



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU

KATEDRA CHEMII I BIOCHEMII KLINICZNEJ

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Maria Iskra

adres: ul. Rokietnicka 8
60-806 Poznań
Centrum Biologii Medycznej

tel.: +48 61 854 77 00
fax.: +48 61 854 77 02
e-mail: iskra@amp.edu.pl
www.chembiochklin.ump.edu.pl

Ocena rozprawy doktorskiej

**pt.: „Innowacyjna metoda syntezy radiofarmaceutyku
do obrazowania transportera dopaminy (DAT)
w technice Pozytonowej Tomografii Emisyjnej (PET)”**

**mgr Justyny Pijarowskiej-Kruszyny
z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej**

Promotor: Dr hab. inż. Renata Mikołajczak, prof. NCBJ

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi dzieło zawierające spójne przedstawienie kilku problemów naukowych: znaczenie radiofarmaceutyków w diagnostyce obrazowej układu nerwowego, projekt i opracowaną automatyczną metody radiosyntezy znacznika przeznaczonego na potrzeby obrazowania przy zastosowaniu techniki pozytonowej tomografii emisyjnej (PET). Obszerne uzasadnienie przeprowadzenia badań odpowiadających na zapotrzebowanie kliniczne przedstawione zostało w części literaturowej, w tym rola radiofarmaceutyków w obrazowaniu transportera dopaminy (DAT) i możliwość wykorzystania izotopu fluoru-18 w postaci radioznacznika do nieinwazyjnego obrazowania, jego strukturę i rolę w etiologii choroby Parkinsona i powstawaniu uzależnień od kokainy.

Radiofarmaceutyki stosowane są w medycynie nuklearnej do obrazowania stanu i czynności fizjologicznej narządów, pozwalają ocenić ich czynności i dysfunkcje.

Radioizotopy, które wchodzą w ich skład, obecne są w nich w śladowych ilościach, nie stanowią więc zagrożenia podczas stosowania u ludzi w diagnostyce i leczeniu. Wytwarzanie radioizotopów o czasie połowicznego rozpadu pozwalającym na przygotowanie znaczników do diagnostyki obrazowej stało się możliwe po zastosowaniu cyklotronów. Radionuklidem ulegającym przemianie β^+ , o względnie długim okresie połowicznego rozpadu i niskiej energii emitowanych pozytonów, odpowiedniej do zastosowania w PET, okazał się ^{18}F . Wykorzystanie tego radionuklidu jest możliwe jedynie gdy cyklotron znajduje się w pobliżu ośrodka wykonującego badania. Urządzenia te używane są obecnie do wytwarzania fluoru-18 w celu przygotowania fluorodeoksyglukozy (^{18}F -FDG), radiofarmaceutyku, który znalazł zastosowanie w obrazowaniu metodą PET nowotworów charakteryzujących się podwyższonym metabolizmem glukozy. Wzrastające zapotrzebowanie kliniczne badań tą metodą powoduje konieczność opracowania nowych radiofarmaceutyków znakowanych ^{18}F , specyficznych dla rodzaju terapii i obrazowanych narządów.

Praca przedstawiona do oceny powstała dzięki możliwości wykorzystania urządzeń i przeprowadzenia doświadczeń w kilku ośrodkach, w tym jednostce macierzystej Doktorantki, Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej, w Ośrodku Radioizotopów POLATOM oraz Centrum Onkologii w Bydgoszczy.

W części literaturowej rozprawy, obejmującej ponad 50 stron, Doktorantka przedstawiła szeroko charakterystykę radionuklidu ^{18}F , metody jego produkcji i wykorzystanie do znakowania nim docelowego związku organicznego. W drugiej części wstępu opisała transporter dopaminy, jego rolę w etiologii choroby Parkinsona i innych, potencjalne ligandy i wpływ ich struktury na efektywność wiązania przez DAT. Określiła również cechy, jakimi powinien charakteryzować się radiofarmaceutyk do obrazowania DAT. W tym celu zebrała dane dotyczące struktury, czyli obecności różnych podstawników w wybranych fenylotropanowych pochodnych kokainy i porównała ich parametry farmakologiczne, w tym rodzaj nuklidu, stałą inhibicji, czas osiągnięcia maksymalnej aktywności. Przedstawiła również wybrany do własnych badań radioznacznik, znakowany fluorem-18 ligand FECNT, przedstawiając charakterystykę farmakologiczną i metody jego syntezy. W tej części rozprawy Doktorantka wykazała się doskonałą umiejętnością przeprowadzanie szerokiej analizy piśmiennictwa, analizowała metody syntezy i kryteria przydatności licznych radioznaczników do obrazowania metoda PET. Wydaje się jednak, że ta część pracy mogłaby ulec pewnemu ograniczeniu i dotyczyć tylko ściślej wybranego modelu badawczego, a pozostały przegląd piśmiennictwa mógłby zostać ujęty w publikacji przeglądowej. Wydaje się również, że celowym byłoby przeniesienie celu pracy ze Wstępu na zakończenie Części literaturowej,

co wyraźniej przedstawiałyby zamiar i powody opracowania jednoetapowej, wydajnej i automatycznej radiosyntezy znacznika do określonego celu diagnostycznego i podkreślało aspekt kliniczny pracy.

Na szczególną uwagę w mojej opinii zasługuje Część eksperymentalna, spełniająca w pełni oczekiwania wobec prac doświadczalnych, wykonywanych z udziałem licznej nowoczesnej aparatury pomiarowej i metod analitycznych. Doktorantka dokonała wyboru ligandu i przeprowadziła syntezę czterech jego prekursorów. Przyjęła założenie, że radiosynteza znacznika z udziałem nuklidu ^{18}F powinna przebiegać jednoetapowo, w zautomatyzowanym procesie, cechować się wysoką wydajnością radiochemiczną i prowadzić finalnie do uzyskania postaci odpowiedniej do podania dożylnego.

Ta część rozprawy jest przedstawiona bardzo wyczerpująco i merytorycznie, zajmuje ponad 30 stron. Wskazuje na duże doświadczenie Doktorantki w pracy laboratoryjnej, opanowanie warsztatu badawczego, umiejętność wyboru i zastosowania wielu metod syntezy organicznej, radiosyntezy, analizy chemicznej, w tym metod spektroskopowych, chromatograficznych, rentgenowskich. Wszystkie zastosowane procedury zostały szczegółowo udokumentowane, co świadczy o rzetelności wykonanych badań i daje możliwość wykorzystania ich przez innych badaczy. Podobnie jak w przypadku Części literaturowej, sugerowałabym przeniesienie szczegółowych wyników, np. czystości uzyskanych preparatów, widm NMR czy MS, do aneksu.

Biorąc pod uwagę uzasadnienie podjęcia badań i możliwości zastosowania uzyskanych przez Doktorantkę radiofarmaceutyków w praktyce klinicznej u ludzi, uważam za wartę podkreślenia przeprowadzenie badań kontroli jakości znacznika $[^{18}\text{F}]\text{FECNT}$ zgodnie z wymogami Farmakopei Europejskiej. Szczególnie ważne jest ocenienie tożsamości i czystości radiochemicznej, chemicznej, jałowości i czystości bakteryjnej.

Wyniki badań połączono z ich dyskusją i są one dominującą częścią tego rozdziału, co w znacznym stopniu ograniczyło odniesienie ich do piśmiennictwa cytowanego w pracy. Rolę dyskusji spełnia w pewnym stopniu kolejny rozdział – Podsumowanie i wnioski. Wyniki poszczególnych etapów badań Doktorantka przedstawiła dokumentując je wyczerpująco w tabelach i rysunkach. Zawierają one wzory chemiczne prekursorów i schematy syntezy, przykładowe chromatogramy HPLC mieszanin reakcyjnych w przeprowadzanych syntezach prekursorów, wzorca $^{19}\text{F}\text{-FECNT}$, dane strukturalne, wyniki badania czystości i stabilności. Wyodrębniona rozstała radiosynteza znacznika $^{18}\text{F}\text{-FECNT}$ z podaniem schematu produkcji,

przygotowaniem nuklidu [^{18}F] w postaci nukleofilowej, ustaleniem warunków wstępnych substytucji nukleofilowej z użyciem ^{19}F , stabilnego izotopu fluoru. Proces radiosyntezy z użyciem jonu [^{18}F] F^- Doktorantka przeprowadziła w jednoetapowej reakcji substytucji nukleofilowej, uzyskując różnice w wydajności zależne od podstawników odchodzących z przewagą prekursora chlorowego i mesylowego. Ostateczny proces radiosyntezy radiofarmaceutyku [^{18}F]-FECNT odbywał się w sposób zautomatyzowany według modułu opracowanego przez Doktorantkę, obejmował kilka etapów radiosyntezy i trwał około 90 minut wraz z oczyszczaniem. Porównanie automatycznej radiosyntezy [^{18}F]-FECNT z danymi literaturowymi wskazały na przewagę metody zastosowanej w pracy, w tym krótszy czas trwania procesu i większą wydajność radiochemiczną. Ocena jakościowa otrzymanego radiofarmaceutyku potwierdziła odpowiednią jakość produktu, spełnienie kryteriów Farmakopei Europejskiej, co w opinii Doktorantki zapewnia skuteczność i bezpieczeństwo stosowania u ludzi.

W Podsumowaniu Doktorantka przedstawiła wnioski ujęte w 26-ciu podpunktach, z których tylko część w mej opinii stanowi rzeczywiste wnioski, a pozostałe są w znacznym stopniu powtórzeniem wyników. Stwarza to trudność w dotarciu i ustaleniu faktycznych końcowych osiągnięć Doktorantki, które niewątpliwie są bardzo istotne i potwierdzają oryginalność i nowatorski charakter pracy. Na wyróżnienie spośród uzyskanych przez Doktorantkę wyników zasługuje z pewnością ich aplikacyjny charakter, możliwość szybkiego wdrożenia do praktyki klinicznej, dbałość o zapewnienie skutecznego i bezpiecznego wykorzystania w ludzi.

Rozprawa zawiera bogaty wykaz piśmiennictwa, obejmujący 226 publikacji, w tym dwie prace Doktorantki, ponadto streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów.

Ocena metodologiczna pracy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została przygotowana bardzo poprawnie pod względem językowym i formalnym, styl i interpunkcja nie budzą zastrzeżeń. Na podkreślenie zasługuje aktualność i celowość przeprowadzonych badań, dająca możliwość klinicznego zastosowania uzyskanych wyników w diagnostyce i terapii. Należy docenić ogromną sumiennność, dociekliwość i konsekwencję Doktorantki w prowadzeniu badań, połączone z umiejętnością wykorzystania nowoczesnego warsztatu badawczego. Opracowane procedury syntezy radiofarmaceutyku, jego prekursorów i związku wzorcowego oraz

zastosowane metody oceny ich jakości stanowią istotny wkład Doktorantki w rozwój nowoczesnych metod neuroobrazowania układu dopaminergicznego techniką PET.

Podsumowując, w mej opinii praca doktorska pt.: „**Innowacyjna metoda syntezy radiofarmaceutyku do obrazowania transportera dopaminy (DAT) w technice Pozytonowej Tomografii Emisyjnej (PET)**” spełnia wymogi stawiane przez ustawodawcę rozprawom doktorskim. 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.

Na tej podstawie stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Justyny Pijarowskiej-Kruszyny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 19.03.2018 r.



Prof. dr hab. Maria Iskra
Zakład Chemii Ogólnej
Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu