

Dr hab. Piotr Garnuszek

Warszawa, dn. 20.07.2023 r.

Ośrodek Radioizotopów POLATOM

Narodowe Centrum Badań Jądrowych

Ul. Andrzeja Sołtana 7

05-400 Otwock

piotr.garnuszek@polatom.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgr Kamila Wawrowicza

pt.: „Radiofarmaceutyki oparte na emiterach elektronów Augera ^{193m,195m}Pt dla chemo- i radioterapii nowotworu piersi (HER2+) oraz raka wątrobowokomórkowego”

Promotorzy: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz, prof. dr hab. Paweł Krysiński

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Agnieszka Majkowska-Pilip

Praca mgr Kamila Wawrowicza została zrealizowana w ramach Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich „RadFarm – Radiofarmaceutyki dla ukierunkowanej molekularnie diagnostyki i terapii medycznej” (POWR.03.02.00-00-I009/17-00). Z analizy przedstawionej metodyki badań można wnioskować, że badania były prowadzone przez Doktoranta głównie w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie, a obrazowanie z użyciem techniki mikroskopii konfokalnej przeprowadzono w Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego w Warszawie i w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Przedstawiona do oceny rozprawa napisana jest w sposób klasyczny i składa się z przeglądu literaturowego (165 pozycji), części doświadczalnej, dyskusji wyników, podsumowania i wniosków oraz bibliografii (łącznie 225 pozycji). Praca liczy w sumie 106 stron i zawiera 34 rysunki oraz 8 tabel, w tym 4 z wynikami badań. Doktorant nie przedstawił w sposób przejrzysty swojego dorobku naukowego, ale z analizy zamieszczonej bibliografii wynika, że jest on współautorem 5 publikacji w czasopismach recenzowanych. W dwóch publikacjach, które ściśle powiązane są z przedstawioną do recenzji dysertacją, Doktorant jest pierwszym autorem. Dorobek Doktoranta znacząco przewyższa ustawowe wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora i świadczy o jego naukowej dojrzałości.

Zakres merytoryczny pracy

Celem pracy doktorskiej była synteza oraz określenie chemo- i radiotoksyczności radioaktywnych nanostruktur opartych na emiterach elektronów Augera ^{193m,195m}Pt oraz ¹²⁵I do terapii HER2-pozytywnego nowotworu piersi i raka wątrobowokomórkowego. Koncepcja zaprojektowania

radiofarmaceutyków o wielokierunkowej aktywności przeciwnowotworowej bazowała założeniach, że wykorzystując doskonale poznane i szeroko opisywane katalityczne właściwości platyny, możliwe będzie jej selektywne działanie jedynie w silnie utleniającym mikrośrodku guza, a emisja elektronów Augera przez przyłączone/wbudowane radionuklidy powinna spotęgować cytotoksyczne działanie na komórki nowotworowe.

Doktorant skoncentrował się na opracowaniu radiobiokoniugatów opartych na nanocząstkach platyny o ukierunkowanym transporcie aktywnym skierowanym na receptor HER-2 z jednej strony, a z drugiej, na selektywnym działaniu radionanocząstek platyny w mikrośrodku nowotworowym komórek raka wątrobowokomórkowego, podatnych na stres oksydacyjny.

Cel pracy Doktorant postanowił osiągnąć poprzez syntezę nanostruktur ze rdzeniem ze złota i powłoką z platyny (Au@Pt) o średnicy 30 nm oraz nanocząstek platyny (PtNPs) o średnicy 2 nm. Średnice rozważanych nanomateriałów dobrano uwzględniając między innymi możliwość uzyskania wysokich aktywności właściwych radioaktywnych związków, łatwość funkcjonalizacji czy umożliwienie dotarcia radiofarmaceutyku do jądra komórkowego. W kolejnym etapie Doktorant modyfikował powierzchnie tych nanocząstek poprzez koniugację z przeciwciałem monoklonalnym dla uzyskania większej specyficzności i internalizacji w przypadku HER2+ nowotworu piersi. Radiochemiczna część pracy obejmuje próbę otrzymywania radionuklidów ^{195m}Pt i ^{197}Pt oraz późniejsze ich wykorzystanie jako prekursorów do syntezy radioaktywnych nanostruktur. Drugim rozwijanym w przedstawionej pracy kierunkiem badań jest immobilizacja radionuklidów jodu (^{125}I oraz ^{131}I) na powierzchni nanocząstek, jako alternatywy dla nieosiągalnych radionuklidów ^{193m}Pt i ^{195m}Pt . Otrzymane radioaktywne nanokoniugaty były poddane badaniom biologicznym *in vitro* celem wykazania ich potencjalnej selektywności, oceny skuteczności terapeutycznej nanocząstek i radiokoniugatów w odniesieniu do hodowli komórkowych 2D i trójwymiarowego modelu guza, a także określenia mechanizmów odpowiedzialnych za aktywność *in vitro* nanocząstek platynowych. Część rozprawy dotycząca badań biologicznych jest bez wątpienia najciekawsza i ma charakter innowacyjny.

Część literaturową Doktorant przedstawił w postaci dwóch bloków tematycznych. W pierwszym scharakteryzowane zostały nanocząstki stosowane w terapii przeciwnowotworowej. Doktorant omówił właściwości, mechanizmy działania oraz zastosowanie medyczne nanocząstek z dwóch podstawowych kategorii: organiczne i nieorganiczne. Swoje zainteresowanie skupił głównie na nanocząstkach metalicznych zbudowanych z metali szlachetnych (Au, Pt), podkreślając ich potencjalną użyteczność szczególnie w aspekcie zastosowania jako nośników dla izotopów promieniotwórczych. Doktorant omawia też wykorzystanie mikrośrodku guza (TME) do uzyskania wysokiej selektywności terapii celowanej. Ciekawym fragmentem części literaturowej jest omówienie zjawiska

stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych i potencjalnej roli nanocząstek platyny w działaniu prooksydacyjnym w komórkach raka wątrobowokomórkowego (HCC).

W drugiej części przeglądu literaturowego Doktorant scharakteryzował zjawisko emisji elektronów Augera, przedstawił kilka potencjalnie użytecznych radionuklidów oraz zastosowanie emisji elektronów Augera w celowanej radioterapii.

Terapia elektronami Augera jest jedną z bardziej obiecujących strategii, czego odzwierciedleniem są liczne prace badawcze nad udoskonaleniem i wprowadzeniem do praktyki klinicznej tej metody leczenia nowotworów, dlatego też przedstawiona rozprawa doktorska będzie potencjalnie pomocna dla środowiska radiofarmaceutycznego przy opracowaniu nowoczesnych radiofarmaceutyków o wielokierunkowym działaniu terapeutycznym.

Dziwi jednak zachowanie w tytule rozprawy radionuklidów platyny $^{193m,195m}\text{Pt}$, jako potencjalnych emiterów elektronów Augera, gdyż jak sam Doktorant to podkreślił w podsumowaniu „... także w przyszłości nie ma perspektyw na otrzymanie odpowiedniej aktywności tych radionuklidów do przeprowadzenia badań klinicznych”. Wsnucie takiego wniosku, zapewne na podstawie przeglądu literaturowego, powinno moim zdaniem spowodować drobną zmianę tytułu, który bardziej odpowiadałby przeprowadzonym badaniom i uzyskanym rezultatom na: **„Radiofarmaceutyki oparte na emiterach elektronów Augera $^{193m,195m}\text{Pt}$ dla chemo- i radioterapii nowotworu piersi (HER2+) oraz raka wątrobowokomórkowego”**. Dla radionuklidów ^{193m}Pt i ^{195m}Pt Doktorant nie uzyskał żadnych wyników, więc w tym zakresie nie zrealizował zakładanego celu, ale uzyskał za to szereg ciekawych wyników po zastosowaniu innego emitera elektronów Augera - ^{125}I .

Ocena metodologiczna dysertacji

Radiochemia

Doktorant wykonał jedną próbę otrzymania ^{195m}Pt w dwuetapowej aktywacji wg reakcji: $^{193}\text{Ir}(n,\gamma)^{194}\text{Ir}(n,\gamma)^{195m}\text{Ir}(3.67\text{ h})\rightarrow^{195m}\text{Pt}$, poprzez naświetlanie w reaktorze Maria 1 mg tarczy wzbogaconej w ^{193}Ir przez 1 h w strumieniu neutronów $10^{14}\text{ n/cm}^2\text{s}$. Doktorantowi nie udało się uzyskać radionuklidu ^{195m}Pt , za co obarcza niski przekrój czynny i utrudniony przerób napromienionej tarczy irydowej.

Doktorant nie podjął dalszych prób nad otrzymaniem tytułowych radionuklidów ^{195m}Pt i ^{193m}Pt i ograniczył się do otrzymania do dalszych badań radionuklidu ^{197}Pt przez naświetlanie w reaktorze Maria tarczy naturalnej platyny w postaci PtCl_2 . Nasuwa się pytanie dlaczego Doktorant nie podjął kolejnych prób wytworzenia ^{195m}Pt stosując np. dłuższy czas aktywacji.

Synteza nanocząstek platyny

Doktorant przeprowadził syntezę nanocząstek AuNPs metodą Turkevicha, a następnie w oparciu o uzyskane doświadczenia i pracę Gao i wsp. (2017) pokrył nanocząstki złota warstwą platyny. Syntezę nanocząstek platyny o średnicy 2 nm przeprowadził zgodnie z metodą opisaną przez Islama i wsp. i w analogiczny sposób przeprowadził syntezę radioaktywnych nanocząstek Au@¹⁹⁷Pt oraz ¹⁹⁷PtNPs. W kolejnym etapie modyfikował powierzchnię otrzymanych nanomateriałów i bazując na publikacji Cai i wsp. (2016), przyłączył do cząstek trastuzumab stosując heterobifunkcyjny związek OPSS-PEG-NHS. W kolejnym etapie, w oparciu o opublikowane protokoły chemisorpcji radionuklidów jodu (¹²⁵I, ¹³¹I) na powierzchni nanokoloidów złota, Doktorant jako pierwszy zbadał wydajność chemisorpcji i stabilność uzyskanych połączeń radionuklidów jodu z niesfunkcjonalizowanymi nanocząstkami platyny.

Doktorant scharakteryzował otrzymane nanocząstki przy użyciu technik: DLS (dynamiczne rozpraszanie światła), TEM/HR-TEM (transmisyjna mikroskopia elektronowa/wysokiej rozdzielczości), UV-Vis i spektrofluorymetria, ICP-MS oraz iTLC z detekcją radiometryczną.

Badania biologiczne in vitro

Najistotniejszą część rozprawy stanowią liczne badania biologiczne *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek adherentnych oraz trójwymiarowych sferoidów, jako modeli guza o zdefiniowanym i ukształtowanym mikrośrodowisku. W ramach realizacji biologicznej części pracy Doktorant wykorzystał pięć nowotworowych linii komórkowych, a badania obejmowały najważniejsze aspekty weryfikacji skuteczności potencjalnych leków, takie jak test powinowactwa receptorowego i internalizacji oraz analiza cytotoxyczości. Doktorant przeprowadził także złożone analizy frakcjonowania komórek i izolacji jądra komórkowego celem określenia wewnątrzjądrowej lokalizacji otrzymanych radiokoniugatów; analizę markerów stresu oksydacyjnego i potencjału oksydacyjnego cytozolu komórek raka wątrobowokomórkowego; identyfikację uszkodzeń DNA oraz zbadał wpływ chemotoksycznego działania nanomateriałów na indukowanie śmierci komórki i inhibicję cyklu komórkowego.

Doktorant ocenił właściwości biologiczne *in vitro* otrzymanych nanocząstek z użyciem szeregu technik typu: badania cytotoxyczości testem MTS, mikroskopia konfokalna oraz cytometria przepływowa. Wszystkie te techniki oraz badania stresu oksydacyjnego pod wpływem nanocząstek platynowych, rozpuszczania platyny w mikrośrodowisku guza, itp. służyły do oceny potencjalnych mechanizmów działania nanokoniugatów i ich zróżnicowanego charakteru w zależności od właściwości fizyko-chemicznych badanych związków i mikrośrodowiska nowotworu. Badania i wyniki z tej części dysertacji zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach.

Uwagi krytyczne

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

Ad. 6.1. Otrzymywanie radionuklidów platyny

- 1) Dlaczego przy założeniu niskiego przekroju czynnego dla reakcji $^{193}\text{Ir}(n,\gamma)^{194}\text{Ir}(n,\gamma)^{195\text{m}}\text{Ir}(3.67\text{ h})\rightarrow^{195\text{m}}\text{Pt}$ zastosowano bardzo krótki czas aktywacji, tj. 1 h?
- 2) Odnosząc się do stwierdzenia o niskim przekroju czynnym dla tej reakcji jądrowej Doktorant bazuje na pracy Knappa Jr. i wsp. z roku 2005. W pracy *Karamian i wsp. Double-neutron capture reaction and natural abundance of ^{183}W , ^{195}Pt and ^{199}Hg isotopes* *Journal of Physics: Conference Series* 724 (2016) 012022) autorzy twierdzą, że obliczony przekrój czynny dla reakcji podwójnego wychwytu neutronów startując z tarczy ^{193}Ir jest bardzo wysoki i wynosi 12900 barn, a z ich wyliczeń wynika, że przy napromienianiu 1 mg tarczy ^{193}Ir strumieniem neutronów $2.5 \times 10^{15} \text{ n/cm}^2\text{s}$ możliwe jest otrzymanie 1,0 Ci $^{195\text{m}}\text{Pt}$. Proszę o skomentowanie rozbieżności w wynikach obliczeń zamieszczonych w dysertacji i w przytoczonej publikacji?
- 3) Przy przerobie napromienionej tarczy irydowej Doktorant zastosował metodę opublikowaną przez Hodgsona i wsp. z nieznacznymi modyfikacjami określonymi podczas optymalizacji procesu na nieradioaktywnym materiale. Co może być przyczyną nieudanego przerobu napromienionej tarczy mimo zoptymalizowania procesu rozpuszczania tarczy z użyciem nadtlenu wodoru?
- 4) Czy Doktorant rozważył zastosowanie metody stapiania alkalicznego (Alkali Fusion) do rozpuszczenia tarczy irydowej, którą po modyfikacjach Obata i wsp. zastosowali do wydajnego wydzielania radionuklidu ^{191}Pt (*Obata, H et al. Production of ^{191}Pt from an iridium target by vertical beam irradiation and simultaneous alkali fusion. Appl. Radiat. Isot. 2019, 149, 31–37*)? Metoda polega na przygotowaniu tarczy do napromieniania w postaci mieszaniny proszku naturalnego irydu z nadtlenkiem sodu w stosunku molowym 1:2. Napromienioną mieszaninę rozpuszczono w 6 M HCl (11 ml) przez ogrzewanie w temperaturze 130-140 °C przez 30 min. Mieszanina zawierająca iryd w postaci IrCl_6^{2-} była następnie poddana chromatografii jonowymiennej celem oddzielenia jonów platyny-191.

Ad. Badania nanocząstek funkcjonalizowanych przeciwciałem trastuzumab

- 5) Skoro zastosowano ^{125}I do badań cytotoxyczności niesfunkcjonalizowanych nanocząstek, to dlaczego zamiast ^{131}I nie użyto emitera elektronów Augera ^{125}I do badań cytotoxyczności biokoniugatów z trastuzumabem? Użycie emitera elektronów Augera być może przyczyniłoby się do sformułowania bardziej wiarygodnych wniosków lub być może potwierdziłoby koncepcję cytotoxyczności radio-biokoniugatów umiejscowionych w przestrzeni okołojądrowej czy też w kopercie jądrowej komórek SKOV-3.

Ad. 2 Elektrycy Augera w nowoczesnej celowanej radioterapii

6) Na stronie 26 Doktorant stwierdza „Ważną zaletą emiterów elektronów Augera jest również ich znikoma toksyczność podczas transportu we krwi lub w stosunku do szpiku kostnego, co minimalizuje częstość występowania działań niepożądanych [109]” i powołuje się na własną pracę przeglądową, a nie na pracę źródłową, w której wspomniane zalety zostały potwierdzone eksperymentalnie.

7) Tabela 2: Zacytowana została tabela z pracy własnej przeglądowej, a brak jest odniesienia do prac źródłowych.

8) Tabela 2: ^{125}I na skalę masową wytwarza się w reaktorze a nie w cyklotronie.

9) Brak w tej Tabeli 2 perspektywicznego emitera elektronów Augera jakim jest antymon-119.

Ad. 2.3 Radionuklidy Platyny

10) Tabela 3 – brakuje odnośników literaturowych do przytoczonych metod wytwarzania radionuklidów platyny.

Ad. 5.4.3. Weryfikacja wydajności przyłączenia trastuzumabu do nanocząstek

11) „Wstępny etap polegał na jodowaniu białka, a więc podstawieniu ^{131}I do pierścienia tyrozynowego na drodze substytucji nukleofilowej”. Przyłączenie $^{131}\text{I}^+$ do pierścienia tyrozyny następuje na drodze **substytucji elektrofilowej!**

Ad. 6.3..2 Internalizacja z wykorzystaniem receptora HER2 - Str. 64

12) W badanej próbie pośrednio wykazano także zwiększoną względem trastuzumabu retencję związku, co może stanowić istotną zaletę w procesie terapeutycznym. Doktorant nie przedstawił porównawczych wyników dla retencji trastuzumabu w komórkach SKOV-3, które mogłyby świadczyć o większym potencjale biokoniugatów.

Ad. 6.5.1. Radiokoniugaty ^{125}I -Au@Pt i ^{125}I -PtNPs.

13) Metodyka przygotowania preparatów ^{125}I -Au@Pt i ^{125}I -PtNPs do badań cytotoxycności nie jest opisana w sposób przejrzysty. Zakładając stężenie platyny w każdej próbce = 145 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i mając na uwadze ok. 85% chemisorpcji ^{125}I na powierzchni nanocząstek platynowych rodzi się pytanie o szczegółowy opis przygotowania próbek do badań cytotoxycności, charakteryzujących się ściśle określoną radioaktywnością w zakresie 6,25-100 MBq/mL. W pkt. 5.5 Doktorant nie opisał sposobu oczyszczania radioaktywnych nanocząstek od pozostałości wolnego jodu-125. Czy każdy z 5 roztworów nanocząstek znakowanych ^{125}I był przygotowywany niezależnie, czy może w pierwszej kolejności przygotowano nanocząstki o najwyższym stężeniu promieniotwórczym (100 MBq/mL po oczyszczeniu) i kolejne roztwory o niższych stężeniach rozcieńczano roztworem nanocząstek o stężeniu Pt 145 $\mu\text{g}/\text{mL}$?

Ad. 6.5.6. Hodowle komórkowe 3D

14) Dlaczego Doktorant nie zastosował kontroli w postaci ^{125}I w badaniach cytotoksyczności z wykorzystaniem modeli 3D guza? Jeśli potraktowanie komórek radionuklidem o stężeniu promieniotwórczym 100 MBq/mL nie spowodowałoby efektu cytotoksyczności lub byłby to efekt nieznaczny i porównywalny do obserwowanego dla PtNPs, to obserwowaną nieproporcjonalnie zwielokrotnioną cytotoksyczność po podaniu preparatu ^{125}I -PtNPs można by raczej nazwać synergizmem hiperaddycyjnym, wynikającym prawdopodobnie z uwrażliwienia komórek przez Pt na działanie elektronów Augera. Brak kontroli w postaci ^{125}I nie uprawnia do wyciągnięcia wniosku o działaniu addytywnym (radio i chemotoksycznym).

Konkluzja końcowa

Mimo wymienionych uwag krytycznych i dostrzeżonych uchybień metodologicznych, pozytywne aspekty pracy przewyższają wady dysertacji, a w związku z tym wydaję ogólną pozytywną ocenę rozprawy. Doktorant uzyskał szereg wartościowych wyników i posiadał wiedzę teoretyczną i praktyczną z zakresu badań *in vitro* mechanizmów działania nanocząstek platyny oraz zdobył umiejętność zarówno samodzielnego prowadzenia pracy naukowej jak i w zespołach badawczych. 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.: „**Radiofarmaceutyki oparte na emiterach elektronów Augera $^{193\text{m}},^{195\text{m}}\text{Pt}$ dla chemo- i radioterapii nowotworu piersi (HER2+) oraz raka wątrobowokomórkowego**” i dopuszczenie mgr Kamila Wawrowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Piotr Garnuszek