

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Marcina Szydły

zatytułowanej „Optymalizacja zautomatyzowanego procesu syntezy i oczyszczania związków biologicznie aktywnych znakowanych izotopem węgla ^{11}C wraz z opracowaniem innowacyjnej linii kontroli jakości.

Celem przedstawionej do recenzji dysertacji doktorskiej było opracowanie i udostępnienie protokołów nadzoru nad produkcją choliny znakowanej radioizotopem węgla-11, a także opracowanie protokołów kontroli jakości tego radioznacznika, w celu jego zastosowania w medycynie nuklearnej. Zgodnie z obowiązującymi w naszym kraju regulacjami prawnymi, podstawowe wymagania jakościowe oraz metody badań produktów leczniczych określa Farmakopea Polska stanowiąca dokument urzędowy, będąca tłumaczeniem na język polski Farmakopei Europejskiej, o czym zresztą pisze autor pracy. Uzasadniając temat swoich badań autor dysertacji zauważa, że Farmakopea, pomimo regularnej aktualizacji, nie zawiera zaleceń dotyczących zapewnienia jakości i kontroli jakości znakowanych izotopowo związków biologicznie aktywnych, stosowanych w pozytonowej tomografii emisyjnej, rozważanych w przedstawionej rozprawie doktorskiej. Autor dysertacji powołuje się przy tym na Farmakopeę Polską z 2017 roku. Chciałbym zauważyć, że już po roku 2017 ukazały się dwa suplementy uzupełniające Farmakopeę Polską. Pierwszy z tych suplementów ukazał się w 2018, a drugi w 2019 roku. Autor nie odniósł się jednak do tych uzupełnień, całkowicie je pomijając. W związku z tym brakuje informacji, czy owe suplementy wprowadzają regulacje istotne dla badań autora objętych rozprawą doktorską. Co prawda na stronie 60, w rozdziale zatytułowanym „Cykl produkcyjny” pojawia się wzmianka, że w 10-tej edycji Farmakopei Europejskiej z 2019 roku, ^{11}C -cholina nie została opisana. Ale to wszystko. Brak radiofarmaceutyka w monografiach Farmakopei nie oznacza wcale braku pozwolenia na dopuszczenie go do zastosowania w medycynie nuklearnej. Jednak sytuacja taka wymaga opracowania standardów naukowych potrzebnych do usystematyzowania procesu produkcji i kontroli jakości danego radiofarmaceutyku. Badania mające na celu wprowadzenie choliny znakowanej węglem-11 do zastosowania klinicznego zostały prawidłowo uzasadnione przez autora. Radiofarmaceutykiem obecnie najczęściej stosowanym w pozytonowej tomografii emisyjnej jest fluorodeoksyglukoza (tzw. FDG) zawierająca radioizotop fluoru-18. Powszechność stosowania FDG wynika, z faktu, że ten związek chemiczny jest pochodną glukozy stanowiącej jedno z najważniejszych źródeł energii żywych komórek. Fluorodeoksyglukoza jest rozprowadzana po całym organizmie przy czym w największej ilości jest przyswajana przez tkanki o wzmożonym metabolizmie. Tak jest w przypadku niektórych tkanek nowotworowych u których da się zauważyć wzmożony wychwyty FDG. Nie wdając się w szczegóły, można powiedzieć, że fluor-18 znakujący FDG zostaje uwięziony w komórce, a jego ilość jest miarą intensywności metabolizmu. Zatem rejestrowana w technice PET radioaktywność fluoru-18 jest odzwierciedleniem stopnia metabolizmu glukozy w komórkach. Niestety podobny mechanizm występuje w komórkach objętych stanem zapalnym. Co więcej, niektóre rodzaje nowotworów, jak rak gruczołu krokowego i kilka innych często nie wykazują

zwiększonego wychwyty FDG. W przypadku nowotworu prostaty tylko w jego przerzutowym stadium obserwuje się gromadzenie FDG. Nowotwór gruczołu krokowego jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych u mężczyzn. Pod względem rejestrowanych przypadków ustępuje jedynie rakowi płuca. W kontekście tego badania przedstawione w dysertacji doktorskiej mgr Marcina Szydły mają swoje głębokie uzasadnienie. Autor słusznie zauważa, że badania polegające na stosowaniu jednocześnie dwóch technik obrazowania – techniki PET i tomografii komputerowej (PET/TK) z użyciem choliny znakowanej radioizotopem ^{11}C poprawiają precyzję detekcji umiejscowienia nowotworu, jego rozmiarów i czułości detekcji przerzutów do węzłów chłonnych, przewyższając pod tym względem technikę magnetycznego rezonansu jądrowego (MRJ). Autor wymienia jeszcze inną ważną korzyść płynącą ze stosowania choliny znakowanej węglem-11. Mianowicie, ten radiofarmaceutyk tylko w śladowych ilościach jest obecny w moczu. Tym samym dostajemy możliwość poszukiwania ewentualnych przerzutów w obszarze miednicy, bez obawy popełnienia błędu wynikającego z obecności znacznika nie związanej z aktywnością metaboliczną. Warto podkreślić, że w uzasadnieniu podjętej tematyki autor powołuje się na liczne publikacje z lat od 1997 do 2012 roku.

Kolejne cztery rozdziały pracy (3-6) stanowią jej część „edukacyjną” nazwaną przez autora dysertacji „Częścią teoretyczną”. Ta część pracy obejmuje strony 12 - 58. Pomimo, iż w pracy autor przeznaczył całą stronę, aby umieścić na niej napis: „Część teoretyczna” to jednak napis ten nie znalazł się w spisie treści. Zresztą podobnie jest z „Częścią eksperymentalną”. Pierwszy rozdział „Części teoretycznej” zawiera podstawową wiedzę dotyczącą pozytonowej tomografii emisyjnej, transportu promieniowania gamma przez materię i sposobów rejestracji fotonów w technice PET, a także zaprezentowane zostały typy aparatów stosowanych w pozytonowej tomografii emisyjnej. Rozdział ten okraszony jest licznymi rysunkami wyjaśniającymi m. in. zasadę detekcji fotonów w koincydencji, techniki projekcji wstecznej z filtrowaniem i bez filtrowania, zasadę obrazowania w tomografii komputerowej itd. Drugi rozdział „edukacyjny” dotyczy łączenia metody PET z tomografią komputerową. Na uwagę zasługują tu przede wszystkim zamieszczone obrazy anatomii pacjenta uzyskane z połączenia PET i TK i dołączone objaśnienia różnych szczegółów wpływających na jakość uzyskiwanych obrazów, szczegółów takich jak np. ułożenie rąk podczas obrazowania górnej części ciała. Trzeci rozdział „Części teoretycznej” poświęcony jest znacznikom stosowanym w diagnostyce PET. W rozdziale tym autor jeszcze raz uświadamia, że znaczniki w świetle prawa są lekami i w związku w tym podlegają restrykcyjnym przepisom już od momentu wyboru dostawcy reagentów, aż po monitorowanie cyklu życia leku, w tym monitorowanie działań niepożądanych. Następnie autor uzupełnia wiedzę dotyczącą zastosowań wybranych znaczników, wśród których jest również cholina znakowana węglem-11. Szczególnie dużo miejsca poświęca fluorodeoksyglukozie, która znalazła zastosowanie w diagnozowaniu i określaniu stadiów nowotworów, ocenie uszkodzeń związanych z zawałem mięśnia sercowego oraz w diagnozowaniu chorób neurologicznych. Autor zaprezentował podstawową wiedzę o zastosowaniu choliny znakowanej przy pomocy ^{11}C , a także kilku innych związków chemicznych, w tym radiofarmaceutyku o nazwie DOPA, opartego na ^{11}C lub na ^{68}Ga . Szósty rozdział zawiera wiedzę związaną z wytwarzaniem radioznaczników opartym na wykorzystaniu modułów Bioscan Mel+ i ReFORM+ zainstalowanych w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach. Autor stosuje dwa źródła radioizotopów przeznaczonych dla techniki PET: generator radioizotopowy $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ służący do pozyskiwania galu-68 i cyklotron protonów firmy IBA o nazwie Cyclone 18/9, za pomocą którego wytwarzany jest flour-18. Autor dość szczegółowo omawia zasadę działania „małych cyklotronów” i skrótowo reakcje jądrowe prowadzące do

powstania emiterów pozytonowych, w szczególności fluoru-18. Do tego rozdziału mam dwie uwagi. Po pierwsze, autor nazywa tarczą cały układ mocujący i utrzymujący tarczę, np. w przypadku tarczy ciekłej lub gazowej, tarczą nazywa korpus, służący do mocowania kolimatora wiązki i holdera tarczy wraz ze wszystkimi komponentami zawartymi w tym korpusie. Zaś tarczę nazywa materiałem tarczowym. Stosowanie takiej nomenklatury jest dość nietypowe i może być potraktowane jako błąd merytoryczny. Nie można również zgodzić się ze stwierdzeniem, że, cytując: „... najwyższa gęstość jonizacji, a tym samym najwyższa wydajność reakcji (pik Bragga) występuje przy różnych energiach w zależności od reakcji”. Wyjaśniam, że największa wydajność reakcji, w której produkuje się dany radioizotop nie musi zachodzić tam, gdzie występuje najwyższa gęstość jonizacji, ponieważ za oba te procesy odpowiadają inne oddziaływania. Jonizacja zachodzi pod wpływem oddziaływań elektromagnetycznych i oczywiście największe przekroje czynne na jonizację będą pojawiały się przy niskich energiach, a więc blisko zasięgu protonu, ponieważ wówczas proton przekazuje swoją energię elektronom atomów najbardziej efektywnie. Natomiast za reakcje jądrowe odpowiedzialne są oddziaływania silne, których natura jest całkowicie odmienna od oddziaływań elektromagnetycznych.

Reasumując, chciałbym podkreślić, że „Część teoretyczna” pracy jest obszerna, zawiera kompleksową wiedzę mniej lub bardziej bezpośrednio związaną z tematem pracy i stanowi doskonałe wprowadzenie do części dysertacji nazwanej przez autora „Częścią eksperymentalną”.

Zasadniczą część przedstawionej mi do recenzji dysertacji doktorskiej stanowi osiem rozdziałów objętych przez autora, jak wspominałem, wspólną nazwą „Część eksperymentalna” (są to rozdziały 7 - 14, strony od 60-tej do 110-tej). W rozdziale 7, zatytułowanym „Cykl produkcyjny” autor podkreśla, że opracowanie technologii produkcji i kontroli jakości znacznika ^{11}C -choliny ma znaczenie dla otrzymywania jego pochodnej fluorocholiny znakowanej fluorem-11, która ma już swoją adnotację w Farmakopei, ale tylko w zakresie kontroli jakości. Doświadczenie zdobyte przez autora przy syntezie choliny znakowanej węglem-11 zaowocuje bardziej efektywną syntezą ^{18}F -Fluorocholiny przy jednoczesnej redukcji ilości substancji potencjalnie szkodliwych. W rozdziale tym został zaprezentowany schemat blokowy cyklu produkcyjnego ^{11}C -choliny, który porządkuje czynności podejmowane podczas wytwarzania niniejszego radioznacznika. W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Materiały i metody” zostały opisane procedury analityczne stosowane w celu określenia czystości substancji chemicznych wykorzystywanych w cyklu produkcyjnym, takich jak dimetyloaminoetanol (skrót DMAE) i dibromometan (DBM). Jako przykład przytoczę określenie czystości dimetyloaminoetanolu za pomocą zastosowanej przez autora, bardzo prostej metody opartej na pomiarze gęstości względnej za pomocą gęstościomierzy oscylacyjnych pozwalających uzyskać bardzo dokładny wynik z dokładnością do siedmiu miejsc po przecinku. Inne stosowane w badaniach metody to spektroskopia w podczerwieni, chromatografia gazowa i spektroskopia NMR. Chciałbym zaznaczyć, że autor wykazał się szeroką wiedzą dotyczącą możliwości i ograniczeń stosowanych metod analitycznych. Istotną częścią pracy jest rozdział 9, zatytułowany „Procesy syntezy ^{11}C -choliny”, w którym opisane zostały poszczególne etapy syntezy choliny znakowanej węglem-11, począwszy od reakcji jądrowej prowadzącej do wytworzenia radioizotopu ^{11}C , aż po końcowy radioznacznik. Do wytworzenia radioizotopu ^{11}C autor wykorzystał reakcję (p,α) na jądrach izotopu azotu-14. Autor zamieścił przekrój czynny na niniejszą reakcję (Rysunek 9.1) zaczerpnięty z bazy przekrojów czynnych Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej. Jednak twierdzi, że ww. reakcja zachodzi w zakresie energii od 4 MeV do 20 MeV, choć z rysunku wyraźnie widać, że nawet przy energii 25 MeV przekrój czynny jest niezerowy, wynosi około 20 mb i bynajmniej nie widać gwałtownego spadku. Skąd więc taka uwaga zamieszczona w pracy? ... Natomiast warto zauważyć, że

wyraźne maksimum przekroju czynnego przypadku na energię około 9 MeV, o czym autor nie pisze. Autor operuje pojęciem „natężenie wiązki”. Lepszym określeniem jest „prąd wiązki”, tym bardziej, że ten parametr wyrażany jest w μA . Autor nie podaje ile wynosi czas półżycia wytworzonego radioizotopu i jakiemu ulega on rozpadowi i ile wynosi energia rozpadu, co w mojej opinii jest dużym niedopatrzeniem. Taka informacja właśnie w tym miejscu pracy jest niezbędna dla dokładnego zrozumienia np. korzyści wynikającej ze skrócenia o 5 minut czasu trwania procedury wytwarzania ^{11}C -choliny, o czym autor pisze w kolejnym rozdziale dysertacji. Informację o rozpadzie węgla-11 znalazłem natomiast w jednym z dalszych rozdziałów pracy (Tabela 8, strona 91). Nie ma również informacji o energii wiązki protonów w miejscu wchodzenia do tarczy i jej opuszczania. We wzorze (9), czas napromieniania oznaczony literą t powinien być w liczniku, a nie w mianowniku wyrażenia występującego we wnętrzu funkcji eksponentyjnej.

Kolejne etapy syntezy ^{11}C -choliny zostały opisane bardzo szczegółowo. Tu chciałbym zauważyć, że autor opisał wszystkie procesy chemiczne, a najważniejsze reakcje chemiczne zaprezentował za pomocą wzorów sumarycznych i strukturalnych. Na uwagę zasługuje skuteczna optymalizacja procesu wytwarzania choliny znakowanej węglem-11, najpierw poprzez pozbycie się toksycznego dimetyloformamidu, zastąpienie go naturalnym rozpuszczalnikiem – etanolem. Następnie, zastąpienie fiolki reakcyjnej kartridżem ekstrakcji do fazy stałej przy jednoczesnym dostosowaniu skryptu sterującego pracą modułu ReFORM+, tak aby media były kierowane przez kartridż, co pozwoliło skrócić proces wytwarzania znacznika z 17 minut do 12 minut poprawiając wydajność produkcji. Dodatkowy wzrost wydajności produkcji autor uzyskał poprzez zwiększenie kontaktu między prekursorem (DMAE), a przepływającym przez kartridż jodkiem ^{11}C -metylu. Ostatecznie udało się uzyskać wydajność 68 %, określoną, jak rozumiem, jako aktywność węgla-11 w ^{11}C -choliny określonej bezpośrednio po jej wytworzeniu, odniesioną do aktywności tego radioizotopu wytworzonej w cyklotronie. Brak jest jednak w tekście informacji jak należy rozumieć owe 68 %. W rozdziale 10 autor dokładnie opisał opracowaną procedurę kontroli jakości wytworzonego radioznacznika ^{11}C -choliny. Zastosował do tego celu ogólne wytyczne i zalecenia Farmakopei. Na stronie 92 jest opisana metoda wyznaczania czasu półżycia radioizotopu ^{11}C przeprowadzona w celu identyfikacji radionuklidowej wytworzonego radioznacznika. Autor pisze, cytując: „Do wyznaczenia czasu półżycia izotopu wykorzystano aktywnościomierz z komorą jonizacyjną ISOMED 1010 skalibrowany na izotop węgla-11”. Jednak nie pisze w jaki sposób ta kalibracja została wykonana. Tej informacji brakuje. Nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem dotyczącym badania czystości radionuklidowej, że bardzo duża intensywność piku anihilacyjnego uniemożliwia identyfikację nuklidów o czasie półrozpadu krótszym od czasu półrozpadu izotopu dostarczającego pozytony anihilacyjne. W przypadku radioizotopów emitujących fotony o energii mniejszej od 511 keV rozwiązanie wspomnianego problemu jest proste. Mianowicie wystarczy tak dobrać parametry pracy detektora, aby ograniczyć zakres pomiarowy do np. 500 keV. Określenie, że cytując: „... kalibracja energetyczna ... pozwala przyporządkować zestawy pasm energetycznych konkretnym nuklidom na podstawie stosunku ich intensywności” jest błędne. Kalibracja energetyczna przypisuje energie kanałom analizatora wielokanałowego i tym samym pozwala odczytać energie odpowiadające fotonikom na zmierzonych widmach. Brakuje mi określenia zawartości zanieczyszczeń radionuklidowych dla ^{11}C -choliny wytworzonej przez autora, zgodnie z opracowaną przez niego procedurą. Informacja o zanieczyszczeniach radionuklidowych była by bardzo interesująca.

Kolejne cztery rozdziały 11 - 14 stanowią podsumowanie badań. Na wstępie autor zauważa, że cytując: „Największy wzrost aktywności węgla-11 wytwarzanego w tarczy cyklotronu miał miejsce w pierwszej

minucie napromieniania ..." i dalej „... otrzymałem 2 GBq tego izotopu w czasie poniżej 2 minut”, a następnie autor kontynuuje te rozważania pisząc: „Nasylenie tarczy uzyskano po około dwóch godzinach przy aktywności węgla-11 wynoszącej blisko 110 GBq”. Chciałbym zauważyć, że po pierwsze to, że nasylenie aktywności będzie widoczne po około dwóch godzinach jest oczywiste dla radioizotopu o czasie półżycia wynoszącym 20.4 min, wynika to z wzoru (9). Po drugie jeśli w niecałe dwie minuty uzyskano aktywność 2 GBq, to po uzyskaniu nasycenia aktywność będzie wynosiła 30 GBq, a nie 110 GBq. Aby uzyskać 110 GBq, to aktywność otrzymana w niecałe dwie minuty musiała by wynosić około 7 GBq. Takie są prawa fizyki. Przyczyną uzyskania większej aktywności w stanie równowagi promieniotwórczej niżby wskazywała na to aktywność uzyskana w dwie minuty może być wzrost gęstości azotu w obrębie wiązki protonów, lub wzrost prądu wiązki, oczywiście zakładając, że kalibracja wydajnościowa detektora stosowanego do pomiaru aktywności węgla-11 uwzględniała znaczną różnicę uzyskanych aktywności uwidaczniającą się w tzw. czasie martwym detektora. Trudno wyjaśnić natomiast, cytuję: „spadek aktywności tarczy po przekroczeniu punktu nasycenia”. Przede wszystkim, nasylenie nie jest punktem, a jego czasową zależność opisuje krzywa, która zbliża się coraz bardziej i bardziej do prostej poziomej. Oczywiście zakładając niezmienność prądu wiązki i zaniedbywalnie mały spadek ilości centrów aktywacji (centrów reakcji) w tarczy.

Dobrym sposobem podsumowania wyników opracowanej przez autora optymalizacji procesu wytwarzania ^{11}C -choliny jest Tabela 9. Warto zauważyć, że dla zoptymalizowanych wartości parametrów takich jak, ciśnienie napełniania tarczy, prąd wiązki, ilości użytego DMF i DMAE, a także czas trwania cyklu produkcyjnego, produkt końcowy wykazuje wymaganą jakość w zakresie czystości chemicznej i radiochemicznej, a także radionuklidowej i mikrobiologicznej. Co więcej opracowana procedura wytwarzania znacznika ^{11}C -choliny jest powtarzalna.

Chciałbym podkreślić, że cel pracy jaki postawił sobie autor dysertacji został osiągnięty. Udało się dostosować warunki wytwarzania choliny znakowanej węglem-11 do wymagań stawianych wytwórcom radioznaczników medycznych. Ponadto, co zauważa autor, a co stanowi ważny aspekt praktyczny, krótki okres półrozpadu węgla-11 sprawia, że skażenie promieniotwórcze w komorze izolatora w ciągu dwóch godzin spada do poziomu akceptowalnego z punktu widzenia ochrony radiologicznej. To z kolei umożliwia przeprowadzenie trzech sesji produkcyjnych w ciągu dnia roboczego z łączną liczbą 24 dawek ^{11}C -choliny.

W rozprawie doktorskiej został zaprezentowany bogaty materiał badawczy. Autor dysertacji wykazał się dużą wiedzą. Wyniki badań zaprezentowane w rozprawie doktorskiej były opublikowane w trzech artykułach w czasopiśmie z listy JCR. We wszystkich tych artykułach pierwszym autorem jest Pan mgr inż. Marcin Szydło. Rozprawa doktorska cechuje się wymaganym dobrym poziomem naukowym. W związku powyższym **wnioskuje o dopuszczenie Pana mgr inż. Marcina Szydła do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. W recenzji wspominałem o bardzo ważnym aspekcie aplikacyjnym przeprowadzonych badań. Wdrożenie choliny znakowanej węglem-11 do praktyki przyczyni się m. in. do podniesienia jakości diagnozowania nowotworów prostaty. W związku z tym **wnioskuje o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji dysertacji doktorskiej**.

Adam Konefst