



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Toksykologii

prof. dr hab. n. farm. Marek Murias

Kierownik Katedry

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel: 616418481
e-mail: marek.murias@ump.edu.pl

Poznań, dn. 24.11.2025r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kastelik-Hryniewieckiej pt.: „*Development of PET imaging agents with potential applications in immunotherapy*” wykonanej w Katedrze Chemii Politechniki Śląskiej w Gliwicach pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Nikodema Kuźnika oraz promotorów pomocniczych: dr inż. Pawła Jewuły z Central European Institute of Technology, Brno, Czechy, oraz prof. dr hab. n. med. Gabrieli Kramer-Marek z Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach.

Nowotwory stanowią jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny i zdrowia publicznego. Pomimo postępu w leczeniu i diagnostyce, choroby nowotworowe pozostają główną przyczyną zgonów na świecie. Wciąż istnieje zatem pilna potrzeba opracowywania nowych, bardziej precyzyjnych metod diagnostycznych, które umożliwią wczesne wykrywanie zmian nowotworowych, ocenę skuteczności terapii oraz monitorowanie odpowiedzi immunologicznej. W tym kontekście szczególne znaczenie zyskują nowoczesne techniki obrazowania molekularnego, takie jak pozytonowa tomografia emisyjna (PET). Przedmiotem recenzowanej rozprawy doktorskiej pt. „*Development of PET imaging agents with potential applications in immunotherapy*” jest opracowanie i charakterystyka nowych radioznaczników PET, które mogą znaleźć zastosowanie w monitorowaniu procesów immunoterapii przeciwnowotworowej. Rozprawa dotyczy więc obszaru o wyraźnym znaczeniu klinicznym ale również i technologicznym: rozwoju radioznaczników oraz sond obrazowych przeznaczonych do diagnostyki onkologicznej ze szczególnym uwzględnieniem terapii ukierunkowanych na układ odpornościowy. Kierunek ten jest zgodny z globalnym zwrotem w kierunku medycyny precyzyjnej i personalizowanej, w której decyzje terapeutyczne opiera się na detekcji biomarkerów z jednoczesnym obrazowaniem funkcjonalnym całego ciała. W tym kontekście celem staje się nie tylko detekcja zmiany, lecz także jej biologiczna charakterystyka, monitoring odpowiedzi i wczesne ostrzeżenie zarówno klinicysty jak i pacjenta przed brakiem korzyści terapeutycznej a więc również możliwość wcześniejszego poszukiwania innych strategii terapeutycznych. Wśród technik o największym potencjale klinicznym znajduje się pozytonowa tomografia emisyjna (PET), w tym immunoPET, oraz układy hybrydowe pozwalające łączyć informacje funkcjonalne PET z anatomicznym i tkankowym obrazowaniem za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI). Rozprawa wpisuje się w ten nurt, formułując dwa

komplementarne cele: wzmocnienie stabilności kompleksów cyrkonu-89 w kontekście immunoPET oraz budowę i walidację sond bimodalnych PET/MRI opartych na superparamagnetycznych nanocząstkach tlenku żelaza sfunkcjonalizowanych przeciwciałem anty-PD-L1. Taki dobór celów jest uzasadniony zarówno z punktu widzenia badań podstawowych, jak i zastosowań klinicznych, ponieważ z jednej strony stanowi istotny wkład w naszą wiedzę o zasadach rządzących obrazowaniem PET i MRI oraz stosowanych w nich sondach, z drugiej strony odnosi się do problemu nieswoistej akumulacji w układzie kostnym obserwowanej w przypadku części związków ^{89}Zr oraz zaspokaja zapotrzebowanie na pozbawione działań ubocznych narzędzia integrujące sygnały molekularne z wysokiej jakości kontrastem tkankowym.

Dysertacja ma strukturę nieco odmienną od najbardziej klasycznych układów, jednak pozostaje spójna i czytelna. Po szerokim wprowadzeniu teoretycznym Autorka przedstawia cele, następnie opisuje blok badawczy zawierający zarówno opisy metod jak i wyniki, kierując czytelnika od ogólnych założeń teoretycznych do wniosków praktycznych. Dzięki umiejętnie prowadzonej narracji Autorka konsekwentnie prowadzi czytelnika przez meandry niezwykle szerokiego spektrum zagadnień, z którymi postanowiła się zmierzyć: od syntezy wyjątkowo skomplikowanych znaczników chelatowanych promieniotwórczymi izotopami cyrkonu-89, poprzez złożone zasady rządzące obrazowaniem MRI i PET, po doświadczenia z zakresu hodowli komórkowych, w tym komórek modyfikowanych genetycznie, oraz doświadczenia z użyciem myszy immunoniekompetentnych. Autorka, prowadząc czytelnika przez te skrajnie od siebie oddalone i skomplikowane zagadnienia, wyjaśnia przesłanki kolejnych decyzji eksperymentalnych i jasno oddziela obserwacje potwierdzone danymi od hipotez wymagających weryfikacji. Należy tutaj zaznaczyć, że na poziomie narracji naukowej praca jest zrozumiała, konsekwentnie zachowuje dyscyplinę terminologiczną oraz, w większości przypadków, precyzję opisu zarówno w części teoretycznej, jak i w opisie metodyki oraz wyników przeprowadzonych eksperymentów.

W części eksperymentalnej Autorka zasadniczo podzieliła swoją pracę na dwie części, podporządkowane celom, jakie postawiła sobie w trakcie jej realizacji. Cel I dotyczy zwiększenia trwałości kompleksów ^{89}Zr z chelatorem wykorzystywanym w znakowaniu wektorów biologicznych (w tym przeciwciał) dla potrzeb immunoPET. Problem praktyczny związany jest z częściowym uwalnianiem ^{89}Zr z kompleksu, które objawia się rejestracją sygnału pochodzącego z kości, obniża swoistość obrazu i komplikuje interpretację, a co najważniejsze związane jest z kumulacją radioaktywnego znacznika w tkance kostnej, co stanowi oczywiste zagrożenie dla pacjenta. Autorka proponuje modyfikację strukturalną układu chelatującego tak, aby lepiej dopasować go do preferencji koordynacyjnych kationu i ograniczyć zjawiska transchelatacji.

Cel II zakładał zaprojektowanie i walidację sondy dwumodalnej widocznej zarówno w PET jak i w MRI. Rdzeń stanowiły superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (kontrast T_2 w MRI), które były pokryte dekstranem zapewniającym stabilność koloidalną i miejsca do

kontrolowanej biokonjugacji. Specyficzność biologiczną nadawało przeciwciało anty-PD-L1 (Atezolizumab). Wątek związany z PET był realizowany poprzez włączenie ^{89}Zr , z dwoma wariantami radiolabelingu: chelatorowym (większa kontrola chemiczna i standaryzacja) oraz bezchelatorowym (uproszczona synteza i krótszy czas przygotowania). Dobór ^{89}Zr wynikał z dopasowania okresu półtrwania do farmakokinetyki przeciwciała. A w odniesieniu do praktyki klinicznej założono, że PET będzie dostarczał ilościowej informacji o ekspresji PD-L1 w całym organizmie, natomiast MRI "osadzał" sygnał w precyzyjnym kontekście anatomicznym. Celem była więc jednoczesna ocena "gdzie" znajdowała się zmiana i "jaka" była jej charakterystyka molekularna, co wspierało kwalifikację do immunoterapii oraz monitorowanie odpowiedzi. Założenia techniczne obejmowały zachowanie aktywności przeciwciała po sprzęgnięciu, stabilność w warunkach fizjologicznych, powtarzalną gęstość funkcjonalizacji oraz parametry relaksacyjne odpowiednie dla MRI. Walidacja przewidywała testy *in vitro* (swoistość wiązania, cytotoksyczność) i wstępne badania *in vivo* (obrazowanie i biodystrybucja), z uwzględnieniem typowych wyzwań z jakimi mamy do czynienia w pracy z tego typu nanocząstkami takim jak np. szybki wychwyt przez wątrobę i śledzionę. Docelowo miała powstać platforma PET/MRI ukierunkowana na PD-L1, zdolna do nieinwazyjnej, dotyczącej całego ciała oceny obecności biomarkera na potrzeby decyzji terapeutycznych.

Oryginalność pracy można rozpatrywać w trzech wymiarach. Po pierwsze, w obszarze chelatorów ^{89}Zr Autorka proponowała modyfikację ukierunkowaną na domknięcie preferowanej koordynacji kationu Zr(IV) do ośmiu wiązań koordynacyjnych (oktakoordynacji) z donorami atomów tlenu, co w zamyśle miało ograniczyć zjawiska transchelatacji i wtórne uwalnianie izotopu w warunkach fizjologicznych, a tym samym zredukować nieswoisty wychwyt kostny. Po drugie, przedstawiała dwa kompletne i powtarzalne zestawy procedur przygotowania sond SPION (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) ukierunkowanych na PD-L1, wariant chelatorowy (z DFO [desferrioksamina] i radioznakowaniem ^{89}Zr) oraz wariant bezchelatorowy (chelator-free), wraz ze zdefiniowanymi punktami kontroli jakości (między innymi: czystość radiochemiczna [RCP], dynamiczne rozpraszanie światła [DLS], potencjał zeta [ζ], relaksacyjność [r_1/r_2], aktywność biologiczna przeciwciała), co umożliwia ich porównywalną ocenę i dalszą optymalizację. Po trzecie, dysertacja wносиła istotny komponent wdrożeniowy: w jednostce zaprojektowano, uruchomiono i przetestowano procedury syntezy, funkcjonalizacji oraz kontroli jakości nanomateriałów i materiałów znakowanych izotopami radioaktywnymi, które można adaptować do innych wektorów biologicznych i alternatywnych izotopów. Ten element realnie zwiększa zdolność zespołu do pracy translacyjnej od powtarzalnego wytwarzania partii badawczych, przez ich rzetelną charakterystykę, po przygotowanie do badań przedklinicznych.

Autorka przedstawiła plan modyfikacji znanego chelatora deferoksaminy (DFO), zakładający wprowadzenie fragmentu bisfosfonianowego w celu lepszego dopasowania geometrii koordynacyjnej do preferencji kationu Zr(IV) i ograniczenia zjawisk transchelatacji. Etap syntezy natrafił jednak na istotne bariery technologiczne, między innymi ograniczoną

rozpuszczalność kluczowych prekursorów, trudności w ich skutecznym oczyszczaniu oraz wrażliwość wybranych fragmentów cząsteczki na warunki reakcyjne. Czynniki te łącznie zmniejszyły wydajność i utrudniły otrzymanie docelowej pochodnej w ilości pozwalającej na jej pełną charakterystykę. Pomimo tego, z naukowego punktu widzenia należy podkreślić, że ta część pracy została rzetelnie udokumentowana: wskazano, które parametry okazały się krytyczne i z jakich przyczyn wpływały na przebieg reakcji. Dzięki temu powstał zestaw praktycznych wskazówek dla kolejnych badań jasno zidentyfikowano newralgiczne punkty procesu i ograniczono ryzyko powielania kosztownych prób. Pomimo opisanych trudności przeprowadzono również porównawcze badania stabilności przygotowanej pochodnej w środowiskach o rosnącej „sile wyzwania” (układy buforowe, matryce białkowe, testy z chelatorami konkurencyjnymi) oraz odniesiono uzyskane wyniki do komercyjnej pochodnej DFO jako chelatora referencyjnego. Zarysował się złożony obraz: w warunkach sprzyjających zachowaniu integralności kompleksu utrzymywała się stabilność na poziomie praktycznie użytecznym; natomiast w układach celowo zaostrzonych (z silnymi czynnikami konkurencyjnymi) różnice względem wzorca ulegały redukcji. Wniosek wynikający z tych obserwacji jest dobrze wyważony: proponowana modyfikacja wydaje się obiecująca, lecz wymaga zakończenia i dopracowania etapu konstrukcyjnego (uzyskania w pełni docelowej pochodnej i jej pełnej charakterystyki) oraz dalszej walidacji w uporządkowanym panelu porównawczym, obejmującym stabilność w surowicy i reakcję na typowe czynniki zakłócające. W tym sensie część poświęcona Celowi I stanowi wartościowy „proof-of-concept”, który tworzy podstawę do kolejnych, precyzyjnie ukierunkowanych iteracji syntetycznych i porównawczych badań stabilności i możliwości zastosowania klinicznego.

W drugim nurcie badań Autorka zrealizowała pełny proces wytwarzania i walidacji sondy SPION: od przygotowania nanocząstek z powłoką sprzyjającą funkcjonalizacji, przez dołączenie chelatora w jednym z wariantów konstrukcyjnych, opracowanie dwuetapowej procedury sprzęgania przeciwciała, następnie znakowanie izotopem, aż po weryfikację właściwości fizykochemicznych i parametrów biologicznych. W tej części również zwraca uwagę dbałość o parametry przesądzające o odtwarzalności w jakich prowadzone były eksperymenty: precyzyjnie określone zakresy pH podczas aktywacji i koniugacji, dobrany sposób mieszania, kontrolowany czas reakcji oraz zachowanie materiału w trakcie zagęszczania i wymiany buforu z minimalizacją strat w kolejnych krokach przygotowawczych. Taki poziom dbałości o detale ma wymierne znaczenie praktyczne ułatwia przeniesienie technologii i wierne odtworzenie protokołów w innych laboratoriach. Charakterystyka otrzymanych układów obejmowała pomiary wielkości hydrodynamicznej i potencjału powierzchniowego, ocenę stopnia funkcjonalizacji powierzchni oraz badania relaksacyjne istotne z perspektywy MRI. Wykazano, że przygotowane preparaty spełniały kryteria środków obniżających sygnał T_2 , a ich właściwości można było modulować przez modyfikację powierzchni. Opracowano równolegle wersję sondy widoczną w PET: jedną z użyciem chelatora, a drugą bez niego, co pozwoliło porównywalnie ocenić jej działanie w badaniach biologicznych. W testach *in vitro* potwierdzono swoistość wiązania do docelowego białka przy użyciu adekwatnych kontroli,

oceniono wchłanianie przez komórki oraz cytotoksyczność. W badaniach *in vivo* przeprowadzono wielokrotne skanowanie tych samych zwierząt w kolejnych punktach czasowych, co pozwoliło śledzić dynamikę dystrybucji sondy. Uzupełniając wykonano końcową biodystrybucję *ex vivo*, polegającą na pobraniu narządów po zakończeniu obrazowania i ilościowym oznaczeniu zgromadzonego znacznika np. jako % podanej dawki na gram tkanki lub w przeliczeniu na zawartość żelaza. Z punktu widzenia zastosowania klinicznego uzyskany profil dystrybucji należy uznać za przewidywalny, lecz problematyczny: po podaniu dożylnym szybkie pochłanianie nanocząstek przez wątrobę i śledzionę istotnie skraca ich obecność w krążeniu i ogranicza szansę dotarcia do guza, a narastający sygnał w tkance kostnej wskazuje na częściowe uwalnianie ^{89}Zr , co obniża jakość obrazowania PET i komplikuje interpretację obrazów. Pomimo, że te zjawiska są typowe dla tej klasy nośników, wprost wyznaczają obszary wymagające udoskonalenia, jeśli celem ma być skuteczne, swoiste obrazowanie PD-L1 w masie guza. Pomimo tych problemów i w tym kontekście należy podkreślić, że interpretacja przedstawiona przez Autorkę jest wyważona i trafna. Prawdopodobnie zidentyfikowano kluczowe czynniki ograniczające: zbyt krótki czas krążenia wobec sprawnego przechwytywania przez układ fagocytny oraz niewystarczającą trwałość wiązania izotopu w dłuższym horyzoncie czasowym. Zaproponowane kierunki rozwiązania napotkanych problemów takie jak modyfikacja warstwy powierzchniowej w celu wydłużenia krążenia są zgodne z aktualnymi standardami obowiązującymi w obrazowaniu molekularnym.

Lektura ocenianej tutaj rozprawy pokazuje więc dojrzały, uporządkowany warsztat badawczy. Procedury są opisane krok po kroku i na tyle dokładnie, by inny zespół mógł je powtórzyć, a przy tym należy przyznać że Autorce udało się uniknąć przeładowania pracy zbędnymi technikami jednocześnie np. w radiochemii i biokoniugacji konsekwentnie pilnowano kluczowych parametrów: pH, temperatury, czasu reakcji, mieszania, oczyszczania i zagęszczania. Po każdym etapie syntezy i sprzęgania wyznaczono czytelne punkty kontrolne, które potwierdzają jakość produktu i pozwalają iść dalej. Nazewnictwo i jednostki są spójne, a składy buforów i stężenia ograniczają niejednoznaczność. Dane z obrazowania połączono z końcowymi wynikami biodystrybucji, co ułatwia interpretację. Kontrole są systematyczne: w hodowlach rozdzielono sygnał swoisty od tła i sprawdzono bezpieczeństwo, a charakterystyka materiału (wielkość, ładunek, stopień funkcjonalizacji) tworzy „profil tożsamości” względem efektów biologicznych. W kwestii jakości i bezpieczeństwa utrzymano równowagę pomiędzy dobrą praktyką a wymaganiami przedklinicznymi: zadbano o aseptykę tam, gdzie to konieczne, oraz o ścisłe oczyszczanie i przechowywanie. Prezentacja wyników tym zamieszczone obrazy, widma i wykresy wraz z komentarzami Autorki prowadzą czytelnika w sposób przejrzysty i czytelny do trafnych i dobrze sformułowanych wniosków.

W Celu I uzyskano dane wspierające hipotezę, że proponowana modyfikacja może poprawiać stabilność kompleksu w warunkach fizjologicznych, choć do przesądzenia o jednoznacznej przewadze potrzebne są porównania w pełnym, jednolicie zaprojektowanym panelu testów, na w pełni zdefiniowanym chemicznie wariacie chelatora. Wniosek należy uznać za trafny

metodologicznie poprawny: praca nie przecenia uzyskanych efektów, a jednocześnie wyznacza klarowną ścieżkę dalszych badań.

W Celu II opracowano powtarzalny sposób przygotowania sondy dwumodalnej i potwierdzono jej właściwe zachowanie w badaniach fizykochemicznych, *in vitro* i *in vivo*. Ograniczony wychwyt w guzie po podaniu dożylnym nie jest zaskoczeniem i wynika z dobrze opisanych mechanizmów farmakokinetycznych nanoukładów; stanowi raczej punkt wyjścia do inżynierii powierzchni oraz do rozważenia alternatywnych dróg podania w wybranych wskazaniach. Jednocześnie wyniki MRI sugerują potencjalną użyteczność układu w obrazowaniu wątroby to kierunek aplikacyjny, który warto odnotować jako równoległy.

Największym ograniczeniem na drodze do bezpośrednich zastosowań klinicznych sondy dwumodalnej pozostaje szybki wychwyt przez wątrobę i śledzionę oraz częściowe uwalnianie ^{89}Zr w dłuższych oknach czasowych. Po stronie chelatora kluczowe jest domknięcie etapu konstrukcyjnego i przeprowadzenie porównań na w pełni odmaskowanej, funkcjonalnej pochodnej. Autorka nie unika tych konstatacji; przeciwnie porządkuje je i przekuwa w plan pracy. To podejście wzmacnia wiarygodność dysertacji: czytelnik otrzymuje nie tylko zestaw pozytywnych obserwacji, ale również pełny obraz ograniczeń i sposobów na ich przełamanie.

Istotnym atutem pracy jest jej wymiar organizacyjno-wdrożeniowy: w ZRO opracowano i wdrożono produkcję ^{89}Zr oraz uruchomiono w lutym 2025 r. Laboratorium Obrazowania Przedklinicznego z PET/CT i MRI, co umożliwia dalszy rozwój badań nad bimodalnymi sondami PET/MRI. W jednostce wprowadzono metody syntezy i analizy dotąd tam nieużywane, dostosowane do nanocząstek (SPION), w tym funkcjonalizację, dwa sposoby znakowania ^{89}Zr (DFO i HIR) oraz zestaw testów kontrolnych (RCP/RCY, stabilność, DLS/ζ, XPS, relaksometrię). Wypracowane procedury stanowią podstawę do adaptacji podobnych związków z innymi izotopami lub wektorami biologicznymi.

Jako uzupełnienie bardzo pozytywnej oceny pozwolę sobie również zwrócić uwagę na kilka kwestii, które mogłyby poszerzyć zakres i wartość poznawczą pracy. Po pierwsze, w części dotyczącej modyfikacji chelatora ^{89}Zr uzyskano obiecujące wyniki stabilności *in vitro*; interesujące byłoby jednak ich uzupełnienie o porównawcze testy *in vivo*, np. poprzez analizę sygnału kostnego po określonym czasie od podania nowego kompleksu i DFO jako punktu odniesienia. Po drugie, w kontekście sond SPION zauważalny jest szybki wychwyt przez układ siateczkowo-śródbłonkowy, co ogranicza czas krążenia i akumulację w guzie, warto byłoby rozważyć alternatywne drogi podania, w tym do węzła chłonnego (intralymphatic) lub dotętniczą, które mogłyby poprawić dystrybucję i swoistość obrazowania. Po trzecie, choć komponent MRI został wykorzystany przekonująco, cennym rozszerzeniem byłaby ilościowa analiza (np. mapowanie T_2^* , korelacja SUV z relaksacyjnością), co pozwoliłoby pełniej wykorzystać potencjał dwumodalnego obrazowania PET/MRI. Wszystkie powyższe uwagi mają charakter konstruktywnych sugestii do dalszych, świetnie rokujących badań.

Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów redakcyjnych i nomenklaturowych: wymagane jest ujednolicenie zapisu izotopów, jednostek, skrótów i terminologii (PET/MRI, zapis kursywą łacińskich zwrotów *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, wybór jednej wersji języka angielskiego). Występują pojedyncze literówki i błędne formy angielskich nazw (np. "silicon" zamiast "silicone", "Appled" zamiast "Applied", "paraformaldehyde" zamiast "paraformaldehyde"). Podpisy rycin są miejscami zbyt skrótowe, a opisy metod nie zawsze zawierają pełne metadane pomiarowe (NMR, MS, DLS, RadioTLC).

Podsumowanie wniosek końcowy

Praca łączy dobrze postawione pytania z rzetelnym warsztatem i dojrzałą interpretacją wyników. Na uznanie zasługują: (i) trafne sformułowanie problemu kliniczno-technologicznego, (ii) dwutorowa strategia badawcza spinająca chemiczny i nanomedyczny wymiar projektu, (iii) powtarzalne procedury przygotowania sond i kontrola jakości, (iv) komplet badań od *in vitro* po *in vivo*, (v) otwarte i rzeczowe przedstawienie ograniczeń oraz (vi) realny wkład wdrożeniowy w infrastrukturę i know-how jednostki.

Rozprawa mgr inż. Anny Kastelik-Hryniewieckiej spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w zakresie oryginalności, dojrzałości metodologicznej i znaczenia dla dyscypliny, dlatego z pełnym przekonaniem wnoszę wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Kastelik-Hryniewieckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marek
Murias

Elektronicznie podpisany
przez Marek Murias
Data: 2025.11.24 22:18:04
+01'00'

