

Dr hab. inż. Renata Mikołajczak
Ośrodek Radioizotopów POLATOM
Narodowe Centrum Badań Jądrowych
ul. Andrzeja Sołtana 7
05-400 Otwock

23.05.2021 r

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Biokoniugaty ferrytu barowego jako nośniki ^{223}Ra
w α -radioimmunoterapii”

mgr Weroniki Gawędy
z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej

Promotor: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz

Ocena merytoryczna pracy

Rad-223 (^{223}Ra) w postaci jonowej, jako roztwór chlorku radu, jest pierwszym emiterym promieniowania α , który uzyskał dopuszczenie do stosowania jako produkt leczniczy wskazany do leczenia dorosłych pacjentów z rakiem gruczołu krokowego, z objawowymi przerzutami do kości (w Polsce dostępny jako Xofigo od 2014 r). Można śmiało stwierdzić, że w historii medycyny nuklearnej i radiofarmacji zarejestrowanie Ra-223 stanowiło przełom w dotychczasowym postrzeganiu izotopów promieniotwórczych emitujących promieniowanie α i potwierdziło ich przydatność i bezpieczeństwo stosowania u ludzi.

Ponadto, w ostatnich latach wykazano skuteczność izotopów promieniotwórczych emitujących promieniowanie α , takich jak bizmut-213, aktyn-225 i in. Charakteryzują się one wysokim liniowym współczynnikiem przekazywania energii (LET) i krótkim zasięgiem (poniżej 1 mm) w tkankach. W stosunku do emiterym promieniowania β^- , promieniowanie α znacznie częściej wywołuje efekt uszkodzenia dwuniciowego DNA a co za tym idzie, skuteczne niszczenie

komórek. Selektywność działania promieniowania jest uzależniona przede wszystkim od stosowania działających wybiórczo nośników.

Zwiększone zainteresowanie wykorzystaniem α -emiterów wynika z faktu, że dostępne są substancje chelatujące, tworzące trwałe kompleksy z niektórymi z nich, np. DOTA wykorzystywana w receptorowej peptydowej radioterapii wewnętrznej do wiązania ^{177}Lu czy ^{90}Y , wiąże również ^{213}Bi czy ^{225}Ac .

W radiofarmaceutyku, ^{223}Ra jest podawany dożylnie i wychwytywany z krwioobiegu przez namnażające się komórki kostne, podobnie do jonów wapnia. Jednak zarówno wapń jak i rad nie tworzą stabilnych związków kompleksowych. Dlatego w przypadku radu strategia znakowania cząsteczek biologicznie czynnych poprzez przyłączanie do nich substancji chelatujących jest nieskuteczna. Ponadto, sześciopowolny rozpad radu-223 do ołowiu-207 następuje poprzez krótko żyjące produkty rozpadu (powstają radionuklidy pochodne, które są izotopami innych pierwiastków niż rad) i towarzyszą mu emisje promieniowania alfa, beta i gamma o różnych energiach i prawdopodobieństwach emisji.

Mając na uwadze korzystny efekt leczniczy ^{223}Ra oraz zwiększające się możliwości wydajnego otrzymywania tego radionuklidu, Doktorantka poszukuje sposobów szerszego wykorzystania Ra-223 w radioterapii wewnętrznej. Ma przy tym dobrą ocenę ograniczeń, jakie stawia przed badaczem ten izotop promieniotwórczy, trudność w tworzeniu stabilnych wiązań koordynacyjnych oraz złożony schemat rozpadu promieniotwórczego.

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnienia trwałego związania radionuklidu ^{223}Ra z cząsteczkami aktywnymi biologicznie, które to trwałe połączenie zwiększałoby dostępność radiofarmaceutyków znakowanych ^{223}Ra w praktyce medycznej. Postawiona hipoteza badawcza zakładała możliwość wykorzystania magnetycznych nanocząstek ferrytu barowego – $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ w której strukturze, ze względu na podobne własności chemiczne, kationy baru byłyby zastępowane kationami radu, prowadząc do otrzymania mieszanego ferrytu barowo-radowego $\text{Ra}_x\text{Ba}_{1-x}\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$. Dodatkowo, własności magnetyczne $[\text{Ra}^{223}]\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ umożliwiałyby włączenie w leczenie drugiej techniki, tj. magnetycznej hypertermii, tym samym zwiększając skuteczność leczenia przeciw-nowotworowego. Badania nad wykorzystaniem nanocząstek nieorganicznych do związania radu-223 uważam za istotne, wnoszące ważny wkład w rozwój tej metody i jej potencjalne przyszłe zastosowania.

Tezy rozprawy można pokrótce scharakteryzować następująco:

- zbadanie możliwości i przeprowadzenie syntezy magnetycznych cząstek ferrytu baru

$\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$

- opracowanie metody wprowadzającej ^{223}Ra do struktury tego ferrytu,
- zbadanie trwałości i związania ^{223}Ra i produktów jego rozpadu promieniotwórczego i określenie ich stabilności w roztworach metodami radiochemicznymi,
- modyfikacja powierzchni nanocząstek w celu przyłączenia cząsteczek aktywnych biologicznie, naprowadzających na wybrany rodzaj nowotworu,
- otrzymanie radiobiokoniugatu nanocząstek $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ i cząsteczek naprowadzających tj. przeciwciała monoklonalnego trastuzumab, wykazującego powinowactwo do receptorów HER2, których ekspresja towarzyszy często nowotworom raka piersi i jajnika,
- ocena cytotoksyczności i powinowactwa receptorowego otrzymanych radiobiokoniugatów metodami in vitro na wybranych liniach komórkowych.

Takie sformułowanie koncepcji badawczej uważam za trafne i logiczne.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy ogółem 113 stron, rozpisanych na 5 głównych rozdziałów z podrozdziałami, 5 tabel i 34 rysunki. Rozprawa napisana jest w sposób klasyczny i składa się z przeglądu literaturowego, części eksperymentalnej, wyników z dyskusją, podsumowania i wniosków. Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział 3.4, w którym Doktorantka przedstawia uzyskane wyniki i dokonuje ich krytycznej oceny, w konsekwencji prowadzącej do podsumowania i wniosków opisanych w rozdziale 4. Przegląd literatury zawiera 191 cytowanych pozycji, z tej liczby 170 pozycji w części literaturowej i dalsze 21 w części eksperymentalnej. Cytowane pozycje są aktualne, większość z ostatnich 10 lat. Zakres tematyczny wyboru literaturowego jest bardzo szeroki i wszechstronnie przedstawia badane zagadnienie. W części literaturowej Doktorantka podaje rys historyczny rozwoju medycyny nuklearnej, ogólnie omawia metody leczenia nowotworów oraz celowanej radioterapii wewnętrznej ze szczególnym uwzględnieniem α terapii. Doktorantka szczegółowo przedstawia znaczenie radionuklidu ^{223}Ra w celowanej radioterapii nowotworowej. Charakteryzuje właściwości chemiczne i jądrowe ^{223}Ra , jego schemat rozpadu i charakter emisji, możliwości jego otrzymywania oraz zalety i ograniczenia wynikające z charakterystyki fizycznej i chemicznej ^{223}Ra i jego produktów rozpadu. Szczegółowej analizy Doktorantka dokonała w odniesieniu do opisanych w literaturze prób skompleksowania kationu Ra^{2+} . Na podkreślenie zasługuje tu omówienie koncepcji radioterapii w połączeniu z magnetyczną hipertermią. Przeprowadzona analiza źródeł jest obszerna, a sformułowane na jej podstawie wnioski – poprawne. Dobrze uzasadniają cel pracy, który Doktorantka konsekwentnie realizuje w części eksperymentalnej.

Część eksperymentalna spełnia oczekiwania wobec prac doświadczalnych, wykonywanych z zastosowaniem licznej nowoczesnej aparatury pomiarowej i metod analitycznych. Realizując swój plan badawczy Doktorantka wykazała, że metodą hydrotermalną można otrzymać nanocząsteczki $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ o średnicach w przedziale 15-30 nm, oraz że możliwe jest trwałe związanie atomów Ra-223 w tych cząsteczkach zaproponowaną metodą. W tym celu badała trwałość związania ^{223}Ra w soli fizjologicznej i w surowicy krwi. Po przyłączeniu cząsteczek przeciwciała na powierzchni nanoczątek $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ Doktorantka scharakteryzowała otrzymane biokoniugaty metodami TEM, DLS, TGA i badaniami magnetycznymi. Ponadto zbadała, że otrzymany radiobiokoniugat $^{223}\text{Ra}[\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}\text{-CEPA-trastuzumab}]$ zachowuje powinowactwo do receptorów HER2 komórek nowotworowych SKOV-3. Potwierdziły to również badania internalizacji oraz mikroskopii konfokalnej, zarówno dla $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ jak i $^{223}\text{Ra}[\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}]$.

Następnie Doktorantka udowodniła, że możliwe jest trwałe związanie Ra-223 i, w znacznym stopniu, produktów jego rozpadu, w cząsteczkach ferrytu barowego $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ oraz możliwe jest przyłączenie do tych cząsteczek wektora biologicznego, jakim w tym przypadku było przeciwciało monoklonalne trastuzumab. Zabieg ten skutkował podwyższoną zdolnością otrzymanych radiobiokoniugatów do łączenia się z receptorami komórek nowotworowych, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia potencjalnych zastosowań medycznych. Nawet jeśli spowodowało to osłabienie własności magnetycznych otrzymanych radiobiokoniugatów, to i tak wartość poznawcza badań przeprowadzonych przez Doktorantkę jest nie do przecenienia i załuguje na podkreślenie. Za dodatkowy walor poznawczy należy uznać zachęcające wyniki badań z wykorzystaniem sferoidów złożonych z klastrów komórek nowotworowych SKOV-3. Niewątpliwie, badania w kierunku sprawdzenia, czy przyjęta strategia mogłaby doprowadzić do otrzymania nanocząsteczek wykazujących selektywne gromadzenie w komórkach nowotworowych w warunkach *in vivo*, warte są kontynuacji.

Część dotycząca wyników i dyskusji rozprawy jest przedstawiona wyczerpująco i merytorycznie, zajmuje ponad 30 stron. Wskazuje na doświadczenie Doktorantki w pracy laboratoryjnej, opanowanie warsztatu badawczego, umiejętność wyboru i zastosowanie wielu metod syntezy nieorganicznej, metodyki znakowania izotopowego, analizy chemicznej w tym zastosowanie techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS), transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (XRD), pomiarów magnetometrycznych, analizy termograficznej, techniki mikroskopii konfokalnej i badań *in vitro* na liniach komórkowych, takich jak badania powinowactwa, internalizacji czy cytotoksyczności. Praca przedstawiona do oceny powstała dzięki możliwości wykorzystania

urządzeń i przeprowadzenia doświadczeń w kilku ośrodkach, w tym w jednostce macierzystej Doktorantki, Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, w Instytucie Tele- i Radiotechnicznym w Warszawie oraz w Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego (CMKP) w Warszawie, natomiast ^{223}Ra otrzymywano z generatora Ac-227/Ra-223 przekazanego przez European Commission Joint Research Centre w Karlsruhe, Niemcy.

W efekcie badań przedstawionych w dysertacji powstała publikacja, w której Doktorantka jest pierwszym autorem:

Gawęda W, Pruszyński M, Cędrowska E, Rodak M, Majkowska-Pilip A, Gawel D, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Bilewicz A. Trastuzumab Modified Barium Ferrite Magnetic Nanoparticles Labeled with Radium-223: A New Potential Radiobioconjugate for Alpha Radioimmunotherapy. Nanomaterials. 2020 Oct 20;10(10):2067. doi: 10.3390/nano10102067. Publikacja ta prezentuje zasadnicze osiągnięcia Doktorantki, nie jest jednak w rozprawie cytowana. Wskazanie tego źródła w tekście rozprawy ułatwiłoby zidentyfikowanie, jaki jest rzeczywisty efekt praktyczny osiągnięć Doktorantki przedstawionych w jej dysertacji. Warto jednak zauważyć, że cytowana jest inna praca Doktorantki, *Gawęda W, Osial M, Żuk M, Pękała M, Bilewicz A, Krysinski P. Lanthanide-Doped SPIONs Bioconjugation with Trastuzumab for Potential Multimodal Anticancer Activity and Magnetic Hyperthermia. Nanomaterials. 2020 Feb 8;10(2):288. doi: 10.3390/nano10020288,* rozszerzająca tematykę przedstawioną w dysertacji. Zarówno wymienione powyżej publikacje a także aktywność Doktorantki w prezentowaniu wyników badań na konferencjach krajowych i międzynarodowych oceniam wysoko.

Stwierdzam, że rozwiązanie postawionego zadania zostało przeprowadzone prawidłowo, a przyjęte założenia i metody nie budzą większych zastrzeżeń. Praca została zredagowana starannie, błędy edytorskie w zasadzie się nie zdarzają. Można jednak zaobserwować pewne niedostatki stylistyczne, poniżej pozwolę sobie zacytować kilka przykładów:

„Promieniowanie jonizujące stawiało pierwsze kroki w medycynie ... „, str. 3.

„Związki oparte na otwartych źródłach promieniowania w medycynie nuklearnej nazywane są radiofarmaceutykami” str. 6,

Inny przykład pewnej niekonsekwencji: „Najprostszą budową charakteryzują się radiofarmaceutyki I generacji, które są jonami metali lub niemetalu bądź prostymi związkami chemicznymi, np. $^{89}\text{Sr}^{+2}$, $^{90}\text{Y}^{3+}$ czy Na^{131}I ”. str. 6

We wstępie do części literaturowej Doktorantka niepotrzebnie kilkakrotnie przytacza argument, że swoiste gromadzenie radionuklidów w postaci jonowej, takich jak ^{89}Sr czy ^{131}I dotyczy tylko kilku rodzajów nowotworów, jako przeciwwagę dla radiofarmaceutyków

zbudowanych na zasadzie koniugatów nośnika biologicznie czynnego z chelatorem jako miejsca wiążącego radionuklid. Nadużywa też konstrukcji zdaniowej zaczynającej się od „Niestety...”, przy omawianiu wyników badań innych autorów jak i własnych, które nie zakończyły się sukcesem lub nie doprowadziły do udowodnienia przyjętej hipotezy, zapominając, że w nauce tego rodzaju wyniki też wnoszą nową wiedzę i należy je traktować obiektywnie.

Inna uwaga dotyczy stosowania w tekście zamiennie: „okres połowicznego rozpadu”, „czas półrozpadu” i „okres półrozpadu”. Zazwyczaj zaleca się, żeby w rozprawach naukowych powoływać się konsekwentnie na jedno źródło danych fizycznych i nomenklaturowych, żeby uniknąć podobnych rozbieżności.

Nieco szerszego omówienia wymagałoby połączenie w jednym zdaniu znaczenia stopnia internalizacji i toksyczności (patrz str. 22). Podobnie jeśli chodzi o stwierdzenie: „Dużą grupę nośników w medycynie nuklearnej stanowią nanocząstki metaliczne...” podczas gdy cytowana literatura [82-84] i [85] odnosi się tylko i wyłącznie do własności bakteriobójczych.

Pracę doktorską mgr Weroniki Gawędy pt. „Biokoniugaty ferrytu barowego jako nośniki ²²³Ra w α -radioimmunoterapii” oceniam wysoko. Doktorantka skutecznie zmierzyła się z trudnym zadaniem immobilizacji Ra-223 w nanocząsteczkach. Praca spełnia wymogi stawiane przez ustawodawcę pracom doktorskim. Pewne drobne manakmenty, budzące moje zastrzeżenia, nie wpływają na ogólną ocenę pracy, na wyciągnięte wnioski i nie umniejszają znaczenia przedstawionych wyników. Uważam, że Doktorantka jest w pełni dojrzałą kandydatką do organizowania i prowadzenia badań naukowych, spełnia tym samym kryteria stawiane pracownikom naukowym ubiegającym się o stopień naukowy doktora.

Podsumowując, oceniam przedstawioną rozprawę doktorską jako bardzo dobrą, spełniającą wymagania ustawy dotyczące rozpraw doktorskich i wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Weroniki Gawędy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. inż. Renata Mikołajczak