

Warszawa, dn. 13.12.2025 r.

Dr hab. Marek Pruszyński, prof. NCBJ
Narodowe Centrum Badań Jądrowych
Centrum Doskonałości NOMATEN
Ul. Andrzeja Sołtana 7
05-400 Otwock
marek.pruszyński@ncbj.gov.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kastelik-Hryniewieckiej
pt.: "Development of PET imaging agents with potential applications in immunotherapy"

Praca doktorska mgr Anny Kastelik-Hryniewieckiej została przygotowana pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. inż. Nikodema Kuźnika z Politechniki Śląskiej w Gliwicach oraz z udziałem dwóch promotorów pomocniczych: dr. inż. Pawła Jewuły z Central European Institute of Technology w Brnie (Czechy) oraz prof. dr hab. n. med. Gabrieli Kramer-Marek z Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, oddział w Gliwicach.

Recenzję sporządzono na podstawie art. 189 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r., poz. 737, t.j.) oraz § 12 ust. 1 rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 lutego 2019 r. w sprawie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora, doktora habilitowanego i profesora (Dz. U. z 2019 r., poz. 392 ze zm.).

Przedmiot rozprawy wpisuje się w jedno z kluczowych wyzwań współczesnej onkologii, jakim jest rozwój nowoczesnych narzędzi diagnostycznych pozwalających na wcześniejsze, szybsze oraz bardziej dokładne rozpoznawanie zmian nowotworowych. W praktyce klinicznej w tym celu szeroko stosowane są metody obrazowania, takie jak pozytonowa tomografia emisyjna (PET) oraz rezonans magnetyczny (MRI). Ich efektywne wykorzystanie wymaga jednak zastosowania specjalnie zaprojektowanych związków chemicznych, które umożliwiają selektywne uwidacznianie ognisk chorobowych, bądź ich akumulację w tkance guza, m.in. w postaci radiofarmaceutyków molekularnych lub środków kontrastowych. Autorka rozprawy podjęła się ambitnego, interdyscyplinarnego przedsięwzięcia polegającego na zaprojektowaniu nowej sondy dwumodalnej, przeznaczonej do równoczesnego obrazowania zmian nowotworowych z wykorzystaniem technik PET i MRI.

Oceniana rozprawa doktorska obejmuje osiem rozdziałów i zawiera część teoretyczną, część eksperymentalną oraz końcowe podsumowanie wraz z wnioskami. Całość liczy 203 strony i została wzbogacona o 35 tabel, 40 schematów oraz 75 rysunków, a także o 199 starannie dobranych i reprezentatywnych pozycji literaturowych. Rozprawa została napisana w języku angielskim i posiada strukturę różniącą się od standardowego modelu prac doktorskich w Polsce, co najprawdopodobniej jest efektem nawiązania do układów powszechnie stosowanych w zagranicznych ośrodkach badawczych. Pomimo tego zachowuje ona przejrzystość i spójność. Autorka wykazała się bardzo dobrą orientacją w literaturze

przedmiotu, poprawnym użyciem terminologii fachowej oraz konsekwentnym, naukowym stylem narracji.

Pierwszy rozdział rozprawy wprowadza w problematykę badawczą oraz jasno formułuje główny cel pracy, którym, jak wskazuje Doktorantka „było zaprojektowanie i ocena dwumodalnych sond PET/MRI w celu poprawy precyzji obrazowania i wsparcia procesu podejmowania decyzji terapeutycznych, szczególnie w kontekście immunoterapii”. Autorka przekonująco uzasadnia wybór tematu, odwołując się do rozwoju nowoczesnych technik diagnostycznych (PET, SPECT, CT, MRI) oraz analizując zalety ich konfiguracji hybrydowych. Wskazuje przy tym, że układ PET/MRI umożliwia integrację informacji funkcjonalnych z danymi anatomicznymi i tkankowymi, co pozwala na dokładną lokalizację nawet niewielkich zmian chorobowych. Zwraca również uwagę na konieczność stosowania sond molekularnych oddziałujących bezpośrednio z receptorami komórek nowotworowych, co uzasadnia wybór w pracy doktorskiej atezolizumabu, jako przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko białku PD-L1.

W celu realizacji głównego założenia rozprawy Doktorantka sformułowała dwa cele szczegółowe. Pierwszy z nich dotyczył zaprojektowania nowego chelatora, bazującego na deferoksamynie, związku powszechnie stosowanym w medycynie do kompleksowania radioizotopu ^{89}Zr . Element nowatorski proponowanego rozwiązania polegał na wprowadzeniu do struktury deferoksaminy grupy bisfosfonianowej, co miało umożliwić oktaedryczne wiązanie kationu cyrkonu, w odróżnieniu od sześciordentnego kompleksowania charakterystycznego dla klasycznej DFO. Takie podejście, zgodnie z założeniami Autorki, powinno prowadzić do zwiększenia stabilności powstającego kompleksu, a jednocześnie ograniczyć obserwowaną w badaniach klinicznych nieswoistą akumulację uwolnionego radioizotopu w tkance kostnej, co w konsekwencji mogłoby poprawić dokładność diagnostyczną oraz interpretację wyników obrazowania. Drugi cel pracy koncentrował się na otrzymaniu sondy dwumodalnej opartej na komercyjnie dostępnych superparamagnetycznych nanocząstkach tlenku żelaza (SPION), funkcjonalizowanych radioizotopem ^{89}Zr oraz przeciwciałem atezolizumab, ukierunkowanym na białko PD-L1. Zakładam, że nowo projektowany chelator, opracowywany w ramach pierwszego celu, miał również znaleźć zastosowanie w realizacji celu drugiego, jednak jego wykorzystanie było ograniczone ze względu na trudności napotkane na etapie syntezy. Otrzymana sonda, dzięki właściwościom superparamagnetycznym nanocząstek, może być stosowana w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI), natomiast obecność radioaktywnego ^{89}Zr umożliwia jej zastosowanie w diagnostyce PET. Takie podejście dobrze wpisuje się w aktualne kierunki rozwoju nowoczesnych, nieinwazyjnych i szybkich metod diagnostyki nowotworów, opartych na molekularnych radiofarmaceutykach w ramach spersonalizowanej medycyny nuklearnej, eliminując konieczność wykonywania biopsji oraz czasochłonnych analiz immunohistochemicznych.

Część przeglądowa rozprawy została opracowana zwięźle i obejmuje 34 strony, opierając się na 134 pozycjach literaturowych. Podzielono ją na kilka bloków tematycznych poświęconych zastosowaniu technik immunoPET oraz MRI w diagnostyce nowotworów. Autorka wykazała się dobrą znajomością literatury przedmiotu, prezentując aktualny stan wiedzy oraz metody stosowane w wykrywaniu zmian nowotworowych. Rzetelnie scharakteryzowała radiofarmaceutyki i środki kontrastowe, w tym rozwiązania oparte na magnetycznych

nanocząstkach. Trafnie uzasadniła wybór atezolizumabu jako wektora sondy dwumodalnej oraz radioizotopu ^{89}Zr , a także wskazała na potrzebę opracowania bardziej stabilnych ligandów do jego kompleksowania. Całość prowadzi do logicznego wniosku, że efektywne wykorzystanie techniki PET/MRI wymaga zastosowania dwumodalnych sond molekularnych w celu zwiększenia precyzji obrazowania.

Drobne zastrzeżenia do tej części pracy:

1. Strona 13 – Autorka napisała, że „Wysoka immunogenność nadal stanowi problem w przypadku niektórych przeciwciał monoklonalnych (mAb) [59–61]. Postuluje się, że główną przyczyną problemów immunogenności jest domena zmienna, dlatego opracowano mniejsze fragmenty przeciwciał pozbawione tej części.” Ale to domena zmienna jest odpowiedzialna za łączenie się z receptorem/antygenem, więc jej usunięcie spowoduje pozbawienie specyficzności łączenia się z antygenem powstałego fragmentu.
2. Ta sama strona – „Nanociała natomiast charakteryzują się o połowę mniejszą masą cząsteczkową (12-15 kDa) w porównaniu ze scFv, ponieważ są one pochodnymi pojedynczych domen V_H lub V_L .” Termin nanociała odnosi się do zmiennej domeny łańcucha ciężkiego, stąd często oznaczane są jako V_{HH} (z ang. Variable Heavy domain of Heavy chain).

Rozdział trzeci rozprawy prezentuje wyniki badań eksperymentalnych odniesione do dwóch celów szczegółowych sformułowanych przez Doktorantkę. W pierwszej części opisano prace mające na celu otrzymanie nowej pochodnej deferoksaminy (DFO) zawierającej grupę bisfosfonianową (BP). W tym zakresie Doktorantka przeprowadziła szereg syntez związków pośrednich, zmierzających do otrzymania reaktywnego bisfosfonianu, który następnie planowano przyłączyć do DFO w reakcji Kabachnik-Fields’a. Pomimo licznych prób prowadzonych w zróżnicowanych warunkach reakcyjnych, nie udało się uzyskać docelowego ligandu DFO-BP. Alternatywna strategia syntezy, polegająca na reakcji DFO z chlorowcopochodną bisfosfonianu, również nie przyniosła oczekiwanego rezultatu. Ostatecznie otrzymano inną pochodną DFO (związek M), dla której przeprowadzono badania kompleksowania radioizotopu ^{89}Zr oraz testy stabilności w buforze HEPES i w obecności ludzkiej surowicy. Uzyskane wyniki wskazują na wyższą stabilność otrzymanego kompleksu w porównaniu z komercyjnym ligandem p-SCN-Bn-DFO, co świadczy o jego potencjalnej przydatności w dalszych badaniach aplikacyjnych.

Komentarze do tej części pracy:

1. Strona 44 – postępowanie reakcji prowadzącej do otrzymania związku B monitorowano z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Doktorantka opisuje położenie plamek odpowiadających poszczególnym substratom i składnikom mieszaniny reakcyjnej na płytce TLC, jednak zasadne byłoby posługiwanie się standardową terminologią chemiczną, tj. podawaniem wartości współczynnika opóźnienia (R_f). Ponadto w tekście pojawia się niejednoznaczność: z jednej strony wskazano, że plamka substratu bisfosfonianowego występuje na wysokości około 2/3 płytki TLC, z drugiej natomiast, że zarówno substrat bisfosfonianowy, jak i produkt pośredni B pojawiają się w połowie jej wysokości. Wymaga to doprecyzowania.

2. Strona 52 – w Tabeli 9 przedstawiono dane dotyczące sygnałów ^{13}C -NMR, w tym teoretyczne położenie sygnału węgla P–CH–P dla związku G przy 30,08 ppm. Sygnał ten nie jest jednak widoczny na widmie zaprezentowanym na rysunku 52. Proszę o wyjaśnienie przyczyny jego braku.
3. Strona 56 – Autorka wskazuje, że monitorowanie postępu reakcji przyłączania bisfosfonianu (G) do deferoksaminy (H) metodą TLC było utrudnione, w związku z czym analizę prowadzono na podstawie widm ^1H -NMR oraz ^{31}P NMR. Nasuwa się pytanie, czy na tym etapie podejmowano również próby analizy produktów reakcji za pomocą technik HPLC lub ESI-MS.
4. Strona 58 – rysunek 5 przedstawia widma ^1H -NMR rejestrowane na kolejnych etapach reakcji prowadzącej do otrzymania ligandu DFO-BP (reakcja I). W tekście zaznaczono, że po dodaniu bisfosfonianu (G) do mieszaniny reakcyjnej pojawił się sygnał dubletowy przy 6,86 ppm, którego intensywność wzrastała w trakcie reakcji. Sygnał ten nie jest jednak widoczny na rysunku 5, gdyż zakres widma został ograniczony do 5,5 ppm. Proszę o wyjaśnienie możliwego pochodzenia tego sygnału.
5. Strona 68 – w przypadku reakcji deferoksaminy (H) z chlorowcopochodną bisfosfonianu (J), prowadzonej w układzie woda-chloroform, brakuje przedstawienia widm masowych uzyskanych dla obu faz. Proszę o informację, czy analizowano frakcję wodną tej reakcji. Czy możliwe jest, że w obecności 5 M KOH oczekiwany produkt DFO-BP znajdował się w fazie wodnej oraz uległ częściowej hydrolizie zasadowej, prowadzącej do utraty grup etoksyłowych?

W drugiej części doświadczalnej rozprawy doktorskiej Doktorantka przedstawiła badania dotyczące opracowania dwumodalnych sond przeznaczonych do jednoczesnego obrazowania metodami PET i MRI, ze szczególnym uwzględnieniem guzów charakteryzujących się ekspresją białka PD-L1 na powierzchni komórek. W badaniach wykorzystano komercyjnie dostępne nanocząstki tlenków żelaza o średnicach 5 i 20 nm, stabilizowane dekstranem. Autorka szczegółowo opisała kolejne etapy funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek, obejmujące przyłączanie przeciwciała atezolizumab, ligandu chelatującego p-SCN-Bn-DFO, a także proces radioznakowania otrzymanych formulacji radioizotopem ^{89}Zr . Zastosowano przy tym dwie odmienne strategie znakowania: poprzez ligand DFO oraz poprzez wysokotemperaturowo indukowane wbudowanie radioizotopu w zewnętrzną warstwę nanocząstek. W rezultacie otrzymano szereg zróżnicowanych układów nanocząstkowych, które poddano kompleksowej charakterystyce obejmującej właściwości fizykochemiczne, magnetyczne i biologiczne, w tym badania *in vitro* (toksyczność, swoistość wiązania, internalizacja) oraz *in vivo* (obrazowanie, farmakokinetyka i biodystrybucja)

Komentarze do tej części pracy:

1. W procesie oczyszczania funkcjonalizowanych nanocząstek SPION warto w przyszłości rozważyć zastosowanie silnego magnesu neodymowego, co umożliwi szybkie oddzielenie nanocząstek od roztworu i skraca czas oczyszczania bez konieczności stosowania kolumn membranowych typu VivaSpin oraz długotrwałego wirowania.
2. Strona 88, Tabela 22 – jak została wyznaczona liczba ligandów DFO przyłączonych do jednej nanocząstki SPIONu, bazując na danych podanych w Tabeli 22?

3. Strona 106 – zdanie „W przypadku komórek H292 wzrost sygnału fluorescencji jest nieco większy dla Atezolizumabu-AF647 niż dla SPION-Atezo-AF647 i jest niemal porównywalny między liniami H292 i ES2”. Wartości MFI podane w tabeli 30 dla obu form nanocząstek nie potwierdzają tej informacji.
4. Strona 108 – dlaczego badania powinowactwa receptorowego były wykonywane na linii H292, a badania wychwyty komórkowego na linii ES2?
5. Strona 112, rysunek 32 – dla linii ES2^{PD-L1 KO} brakuje wyniku przeżywalności komórek dla samych nanocząstek SPION po 48 h.
6. Strona 116, rysunek 35 i 36 – przy jakim stężeniu GBCA były prowadzone badania relaksacji?
7. Strona 123 – w ostatnim zdaniu Doktorantka stwierdza, że kumulacja w guzie po 72 h od podania dożylnego jest większa dla niespecyficznego ⁸⁹Zr-DFO-SPION niż dla ⁸⁹Zr-DFO-SPION-Atezolizumab. Porównując wartości w tabeli 35, zwłaszcza większą wartość błędu, uważam że są to wartości porównywalne.

Rozdział czwarty poświęcony jest metodologii prowadzonych badań i stanowi starannie opracowaną oraz przejrzystą zaprezentowaną część rozprawy. Zawiera on szczegółowy opis zastosowanych odczynników, wykorzystywanej aparatury pomiarowej oraz metod analitycznych. Autorka w sposób klarowny przedstawiła procedury obejmujące syntezę związków organicznych oraz ich charakterystykę z wykorzystaniem technik ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ³¹P-NMR i ESI-MS. Fizykochemiczna charakterystyka otrzymanych sond dwumodalnych obejmowała m.in. pomiary DLS, potencjału zeta, analizy FTIR oraz XPS, a także badania relaksacji z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (MRI). Część biologiczna badań obejmowała elektroforezę żelową, technikę Western Blott, cytometrię przepływową, mikroskopię konfokalną oraz badania powinowactwa receptorowego, internalizacji i cytotoksyczności. Z kolei badania *in vivo*, prowadzone na modelu mysim, obejmowały obrazowanie z wykorzystaniem technik PET i MRI, jak również analizy *ex vivo*. Całość prac została przeprowadzona z zachowaniem zasad dobrej praktyki laboratoryjnej oraz obowiązujących rygorów ochrony radiologicznej.

W ósmym rozdziale przedstawiono omówienie kluczowych rezultatów badań z odniesieniem do dorobku innych autorów. Analiza wyników prowadzona jest w sposób stonowany i rzeczowy. Autorka rozprawy, interpretując rezultaty uzyskane w ramach realizacji celu I, wskazuje, że zaproponowane rozwiązanie polegające na modyfikacji ligandu chelatującego DFO ma potencjał aplikacyjny, jednak wymaga dalszych prac na etapie projektowym, obejmujących otrzymanie w pełni docelowej pochodnej, jej kompleksową charakterystykę oraz przeprowadzenie dodatkowych badań walidacyjnych w warunkach przedklinicznych. W odniesieniu do realizacji drugiego celu Doktorantka omawia uzyskany profil biodystrybucji opracowanych sond dwumodalnych i zasadnie wyjaśnia, że ich szybka akumulacja w wątrobie i śledzionie jest konsekwencją efektywnego usuwania nanocząstek z krążenia przez układ makrofagów. Skrócony czas obecności sond we krwi może skutkować obniżonym wychwytem w tkance nowotworowej. Autorka trafnie wskazuje potencjalne kierunki dalszych badań, podkreślając, że optymalizacja sondy dwumodalnej powinna obejmować modyfikacje prowadzące do wydłużenia czasu jej krążenia w organizmie, co mogłoby ograniczyć nieswoistą akumulację oraz zwiększyć ekspozycję guza. Alternatywnym kierunkiem optymalizacji,

ukierunkowanym na przezwycięzenie efektu mononuklearnego układu fagocytyzującego (MPS), mogłaby być zmiana drogi podania.

Przygotowując rozprawę doktorską nie sposób uniknąć błędów edytorskich lub językowych, wymienionych poniżej. Nie umniejszają one jednak wysokiej oceny pracy.

- strona iv: ^{89}Zr - powinno być ^{89}Zr lub Zr-89
- strona iv: *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* powinny być napisane kursywą
- strona 11: ^{18}F -fluodeoxy-D-glucose (FDG) – powinno być ^{18}F -fluorodeoxy-D-glucose
- strona 13: brak rozwinięcia i wyjaśnienia skrótu FDA
- strona 17: Fluorium-18 – powinno być fluorine-18
- strona 31: w tekście trzykrotnie błędnie zapisano skrót od środków kontrastowych jako „Cas” zamiast poprawnej formy „CAs”
- strona 36: określenie „ferric anions” jest nieprawidłowe i powinno zostać skorygowane. Termin „ferric” odnosi się do kationu żelaza na III stopniu utlenienia (Fe^{3+}), a nie do anionów
- strona 38: powinno być „bioorthogonal” a nie „38orthogonal”
- strona 47: opis tabeli 4 powinien zawierać informację, że podane są także sygnały ^1H - NMR dla związku C (przesunięcie chemiczne 6,97 ppm)
- strona 49: nastąpiło przeniesienie informacji dotyczącej przedstawienia wyników w tabeli 7 oraz symboli ze schematów 17, 19 i 22 ze strony 49 na stronę 50
- strona 133: „133ppendorf” zamiast Eppendorf
- strona 152: „carbohydrate” powinno być carboxylic

Rozprawa doktorska mgr Anny Kastelik-Hryniewieckiej jest pracą obszerną i starannie opracowaną pod względem merytorycznym. Zastosowane metody badawcze nie budzą zastrzeżeń. Na szczególne podkreślenie zasługuje szeroki, interdyscyplinarny zakres przeprowadzonych badań. Autorka zrealizowała syntezy organiczne oraz dokonała charakterystyki otrzymanych związków. Otrzymane i wyznakowane nanocząstki poddano rozległym badaniom biologicznym, obejmującym zarówno testy *in vitro* na czterech liniach komórkowych, jak i badania obrazowe *in vivo* z wykorzystaniem technik PET i MRI oraz analizy *ex vivo* na modelach zwierzęcych. Tak kompleksowe podejście badawcze jest rzadko spotykane w rozprawach doktorskich z zakresu chemii i stanowi istotny walor naukowy pracy.

Autorka wykazała się dobrą znajomością zagadnień z obszaru chemii organicznej, radiochemii, nanotechnologii oraz biotechnologii, a uzyskane wyniki mają istotne znaczenie dla rozwoju nowoczesnych metod diagnostycznych. Przedstawione rezultaty wykraczają poza ramy badań podstawowych i posiadają wyraźny charakter aplikacyjny w obszarze medycyny nuklearnej.

Reasumując, przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w obowiązujących przepisach prawa. W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr Anny Kastelik-Hryniewieckiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych.

Podpisano odręcznie przez autora

Podpisany elektronicznie przez
Marek Pruszyński
13.12.2025
18:12:42 +01'00'