

Prof. dr hab. n. farm. Beata Morak-Młodawska
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec
bmłodawska@sum.edu.pl
tel. 32 364 16 04

Sosnowiec, 9.12.2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Kasteli-Hryniewieckiej
zatytułowanej:**

**„Development of PET imaging agents with potential applications
in immunotherapy”.**

**przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne
Politechniki Śląskiej w Gliwicach**

Recenzja została przygotowana w związku z pismem Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, Politechniki Śląskiej w Gliwicach, Pani Prof. dr hab. Doroty Neugebauer.

Informacje ogólne

Pani mgr inż. Anna Kastelik-Hryniewiecka jest absolwentką Wydziału Chemicznego, Politechniki Śląskiej w Gliwicach, która podjęła kształcenie w Szkole Doktorów macierzystej uczelni, realizując interdyscyplinarne badania naukowe doktoratu wdrożeniowego w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, i w Narodowym Instytucie Onkologii w Gliwicach.

Doktorantka posiada w swoim dorobku 3 publikacje naukowe o zasięgu międzynarodowym o łącznym wskaźniku oddziaływania $IF = 19,06$ co odpowiada 390 punktom ministerialnym. Wśród powyższych publikacji znajduje się praca opublikowana na łamach *International Journal of Nanomedicine* związana z tematyką rozprawy o wskaźniku oddziaływania $IF = 8$ i liczbie punktów 140. Przedstawione prace są wieloautorskie, co wskazuje na realizację zespołowych badań. Ponadto Doktorantka jest głównym wykonawcą w grantach PRELUDIUM 21, była wykonawcą w grantach programu IDUB (2022r), uczestniczy w realizacji badań grantowych Agencji Badań Medycznych grant no: 2019/ABM/01/00062 (lata 2022-2026),

odbyła staż naukowy w Instytucie Badań nad Rakiem w Londynie (Wielka Brytania), w zespole Przedklinicznego Obrazowania Molekularnego (the Institute of Cancer Research in London (UK), at Preclinical Molecular Imaging team (Division of Radiotherapy and Imaging). Doktorantka prezentowała także wyniki badań w czasie konferencji i kongresów naukowych uzyskując nominacje oraz wyróżnienia za najlepsze postery. Zaprezentowany powyżej dorobek Doktorantki w ocenie recenzenta jest wyróżniający i zarazem imponujący.

Ocena rozprawy

Rozprawa doktorska została przygotowana w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy IV”, który realizowano we współpracy Narodowego Instytutu Onkologii i Politechniki Śląskiej, a który był finansowany przez Ministerstwo Edukacji i Nauki. Część badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie została sfinansowana grantem NCN PRELUDIUM 21 pt.: „Opracowanie nowych bimodalnych sond PET/MRI ukierunkowanych na PD-L1”. Promotorem niniejszej rozprawy jest Pan Prof. dr hab. inż. Nikodem Kuźnik z Politechniki Śląskiej w Gliwicach, a rolę dwóch promotorów pomocniczych pełnili: Pan Dr inż. Paweł Jewuła, Central European Institute of Technology, Brno, Czechy i Pani Prof. dr hab. n. med. Gabriela Kramer-Marek, National Research Institute of Oncology, Gliwice.

Problematyka dysertacji skupia uwagę na zaprojektowaniu, otrzymaniu i ocenie przydatności bimodalnych sond PET/MRI, które mogłyby zostać wykorzystane w obrazowaniu a w szczególności w immunoterapii, stosowanej w trakcie terapii onkologicznej. Choroby nowotworowe stanowią dziś jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny i zdrowia publicznego, generując daleko idące konsekwencje zdrowotne, społeczne i ekonomiczne. W ostatnich dekadach obserwuje się systematyczny wzrost liczby zachorowań na różne typy nowotworów. Pomimo znaczącego postępu w diagnostyce i terapii, nowotwory wciąż cechują się wysoką śmiertelnością. W diagnostyce onkologicznej kluczową rolę odgrywają nowoczesne techniki obrazowania, które umożliwiają nie tylko wczesne wykrycie choroby, lecz również precyzyjną ocenę jej zaawansowania. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI) stanowi jedno z najważniejszych narzędzi diagnostycznych ze względu na wysoką rozdzielczość kontrastową i możliwość szczegółowej oceny struktur tkanek miękkich. Z kolei pozytonowa tomografia emisyjna (PET), często wykonywana w połączeniu z rezonansem magnetycznym (PET/MRI), znacząco poszerza możliwości diagnostyczne dzięki ocenie aktywności metabolicznej tkanek. PET pozwala na wykrywanie zmian nowotworowych

na bardzo wczesnym etapie choroby, a także identyfikację mikroprzerzutów. Metoda ta odgrywa istotną rolę w precyzyjnym stopniowaniu nowotworów, planowaniu leczenia i ocenie jego skuteczności, zwłaszcza w nowotworach o wysokiej aktywności metabolicznej.

Współczesne trendy badań onkologicznych to poszukiwanie nowych związków o lepszym profilu bezpieczeństwa i skuteczności, repozycjonowanie leków jak i rozwój zaawansowanych metod diagnostycznych. Integracja projektowania leków z zaawansowanymi technikami obrazowania, stanowi istotny kierunek współczesnej onkologii. W nowoczesnej medycynie coraz większą rolę odgrywa podejścia teranostyczne, łączące funkcje terapeutyczne i diagnostyczne w jednym systemie. Biorąc pod uwagę powyższe można zatem śmiało stwierdzić, iż badania Doktorantki poruszają aktualną i niezmiernie ważną tematykę naukową związaną z chorobami cywilizacyjnymi, którymi są choroby nowotworowe.

Rozprawa doktorska Pani Anny Kastelik-Hryniewieckiej została przygotowana w postaci 193 stronicowej anglojęzycznej tradycyjnej dysertacji. Rozprawa zawiera rozdziały: *Abstract i Streszczenie polskojęzyczne, Wstęp* prezentujący założenia i cele pracy, *Część literaturową, Omówienie wyników, Część eksperymentalną, Podsumowanie i Wnioski, Zestawienie rycin, Literaturę*. Praca zawiera również wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń jak i dorobek naukowy Doktorantki.

Przegląd piśmiennictwa zawarty w części literaturowej został przygotowany przejrzyście i interesująco. Doktorantka omawia w nim znaczenie obrazowania PET, wykorzystanie radiofarmaceutyków, obrazowanie techniką rezonansu magnetycznego i środki kontrastujące stosowane w tej technice jak i pokazuje stan wiedzy dotyczący sond bimodalnych PET/MRI. Przegląd ten jest bardzo bogaty, a do przygotowania tej części rozprawy Doktorantka wykorzystala 148 referencji z 199 wszystkich cytowanych prac. Warto zwrócić uwagę, że rozdział ten powstał w oparciu o literaturę większości ostatnich 10 lat (103 prace z lat 2015-2025 na 148 referencji tj.: prawie 70%), co pokazuje jednoznacznie, iż ten nurt badań jest nadzwyczaj aktualny.

Rozprawa doktorska Pani Anny Kastelik-Hryniewieckiej jest w pełni interdyscyplinarną dysertacją mającą charakter aplikacyjny. Składa się ona z części badań chemicznych i bardzo bogatej części badań biologicznych.

W ramach badań części chemicznej Doktorantka wybrała ambitny cel otrzymania nowego chelatora cyrkonowego ^{89}Zr , opartego na deferoksaminie (DFO), zmodyfikowanego grupą bisfosfonianową w celu zwiększenia stabilności kompleksu. Takie podejście naukowe

wynikało w doniesień literaturowych ukazujących słabą stabilność *in vitro* tego typu chelatorów. Autorka zaproponowała dwie drogi syntezy, które wnikliwie optymalizowała, poszukując najlepszych rozwiązań. Mimo usilnych starań niestety finalny układ nie został otrzymany. W tym miejscu należy podkreślić, iż mimo faktu negatywnych rezultatów Doktorantka wykonała ogrom pracy syntetycznej, a każdy wynik został potwierdzony nowoczesnymi analizami spektralnymi (^1H , ^{31}P , ^{13}C NMR i MS). Badania te zostały zaprojektowane wnikliwie i logicznie. Negatywne wyniki Autorka omawia dogłębnie a dodatkowo wskazuje również na fakt użyteczności tych analiz w przyszłościowych projektach. W tym miejscu jako Recenzent chciałbym postawić pytanie Pani Doktorantce jakie inne metody modyfikacji strukturalnych można byłoby podjąć w celu efektywnego otrzymania nowego chelatora cyrkonowego o większej stabilności kompleksu i czy istnieją najnowsze doniesienia literaturowe opisujące takie czy też inne układy?

Drugim celem postawionym przez Doktorantkę było wykonanie funkcjonalizacji dostępnych na rynku superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPION) pokrytych dekstranem w celu stworzenia sond bimodalnych, które zostały połączone z: Atezolizumabem (tj.: przeciwciało monoklonalne anty-PD-L1), DFO i ^{89}Zr . Na podstawie obszernych studiów literaturowych zostały otrzymane dwie sondy bimodalne do jednoczesnego obrazowania ekspresji PD-L1 metodą PET/MRI:

- a) układ ^{89}Zr -DFO-SPION-Atezolizumab,
- b) układ ^{89}Zr -SPION-Atezolizumab pozbawiony DFO.

Autorka wybrała jako podstawę powyższych sond SPION-y pokryte dekstranem, mając na uwadze korzystne właściwości kontrastowe w obrazowaniu MRI oraz powłokę węglowodanową, która umożliwiała modyfikację powierzchni. W pierwszym podejściu powierzchnia SPION-ów była funkcjonalizowana za pomocą DFO, a następnie znakowana radioaktywnie. W drugim podejściu, przed wbudowaniem ^{89}Zr w strukturę nanocząstki, Autorka zastosowała metodę *Heat-induced radiolabelling* (HIR) bez chelatora. W celu uzyskania sond Doktorantka wykonała szereg eksperymentów radiochemicznych. Napotykała przy tym na problemy analityczne, obserwowowała różnice w zachowaniu nanocząstek w zależności od zakupionej partii. Uzyskane sondy scharakteryzowała pod względem właściwości fizykochemicznych, strukturalnych z użyciem spektroskopii fotoelektronowej rentgenowskiej (XPS), oznaczyła rozmiar i ładunek powierzchniowy z zastosowaniem

dynamicznej dyfrakcji światła (DLS). Biorąc to pod uwagę, jako recenzent mogę śmiało stwierdzić, iż warsztat jej ogromnej pracy warty jest docenienia.

Następnie Doktorantka przystąpiła do realizacji badań części biologicznej na poziomie *in vitro* i *in vivo*. Badania *in vitro* wykonano w stosunku do ludzkich linii komórek nowotworowych jajnika i płuc z ekspresją PD-L1 (ES2, H292) oraz ich odpowiedników z nokautem (H292PD-L1KO i ES2PD-L1KO). Ekspresję ligandu PD-L1 na błonach komórkowych jak i jej brak Autorka potwierdziła metodą Western blot i cytometrią przepływową. W celu analizy specyficzności wiązania i internalizacji konstruktów metodami fluorescencyjnymi (tj. cytometria przepływowa, mikroskopia konfokalna), Doktorantka przygotowała strukturę SPION-Atezolizumab-AF647, w której fluorofor AlexaFluor647 (AF647) został przyłączony do grup lizynowych przeciwciała monoklonalnego. Układ Atezolizumab-AF647 zastosowano jako kontrolę pozytywną. Autorka udowodniła swoistość wiązania i internalizacji obu struktur, z silniejszym wiązaniem w stosunku do komórek nowotworu jajnika ES2 niż komórek nowotworu płuc H292, co potwierdziło wyniki uzyskane podczas charakteryzacji linii komórkowych, gdzie komórki ES2 wykazywały wyższą ekspresję ligandu PD-L1 niż komórki H292. Swoistość wiązania Doktorantka potwierdziła również za pomocą nowoczesnej mikroskopii konfokalnej. Ponad to zbadała również swoistość wiązania *in vitro* koniugatów ^{89}Zr -DFO-SPION-Atezolizumab i ^{89}Zr -SPION-Atezolizumab wskazując, iż niezależnie od zastosowanych stężeń i warunków eksperymentalnych, wyniki potwierdzały pewien poziom nieswoistego wiązania z błonami komórkowymi. Dodatkowo cytotoksyczne działanie sond bimodalnych Doktorantka oceniła przy użyciu formułacji zawierających nieradioaktywny cyrkon, co też pozwoliło jej udowodnić, że obserwowane efekty można przypisać strukturze nanocząsteczek i chemii powierzchni, a nie wpływowi promieniowania. W kolejnych badaniach Pani Hryniewiecka analizowała wpływ modyfikacji struktur superparamagnetycznych na ich czas relaksacji, wyciągając obiecujące przyszłościowe wnioski. Badania *in vivo* wykonane na myszach z przeszczepami nowotworów PD-L1-dodatnich potwierdziły obiecujące potencjalne zastosowanie skonstruowanych sond do obrazowania zmian nowotworowych. Doktorantka wskazała w swych wynikach, iż dane obrazowe z badań MRI i PET wykazują bardzo szybki wychwyty przez wątrobę i brak radiokoniugatu w badanej krwi lub guzie. Uzyskane nowatorskie wyniki poszerzone analizami biodystrybucji *ex vivo* Pani Doktorantka analizowała wnikliwie w kontekście doniesień literaturowych wskazując na przyszłościowe wykorzystanie i możliwość optymalizacji.

W tym miejscu chciałabym również zapytać czy Doktorantka rozważała możliwość wykorzystania w prowadzonych badaniach dotyczących sond bimodalnych innych leków stosowanych w immunoterapii?

Oceniając rozprawę doktorską przygotowaną przez Panią mgr inż. Annę Kastelik-Hryniewiecką pragnę wskazać, że mimo olbrzymiej ilości wyników została ona przygotowana w sposób przejrzysty, choć zawiera niewielkie niedociągnięcia jak np.: brak spisu rycin, tabel czy też brak jasno wskazanych rodzajów stosowanych linii komórek nowotworowych w abstrakcie i w wykazie skrótów. Natomiast niezwykle ważnymi walorami wartymi podkreślenia są: aktualność zaprezentowanej tematyki odzwierciedlająca światowe trendy naukowe rozwoju radiofarmaceutyków, opracowanie nowej technologii otrzymywania sond, kompleksowe i multidyscyplinarne podejście badawcze jak i wykorzystanie nowoczesnych narzędzi analitycznych w przedstawionych badaniach.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Kastelik-Hryniewieckiej prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną jak i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w interdyscyplinarnym zespole badawczym, i tym samym w pełni spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim, zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742) w związku z czym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, Politechniki Śląskiej w Gliwicach z wnioskiem o nadanie Pani mgr inż. Annie Kastelik-Hryniewieckiej stopnia doktora w dyscyplinie nauk chemicznych.

Mając na uwadze oryginalność i aktualność przedstawionych badań, ich wysoce znaczący, aplikacyjny, nowatorski charakter, bogaty dorobek naukowy, staż międzynarodowy w Wielkiej Brytanii jak i współfinansowanie badań grantem NCN zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Sosnowiec, 9 grudzień 2025r.

prof. dr hab. n. farm. Beata Morak-Młodawska

PROFESOR BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Podpisano odręcznie przez autora

prof. dr hab. n. farm. Beata Morak-Młodawska