

Dr hab. Małgorzata Dobrzyńska, prof. NIZP PZH – PIB  
Zakład Higieny Radiacyjnej i Radiobiologii  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – PIB  
ul. Chocimska 24  
00-791 Warszawa

Warszawa, 16.06.2023 r.

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Pana mgr Michała Juszcza**

**pt. „Ocena właściwości biologicznych kompleksów rutenu w badaniach *in vitro*”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem pracy jest Pani Prof. dr hab. Katarzyna Woźniak.

Ruten jest pierwiastkiem z grupy platynowców. Inny związek z tej grupy, cisplatyna od blisko 50 lat stosowana jest w leczeniu nowotworów jąder, jajników, pęcherza moczowego, głowy i szyi oraz nie drobnokomórkowego raka płuc. Występujące w terapii działanie niepożądane oraz ograniczenia odnośnie rodzajów nowotworów, które można leczyć cisplatyną spowodowały, że zaczęto poszukiwać innych aktywnych biologicznie związków, takich jak złoto, srebro, iryd czy ruten. Ruten wykazuje pożądane cechy w kontekście zastosowania go w syntezie kompleksów o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. W warunkach fizjologicznych ruten występuje głównie na dwóch stopniach utlenienia, jako Ru(II) i Ru(III), z których Ru(II) jest uznawany za najbardziej aktywny biologicznie. W terapii przeciwnowotworowej rekomendowane jest wykorzystanie kompleksów zawierających ruten Ru(III), który po wniknięciu do komórki nowotworowej zostaje zredukowany do Ru(II). Ze względu na strukturalne podobieństwo pomiędzy żelazem a rutenem, możliwe jest wiązanie się rutenu z białkami zawierającymi żelazo, szczególnie z transferyną. Ze względu na większe zapotrzebowanie na żelazo komórek intensywnie dzielących się, tym także nowotworowych zwiększa się liczba receptorów transferynowych na powierzchni tych komórek, co z kolei stwarza możliwość transportu kompleksów rutenowych do wnętrza komórek nowotworowych.

Doktorant postawił sobie za cel ocenę właściwości biologicznych 10 kompleksów zawierających ruten, które były różnicowane pod względem struktury chemicznej i obejmowały związek uwalniający tlenek węgla CORM-2, należący do klasy związków CORMs, a także nowo zsyntetyzowane kompleksy rutenu zawierające ligandy, takie jak maleimid, sukcyimid, ftalimid czy ligandy fosfoorganiczne – fosforinowe i fosforynowe. Oceny tej dokonał w warunkach *in vitro*. W ramach celów szczegółowych określił właściwości cytotoksyczne i genotoksyczne, możliwości indukcji apoptozy, zanalizował przebieg cyklu komórkowego, określił potencjał pro- i antyoksydacyjny oraz zdolności do bezpośredniej interakcji z DNA. W mojej ocenie zarówno cel główny, jak i cele szczegółowe rozprawy doktorskiej są uzasadnione i jasno sprecyzowane.

Na rozprawę doktorską mgr Michała Juszczała składa się cykl 5 prac opublikowanych w latach 2020-2023 o łącznym 5-letnim IF wynoszącym 18,711, ocenionych zgodnie z punktacją MEiN na 560 pkt. Jeden artykuł przeglądowy opublikowano w czasopiśmie polskojęzycznym, a pozostałe w angielskojęzycznych czasopismach naukowych o szerokim zasięgu. We wszystkich tych publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, co świadczy o jego znacznym wkładzie pracy podczas realizacji części doświadczalnej i powstawania manuskryptów. Udział ten został potwierdzony zamieszczonymi w rozprawie oświadczeniami współautorów. Cykl prac jest spójny tematycznie, poszczególne publikacje stanowią realizację założonych celów badawczych. Prace wiążą się ze sobą tworząc jednolitą dysertację doktorską. Dodatkowo Doktorant zamieścił w rozprawie „Skrócony opis prowadzonych prac wraz z omówieniem wyników”, składający się z podrozdziałów Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Opis wyników, Podsumowanie wyników, Wnioski, Literatura uzupełniająca, który stanowi podsumowanie informacji przedstawionych w składających się na rozprawę publikacjach.

Układ dysertacji doktorskiej oceniam, jako przejrzysty i odpowiednio przygotowany. Piśmiennictwo do każdej publikacji oraz piśmiennictwo uzupełniające zostało dobrane prawidłowo i zgodnie z bieżącym stanem wiedzy odnośnie przedstawionych tematów.

Pierwsza publikacja zatytułowana „Właściwości przeciwnowotworowe związków rutenu – NAMI-A i KP1019” opublikowana w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* jest pracą przeglądową, która stanowi odpowiednik wstępu typowej dysertacji doktorskiej. W manuskrypcie usystematyzowano dostępną wiedzę o związkach rutynowych oraz szczegółowo opisane dwa najbardziej znane, odnośnie zastosowania terapeutycznego, związki rutynowe: NAMI-A oraz KP1019. NAMI-A posiada zdolność wiązania się z kwasami nukleinowymi oraz z różnymi białkami, w tym z ferrytyną, co może

umożliwić selektywny transport NAMI-A do wnętrza komórek nowotworowych. NAMI-A posiada też właściwości antymetastatyczne, moduluje proces angiogenezy, najprawdopodobniej poprzez wiązanie tlenku azotu. Ponadto, kompleks ten obniża ekspresję metaloproteinaz MMP-2 oraz MMP-9, które degradują macierz wewnątrzkomórkową oraz selektywnie wiąże się do włókien kolagenowych, co może utrudnić proces migracji komórek nowotworowych. Z kolei kompleks KP1019 oddziałuje na białka cytozolu, indukując stres oksydacyjny. Kompleks ten posiada zdolność do indukcji uszkodzeń DNA, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym związanym z białkiem Rad9 oraz wykazuje zdolność do tworzenia adduktów z histonem H3. KP1019 wpływa także na naprawę uszkodzeń DNA, biogenezę rybosomów, sygnalizację komórkową czy też stres osmotyczny.

Druga z kolei, a jednocześnie pierwsza publikacja doświadczalna pod tytułem „DNA damage and antioxidant properties of CORM-2 in normal and cancer cells”, opublikowane w *Scientific Reports*, dotyczy oceny właściwości biologicznych kompleksu CORM-2 (ang. tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer) należącego do grupy związków uwalniających tlenek węgla – CORMs (ang. carbon monoxide-releasing molecules). Badania wykazały wzrost żywotności komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) oraz komórek HL-60 po 2 godz. inkubacji z CORM-2 w stężeniu 100  $\mu$ M. Dłuższa inkubacja komórek (24 godz.) powodowała spadek żywotności, zarówno w przypadku CORM-2, jak i iCORM-2 w stężeniu 100  $\mu$ M. Dokonano też analizy uszkodzeń DNA oraz kinetyki naprawy DNA z użyciem testu kometowego w wersji alkalicznej. W przypadku komórek PBMC nie zaobserwowano istotnego statystycznego zwiększenia uszkodzeń dla CORM-2 oraz iCORM-2 w porównaniu do kontroli. Przeciwny efekt uzyskano w przypadku komórek HL-60. Podczas inkubacji naprawczej poziom uszkodzeń DNA w komórkach PBMC dla postaci aktywnej CORM-2 zwiększał się w czasie, podczas gdy w przypadku iCORM uszkodzenia przez cały czas utrzymywały się na stałym poziomie. W komórkach HL-60 nie zaobserwowano wzrostu poziomu uszkodzeń DNA podczas inkubacji naprawczej, zarówno dla CORM-2, jak i iCORM-2. Zarówno CORM-2, jak i iCORM-2 zmniejszały poziom uszkodzeń oksydacyjnych DNA w obu typach komórek, z tym, że w przypadku CORM-2 redukcja poziomu uszkodzeń DNA była zdecydowanie większa. W przypadku komórek PBMC zaobserwowano widoczny spadek poziomu RFT indukowanych przez 1 mM nadtlenek wodoru, po pre-inkubacji z CORM-2 oraz iCORM-2. W przypadku 5 mM nadtlenku wodoru zaobserwowano wzrost poziomu RFT dla obu form związku. Bardzo silny efekt antyoksydacyjny CORM-2 zaobserwowano w komórkach HL-60. Pre-inkubacja z CORM-2 znacząco redukowa

poziom RFT powstałych w wyniku działania nadtlenu wodoru. Pre-inkubacja z iCORM-2 nie wpłynęła w sposób istotny na poziom RFT w komórkach HL-60. Zaobserwowano znaczące zwiększenie poziomu ekspresji genu HMOX1, zarówno w PBMC, jak i w komórkach HL-60 po inkubacji z CORM-2 w stężeniu 100  $\mu$ M. W przypadku PBMC zaobserwowano nieznacznie większy wzrost ekspresji po inkubacji z CORM-2, w porównaniu do iCORM-2. W komórkach HL-60 widoczna jest ponad 50% różnica w indukcji ekspresji pomiędzy CORM-2 a iCORM-2, a nominalnie ekspresja wzrosła niemal 100-krotnie dla CORM-2 i nieco ponad 40-krotnie dla iCORM-2

W kolejnej z prac doświadczanych zatytułowanej „Cytotoxicity of piano-stool ruthenium cyclopentadienyl complexes bearing different imidato ligands” opublikowanej w *Applied Organometallic Chemistry* zbadano cztery kompleksy rutenu zsyntetyzowane przez zespół Profesor Bogny Rudolf z Katedry Chemii Organicznej UŁ. Częścią wspólną wszystkich kompleksów jest obecność rutenowego rdzenia, do którego przyłączone są różne ligandy. Charakteryzują się one zróżnicowanymi właściwościami biologicznymi. Maleimid, który w postaci ligandu 17 obecny jest w kompleksie 1 wykazuje cytotoksyczne działanie względem białaczkowych komórek K562 oraz Jurkat, podczas gdy sukcyminid obecny w postaci ligandu w kompleksach 2 oraz 3 może wykazywać właściwości antyoksydacyjne. Wykazano, że najbardziej cytotoksyczny dla obu typów komórek (PBMC oraz HL-60) jest kompleks 1. Wartość IC50 dla komórek HL-60 była niemal 10-krotnie mniejsza, niż w przypadku PBMC. Kompleksy 2-4 wykazały niewielką cytotoksyczność względem komórek PBMC oraz HL-60. Maleimid był cytotoksyczny na poziomie porównywalnym do kompleksu 1, z kolei sukcyminid podobnie jak kompleksy 2 oraz 3 nie wpłynął w sposób istotny na żywotność komórek PBMC i HL-60. Analiza genotoksyczności przeprowadzona za pomocą testu kometowego w wersji alkalicznej wykazała, że związkiem o największym potencjale genotoksycznym jest kompleks 1. Indukował on uszkodzenia DNA w komórkach PBMC oraz HL-60. Kompleksy 2-4 nie wykazały właściwości genotoksycznych w komórkach PBMC oraz niewielkie w komórkach HL-60. Ligand maleimidowy indukował uszkodzenia DNA na zbliżonym poziomie jak kompleks 1, natomiast sukcyminid nie był genotoksyczny. Kompleks 1 indukował apoptozę w komórkach HL-60. Maleimid również wykazał silnie apoptogenne właściwości względem komórek HL-60. Analiza przebiegu cyklu komórkowego wykazała istotnie statystyczne zwiększenie populacji komórek w fazie sub-G1 w przypadku kompleksu 1 w stężeniu 10  $\mu$ M, co może świadczyć o wejściu komórek na drogę apoptozy. Inkubacja kompleksów rutenu z genomowym DNA nie wykazała ich zdolności do indukowania pęknięć DNA.

W trzeciej z prac doświadczalnych zatytułowanej "Activity of Ruthenium Cyclopentadienyl Complexes Bearing Succinimidato and Phthalimidato Ligands" opublikowanej w *Molecules*, oceniono właściwości antyoksydacyjne trzech kompleksów rutenu, które nie wykazały właściwości cytotoksycznych w poprzedniej publikacji. Pre-inkubacja ze wszystkimi badanymi kompleksami zwiększała żywotność komórek PBMC oraz HL-60, redukowała odsetek komórek występujących w fazie sub-G1, co świadczy o zmniejszeniu się populacji komórek apoptotycznych. Podobne właściwości wykazał sukcyrimid. Ocena genotoksyczności przeprowadzona w teście kometowym w wersji alkalicznej wykazała, że kompleksy 1-3 znacząco obniżyły oksydacyjne uszkodzenia DNA w przypadku komórek HL-60. Z kolei w przypadku PBMC, jedynie kompleks 1 obniżył poziom tych uszkodzeń DNA. Sukcyrimid zmniejszył uszkodzenia DNA jedynie w komórkach HL-60. W przypadku komórek PBMC pre-inkubacja z kompleksami 1 oraz 2 obniżyła poziom RFT, z kolei kompleks 3 oraz sukcyrimid zwiększyły poziom RFT. Odmienna sytuacja ma miejsce w przypadku komórek HL-60, w których pre-inkubacja z kompleksami 1-3 lub sukcyrimidem znacząco obniżyła poziom RFT dla nadtlenu wodoru. Ponadto, kompleksy 1 oraz 2 przywracają aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w przypadku PBMC. Wszystkie badane kompleksy przywróciły aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach HL-60. Sukcyrimid nie wpłynął na aktywność SOD w przypadku PBMC, natomiast przywrócił aktywność tego enzymu w komórkach HL-60.

W ostatniej z cyklu prac składających się na dysertację pt. „Piano-stool ruthenium(II) complexes with maleimide and phosphine or phosphite ligands: synthesis and activity against normal and cancer cells” opublikowanej w *Dalton Transactions*, skupiono się na pięciu nowych kompleksach rutenu, które zawierają rutenowy rdzeń oraz ligand maleimidowy. Dołączono do nich ligandy fosforoorganiczne. Badania żywotności wykazały, że kompleksy 1, 2a oraz 3a charakteryzują się ponad 10-krotnie mniejszymi wartościami IC50 dla komórek HL-60 w porównaniu do PBMC. Z kolei kompleksy 2b, 3b oraz 3c wykazywały zbliżone wartości IC50 dla obu typów komórek. W przypadku komórek HL-60/DR (opornych na doksorubicynę) efekt cytotoksyczny kompleksów był wyraźnie mniejszy niż w przypadku komórek HL-60. Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano kompleksy 1, 2a oraz 3a. Ocena genotoksyczności wykazała, że kompleksy te indukują uszkodzenia DNA w komórkach HL-60. W przypadku komórek PBMC efekt genotoksyczny wykazał jedynie kompleks 1. Żaden z kompleksów nie indukował uszkodzeń DNA w komórkach HL-60/DR. Kolejny aspekt analizy genotoksyczności kompleksów rutenu dotyczył możliwości bezpośredniego oddziaływania z DNA. Wszystkie badane kompleksy indukowały

jednociowe pęknięcia DNA. W przypadku kompleksu 3c stwierdzono możliwość indukcji dwuniciowych pęknięć DNA. Ponadto, kompleksy 1, 2a oraz 3a w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  indukowały apoptozę w komórkach HL-60. Wykazano także, że kompleksy rutenu 1, 2a oraz 3a w sposób znaczący zwiększyły aktywność kaspaz 3/7. Kompleksy 1, 2a oraz 3a nie indukują RFT w czasie 2 godz. inkubacji, co wyklucza indukcję RFT jako mechanizmu odpowiedzialnego za cyto- oraz genotoksyczność badanych kompleksów rutenu. Przeprowadzono także dokowanie molekularne, które miało na celu sprawdzenie możliwości przyłączania się kompleksów rutenu do DNA. Badania wykazały większy potencjał kompleksów rutenu do wiązania się z uszkodzonym DNA.

Dysertacja doktorska została przygotowana starannie. Doktorant wykazał dobrą znajomość metod badawczych i umiejętności posługiwania się nimi podczas planowania doświadczeń i w realizacji założonego celu badawczego. Autor sprawnie posługuje się specjalistyczną terminologią naukową. Właściwie przedstawił i wnikliwie przeanalizował wyniki, logicznie je zinterpretował, a następnie krytycznie przedyskutował porównując z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, co świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym i dojrzałości badacza. Przedstawiona do oceny praca doktorska świadczy o dobrej znajomości problematyki podjętej przez Doktoranta. Autor udowodnił, że jest w stanie opublikować wyniki badań w czasopismach naukowych o szerokim zasięgu. Jest zatem przygotowana do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant sformułował 5 logicznych wniosków, które znajdują potwierdzenie w wynikach przedstawionych badań:

- Kompleksy rutenu w zależności od ligandów wykazują szereg właściwości biologicznych w komórkach prawidłowych PBMC i nowotworowych HL-60.
- Tlenek węgla uwalniany z kompleksu CORM-2 odpowiada za właściwości antyoksydacyjne tego związku.
- Kompleksy rutenu zawierające ligand maleimidowy wykazują znacznie silniejsze właściwości cyto- oraz genotoksyczne w porównaniu do kompleksów zawierających ligand sukcydimidowy i ftalimidowy.
- Kompleksy rutenu zawierające ligand sukcydimidowy i ftalimidowy wykazują właściwości antyoksydacyjne w komórkach prawidłowych PBMC i nowotworowych HL60
- Dwa kompleksy rutenu zawierające ligand maleimidowy oraz ligandy fosforoorganiczne – fosfinowy  $\text{CpRu}(\text{CO})(\text{PPh}_3)(\eta^1\text{-N-maleimidato})$  (kompleks 2a) i fosforynowy  $\text{CpRu}(\text{CO})(\text{P}(\text{OEt})_3)(\eta^1\text{-N-maleimidato})$  (kompleks 3a) są cyto-i genotoksyczne jedynie dla komórek HL-60.

Z obowiązku recenzenta muszę przedstawić również uwagi krytyczne dotyczące ocenianej dysertacji. Nie ma ich jednak dużo. Doktorant kończy podsumowanie wyników stwierdzeniem, że różnorodność efektów biologicznych wykazywanych przez badane kompleksy rutenu skłania do prowadzenia dalszych badań w dwóch niezależnych kierunkach: analizy aktywności przeciwnowotworowej oraz oceny potencjału antyoksydacyjnego. Szkoda, że w tym miejscu nie znalazł się kilkuzdaniowy opis przybliżający potencjalne zastosowanie badanych kompleksów, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania ich w terapii przeciwnowotworowej. Ponadto, zauważyłam kilka drobnych błędów edytorskich i stylistycznych.

Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają oczywiście wartości merytorycznej rozprawy, którą oceniam wysoko.

Analizując całokształt dorobku naukowego Doktoranta warto podkreślić jego dużą aktywność naukową. Oprócz publikacji wchodzących w skład rozprawy jest współautorem 8 manuskryptów, w jednej z tych prac jest pierwszym autorem. Jeśli chodzi o punktację tych prac to przedstawia się ona następująco: IF=30,853 i 680 pkt MEiN. Mgr Michał Juszcak jest również współautorem 11 doniesień na konferencje naukowe. Na jednej z konferencji otrzymał nagrodę za najlepszy poster.

Reasumując stwierdzam, że dysertacja doktorska Pana mgr Michała Juszcaka pt. „Ocena właściwości biologicznych kompleksów rutenu w badaniach *in vitro*” ma charakter innowacyjny, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i może stanowić podstawę do dalszych badań nad wykorzystaniem kompleksów rutenu w terapii przeciwnowotworowej.

Z przyjemnością i satysfakcją stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska Pana mgr Michała Juszcaka spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668). Dlatego zwracam się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Michała Juszcaka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Równocześnie, ze względu na wysoką wartość poznawczą pracy, szeroki zakres i wysoką jakość przeprowadzonych badań, wysoki poziom merytoryczny rozprawy, jak również opublikowanie wyników w renomowanych czasopismach z listy JCR (łącznie IF=18,711), co wskazuje, że manuskrypty zostały wnikliwie ocenione przez międzynarodowych ekspertów i zyskały ich akceptację, składam do Wysokiej Komisji

Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wniosek formalny o wyróżnienie pracy.

p.o. KIEROWNIKA ZAKŁADU  
Higieny Radiacyjnej i Radiobiologii  
NIZP PZH-PIB  
  
dr hab. n. med. Małgorzata Dobrzyńska