

Załącznik 2: Autoreferat przedstawiający opis osiągnięć naukowych w języku polskim.

AUTOREFERAT

Dr n. farm Piotr Garnuszek

Warszawa, 2012 r.

1. Imię Nazwisko: Piotr Garnuszek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- a) magister chemii; Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; 06.07.1990 r.
- b) doktor nauk farmaceutycznych; Rada Naukowa Instytutu Leków w Warszawie; 10.01.2000 r.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01.08.2011 – obecnie	Narodowe Centrum Badań Jądrowych Ośrodek Radioizotopów POLATOM, ul. Andrzeja Sołtana 7, 05-400 Otwock. Z-ca Kierownika Pracowni Radiofarmaceutyków / Główny Specjalista Badawczo-Techniczny.
01.04.2011 – 31.07.2011	Instytut Energii Atomowej POLATOM Ośrodek Radioizotopów, 05-400 Otwock-Świerk Główny specjalista (wymiar etatu 1/10).
01.02.2007 – 31.07.2011	Narodowy Instytut Leków, Zakład Leków Izotopowych, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa. Kierownik zakładu / Adiunkt / Osoba wykwalifikowana (GMP).
01.2003 – 02.2007	Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego (d. Instytut Leków). P.o. Kierownika Zakładu Leków Izotopowych.
01.1996 – 12.2002	Instytut Leków, Zakład Leków Izotopowych, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa. Z-ca Kierownika Zakładu / Adiunkt.
01.1992 – 12.1995	Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Izotopów POLATOM, Zakład Radioimmunologii, 05-400 Otwock/Świerk. Asystent / od 01.1995 Kierownik Pracowni Badawczo-Produkcyjnej.
02.1990 – 01.1992	Katedra Radiochemii i Chemii Radiacyjnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Pasteura 1, Warszawa. Młodszy specjalista inżynierjno-techniczny.
08.1991 – 02.1992	Zakład Chemii Środowiska Narodowej Fundacji Ochrony Środowiska, ul. Żwirki Wigury 101, Warszawa. Asystent dyrektora (wymiar 1/2 etatu).

4. Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.)

Wskazanie osiągnięcia

„Radioaktywne kompleksy platyny - nowe perspektywy wieloczynnikowej terapii przeciwnowotworowej”

Moje zainteresowania naukowe szczególnie dotyczą opracowania efektywnych radiofarmaceutyków przeciwnowotworowych, które poprzez połączenie związków cytostatycznych z radionuklidami posiadałyby możliwość wieloczynnikowego niszczenia komórek nowotworowych. Efektem moich badań było opracowanie i scharakteryzowanie właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych nowych radioaktywnych kompleksów platyny znakowanych radionuklidami jodu ($I-125$, $I-131$) i wykazanie, że posiadają one cechy potencjalnych chemio-radioterapeutyków do leczenia nowotworów złośliwych.

Badania nad właściwościami przeciwnowotworowymi radioaktywnych kompleksów platyny z [$^{125}I/^{131}I$]histaminą były prowadzone m.in. w ramach grantu badawczego KBN Nr 3 P05F 004 23 (26.09.2002 – 25.09.2004), pt. „Badanie synergii aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* kompleksów platyny(II) z radioaktywną [$^{131}I/^{125}I$]jodohistaminą”, którego byłem kierownikiem. Przeprowadzone badania w sposób jednoznaczny udowodniły znaczące podwyższenie aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* po równoczesnym zastosowaniu kompleksu platyny(II) o aktywności cytotoksycznej/cytostatycznej i radionuklidu emitującego radiotoksyczne promieniowanie elektronowe. Badania nad modyfikacją struktury radioaktywnych kompleksów platyny, w celu poprawy właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych, w tym m.in. poprawy rozpuszczalności i umożliwienia koordynacji specyficznych ligandów nośnikowych były prowadzone w ramach drugiego, kierowanego przeze mnie grantu badawczego MNiSW Nr N405 020 31/0911 (15.09.2006-14.01.2009) pt. „Opracowanie i badanie nowych radioaktywnych kompleksów platyny o zmodyfikowanych właściwościach farmakokinetycznych”.

Materiałem źródłowym opisu moich znaczących osiągnięć naukowych, będących podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, stanowi cykl publikacji składający się z 8 prac o łącznym IF równym 10,846 (MNiSW = 127):

- I. **Garnuszek P**, Maurin JK, Witowska-Jarosz J, Ptasiwicz-Bąk B. Synthesis and characterisation of platinum(II) complexes with histamine and iodohistamine. *Inorganica Chimica Acta*. 2002;338C: 119-126. (IF = 1,566; MniSW = 10).
- II. **Garnuszek P**, Licińska I, Skierski JS, Koronkiewicz M, Mirowski M, Wiercioch R, Mazurek AP. Biological investigation of the platinum(II)-[*I]iodohistamine complexes of potential synergistic anti-cancer activity. *Nuclear Medicine and Biology*. 2002;29(2):169-175. (IF = 1,924; MniSW = 10).
- III. **Garnuszek P**, Licińska I. Preliminary radiochemical and biological studies on the liposome encapsulated platinum-[¹²⁵I]iodohistamine complex. *Nuclear Medicine Review Central East Europe*. 2002;5(2):145-149. (MniSW = 5).
- IV. **Garnuszek P**, Maurin M, Skierski JS, Koronkiewicz M, Witowska-Jarosz J. Synthesis and Preliminary Evaluation of the New Water-Soluble Radioactive Platinum(IV) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2004;98(3):553-559. (IF = 2,225; MniSW = 11).
- V. **Garnuszek P**. Marked Survival prolongation of Mice Bearing a Transplantable Colon Adenocarcinoma by Treatment with Radioactive Platinum-[¹²⁵I]Histamine Complex. Preliminary Report. *Nuclear Medicine Review Central East Europe*. 2004;7(2):113-116. (MniSW = 5).
- VI. Ozimiński W, **Garnuszek P**, Bednarek E, Dobrowolski JCz. The Platinum Complexes with Histamine: Pt(II)(Hist)Cl₂, Pt(II)(Iodo-Hist)Cl₂ and Pt(IV)(Hist)₂Cl₂. *Inorganica Chimica Acta*. 2007;360:1902-1914. (IF = 1,713; MniSW = 27).
- VII. **Garnuszek P**, Karczmarczyk U, Maurin M. Antitumor activity of platinum(II) complexes with histamine and radioiodinated histamine in a transplantable murine adenocarcinoma model. *Nuclear Medicine and Biology*. 2008;35:605-613. (IF = 2,419; MniSW = 27).
- VIII. Maurin M, **Garnuszek P**. Radiochemical synthesis and preliminary in vivo evaluation of new radioactive Platinum complexes with Carnosine. *Applied Radiation and Isotopes*. 2010;68:317-324. (IF = 0,999; MniSW = 32).

Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Oprócz nowej generacji chemioterapeutyków pozwalających w przypadku schorzeń nowotworowych regulować cykl komórkowy, indukować apoptozę nieprawidłowych komórek, czy hamować angiogenezę, perspektywiczną strategię w walce z rakiem stanowią terapie wieloczynnikowe, łączące stosowanie określonych związków chemicznych (cytostatyków) lub immunomodulacyjnych (przeciwciała, cytokiny, peptydy receptorowe) z działaniem promieniowania jonizującego. Podstawową korzyścią takiej strategii jest amplifikacja efektu terapeutycznego, wynikająca z addytywności bądź synergii aktywności przeciwnowotworowej zastosowanych czynników oraz lokalnego działania. Promieniowanie jonizujące, w wyniku różnorodnych procesów radiacyjnych, oddziałuje na komórki niszcząc DNA, a także inne struktury komórkowe. Pod wpływem promieniowania dochodzi do szeregu uszkodzeń (głównie w jądrze komórkowym), które powodują stopniowe obumieranie komórek, a tym samym dochodzi do niszczenia guza. Skuteczność metody radioterapii nowotworowej w dużym stopniu zależy od radioczułości komórek nowotworowych. Jedną z metod uwrażliwienia komórek na promieniowanie jonizujące jest zastosowanie związków chemicznych oddziałujących z DNA. Cisplatyna, a także inne preparaty alkilujące zawierające w swojej strukturze atom platyny, należą do grupy bardzo efektywnych radiosensybilizatorów. Zarówno w badaniach laboratoryjnych jak i klinicznych wykazano, że równoczesne zastosowanie chemioterapii i radioterapii znacząco podwyższa niszczenie wielu różnorodnych komórek nowotworowych, głównie w wyniku zahamowania komórkowych mechanizmów naprawczych. Dlatego też, w ciągu ostatnich kilku lat metoda radiochemioterapii, tzn. równoczesnego zewnętrznego napromieniania i terapii cisplatyną, stała się standardową metodą leczenia pacjentów w stadium zaawansowanego i nieoperacyjnego niedrobnokomórkowego rozległego raka płuc (NSCLC). Taki schemat leczenia rokuje też nadzieje u pacjentów z nieoperacyjnym złośliwym rakiem głowy i szyi, a także w leczeniu raka pęcherza moczowego.

Radioterapia jest obok chirurgii najskuteczniejszą metodą leczenia nowotworów złośliwych, a jej zastosowania w medycynie ma już ponad 100 letnią historię. Polega na wykorzystaniu promieniowania jonizującego w celu zniszczenia komórek nowotworowych. Najczęściej stosowaną techniką radioterapii jest teleradioterapia (TRH) polegająca na napromienianiu chorej tkanki pacjenta z pewnej odległości, przy użyciu zewnętrznych źródeł

promieniowania jonizującego, takich jak np. bomba kobaltowa czy akceleratory medyczne, itp. Inną techniką radioterapii jest terapia radionuklidowa polegająca na leczeniu przy użyciu promieniowania jonizującego po bezpośrednim wprowadzeniu do organizmu pacjenta izotopu promieniotwórczego w postaci odpowiedniego radiofarmaceutyku. Zastosowanie specyficznych radiofarmaceutyków, w których obecny radioizotop emituje cząstki o krótkim (promieniowanie β^-) lub ultrakrótkim zasięgu (promieniowanie α , elektrony Augera), może prowadzić do lokalnego podwyższenia lub nawet zwielokrotnienia efektywnej dawki radioterapeutycznej, dodatkowo działającej na nowotwór w sposób ciągły. Krótki zasięg emitowanych cząstek β^- lub cząstek α czy też elektronów Augera, o wysokim liniowym współczynniku przenoszenia energii (LET – *Linear Energy Transfer*) zmniejsza ryzyko radiacyjnego uszkodzenia tkanek zdrowych, a w związku z tym, przy spełnionym warunku specyficznej lokalizacji radiofarmaceutyku, toksyczność tej metody jest znacznie niższa niż przy zastosowaniu zewnętrznego napromienienia. Przykładem wieloczynnikowej terapii z użyciem radionuklidów może być radio-immunoterapia z zastosowaniem przeciwciała monoklonalnego anti-CD20 znakowanego radionuklidami I-131 lub Y-90 (Zevalin), która charakteryzuje się kilkukrotnie większą skutecznością leczenia niektórych typów chłoniaków (non-Hodgkin's lymphoma) niż dotychczasowa metoda z użyciem nieradioaktywnego przeciwciała Rituximab. W badaniach *in vitro*, synergiczne efekty przeciwnowotworowe obserwowano stosując równocześnie cisplatynę z radiofarmaceutykami takimi jak np. etydronian renu-186 ($^{186}\text{Re-HEDP}$), czy jodek-131 sodu. Także w badaniach klinicznych stwierdzono korzyści stosowania cisplatyny w połączeniu z radiofarmaceutykami, takimi jak np. meta-[^{131}I]jodo-benzyloguanidyna ($^{131}\text{I-MIBG}$) czy $^{89}\text{SrCl}_2$ (zwiększona odpowiedź na paliatywne leczenie przerzutów nowotworowych do kośćca – z 50% do 86%). Strategia jednoczesnej kuracji cisplatyną i $^{131}\text{I-MIBG}$ w niedługim czasie będzie rutynowo stosowana do leczenia nerwiaka niedojrzałego o rozsianym charakterze. Do tej pory, jedynym efektem niekorzystnym obserwowanym w badanych klinicznie przypadkach była przejściowa toksyczność hematologiczna.

Radioaktywne kompleksy platyny

Oprócz jednoczesnego stosowania chemioterapeutyków np. cisplatyny z różnymi powszechnie znanymi radiofarmaceutykami jak np. $^{131}\text{I-MIBG}$ i $^{89}\text{SrCl}_2$, czy jodek-131 sodu, otrzymano również radioizotopowe analogi cisplatyny, karboplatyny i iproplatyny z użyciem radionuklidów platyny: Pt-195m ($t_{1/2}$ 4.02 d; IT; E_γ 76.3 keV, E_e 175 keV), Pt-193m ($t_{1/2}$ 4.33 d; IT; E_γ 12.6 keV, E_e 130 keV) oraz Pt-191 ($t_{1/2}$ 2.8 d; EC; E_γ 293 keV, E_e 65.6 keV).

Zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* wykazano efektywne i spotęgowane niszczenie komórek nowotworowych po zastosowaniu radioizotopowych kompleksów platyny w porównaniu do ich nieradioaktywnych analogów a także promieniowania jonizującego – czynników stosowanych osobno. W badaniach *in vitro* Howell i wsp. (*Radiat Res*, 1994) wykazali radiotoksyczne działanie elektronów Augera na komórki nowotworowe poddane działaniu ^{195m}Pt -trans-platyny. Howell i Sastry (*Proc. 4th Int. Radiopharm. Dosimetry Symp*, 1986) wykazali na zwierzęcym modelu nowotworowym czerniaka (B16 melanoma), że ^{193m}Pt -cisplatyna wydłuża czas życia zwierząt w stosunku do grupy leczonej cisplatyną. W badaniach na myszach z bezpostaciowym rakowiakiem AB (BALBc/human squamous cell carcinoma AB) Areberg i wsp. (*Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 2001) zaobserwowali kilkukrotnie wyższą inhibicję rozwoju guza po leczeniu zwierząt ^{191}Pt -cisplatyną w porównaniu do leczenia samą cisplatyną, a ponadto nie stwierdził istotnego zwiększenia toksyczności towarzyszącej stosowaniu chemioterapeutyku.

Cel i Koncepcja Podjętych Badań

Celem moich badań było opracowanie nowej generacji radioizotopowych pochodnych cisplatyny o podwyższonej efektywności przeciwnowotworowej, wynikającej z synergii cytostatycznej aktywności jonu centralnego platyny (działanie alkilujące) i promieniowania jonizującego emitowanego przez przyłączony radionuklid.

Izotopy platyny (^{191}Pt , ^{193}Pt , ^{195m}Pt) wydają się wyborem naturalnym do opracowania radiofarmaceutyków przeznaczonych do wewnętrznej terapii wieloczynnikowej, jednak posiadają wady, które ograniczają ich powszechne zastosowanie, w tym przede wszystkim wysoki koszt pozyskania oraz niską aktywność właściwa. Ze względu na korzystne cechy rozpadu promieniotwórczego, przewidywalną chemię oraz biologiczne właściwości, a także wieloletnie zastosowanie w medycynie nuklearnej, do realizacji celu wybrałem izotopy jodu: I-131 ($t_{1/2}$ 8.02 d; β^- : 606.3 keV (89.4%), 333.8 keV (7.36%), γ : 364.48 keV (81.2%)) oraz I-125 ($t_{1/2}$ 59.6 d; EC; elektrony Augera: 25/rozpad ~15-350 eV, γ : 35.49 keV).

W myśl założonej koncepcji, nowy radiofarmaceutyk powinien posiadać strukturę kompleksu, w którym rdzeń stanowi atom platyny, do którego przyłączony jest ligand stanowiący nośnik terapeutycznego izotopu promieniotwórczego. Współobecność kationów platyny oraz źródła promieniowania jonizującego w komórkach nowotworowych, powinna prowadzić do ich uwrażliwienia na działanie promieniowania jonizującego, a w konsekwencji do większej efektywności destrukcyjnego oddziaływania obu czynników na DNA i proces replikacji komórek nowotworowych.

Omówienie Wyników Badań

Synteza i charakterystyka kompleksów Pt(II) z histaminą znakowaną radionuklidami: I-125 i I-131

Praca I. Garnuszek P, Maurin JK, Witowska-Jarosz J, Ptasiewicz-Bąk B. *Synthesis and characterisation of platinum(II) complexes with histamine and iodohistamine. Inorganica Chimica Acta.* 2002;338C: 119-126.

W reakcji równomolowych ilości K_2PtCl_4 z histaminą lub jodohistaminą otrzymałem kompleksy o stechiometrii 1:1, o postulowanym wzorze ogólnym $Pt(II)Cl_2L \cdot nH_2O$, gdzie L oznacza ligand, histaminę lub jodohistaminę, a n reprezentuje liczbę zasocjowanych cząsteczek wody. Wyniki analizy elementarnej sugerują obecność dwóch cząsteczek wody związanych z cząsteczką kompleksu $PtCl_2Iodohistamina$, oraz ułamkową liczbę (najprawdopodobniej $\frac{1}{2}$) dla kompleksu $PtCl_2Histamina$. Wzory sumaryczne obu kompleksów zostały potwierdzone metodą spektrometrii mas (MS) z zastosowaniem łagodnej techniki jonizacji ESI (*Electron Spray Ionisation*). Badania techniką MS ESI potwierdziły solwatowanie cząsteczek kompleksu oraz tworzenie dimerów z udziałem rozpuszczalnika, a także dostarczyły dowodów stopniowej wymiany anionów chlorkowych z kompleksu na cząsteczki rozpuszczalnika, analogicznie jak obserwuje się w przypadku cisplatyny. Na widmach masowych (MS ESI) zarejestrowanych dla kompleksów platyny(II) z jodohistaminą (I-Hist) w roztworze dimetyloformamidu, obserwowano głównie deprotonowane jony ujemne przy wartościach m/z 501 i 574, odpowiadające kolejno kompleksom $PtCl_2I-Hist$ o masie nominalnej $M=502$ i jonowi addycyjnemu kompleksu z rozpuszczalnikiem $PtCl_2I-Hist \cdot DMF$ o masie 575. Badania metodą elektroforezy bibułowej wykazały, że kompleksy $Pt(II)Cl_2L$ są cząsteczkami obojętnymi. Obserwacje te sugerują koordynację platyny(II) przez dwa aniony chlorkowe oraz dwa donorowe atomy azotu z cząsteczki histaminy lub jodohistaminy – przez atom azotu z funkcyjnej grupy aminowej (N^a) oraz atom azotu z pierścienia imidazolowego (N_3). Jednoznacznego dowodu na taki typ koordynacji dostarczyły badania przeprowadzone metodą dyfrakcji rentgenowskiej, wykonane dla otrzymanej krystalicznej postaci kompleksu $Pt(II)Cl_2Histamina$. Oprócz potwierdzenia struktury i opisu kompleksu $Pt(II)Cl_2Histamina$ o płasko kwadratowym rdzeniu, badania krystalograficzne pokazały istnienie w sieci krystalograficznej silnej sieci międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, w tym również rzadkiego typu $NH \cdots Pt$ i $CH \cdots Pt$, tzw. trzy-centrowe-cztero-elektronowe oddziaływania (3c-4e). Przypuszcza się, że tego typu oddziaływania międzycząsteczkowe mają istotne znaczenie w aktywacji reakcji katalitycznych z udziałem atomów metali przejściowych, a także w reakcjach przeniesienia protonu w systemach biochemicznych.

Synteza radiochemiczna kompleksu platyny(II) ze znakowaną histaminą (^{125}I -Histamina lub ^{131}I -Histamina) prowadziła do otrzymania kompleksów o stechiometrii 1:1, zwykle o aktywności właściwej od 5 do 30 MBq/ μmol Pt. Po etapie chromatograficznego oczyszczania czystość radiochemiczna kompleksów wynosiła ponad 98% i utrzymywała się na tym poziomie ponad 1 miesiąc od syntezy.

Kompleksy Pt(IV) z Histaminą

Praca IV. Garnuszek P, Maurin M, Skierski JS, Koronkiewicz M, Witowska-Jarosz J. Synthesis and Preliminary Evaluation of the New Water-Soluble Radioactive Platinum(IV) Complexes. Journal of Inorganic Biochemistry. 2004;98(3):553-559.

Reakcja K_2PtCl_6 z histaminą prowadzi do otrzymania głównie kompleksów o stechiometrii 1:2 ($[\text{Pt(IV)Cl}_2(\text{Histamina})_2]^{2+}$), o bardzo dobrej rozpuszczalności w wodzie (>100 mg/ml). Wyniki analizy elementarnej wyizolowanego kompleksu, wskazywały na otrzymanie związku o wzorze sumarycznym $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_3\text{Pt}$ (Mw 540.3 g/mol), który można przypisać kompleksom o wzorze ogólnym $\text{Pt}(\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3)_2(\text{OH})_2\text{Cl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, gdzie $(\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3)_2 = (\text{Hist})_2$. Widma masowe (MS ESI) wykazały cztery główne szeregi izotopowe reprezentowane stosunkami m/z: 522-525, 486-488, 447-453 i 411-416, które można przypisać odpowiednio jonom: $[\text{Pt}(\text{Hist})_2(\text{OH})_2\text{Cl}_2 + \text{H}^+]^+$, $[\text{Pt}(\text{Hist})_2(\text{OH})_2\text{Cl}]^+$, $[\text{Pt}(\text{Hist})(\text{OH})_2\text{Cl}_2\text{HCl} + \text{H}^+]^+$, $[\text{Pt}(\text{Hist})(\text{OH})_2\text{Cl}_2 + \text{H}^+]^+$. Wyniki badań MS wskazują na labilność kompleksu w roztworach wodnych, związaną na przykład z szybką wymianą ligandów między wewnętrzną i zewnętrzną sferą koordynacyjną.

Synteza radiochemiczna prowadzona była przy 2.5-krotnym nadmiarze znakowanej $[^*\text{I}]\text{histaminy}$ w stosunku do K_2PtCl_6 . Po oczyszczeniu metodą chromatografii żelowej otrzymywano preparaty radioaktywnego kompleksu Pt(IV) o czystości radiochemicznej powyżej 96% i aktywności właściwej w zakresie od 2 do 25 MBq/ μmol Pt. Badania metodą elektroforezy bibułowej wykazały pojedynczy sygnał kompleksu, który migrował w kierunku katody, co świadczyło o występowaniu kompleksu Pt(IV) w formie jonowej o dodatnim ładunku.

Badania kompleksów platyny z histaminą metodami obliczeniowymi

Praca VI. Ozimiński W, Garnuszek P, Bednarek E, Dobrowolski JCz. The Platinum Complexes with Histamine: Pt(II)(Hist)Cl₂, Pt(II)(Iodo-Hist)Cl₂ and Pt(IV)(Hist)₂Cl₂. Inorganica Chimica Acta. 2007;360:1902-1914.

Aby wspomóc charakterystykę struktury kompleksów platyny z histaminą, szczególnie w przypadkach kompleksów radioaktywnych i kompleksu Pt(IV) z histaminą, dla którego nie

uzyskano wiarygodnych wyników badań strukturalnych metodą dyfrakcji rentgenowskiej i NMR, przeprowadzono badania metodami obliczeniowymi chemii kwantowej celem przybliżonego określenia potencjalnych struktur kompleksów. Badania obliczeniowe struktury kompleksów $\text{Pt(II)Cl}_2(\text{I-Hist})$ i $\text{Pt(IV)Cl}_2(\text{Hist})_2$ poprzedzono poszukiwaniem najbardziej wiarygodnych metod obliczeniowych, dających największą zgodność obliczonych parametrów geometrycznych dla wytypowanych kompleksów referencyjnych w zestawieniu z danymi eksperymentalnymi.

Obliczenia kwantowo-chemiczne były prowadzone przy użyciu pakietu programów Gaussian 03. Dla referencyjnych kompleksów: $\text{Pt(II)Cl}_2\text{Hist}$ oraz kompleksu Pt(IV) z dwoma cząsteczkami etylenodiaminy (en): $\text{Pt(IV)Cl}_2(\text{en})_2$, wykonano szereg obliczeń optymalizacji geometrii z zastosowaniem ponad 20 różnych funkcjonałów DFT zarówno pierwszej jak i nowszych generacji. Zastosowano funkcjonały DFT tzw. *pure-DFT*: OLYP, OPW91, VSXC, BB95, G96LYP, HCTH, SVWN5 oraz hybrydowe tzw. *hybrid-DFT*: MPW1PW91, B3PW91, B3LYP, B3P86, BHandHLYP, B971, B1B95. Sprawdzono także możliwości zastosowania rachunku zaburzeń drugiego rzędu w ujęciu Møllera-Pleseta MP2. W ramach prowadzonych prac zbadano również zależność dokładności obliczeń od zastosowanej bazy funkcyjnej orbitali atomowych. Przetestowano następujące bazy: dla atomu Pt: LANL2DZ oraz Stuttgart ECP RSC 1997; dla pozostałych atomów: 6-31G**, 6-311G**, 6-31++G**, 6-311++G**, cc-pVTZ. Dla badanych kompleksów obliczono teoretyczne widma NMR metodą GIAO-CHF oraz rozkład ładunku elektronowego metodą NBO. Wyniki obliczeń zostały następnie porównane z dostępnymi danymi eksperymentalnymi dla obu zastosowanych związków referencyjnych.

Na podstawie przeprowadzonych obliczeniowych badań walidacyjnych wytypowano trzy funkcjonały DFT: MPW1PW91, OPW91 oraz SVWN5, dające najlepszą zgodność z danymi eksperymentalnymi. Jako kryteria zgodności brano pod uwagę zarówno długości wiązań i wartości kątów, jak i rozmieszczenie ładunku elektronowego w molekułę odzwierciedlane w widmach NMR. Obliczenia wykonane za pomocą różnych baz funkcyjnych pozwoliły wybrać jako optymalne bazy Stuttgart ECP RSC 1997 (dla Pt) oraz 6-311G** (dla pozostałych atomów). Stosując obliczenia DFT z funkcjonałem MPW1PW91 uzyskano również bardzo dobrą korelację pomiędzy symulacją widma NMR ^1H i ^{13}C z danymi eksperymentalnymi dla $\text{Pt(II)Cl}_2\text{Hist}$. Dla uzyskania zbieżnych przesunięć chemicznych dla ^{195}Pt konieczne było podejście relatywistyczne z formalizmem ZORA.

Prognozowanie struktury kompleksu Pt(II)Cl₂(I-Hist)

Badania metodą MPW1PW91/Pt(Stutt.)/6-311G** pokazały zaskakującą zgodność pomiędzy obliczonymi długościami wiązań w kompleksie Pt(II)Cl₂(I-Hist) z długościami wiązań obserwowanymi eksperymentalnie dla kompleksu Pt(II)Cl₂(Hist) (w sytuacji pominięcia długości wiązań dla C-I i atomów H). Ponadto, zestawienie obliczonych ładunków częściowych, oszacowanych z zastosowaniem metody NBO przekonuje, że wpływ atomu jodu przyłączonego do atomu węgla C5, jest praktycznie zaniedbywalny dla wszystkich innych atomów poza C5 – różnica częściowego ładunku była nie większa niż 0.01 e. Ładunki częściowe dla atomów H(C5) i I(C5) różnią się, aczkolwiek nie w sposób drastyczny: odpowiednio 0.260 vs. 0.405. Na podstawie tych obserwacji oraz istotnej zgodności parametrów geometrycznych i ładunków częściowych dla pozostałych atomów, można wyciągnąć wniosek, że wprowadzenie atomu jodu do pierścienia imidazolowego histaminy nie wpływa zauważalnie na geometrię kompleksu, poza oczywistym wpływem na atom węgla bezpośrednio połączonego z atomem jodu, a potencjał elektrostatyczny dla obu kompleksów, PtCl₂(Hist) i PtCl₂(I-Hist), jest podobny.

Prognozowanie struktury kompleksu Pt(IV)Cl₂(Hist)₂

W badaniach nad kompleksem Pt(IV)(Hist)₂Cl₂ rozważano 4 struktury: 2 struktury *cis* (cis-anti i cis-syn), w których kąt pomiędzy dwoma atomami chloru (Cl₁–Pt–Cl₂) wynosi ok. 90° i dwa dwukleszczowe ligandy histaminowe (N^α, N₃) zajmują pozostałe cztery pozycje w kompleksie o strukturze oktaedru oraz 2 struktury *trans* (syn-trans i anti-trans), w których kąt pomiędzy atomami chloru jest bliski 180°. Te dwie struktury *trans* różnią się symetrią: syn-trans – symetria bliska C₂ i anti-trans – symetria bliska C_{2h} (lub C_i).

Obliczone różnice energii pomiędzy izomerami są względnie małe, poniżej 0.956 kcal/mol. Ponadto, różne zastosowane funkcjonały, faworyzują różne struktury. MPW1PW91/Pt(Stutt.)/6-311G** wskazuje izomer cis-anti jako najbardziej stabilny, jednakże stabilność izomeru anti-trans jest ledwie 0.119 kcal/mol niższa. Metody OPW91/Pt(Stutt.)/6-311G** i SVWN5/Pt(Stutt.)/6-311G** wskazuje na najwyższą stabilność izomeru anti-trans. Stąd konkluzja, że w przypadku kompleksów labilnych, takich jak Pt(IV)(Hist)₂Cl₂, nie można w sposób jednoznaczny wskazać najbardziej stabilnych izomerów, gdyż znalezione różnice energii są poniżej poziomu dokładności zastosowanych metod obliczeniowych. Na tej podstawie można się spodziewać, że w roztworach kompleks może występować w postaci mieszaniny izomerów, natomiast nie można wskazać

dominującej struktury w fazie krystalicznej, gdyż każda z rozważanych struktur może być stabilizowana w wyniku oddziaływań międzycząsteczkowych.

Aktywność cytotoksyczna i cytostatyczna *in vitro* kompleksów platyny z histaminą

Praca II. Garnuszek P, Licińska I, Skierski JS, Koronkiewicz M, Mirowski M, Wiercioch R, Mazurek AP. Biological investigation of the platinum(II)-[*I]iodohistamine complexes of potential synergistic anti-cancer activity. *Nuclear Medicine and Biology*. 2002;29(2):169-175.

Praca IV. Garnuszek P, Maurin M, Skierski JS, Koronkiewicz M, Witowska-Jarosz J. Synthesis and Preliminary Evaluation of the New Water-Soluble Radioactive Platinum(IV) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2004;98(3):553-559.

Aktywność cytotoksyczna kompleksów

Badania własne aktywności cytotoksycznej *in vitro* dla opracowanych kompleksów platyny z histaminą, przeprowadzone na kilku liniach komórek nowotworowych wykazały, iż nieradioaktywne kompleksy platyny(II) i (IV) charakteryzują się około dwukrotnie niższą cytotoksycznością niż cisplatyna w stosunku do komórek MCF-7 i COLO-205, i ponad 4-krotnie niższą cytotoksycznością w stosunku do komórek raka płuc H460 (Tabela 1). Badania z zastosowaniem radioaktywnego kompleksu Pt(II)Cl₂[¹²⁵I]Hist pokazały podwyższenie aktywności cytotoksycznej w porównaniu z kompleksem nieradioaktywnym. Bardzo niską lub całkowity brak cytotoksyczności obserwowano dla kompleksów w badaniach na liniach białaczkowych: HL-60, L-1210 i MOLT-4, a także w stosunku do normalnych komórek małpiej nerki (VERO).

Tabela 1. Cytotoksyczność (IC₅₀ μM) preparatów platynowych (inkubacja 48 h) badanych na kilku liniach komórkowych ludzkich nowotworów

Kompleks	MCF-7	COLO-205	H460	A549/ ATCC	HT-29	LNcap
Cis-PtCl ₂ (NH ₃) ₂	33	25	30	4.5*	17.3*	2.4*
Pt(II)Cl ₂ Histamine	55	66	135	13.8*	25.1*	10.5*
Pt(II)Cl ₂ [¹²⁵ I]Histamine	37	20	75	-	-	-
[Pt(IV)(Hist) ₂ (OH) ₂]Cl ₂	59	-	-	-	-	-

MCF-7 – human breast adenocarcinoma; COLO-205 – human colon carcinoma; H460 – human lung cancer; A49/ATCC – human lung carcinoma; HT-29 – human colon carcinoma; LNcap – human prostate adenocarcinoma.

* dane z publikacji Ye QS, Xie MJ, Liu WP, Chen XZ, Yu Y, Chang QW, Hou SQ. Synthesis, characterization and cytotoxicity of dihalogeno-platinum(II) complexes with L-histidine ligand. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2009;57(4):424-7.

Aktywność cytostatyczna kompleksów

Badania metodą cystometrii przepływowej pokazały silną, cytostatyczną aktywność kompleksu Pt(II)Cl₂(I-Hist) w stosunku do komórek gruczolakoraka okrężnicy (COLO-205). Kompleks silnie moduluje cykl komórkowy blokując przejście z fazy G1 (blok w G1), co objawia się istotnym wzrostem liczby komórek w fazie G1. W tym samym czasie obserwuje się spadek liczby komórek w fazie S i G2+M, co wskazuje na zaburzenie w funkcjonowaniu genomu. W konsekwencji obserwuje się zahamowanie proliferacji komórek i indukcję procesu apoptozy. Faza S cyklu komórkowego jest najbardziej odporną fazą na działanie radiacyjne. Dlatego też obserwowany spadek ilości komórek COLO-205 w tej fazie i obserwowany jednocześnie wzrost liczby komórek w radioczułej fazie G1 sugerują potencjalną skuteczność współniszczenia tych komórek przez kompleks platynowy i promieniowanie jonizujące.

Dla kompleksu Pt(IV) z histaminą, badania cytometryczne wykazały aktywność cytostatyczną w stosunku do komórek gruczolakoraka sutka (MCF-7), przejawiającą się w blokowaniu komórek w fazie S cyklu komórkowego. Podobne obserwacje poczyniono dla cisplatyny.

Badania *in vivo* biodystrybucji i farmakokinetyki radioaktywnych kompleksów platyny

Biodystrybucja kompleksu Pt(II)Cl₂[*I]Histamina

- Praca II. Garnuszek P, Licińska I, Skierski JS, Koronkiewicz M, Mirowski M, Wiercioch R, Mazurek AP. Biological investigation of the platinum(II)-[*I]iodohistamine complexes of potential synergistic anti-cancer activity. *Nuclear Medicine and Biology*. 2002;29(2):169-175.
- Praca V. P. Garnuszek, I. Licińska. Preliminary radiochemical and biological studies on the liposome encapsulated platinum-[¹²⁵I]iodohistamine complex. *Nucl. Med. Rev. - CEE* 5(2): 145-149 (2002).

W badaniach biodystrybucji na zdrowych szczurach (Wistar) stwierdzono lokowanie radioaktywnego kompleksu Pt(II)Cl₂[*I]Hist głównie w wątrobie (40% dawki podanej ID – *injected dose*, po 2h po iniekcji dożylniej), a także w jelitach (15 %ID). Po 24 h stężenie preparatu w wątrobie utrzymywało się na prawie niezmiennym poziomie, obserwowano natomiast klirens preparatu z innych tkanek miękkich. Wydalanie kompleksu z moczem wynosiło blisko 40 %ID po 24 h. Retencja kompleksu w nerkach była dość niska i zmniejszała się w czasie (z 3.1 do 1.8 %ID, odpowiednio po 2 i 24 h). Korzystną cechą było niskie gromadzenie w tarczycy, co świadczy o stabilności preparatu *in vivo*, a także niski poziom retencji kompleksu w zdrowej tkance mięśniowej. Generalnie, taki schemat

biodystrybucji jest podobny do obserwowanego dla cisplatyny, ale niewątpliwie korzystniejszą cechą nowego kompleksu jest jego niski poziom retencji w nerkach, a jak wiadomo nefrotoksyczność jest najpoważniejszym skutkiem ubocznym towarzyszącym chemioterapii cisplatyną.

Porównawcze badania biodystrybucji radioaktywnego kompleksu Pt(II) z [^{*}I]histaminą wykonano również na kilku mysich modelach nowotworowych (Tabela 2): heterotopowym i homotopowym modelu gruczolakoraka u myszy C3H (myszy z genetyczną predyspozycją do rozwoju raka sutka) – odpowiednio podskórny i dosutkowy przeszczep ustabilizowanych komórek 16C (wyizolowana linia komórek gruczolakoraka sutka); heterotopowym modelu po implantacji homogenizatu komórek nowotworowych pozyskanych od myszy C3H z rozwiniętym spontanicznym rakiem sutka; oraz dwóch heterotopowych modelach (przeszczep podskórny w okolicy grzbietowej): gruczolakoraka okrężnicy (C38) i raka płuc (LLC).

W badaniach na myszach po implantacji homogenizatu spontanicznego raka sutka obserwowano bardzo wysoką retencję radioaktywności we krwi (ponad 14 %ID/ml), z czym należy wiązać również wysoki poziom radioaktywności w wielu organach oraz w guzie. Po czasie 24 godzin obserwowano spadek radioaktywności w organach, ale także w guzach (3.8 %ID/g po 2h i 2.3 %ID/g po 24h). W organizmie myszy C3H z przeszczepionymi komórkami 16C (model heterotopowy) stężenie preparatu we krwi było niższe, ale za to poziom retencji kompleksu w guzach wykazywał tendencję wzrostową (narastanie z 1.7 %ID/g po 2 h do 3.2% ID/g po 24 h). Najwyższe gromadzenie w guzach obserwowano na heterotopowym modelu raka okrężnicy C57BL6(C38): 4.0 %ID/g i 3.8 %ID/g, odpowiednio po 2 i 24 h. Na wszystkich badanych mysich modelach nowotworowych zaobserwowano korzystnie wysokie stosunki gromadzenia kompleksu Pt(II)Cl₂[^{*}I]Hist w guzach nowotworowych w porównaniu do gromadzenia w zdrowej tkance mięśniowej (T/M - *tumour to muscle*), przekraczające T/M > 3, a nawet T/M > 5 (modele heterotopowe C3H(16C) i C57BL6(C38), Tabela 2).

Tabela 2. Porównanie wybranych parametrów biodystrybucyjnych kompleksu Pt(II)/[^{}I]Hist na kilku modelach nowotworowych*

Model nowotworowy	Czas po iniekcji preparatu	Gromadzenie w guzie (%ID/g)	Guz/Krew (T/B)	Guz/Mięsień (T/M)
Model heterotopowy C3H (16C)	2 h	1.7 +/- 0.1	0.6	2.2
	24 h	3.2 +/- 0.6	1.3	5.2
Model homotopowy C3H (16C)	2 h	1.4 +/- 0.3	0.4	1.8
	24 h	1.6 +/- 0.4	0.8	3.5

Model spontanicznego raka u myszy C3H	2 h	3.8 +/- 1.1	0.3	3.8
	24 h	2.3 +/- 0.8	0.5	2.6
Model heterotopowy C57BL6 (C38)	2 h	4.0 +/- 1.1	1.0	1.7
	24 h	3.8 +/- 1.7	3.2	5.5
Model heterotopowy BALB/c (LLC)	2 h	2.1 +/- 0.2	0.5	1.6
	24 h	2.9 +/- 0.4	1.7	3.1

Farmakokinetyka kompleksu $Pt(II)Cl_2[^{125}I]Histamina$

Komunikat. Garnuszek P. Biodistribution studies of the radioactive Platinum-Histamine complex. Annual Congress of the EANM Munich, Germany, 11-15 Oct. 2008. Oral presentation 461. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2008;35 (suppl. 2): S204.

Komunikat. Garnuszek P. Badania farmakokinetyki radioaktywnych kompleksów platyny z $[^{125}I]histaminą$. Referat. XII Zjazd PTMN, Wrocław 8-11 września 2010r. Problemy Medycyny Nuklearnej. 2010;24(47): 51.

Farmakokinetykę kompleksu $PtCl_2([^{125}I]Hist)$ zbadano na zdrowych myszach Swiss (samce, 18-24 g). W badaniach zastosowano trzy preparaty kompleksu o różnych aktywnościach właściwych: 6, 6.9 i 10.6 MBq/ μ mol Pt. Myszom podano dootrzewnowo następujące dawki średnie: 1.5 ± 0.2 MBq (143 ± 14 nmol Pt), 1.7 ± 0.2 MBq (247 ± 33 nmol Pt), 2.0 ± 0.2 MBq (343 ± 32 nmol Pt). Biodystrybucję i stężenie radioaktywności we krwi badano w 10 punktach czasowych, w zakresie od 10 min do 120 godz. po podaniu preparatu (n=30). Z procentowego udziału podanej dawki radioaktywności w 1 gramie krwi/tkanki (%ID/g) i aktywności właściwej preparatu, obliczono stężenia kompleksu (C_{Pt}) w przeliczeniu na nmol Pt w 1 g krwi/tkanki. Pola powierzchni (AUC) pod krzywymi stężenia-czas (C-T) i pierwszego momentu statystycznego (AUMC) obliczono metodą trapezów, a pola resztkowe oszacowano z użyciem ostatnich zmierzonych stężeń i stałych szybkości eliminacji, które wyznaczono metodą regresji nieliniowej. Średni czas przebywania preparatów w organizmie (MRT – *mean residence time*) obliczono ze stosunków AUMC/AUC.

Analiza krzywych C-T dla całkowitego stężenia kompleksu platyny we krwi wskazuje na trójfazową farmakokinetykę kompleksu, w której wyróżnić można szybką fazę dystrybucji ($t_{1/2a}$ ok. 0.4-0.7 h), fazę redystrybucji występującą po ok. 2-5 h po podaniu i fazę eliminacji ($t_{1/2b}$ ok. 22 h). Stwierdzono, że stężenie kompleksu $PtCl_2Hist$ we krwi jest liniowo zależne od dawki podanej (r^2 0.956). Średni czas przebywania kompleksu w organizmie wynosił ok. 42h. Z obliczonych AUC C-T wynika, że największe stężenie kompleksu występuje w nerkach zwierząt i jest ono 2-krotnie wyższe niż w wątrobie i 5-krotnie wyższe niż w układzie żołądkowo-jelitowym. Zależność radioaktywności wydaliny (moczu i kału) w czasie od

podania, wskazuje na dwufazowe wydalanie kompleksu ($t_{1/2}$ 0.3 h i 18.5 h), przy czym głównie z moczem (ponad 80%).

Przeprowadzone badania wskazują na liniowy charakter farmakokinetyki, zależny od dawki podanego preparatu $\text{PtCl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}$.

Biodystrybucja kompleksu Pt(IV) z $[^{131}\text{I}]\text{histamina}$

Praca IV. Garnuszek P, Maurin M, Skierski JS, Koronkiewicz M, Witowska-Jarosz J. Synthesis and Preliminary Evaluation of the New Water-Soluble Radioactive Platinum(IV) Complexes. Journal of Inorganic Biochemistry. 2004;98(3):553-559.

Badania biodystrybucji kompleksu $\text{Pt(IV)}([^{131}\text{I}]\text{histamina})_2$ na zdrowych szczurach Wistar pokazało lokowanie się kompleksu głównie w wątrobie i nerkach (odpowiednio 41 i 12 %ID po 24 h p.i.v.). W ogólności schemat biodystrybucji kompleksu był podobny do obserwowanych dla cisplatyny i innych kompleksów platynowych. W porównaniu do kompleksu $\text{Pt(II)Cl}_2[*\text{I}]\text{Hist}$, radioaktywny kompleks Pt(IV) wykazywał ok. 10-krotnie wyższe stężenie w nerkach zwierząt (9.4 vs. 0.9 %ID/g po 24h, odpowiednio dla kompleksów Pt(IV) i Pt(II)) oraz ponad 2-krotnie mniejsze wydalanie z moczem (16.3 %ID po 24 p.i.v.). Taki schemat biodystrybucji wskazuje, że wątroba i nerki są organami krytycznymi i podobnie jak w przypadku cisplatyny, można się spodziewać nefrotoksyczności ze strony tego nowego kompleksu. Obserwowana niska retencja radioaktywności w tarczycy świadczy, że radionuklid jodu jest mocno związany z kompleksem i nie dysocjuje w warunkach *in vivo*. Można jednak przypuszczać, że kompleks przechodzi biotransformację, na przykład w wyniku reakcji ze związkami tiolowymi (metionina, metalotioneiny), a powstające pochodne ulegają depozycji w nerkach.

Biodystrybucja kompleksu Pt(IV) z $[^{131}\text{I}]\text{histaminą}$ zbadana na heterotopowym modelu nowotworowym u myszy C3H z podskórnie wszczepionymi komórkami spontanicznego raka sutka, była podobna do obserwowanej w badaniach na zdrowych szczurach. Ale porównując dwie drogi podania, dożylną i dootrzewnową stwierdzono, że po podaniu dootrzewnowym gromadzenie kompleksu w wątrobie było o około 15% niższe, natomiast w guzie było wyższe niż po podaniu dożylnym (2.5 %ID vs. 1.7 %ID po 24 h). W obu przypadkach obserwacją pozytywną z punktu widzenia potencjalnego zastosowania terapeutycznego, były wzrastające stosunki stężenia kompleksu w guzie w zestawieniu do stężenia w zdrowej tkance mięśniowej (T/M) i we krwi (T/B - *tumour to blood*), sięgające nawet odpowiednio: T/M = 4.5 i T/B = 3.4.

Badania *in vivo* aktywności przeciwnowotworowej kompleksów Pt(II)[*I]histamina

Badanie na modelu przeszczepialnego raka okrężnicy (C38) u myszy C57BL6

Praca V. P. Garnuszek. *Marked Survival prolongation of Mice Bearing a Transplantable Colon Adenocarcinoma by Treatment with Radioactive Platinum- ^{125}I Histamine Complex. Preliminary Report. Nucl. Med. Rev. Cent. East Eur. 7(2), 113-116 (2004).*

Na modelu przeszczepialnego gruczolakoraka okrężnicy (C38) u myszy C57BL6 zbadano przeżywalność zwierząt leczonych (5 dootrzewnowych iniekcji co 2-3 dni) następującymi preparatami: PtCl_2Hist (sumaryczna dawka $\sum_{\text{Pt}}$ 125 $\mu\text{mol/kg}$), $\text{PtCl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}$ (sumaryczna dawka $\sum_{\text{I-125}}$ 4.2 MBq; $\sum_{\text{Pt}}$ 13 $\mu\text{mol/kg}$) i "Active/Cold" - $\text{PtCl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}/\text{PtCl}_2\text{Hist}$ ($\sum_{\text{I-125}}$ 4.2 MBq; $\sum_{\text{Pt}}$ 125 $\mu\text{mol/kg}$). Grupie kontrolnej podawano roztwór 15% dimetyloformamidu w soli fizjologicznej, który stosowany był do przygotowania roztworów kompleksów. Wyznaczono współczynniki opóźnienia wzrostu guzów (GDF) w stosunku do grup kontrolnych. Przeprowadzono analizę przeżywalności zwierząt metodą Kaplana-Meiera z zastosowaniem testu log-rank. Wyznaczono średnie przeżywalności zwierząt (MS – *median survival*), ryzyko zgonów (HR – *hazard ratio*), oraz korzyść terapeutyczną ($\text{MS}_{\text{treat}}/\text{MS}_{\text{con}}$ – *survival benefit* – stosunek median życia zwierząt leczonych i kontrolnych).

Zaobserwowano wysoką śmiertelność zwierząt w grupie kontrolnej w przeciągu jednego miesiąca od przeszczepu komórek nowotworowych (MS = 26), wynikająca zapewne z agresywnego typu nowotworu. Analiza przeżywalności wykazała najwyższe przedłużenie średniego czasu życia (MS) zwierząt leczonych preparatem nośnikowanego radioaktywnego kompleksu "Active/Cold" ($\text{MS}_{\text{treat}}/\text{MS}_{\text{con}} = 1.58$, $P < 0.005$). Dla tej grupy zaobserwowano najniższe ryzyko zgonu (HR = 0.29), podczas gdy dla zwierząt leczonych radioaktywnym kompleksem o niskim udziale chemiotoksycznego kompleksu i dla "zimnego" kompleksu PtCl_2Hist ryzyka zgonów wynosiły odpowiednio 0.45 i 0.47. Stwierdzono, że efektywność jednoczesnego leczenia chemioterapeutykiem i promieniowaniem jonizującym (Active/Cold) była odpowiednio 1.44 i 1.79 razy wyższa w porównaniu do efektywności leczenia wyłącznie "zimnym" kompleksem lub kompleksem radioaktywnym o niskim udziale czynnika chemiotoksycznego („zimnego” kompleksu).

Przeprowadzone badania w sposób jednoznaczny udowodniły znaczące podwyższenie aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* po zastosowaniu kompleksu platyny(II) o aktywności cytotoksycznej/cytostatycznej i radionuklidu emitującego radiotoksyczne promieniowanie elektronowe (elektrony Augera) o ultrakrótkim zasięgu, lecz efektywnym działaniu radiacyjnym.

Badanie aktywności przeciwnowotworowej na modelu przeszczepialnego raka sutka (mammary adenocarcinoma) u myszy C3H/W

Praca VII. P. Garnuszek, U. Karczmarczyk, M. Maurin. Antitumor activity of platinum(II) complexes with histamine and radioiodinated histamine in a transplantable murine adenocarcinoma model. Nucl. Med. Biol. 35: 605-613 (2008).

Aktywność terapeutyczną kompleksów platyny(II) z histaminą i ^3I -histaminą zbadano również na heterotopowym modelu raka sutka (mammary adenocarcinoma) u myszy C3H/W (samice, 17-23 g), wywołanym podskórnym wszczepieniem zawiesiny komórek pozyskanych od zwierzęcia, u którego nastąpił rozwój spontanicznego raka sutka. Zaplanowano trzy niezależne eksperymenty terapeutyczne, różniące się zastosowanymi dawkami badanych preparatów (PtCl_2Hist , $\text{PtCl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}$, $\text{PtCl}_2[^{131}\text{I}]\text{Hist}$, $\text{PtCl}_2\text{Hist}/\text{PtCl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}$ i $\text{PtCl}_2\text{Hist}/\text{PtCl}_2[^{131}\text{I}]\text{Hist}$), harmonogramem leczenia, jak również stopniem zaawansowania choroby nowotworowej u leczonych zwierząt doświadczalnych. *Eksperyment 1* – długoterminowe, wielodawkowe leczenie niskimi dawkami (okres leczenia 31–32 dni; 8–10 dawek, każda na poziomie ok. $0.25 \cdot \text{MTD}_{\text{Pt}}$; gdzie MTD – *maximum tolerated dose*). *Eksperyment 2* – krótkoterminowe, wielodawkowe leczenie wyższymi dawkami pojedynczymi (okres leczenia 13 dni, 4 x ok. $0.5 \cdot \text{MTD}_{\text{Pt}}$). *Eksperyment 3* – długoterminowe, wielodawkowe współleczenie mieszaniną radioaktywnych kompleksów ($^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$) o wyższej pojedynczej dawce (okres leczenia – do 33 dnia; 9 x $0.9\text{--}0.4 \cdot \text{MTD}_{\text{Pt}}$; sumaryczna dawka kompleksu platyny $\sum_{\text{Pt}} 255 \mu\text{mol/kg}$, radioaktywności $\text{I-125 } \sum_{\text{I-125}} 350 \text{ MBq/kg}$ i $\text{I-131} - \sum_{\text{I-131}} 430 \text{ MBq/kg}$).

Długoterminowe leczenie preparatami platyny(II) z histaminą i znakowaną histaminą skutkowało inhibicją wzrostu guzów w porównaniu do nieleczonej grupy kontrolnej. Najefektywniejsze i statystycznie istotne działanie przeciwnowotworowe zaobserwowano dla znośnikowanych kompleksów radioaktywnych. Współczynniki opóźnienia wzrostu guzów (GDF) obserwowane w *Eksperymentcie 1* wynosiły odpowiednio 0.4, 0.7 i 1.2 dla PtCl_2Hist , $\text{PtCl}_2\text{Hist}/\text{PtCl}_2[^{131}\text{I}]\text{Hist}$ i $\text{PtCl}_2\text{Hist}/\text{PtCl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}$. Istotnie statystycznie ($P < 0.05$) wydłużenie średniego czasu przeżycia (MS) zaobserwowano w *Eksperymentcie 2*, po leczeniu wyższymi dawkami PtCl_2Hist i $\text{PtCl}_2\text{His}/\text{PtCl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}$ (Stosunek $\text{MS}_{\text{tr}}/\text{MS}_{\text{con}}$ ok. 1.4). Nieznacznie niższą aktywność zaobserwowano dla preparatu znośnikowanego kompleksu znakowanego jodem-131 ($\text{PtCl}_2\text{Hist}/\text{PtCl}_2[^{131}\text{I}]\text{Hist}$), natomiast żadnych efektów terapeutycznych nie stwierdzono w przypadku grup zwierząt leczonych preparatami radioaktywnymi o bardzo małym udziale kompleksów nośnikowych ($\text{PtCl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}$ i $\text{PtCl}_2[^{131}\text{I}]\text{Hist}$). Z tych obserwacji wynika, że radiotoksyczność promieniowania emitowanego przez radionuklidy I-125 i I-131

jest dalece niewystarczająca do wywołania pożądanych efektów terapeutycznych u leczonych zwierząt. Zestawiając te obserwacje ze stwierdzonym w *Eksperymencie 1* istotnym zahamowaniem wzrostu guzów po zastosowaniu leczenia preparatem PtHist/Act.I-125 w porównaniu do leczenia preparatem nieradioaktywnym PtCl₂Hist (różnica średniego GDF ok. 0.8), można wnioskować, że podwyższenie efektów terapeutycznych wynika z synergii pomiędzy czynnikami chemio- i radio-toksycznymi.

Intensywne, długoterminowe leczenie preparatem zawierającym mieszaninę nieradioaktywnego kompleksu i kompleksów znakowanych I-125 i I-131 (*Eksperyment 3*), skutkowało istotną inhibicją wzrostu guzów (GDF=1.9), wydłużeniem czasu przeżycia zwierząt ($MS_{tr}/MS_{con}=1.5$, $P=0.023$) i niskim współczynnikiem ryzyka zgonu $HR = 0.32$. Zastosowana procedura intensywnego leczenia nie spowodowała wzmożonej toksyczności. Nie stwierdzono żadnych zgonów wynikających z zastosowanych dawek preparatu, a przejściowe spadki masy ciała zwierząt leczonych nie przekraczały 15%. Warto wspomnieć, iż częste aplikowanie wysokich dawek nośnikowanego radioaktywnego kompleksu mieszanego, prowadziło do uzyskania kontroli nad wzrostem nowotworu (*partial response*), ale nie doprowadziła do cofnięcia choroby nowotworowej, co mogło być wynikiem zbyt późnego rozpoczęcia leczenia zwierząt (32 dni po implantacji guzów).

Przeprowadzone badania potwierdziły skuteczność metody radio-chemioterapii przy zastosowaniu opracowanych kompleksów platyny(II) z histaminą. Stopień skuteczności terapii zależny był od zastosowanych preparatów, a najwyższą efektywność zaobserwowano dla radioaktywnych kompleksów znakowanych radionuklidem I-125, który jest emitерem elektronów Augera o ultrakrótkim zasięgu (25 elektronów Augera na rozpad).

Modyfikacje struktury i transportu ustrojowego kompleksów platyny

Zastosowanie liposomów do transportu ustrojowego radioaktywnych kompleksów platyny

Praca V. P. Garnuszek, I. Licińska. Preliminary radiochemical and biological studies on the liposome encapsulated platinum-^[125]I iodohistamine complex. Nucl. Med. Rev. - CEE 5(2): 145-149 (2002).

Racjonalne podejście do problemu opracowania terapeutycznie skutecznych kompleksów o potencjalnym znaczeniu w metodzie radio-chemioterapii, wymaga zastosowania wektorów prowadzących do specyficznej kumulacji leku w tkankach patologicznych. Bezpośredni transport leku do tkanki nowotworowej mógłby w takiej sytuacji prowadzić do zwiększenia efektywnego stężenia preparatu w guzie, a także do mniejszej kumulacji w tkankach zdrowych. Kolejną korzyścią może być potencjalna osłona kompleksu

platynowego na działanie ustrojowych czynników nukleofilnych takich jak glutation czy metalotioneiny, które m.in. odpowiedzialne są za dezaktywujące działanie na cisplatynę.

W związku ze słabą rozpuszczalnością kompleksów platyny z jodohistaminą, jak również obserwowanego znacznego gromadzenia kompleksu w wątrobie i układzie żołądkowo-jelitowym, zbadałem możliwość zastosowanie liposomów do transportu ustrojowego kompleksu $\text{Pt(II)Cl}_2[^*\text{I}]\text{Hist}$. Liposomy, sztuczne układy lipidowe, w których fosfolipidowa błona otacza kompartment wodny, stanowią obecnie coraz częściej wykorzystywany wektor do efektywnego transportu wielu substancji leczniczych, m.in. leków przeciwnowotworowych takich jak np. doksorubicyna (*Caelyx* lub *Doxil*), daunorubicyna (*Daunoxone*) i innych. Trwają również badania nad liposomalną postacią cis-platyny.

W ramach prac nad modyfikacją postaci farmaceutycznej zbadałem inkorporację kompleksu $\text{Pt(II)Cl}_2[^{125}\text{I}]\text{histamina}$ (aktywność właściwa ok. $0.5 \text{ MBq}/\mu\text{mol Pt}$) w zależności od stosunku molowego kompleksu i lipidu, oraz w zależności od metody inkubacji. Stopień inkorporacji kompleksu do liposomów monitorowałem metodami: TLC, radioelektroforezy bibułowej oraz metodą RP HPLC. Do izolacji i oczyszczania liposomalnej postaci kompleksu $\text{Pt(II)Cl}_2[^*\text{I}]\text{Hist}$ zastosowałem technikę filtracji żelowej.

Przeprowadzone badania doprowadziły do opracowania powtarzalnej metody inkorporacji kompleksu $\text{Pt(II)Cl}_2[^*\text{I}]\text{Hist}$ do liposomów z wydajnością ok. 40%. Porównawcze badania biodystrybucji w organizmie zdrowych szczurów wykazały pewne różnice w kinetyce oraz stopniu gromadzenia kompleksu $\text{Pt(II)Cl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}$ i jego postaci liposomalnej w niektórych organach, jednak ogólny schemat biodystrybucji był podobny do obserwowanego dla wolnego kompleksu. Istotne różnice dotyczą głównie prawie 2-krotnie wyższego stężenia radioaktywności w płucach oraz śledzionie zwierząt którym podano kompleks w postaci liposomów o dodatnim ładunku membrany lipidowej, co prawdopodobnie należy wiązać z powinowactwem tego typu liposomów do makrofagów. W organizmie myszy nowotworowych C3H/16C różnice w poziomie gromadzenia znacznika izotopowego obserwowano głównie po 24 godzinach po podaniu preparatów. Kompleks w postaci liposomalnej wykazywał wysoką i prawie niezmienną retencję w wątrobie i śledzionie, oraz bardzo znaczny klirens aktywności z układu żołądkowo-jelitowego i nerek. Postać liposomalna kompleksu była również szybciej usuwana z krwi, a także z organizmu wraz z moczem. W guzie retencja liposomalnej postaci kompleksu była umiarkowana i na stałym poziomie (ok. 2% ID/g), podczas gdy dla kompleksu $\text{Pt(II)Cl}_2[^{125}\text{I}]\text{Hist}$ obserwowano wzrost gromadzenia w guzach w czasie od podania (1.6 %ID/g po 2 h, 3.5 %ID/g po 24 h).

Badania nad liposomalną postacią radioaktywnego kompleksu platyny(II) nie wykazały istotnych korzyści w aspekcie pożądanej farmakokinetyki i lokalizacji preparatu w tkance nowotworowej. W badaniach zastosowałem liposomy o niezmodyfikowanej membranie, jednakże, ten typ liposomów może być wychwytywany i metabolizowany w makrofagach wątroby i śledziony. Istnieje wiele metod modyfikacji membrany liposomów ukierunkowanych na zmniejszenia powinowactwa liposomów do makrofagów, przedłużenie ich cyrkulacji w organizmie i zwiększenia gromadzenia w komórkach nowotworowych. Być może wybór jednej z metod sterycznej stabilizacji membrany lipidowej, m.in. poprzez wbudowanie łańcuchów np. glikolu-polietylenowego (tzw. *Stealth liposomes*), poprawiłoby znacząco transport ustrojowy radioaktywnych kompleksów platyny z histaminą.

Modyfikacje struktury radioaktywnych kompleksów platyny poprzez przyłączanie peptydów

Praca VIII. M. Maurin and P. Garnuszek. Radiochemical synthesis and preliminary in vivo evaluation of new radioactive Platinum complexes with Carnosine. Appl. Radiat. Isotop. 68: 317-324 (2010).

Celem badań nad modyfikacją struktury radioizotopowych kompleksów $Pt([^{*}I]Hist)L$, poprzez zastąpienie jednego ligandu (L) innym, takim jak aminokwas, reszta kwasowa czy krótki peptyd, miały na celu obniżenie gromadzenia kompleksu *in vivo* w nerkach oraz w wątrobie, jak również poprawę wchłanianości z układu pokarmowego.

W tym celu prowadzono m.in. badania nad otrzymywaniem nowych radioaktywnych kompleksów platyny z karnozyną - endogennym dipeptydem (β -alanylo-L-histydyną) o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Syntezę przeprowadzono z użyciem linkerów zawierających atom siarki: SATA (*N-succinimidyl S-acetylthioacetate*) i 2-iminotiolan (IT). Kompleks mieszany $Pt([^{125}I]Hist)(Karnozyna)$ otrzymano w wieloetapowej reakcji. Karnozynę zmodyfikowano poprzez przyłączenie linkera SATA, a bezpośrednio przed reakcją kompleksowania przeprowadzono odbezpieczenie reaktywnej grupy sulfydrylowej poprzez deacetylację z użyciem hydroksyloaminy. W końcowym etapie przeprowadzono reakcję podstawienia (stechiometria 1:1) zmodyfikowanej karnozyny do kompleksu $PtCl_2[^{125}I]Hist$. Otrzymany kompleks oczyszczano met. chromatografii żelowej (Sephadex G10). Kompleks $Pt(II)([^{125}I]Karnozyna)$ otrzymano w reakcji K_2PtCl_4 z radioaktywną karnozyną ($[^{125}I]Karnozyna$), uprzednio zmodyfikowaną przez przyłączenie wolnej grupy SH w reakcji z 2-iminotiolanem (IT).

Analizy HPLC wykazały umiarkowane tempo tworzenia nowego radioaktywnego kompleksu $Pt([^{125}I]Hist)(Karnozyna)$. Po 15 min inkubacji w temp. 20°C stwierdzono ok.

10% nowej postaci radioaktywnej, a po 20 h całkowita wydajność syntezy kompleksu mieszanego wynosiła ok. 60%. Z kolei, reakcja K_2PtCl_4 ze zmodyfikowaną $[^{125}I]$ Karnozyna-SH przebiegała bardzo szybko i już po około 2 h reakcji, obserwowano całkowity zanik reagentów i tworzenie nowego kompleksu $Pt(II)([^{125}I]Karnozyna)$ z wydajnością >95%.

Badania *in vivo* na zdrowych szczurach Wistar, pokazały różne rozmieszczenie fizjologiczne nowych kompleksów $Pt(II)([^{125}I]Hist)(Karnozyna)$ i $Pt(II)([^{125}I]Karnozyna)$ w porównaniu do referencyjnego kompleksu $PtCl_2[^{125}I]Hist$. Po 2h p.i.v. kompleks mieszany wykazywał najwyższe gromadzenie w nerkach (>5% ID/g) i bardzo szybkie wydalanie z moczem (>45 %ID). W przypadku kompleksu $Pt(II)([^{125}I]Karnozyna)$ obserwowano wysokie stężenie radioaktywności we krwi (3.5 %ID/g) i w wątrobie (>7 %ID/g), ale jednocześnie najniższe stężenie w nerkach (<1 %ID/g). Wstępne badania na szczurzym (szczury Lewis) modelu przeszczepialnego (s.c.) raka trzustki (AR42J) wykazały korzystny stosunek gromadzenia kompleksu $Pt(II)([^{125}I]Karnozyna)$ w guzie w porównaniu do zdrowej tkanki mięśniowej (T/M ok. 4). Stwierdzono także różne rozmieszczenie fizjologiczne badanego kompleksu w porównaniu do radioaktywnej karnozyny i imino-karnozyny, co świadczy o stabilności kompleksu *in vivo* i silnym skompleksowaniu karnozyny z jonem centralnym $Pt(II)$.

Przeprowadzone badania pokazały możliwość skutecznego przyłączania do rdzenia kompleksów platynowych krótkich peptydów, zmodyfikowanych poprzez wprowadzenie za pośrednictwem linkerów SATA lub 2-iminotiolanu terminalnej grupy tiolowej o wysokiej reaktywności w stosunku do jonu centralnego platyny.

Wnioski

Opracowane przeze mnie nowe radioaktywne kompleksy platyny z histaminą znakowaną powszechnie stosowanymi w medycynie nuklearnej radionuklidami jodu: I-131 i I-125, mogą stanowić grupę radiofarmaceutyków potencjalnie przydatną w metodzie radio-chemioterapii nowotworów.

W badaniach aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* na dwóch zwierzęcych modelach nowotworowych, zweryfikowałem hipotezę o zwiększonej efektywności przeciwnowotworowej terapii wieloczynnikowej, wykazując znacznie wyższą skuteczność działania opracowanych przeze mnie radioaktywnych kompleksów platyny (szczególnie znakowanych I-125 - emitерem elektronów Augera) w porównaniu do kompleksów nieradioaktywnych. W omówionych publikacjach przedstawiłem również problemy i ograniczenia związane z właściwościami opracowanych i badanych związków platynowych oraz próby ich przezwyciężenia, czego przykładem mogą być prace nad modyfikacją struktury kompleksów celem poprawy właściwości biodystrybucyjnych i przeciwnowotworowych. W ramach prac nad optymalizacją właściwości biologicznych radioaktywnych kompleksów platyny, w tym przede wszystkim poprawy biodystrybucji i zwiększenia kumulacji kompleksów w tkance nowotworowej, prowadziłem badania z użyciem nośników leku, takich jak np. liposomy. Wykonałem również próby przyłączenia do opracowanych kompleksów modelowych peptydów jako potencjalnych nośników wektorowych wykazując, iż zastosowanie odpowiednich linkerów typu 2-iminotiolan lub SATA prowadzi do kontrolowanej i wydajnej modyfikacji struktury i właściwości radioaktywnych kompleksów platyny.

Przedstawione wyniki badań, obejmujące swym zakresem: projektowanie i syntezę nowych radioizotopowych kompleksów platynowych, określenie struktury i właściwości fizyko-chemicznych, wspomagane metodami obliczeniowymi modelowania molekularnego, a także zbadanie właściwości biologicznych *in vitro* i *in vivo*, w tym przede wszystkim potwierdzenie na zwierzęcych modelach nowotworowych efektywności wieloczynnikowego leczenia nowotworów z zastosowaniem opracowanych radioaktywnych kompleksów platyny, mogą stanowić istotną pomoc przy projektowaniu leków dedykowanych do wewnętrznej radio-chemioterapii chorób nowotworowych.

5. Omówienie Pozostałych Osiągnięć Naukowo-Badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

6.07.1990 r. ukończyłem z wynikiem bardzo dobrym studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Pracę magisterską pt. „Synteza i badania fizykochemicznych właściwości metioninowych kompleksów żelaza” wykonałem w Pracowni Radiochemii i Chemii Radiacyjnej pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Samochockiej. Już w trakcie ostatniego roku studiów tj. od dn. 15.02.1990 r. rozpocząłem swoją pierwszą pracę w Pracowni Radiochemii i Chemii Radiacyjnej na Wydziale Chemii UW. Zajmowałem się opracowaniem metod syntezy i analizy kompleksów metaloorganicznych znakowanych radionuklidem ^{99m}Tc , z przeznaczeniem do scyntygraficznej diagnostyki nowotworów. Zainteresowanie radioaktywnymi związkami do diagnostyki i radioterapii mogłem następnie rozwinąć w Zakładzie Radioimmunologii Ośrodka Badawczo-Rozwojowego Izotopów POLATOM, w którym pracowałem od 15.01.1992 r. do 31.12.1995 r. W trakcie tej pracy poznałem nowe techniki izotopowe RIA i IRMA, i procesy technologiczne wytwarzania zestawów do diagnostyki *in vitro*. W Zakładzie Radioimmunologii OBRI POLATOM odpowiedzialny byłem za produkcję zestawów radioimmunodiagnostycznych do oznaczania całkowitej tyroksyny (T4) w surowicy krwi ludzkiej. Po odbyciu szkoleń w kooperującej z OBRI firmie Orion Diagnostica (Finlandia) opracowałem i wdrożyłem do produkcji nowe znaczniki do zestawów typu SPECTRIA i IRMA do diagnostyki *in vitro*: Testosteronu, Progesteronu, Estradiolu, Kortyzolu i FT4 (wolna frakcja tyroksyny).

W okresie pracy dla OBRI POLATOM uczestniczyłem w realizacji grantu badawczego (KBN Nr 412919101) dotyczącego opracowania technologii otrzymywania kompleksu samaru-153 z kwasem etylenodiaminotetrametylenofosfonowym (EDTMP), przeznaczonego do paliatywnej terapii rozsiaanych, bolesnych przerzutów nowotworowych do kośćca. Następnie zostałem koordynatorem prac zmierzających do wdrożenia radiofarmaceutyku ^{153}Sm -EDTMP do produkcji.

W styczniu 1996 r. podjąłem pracę w Zakładzie Leków Izotopowych Instytutu Leków. W Zakładzie Leków Izotopowych zajmowałem się kontrolą jakości radiofarmaceutyków, oceną dokumentacji chemiczno-biologiczno-farmaceutycznej dla rejestrowanych w Polsce nowych produktów radiofarmaceutycznych, wprowadzaniem nowych metod analitycznych do badania radiofarmaceutyków, oraz tematyką badawczą ukierunkowaną na opracowanie nowych związków znakowanych izotopami promieniotwórczymi do diagnostyki i terapii izotopowej. We współpracy z Instytutem Transplantologii Akademii Medycznej w Warszawie podjąłem się realizacji projektu dotyczącego opracowania radiofarmaceutyku do

diagnostyki przyżyciowych komórek β -Langerhansa po przeszczepie wysepek trzustkowych u pacjentów z cukrzycą typu II. Celem mojej pracy była synteza radioizotopowego preparatu farmaceutycznego bazującego na strukturze ditizonu, posiadającego zdolność chelatowania jonów cynku oraz emitującego promieniowanie gamma przez wbudowany radionuklid jodu. Przeprowadziłem syntezę nowego związku chemicznego 2,2'-dikarboksy-ditizonu. Metodami spektroskopowymi i obliczeniowymi chemii kwantowej zbadałem jego strukturę oraz właściwości fizyko-chemiczne. Zaprojektowałem i przeprowadziłem syntezę nowego radioaktywnego analogu ditizonu poprzez połączenie 2,2'-dikarboksy-ditizonu z radioaktywną [125 I]Histaminą. Określiłem czystość radiochemiczną koniugatu, jego stabilność, lipofilność, itp., a także wykazałem właściwości chelatowania jonów cynku oraz wybarwiania i znakowania wyizolowanych wysepek trzustkowych. W badaniach *in vivo* na zwierzętach doświadczalnych określiłem biodystrybucję koniugatu oraz optymalny sposób podania preparatu, prowadzący do maksymalnego gromadzenia radioaktywności w trzustce. Na modelu syngenicznego przeszczepu wysepek trzustkowych do jądra wykazałem specyficzny mechanizm gromadzenia radiofarmaceutyku w obszarze funkcjonujących komórek β -Langerhansa. Badania dotyczące znakowania ditizonu radionuklidami jodu były tematem grantu promotorskiego Nr 4 P05F 014 16 pt. „Synteza, charakterystyka fizyko-chemiczna oraz badanie przydatności w metodach diagnostyki klinicznej nowej karboksylowej pochodnej ditizonu”, kierowanego przez prof. A.P. Mazurka. Dodatkowym uwieńczeniem badań dotyczących opracowania radioaktywnych pochodnych ditizonu było uzyskanie ochrony patentowej na terytorium RP na wynalazek pt. „Nowe karboksylowe pochodne ditizonu, radioaktywne koniugaty ditizonu i histaminy i preparat farmaceutyczny” autorstwa: P. Garnuszek, I. Licińska, A.P. Mazurek, P. Fiedor. Patent nr PL 188196, 31.12.2004 WUP 12/04.

W marcu 1998 r. decyzją Rady Naukowej Instytutu Leków został otwarty mój przewód doktorski pod opieką prof. Aleksandra P. Mazurka, a 10 stycznia 2000 r. obroniłem z wyróżnieniem pracę doktorską na podstawie rozprawy „Synteza, Charakterystyka Fizyko-Chemiczna oraz Badanie Przydatności w Metodach Diagnostyki Klinicznej Nowej Karboksylowej Pochodnej Ditizonu” i uzyskałem stopień naukowy **doktora nauk farmaceutycznych**.

5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

W moich zainteresowaniach naukowych istotne znaczenie mają badania nad otrzymywaniem radiofarmaceutyków na bazie związków biologicznie czynnych m.in.:

hormonów, peptydów, przeciwciał oraz cytostatyków. Od 2000 r. uczestniczyłem w realizacji 6 grantów badawczych, w tym kierowałem dwoma projektami (KBN Nr 3 P05F 004 23: 2002-2004 i MNiSW Nr N405 020 31/0911:2006-2009). Projekty badawcze, w których brałem udział dotyczyły opracowania nowych radiofarmaceutyków, badania ich parametrów fizyko-chemicznych, losów i zachowania w ustroju, przydatności do statycznej i dynamicznej diagnostyki scyntygraficznej oraz do terapii radionuklidowej. Tematy naukowe jakie podjąłem po doktoracie dotyczyły także m.in.: badania metodami fizykochemicznymi i chemii kwantowej tautomerii jodohistaminy, analizy chromatograficznej związków biologicznie czynnych znakowanych radionuklidami, poszukiwania nowych radiofarmaceutyków opartych na morficeptynie i alfafetoproteinie do scyntygraficznej diagnostyki raka sutka, a także badań biologicznych *in vivo* nowych radiofarmaceutyków opartych na analogach bombezyny do diagnostyki i leczenia chorób nowotworów, którym towarzyszy nadekspresja receptorów dla GRP (*gastrin releasing peptide*), czy też opracowania zestawu do otrzymywania rekombinowanej interleukiny-2 znakowanej radionuklidem technetu-99m do scyntygraficznej diagnostyki blaszki miazdzykowej w tętnicach szyjnych.

5.3. Projekty badawcze:

- | | |
|------------------|--|
| Nr 412919101 | Otrzymywanie Chelatu Kwasu Etylenodiaminotetrametyleno-fosfonowego (EDTMP) z Samarem-153 i Badanie Jego Właściwości. (10.1991 - 09.1994). M. Nowak - kierownik grantu, P. Garnuszek - główny wykonawca. |
| Nr 4 P05F 014 16 | Synteza, charakterystyka fizyko-chemiczna oraz badanie przydatności w metodach diagnostyki klinicznej nowej karboksylowej pochodnej ditizonu. (1999– 10.01.2000). A.P. Mazurek - kierownik projektu promotorskiego, P. Garnuszek - główny wykonawca. |
| Nr 4 P05F 014 19 | Opracowanie strategii projektowania leków aktywnych przeciwko rakom opornym wielolekowo. (07.2000 - 06.2003). J.S. Skierski - kierownik projektu, P. Garnuszek – wykonawca. |
| Nr 3 P05F 004 23 | Badanie synergii aktywności przeciwnowotworowej <i>in vivo</i> kompleksów platyny(II) z radioaktywną [¹³¹ I/ ¹²⁵ I]jodohistaminą. (09.2002 - 09.2004). P. Garnuszek - kierownik projektu . |

- Nr 2 P05A 024 28 Opracowanie metod otrzymywania i badania ligandów receptorowych znakowanych izotopami promieniotwórczymi do diagnostyki nowotworowej, obrazowania molekularnego i terapii receptorowej. (04.2005 – 04.2008). R. Mikołajczak – kierownik projektu, P. Garnuszek - wykonawca 1.
- Nr N405 020 31/0911 Opracowanie i badanie nowych radioaktywnych kompleksów platyny o zmodyfikowanych właściwościach farmakokinetycznych. (15.09.2006-14.01.2009). P. Garnuszek - **kierownik projektu**.
- Nr 2011/03/B/ST5/02734 Badania In vitro i In vivo wpływu radiometali na zdolność obrazowania receptorów CCK2R przez znakowane analogi gastryny. (08.2012-08.2015). R. Mikołajczak – kierownik projektu, P. Garnuszek – główny wykonawca.
- Nr 178744 (NCBiR) Alternatywne metody wytwarzania ^{99m}Tc w cyklotronach medycznych. (11.2012-10.2015). R. Mikołajczak – kierownik projektu, P. Garnuszek – główny wykonawca i koordynator zadania

5.4. Staże naukowe / szkolenia naukowe

W 1994 r. odbyłem dwumiesięczne stypendium o tematyce "Medycyna Nuklearna" w Zakładzie Chemii Klinicznej Szpitala Karolinska w Sztokholmie, ufundowane przez Międzynarodową Agencję Energii Atomowej. W trakcie stypendium poznawałem różnorodne metody diagnostyczne i analityczne, system zapewnienia jakości wg ISO 9000 oraz uczestniczyłem w projekcie badawczym ukierunkowanym na opracowanie ultra czułej metody oznaczania neuropeptydów w surowicy ludzkiej.

W ramach między-instytucjonalnej współpracy naukowej, dotyczącej izotopowej diagnostyki trzustki, w 1997 r. zostałem oddelegowany na dwa miesiące do Zakładu Chirurgii Columbia University College of Physicians and Surgeons w Nowym Yorku, do pracy w zespole transplantacyjnym wysepek trzustkowych pod kierunkiem prof. Marka A. Hardy.

Ponadto, uczestniczyłem w wielu krótkoterminowych szkoleniach i kursach specjalistycznych, w tym w dużej mierze z zakresu wymagań dla laboratoriów analitycznych wg Normy ISO/EN/PN 17025 oraz szkoleniach dotyczących auditowania laboratoriów działających w ramach tej normy, w tym przede wszystkim w Oficjalnej Sieci Laboratoriów Badania Produktów Leczniczych (OMCL Network).

5.5. Członkostwo w towarzystwach naukowych i Radach Naukowych:

Członkostwo w towarzystwach naukowych:

- The European Association of Nuclear Medicine (EANM) - od 2001 do obecnie.
- The Society of Radiopharmaceutical Sciences (SRS) - od 2004 do 2010.
- Polskie Towarzystwo Medycyny Nuklearnej (PTMN) – od 2002 do obecnie.

Członkostwo w Radach Naukowych

- Rada Naukowa Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego kadencji 2003-2007 (sekretarz RN, Komisja Ekonomiczna).
- Rada Naukowa Ośrodka Badawczo-Rozwojowego Izotopów POLATOM kadencji 2004-2007 (Komisja ds. Nauki i Wdrożeń).
- Rada Naukowa Narodowego Instytutu Leków kadencji 2007-2008 (sekretarz RN, Komisja Ekonomiczna).
- Rada Naukowa Narodowego Instytutu Leków kadencji 2008-2011 (Komisja Ekonomiczna).

Moje zainteresowanie tematyką radiofarmacji i działalność naukowa w tym zakresie znalazły uznanie środowisk medycyny nuklearnej i radiofarmacji, czego wyrazem było powołanie mnie do Rady Programowej Centrum Badawczego Medycyny Nuklearnej. Jestem również członkiem Rady Programowej Krajowej Sieci Naukowej „Radiofarmacja i Medycyna Nuklearna”.

5.6. Działalność ekspercka:

Od 2004 r. do 2011 r. uczestniczyłem w pracach Podkomisji ds. Radiofarmaceutyków przy Komisji Farmakopei Polskiej. Między innymi, w ramach procesu przygotowania Farmakopei Polskiej Wyd. VII Tom I (2006) i Suplementu, współpracowałem przy przygotowaniu polskojęzycznej wersji monografii Farmakopei Europejskiej dot. produktów radiofarmaceutycznych i weryfikacji tekstów 57 monografii dla produktów radiofarmaceutycznych. Współpracowałem również przy tłumaczeniu i weryfikacji ok. 63 monografii szczegółowych i ogólnych dla preparatów radiofarmaceutycznych i innych grup leków w ramach przygotowania VIII, IX i X wydań Farmakopei Polskiej.

W listopadzie 2007 roku zostałem powołany do Grupy 14 (radioactive compounds) Ekspertów Komisji Farmakopei Europejskiej przy Europejskim Dyrektoriacie ds. Jakości

Produktów Leczniczych (EDQM) w Strasburgu, gdzie do dnia dzisiejszego uczestniczę w opracowaniu monografii szczegółowych i ogólnych dla preparatów radiofarmaceutycznych.

Byłem również Auditorem Technicznym (w zakresie analityki radiofarmaceutycznej) z ramienia Europejskiego Dyrektoriatu ds. Jakości Produktów Leczniczych (EDQM) przy Radzie Europy. Uczestniczyłem w 2 auditach laboratoriów należących do Sieci Oficjalnych Laboratoriów Kontroli Produktów Leczniczych (OMCL Network):

- Audit MJA 11/08 w The National Institute of Pharmacy (NIP), Budapest, Hungary (20-22.10.2008);

- Audit MJA 02/10 w Medicines Control Division of the Danish Medicines Agency, Copenhagen, Denmark (15-17.06.2010).

W kwietniu 2009 roku zostałem powołany przez Ministra Zdrowia na Członka Zespołu Ekspertów do opracowania programu specjalizacji w dziedzinie „Radiofarmacja” (data opublikowania programu specjalizacji RADIOFARMACJA, CMKP, Warszawa 2010).

6 września 2010 r. Minister Zdrowia powierzył mi obowiązki specjalisty w dziedzinie „Radiofarmacja” (Decyzja Nr 61/10).

5.7. Działalność edukacyjna:

W bieżącym roku, 23.04.2012, zostałem zaproszony do wygłoszenia 2 godzinnego wykładu edukacyjnego pt. „Radiofarmaceutyki – charakterystyka, zastosowanie i aspekty prawne”, w ramach specjalizacja podstawowej – Farmacja Szpitalna [III rok] – nr kursu 02/SP/12 pt. „Zadania Farmacji Szpitalnej”. Organizator: Zakład Farmacji Stosowanej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

5.8. Recenzje

- Chemotherapy (Karger): 1 recenzja,
- Nukleonika (International Journal of Nuclear Research): 11 recenzji,
- Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology (Prous Science): 1 recenzja,
- Inorganic Chemistry Communications: 1 recenzja,
- Journal of Molecular Structure THEOCHEM: 1 recenzja,
- Chemia Analityczna/Chemical Analysis: 1 recenzja,
- Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals (2011): 1 recenzja,
- Chromatographia (Springer) (2012): 1 recenzja.

6. Podsumowanie Osiągnięć Naukowo-Badawczych

Mój dorobek naukowo-badawczy obejmuje łącznie:

- 33 oryginalne prace doświadczalne: 19 prac z IF = **29,990** (298 pkt. MNiSW/KBN) oraz 14 prac z listy MNiSW (41 pkt.);
- 4 prace poglądowe - IF **2,491** (34 pkt. MNiSW);
- 1 przewodnik GMP dot. wytwarzania radiofarmaceutyków (1 pkt. MNiSW);
- 75 wystąpień na międzynarodowych i krajowych zjazdach: 41 komunikatów na zjazdach międzynarodowych, 34 na krajowych;
- 1 Patent polski nr **PL 188196**, 31.12.2004 WUP 12/04;
- współudział w opracowaniu programu specjalizacji z dziedziny Radiofarmacja (CMKP, Warszawa 2010);
- współudział przy tłumaczeniu i przygotowaniu ok. 120 tekstów monografii do polskich wydań Farmakopei Polskiej (wydania: VII, VIII, IX, X);
- 18 recenzji publikacji w czasopismach z IF;
- udział w realizacji 8 grantów badawczych finansowanych przez KBN/MNiSW/NCN/NCBiR, w tym kierowanie 2 projektami.

Łączna ilość punktów MNiSW, jaką uzyskały prace z moim udziałem, opublikowane do doktoratu (12 prac) wyniosła **54**, łączny IF = **3,630**.

Łączna ilość punktów MNiSW, jaką uzyskały prace z moim udziałem, opublikowane po uzyskaniu doktoratu (25 prac) wyniosła **320**, łączny IF = **28,851**.

Łączna ilość punktów MNiSW uzyskana w całości dorobku za publikacje wyniosła **374**, łączny IF = **32,481**.



Dr n. farm. Piotr Garnuszek

20 Listopada 2012 r.