przeniknęło zaledwie 0.12 %ID/g po 72 h. Doktorantka nie miała możliwości obserwacji uwalniania radionuklidów pochodnych ^{225}Ac : ^{221}Fr i ^{213}Bi i takie badania zamierza wykonać w przyszłości, stąd wrażenie, że praca jest niedokończona i będzie miała swój ciąg dalszy. A jeśli tak, to zasugerowałbym Doktorantce wykonanie badań również dla znakowanych ale niesfunkcjonalizowanych nanocząstek magnetytu. Być może przy podaniu preparatu bezpośrednio do guza nie ma potrzeby funkcjonalizowania nanostruktur specyficznymi ligandami wektorowymi typu Substancja P (5-11) czy mAb Trastuzumab. Może oczekiwany efekt leczniczy zostanie osiągnięty wyłącznie po zastosowaniu nanostruktur znakowanych ^{225}Ac , jak to ma miejsce w przypadku metody radiosynowektomii.

Wyniki obu zagadnień prowadzą do wspólnego, istotnego wniosku, że znakowane ^{225}Ac nanokoniugaty ze względu na istotną niestabilność wiązania radionuklidów pochodnych i bardzo niski poziom gromadzenia w guzie *in vivo*, mimo funkcjonalizacji wektorami bioaktywnymi, nie mogą być zastosowane do systemowego podania dożylnego lecz wyłącznie bezpośrednio do guza. To istotny wniosek z punktu widzenia bezpieczeństwa pacjentów i świadczy o dojrzałym krytycyzmie naukowym, cennej cesze naukowca poszukującego prawdy. Ta bardzo ważna obserwacja wyznaczająca kierunek dalszych prac nad immobilizacją aktynu-225 i radionuklidów pochodnych zasługuje na podkreślenie. Mimo wrażenia niezakończenia badań (Doktorantka wspomina, że badania z nanocząstkami magnetytu będą kontynuowane), przedstawione wnioski znajdują swoje uzasadnienie w zaprezentowanych wynikach.

Uwagi krytyczne

W trakcie lektury dysertacji nasuwa się szereg pytań i wątpliwości, z których najistotniejsze pozwolę sobie wypunktować poniżej.

Najpoważniejszym mankamentem pracy jest brak analizy statystycznej wyników eksperymentów, szczególnie w przypadku badań *in vitro*.

Inne aspekty wątpliwe:

- str. 97 – „ze względu na ultraśladowe ilości ^{225}Ac i ^{177}Lu nie miałam możliwości zbadania czy oba radionuklidy inkorporowały się w sieć krystaliczną.” – *Łatwo dostępny jest lutet nieradioaktywny, który można zastosować do wykonania badań inkorporacji w sieć krystaliczną!!!*

- str. 103 – *Mimo informacji zamieszczonej przez Doktorantkę, w pracy niestety nie przedstawiono badań stabilności sfunkcjonalizowanych nanostruktur $^{225}\text{Ac-Fe}_3\text{O}_4\text{-Tras}$. Przedstawiono tylko badania stabilności $^{225}\text{Ac-Fe}_3\text{O}_4$.*

- str. 106 – *Na przedstawionych rysunkach 47 i 48 trudno dostrzec różnice pomiędzy aktywnością cytotoksyczną znakowanych ^{225}Ac nanostruktur $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ i $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Tras}$. Brak analizy statystycznej uniemożliwia rzetelną ocenę przewagi jednego preparatu nad drugim.*

Uwagi szczegółowe:

- str. 18 – „Za szybkość oraz rodzaj transportu danego radionuklidu do miejsca docelowego w organizmie odpowiada jego wielkość, specyficzna budowa oraz właściwości całego radiofarmaceutyku.” – *Podkreślone cechy wymagają wyjaśnienia w aspekcie przesłania jakie Doktorantka chce przekazać czytelnikom. Co do właściwości „całego radiofarmaceutyku” nie mam wątpliwości.*

- str. 21 – „Głównym elementem budowy radiofarmaceutyku jest radionuklid promieniotwórczy” – *Ten trywialny opis radiofarmaceutyku zastosowany przez Doktorantkę za chwilę jest obalany w pkt. 1.3.3, gdzie Doktorantka podkreśla wagę biologicznie aktywnych ligandów wektorowych, które wspólnie z radionuklidem, systemem chelatującym radionuklid oraz łańcuchem oddalającym system wiązania radionuklidu od części biologicznie aktywnej (space arm) stanowią nierozłączne elementy radiofarmaceutyków III generacji zgodnie z koncepcją Paula Ehrlicha tzw. „magic bullet”.*

- str. 21 – „Wykorzystywane w terapii radionuklidy charakteryzują się czasem połowicznego zaniku od 6 godzin do 7dni. Jedyny wyjątek stanowi ^{89}Sr ($t_{1/2}$ = 50 dni).” - *A co z najważniejszym radionuklidem terapeutycznym stosowanym od 1940 roku – jod-131 ma okres półtrwania 8,01 dnia?*

- str. 25: „W wyniku bombardowania neutronami tarczy zbudowanej ze wzbogaconego tlenu iterbu zachodzi reakcja jądrowa typu n,γ i uzyskiwany jest ^{177}Y ($t_{1/2}$ = 1,9 h), który następnie ulega rozpadowi β^- do ^{177}Lu . Niestety, ze względu na niski przekrój czynny ^{176}Y na neutrony termiczne wynoszący jedynie 2,5 barnów oraz skomplikowaną procedurę rozdzielania ^{177}Lu od ^{177}Y opisana metoda jest znacznie rzadziej wykorzystywana”.

Po pierwsze należało podać w jaki izotop wzbogacony jest materiał tarczowy – a jest to ^{176}Yb , a po drugie – procedura rozdzielania dotyczy ^{177}Lu głównie od ^{176}Yb , czyli materiału tarczowego, a nie od ^{177}Yb , który rozpada się do ^{177}Lu !

„Zjadanie” liter na końcu wyrazów jest przypadłością Doktorantki, ale to już przesada, aby osoba ubiegająca się o tytuł doktora nauk chemicznych „zjadała” końcówki symboli pierwiastków!!! – nie ^{176}Y i ^{177}Y lecz ^{176}Yb i ^{177}Yb - jak tak można?!!

- str. 25 – „Istnieje wiele doniesień na temat otrzymanych potencjalnych radiofarmaceutyków znakowanych ^{177}Lu , które mogłyby znaleźć zastosowanie w celowanej terapii radionuklidowej (np. analog somatostatyny, ^{177}Lu -DOTATATE)...” – *od ponad 20 lat ^{177}Lu -DOTATATE jest stosowany do terapii PRRT, a od 2017 roku mamy oficjalnie zarejestrowany w europejskiej procedurze centralnej preparat Lutathera czyli ^{177}Lu -DOTATATE.*

- str. 26 i 31 – *Doktorantka umniejsza znaczeniu Europejskiej Agencji Leków (EMA) pomijając kilkakrotnie fakt, że nowoczesne radiofarmaceutyki typu np. Zevalin dopuszczone są nie tylko przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA), ale również przez EMA. Nie zorientowany czytelnik może odnieść wrażenie, że postęp w dziedzinie radiofarmacji odbywa się tylko w Stanach Zjednoczonych Ameryki, a w Europie nie dzieje się w tej dziedzinie nic!*

- str. 40 – 63 GBq to zdecydowanie 1,7 Ci a nie 1,7 mCi.

- str. 77 i 79 – współczynniki K_d dla TiO_2 (anatazu) różnią się o rząd wielkości w Tabelach 12 i 13 – *rozbieżność wymaga wyjaśnienia!*

Literówki, błędy fleksyjne, lapsusy językowe i błędy składniowe

Praca nie została napisana starannie; zawiera wiele literówek, błędów fleksyjnych i lapsusów językowych. Poniżej przykłady tylko z kilku stron, ale jest ich znacznie więcej:

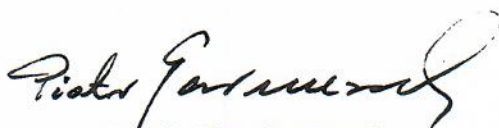
- str. 24 – nie „ilość protonów” lecz „liczba protonów”!!!

- str. 31: „połączonych za pomocą wiązaniami disiarczkowymi”, „obecne wycofane” „przeprowadzone badani”, „doniesienia o próba” ;

- str. 35 – „który zwiększona ekspresja”, „Dlatego w literaturze coraz częściej pojawiają się doniesienia o próba wykorzystania cząsteczek ... ale posiadających znacznie mniejsza ...”

Konkluzja końcowa

Mimo wymienionych uwag krytycznych i dostrzeżonych uchybień metodologicznych i językowych, pozytywne aspekty pracy w sposób dostateczny przewyższają wady dysertacji, a w związku z tym wydaję ogólną pozytywną ocenę rozprawy. Jej Autorka uzyskała szereg wartościowych wyników systematyzujących i rozszerzających wiedzę na temat immobilizacji radionuklidów ^{225}Ac i radionuklidów pochodnych na dwóch typach nanocząstek: tlenku tytanu(IV) (TiO_2) i magnetytu (Fe_3O_4). Doktorantka posiadała również wiedzę teoretyczną i praktyczną z zakresu fizyko-chemii nanostruktur oraz zdobyła umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam zatem, że spełnione zostały wszelkie wymagania stawiane tego typu opracowaniom i stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie o przyjęcie rozprawy doktorskiej pt.: „Bioskoniugaty nanocząstek tlenków metali jako nośniki emiterów cząstek α w celowanej terapii radionuklidowej” i dopuszczenie mgr Edyty Cędrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Piotr Garnuszek