



Politechnika Łódzka



Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Dr hab. Adriana Nowak, prof. PŁ
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul. Wólczańska 171/173
90-530 Łódź

Łódź, 06.06.2023 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Michała Juszcza

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

wykonanej w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii

Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

w dyscyplinie nauki biologiczne

pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Woźniak

Oceny pracy dokonano na podstawie decyzji Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne podjętej na posiedzeniu w dniu 25 kwietnia 2023 r., podpisanej przez Przewodniczącą Komisji – prof. dr hab. Agnieszkę Marczak.

Uzasadnienie podjęcia temat

Poszukiwanie nowych, aktywnych biologicznie związków chemicznych przeciwdziałających tzw. chorobom cywilizacyjnym wydaje się najważniejszym wyzwaniem współczesnej medycyny oraz nauk biologicznych. Jednymi z nich są kompleksy zawierające różne metale, w tym ruten. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena właściwości biologicznych nowych kompleksów rutenu w warunkach *in vitro*. Podjęcie badań w danej tematyce uważam za wysoce uzasadnione.

Formalna ocena pracy

Praca doktorska p. Michała Juszczaaka stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie pięciu publikacji naukowych: jednej przeglądowej w języku polskim oraz czterech doświadczalnych w języku angielskim, zgodny z wymaganiami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, który składa się z następujących artykułów:

1. **Juszczak M**, Kluska M, Wysokiński D, Woźniak K. (2020) Właściwości przeciwnowotworowe związków rutenu – NAMI-A i KP1019. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 74:12-19.
IF: 0,878; IF 5-letni: 1,049; 40 pkt. MEiN
2. **Juszczak M**, Kluska M, Wysokiński D, Woźniak K. (2020) DNA damage and antioxidant properties of CORM-2 in normal and cancer cells. *Scientific Reports* 10(1):12200.
IF: 4,379; IF 5-letni: 5,133; 140 pkt. MEiN
3. **Juszczak M**, Kluska M, Kosińska A, Palusiak M, Rybarczyk-Pirek AJ, Wzgarda-Raj K, Rudolf B, Woźniak K. (2022) Cytotoxicity of piano-stool ruthenium cyclopentadienyl complexes bearing different imidato ligands. *Applied Organometallic Chemistry* 36(4):e6595.
IF: 4,105; IF 5-letni: 3,515; 100 pkt. MEiN
4. **Juszczak M**, Kluska M, Kosińska A, Rudolf B, Woźniak K. (2022) Antioxidant Activity of Ruthenium Cyclopentadienyl Complexes Bearing Succinimidato and Phthalimidato Ligands. *Molecules* 27(9):2803.
IF: 4,927; IF 5-letni: 5,110; 140 pkt. MEiN
5. **Juszczak M**, Das S, Kosińska A, Rybarczyk-Pirek AJ, Wzgarda-Raj K, Tokarz P, Vasudevan S, Chworos A, Woźniak K, Rudolf B. (2023) Piano-stool ruthenium(II) complexes with maleimide and phosphine or phosphite ligands: synthesis and activity against normal and cancer cells. *Dalton Transactions* 52(13)4237-4250.
IF: 4,569; IF 5-letni: 3,904; 140 pkt. MEiN

Wszystkie publikacje to prace w czasopismach z listy JCR powstałe w latach 2020-2023 o łącznym 5-letnim współczynniku *Impact Factor* 18,711 (wg listy z 2022 r.) i **560 punktach MEiN**. Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach, w żadnej nie jest autorem korespondencyjnym. Udział Doktoranta w powstanie jednolitego tematycznie zbioru

pięciu publikacji oceniam jako wysoki i dominujący. Obejmuje on wszystkie etapy pracy naukowej polegającej na współtworzeniu koncepcji prac, planowaniu i prowadzeniu głównej części eksperymentalnej (przede wszystkim hodowli i/lub izolacji linii komórkowych i wykonywanych na nich testów), poprzez opracowywanie wyników, analizę literatury, przygotowanie wykresów oraz współdziałanie w pisaniu każdego manuskryptu. We wszystkich publikacjach Doktorant jest autorem wiodącym, co zostało potwierdzone dołączonymi do pracy oświadczeniami Współautorów.

Cała praca doktorska Pana Michała Juszcza liczy 133 strony wydruku komputerowego oraz oświadczenia współautorów. Cykl publikacji uzupełniono o 32-stronicowe polskojęzyczne opracowanie autorskie Pana Michała Juszcza pt.: „*Ocena właściwości biologicznych kompleksów rutenu w badaniach in vitro*”. W niniejszym opracowaniu Doktorant przedstawił wykaz publikacji stanowiących osiągnięcia naukowe oraz skrócony opis przeprowadzonych prac zawierający: wstęp, cel pracy, materiały i metody, opis wyników, podsumowanie wyników, wnioski oraz spis literatury uzupełniającej. Tytuł został sformułowany prawidłowo. We wstępie Doktorant zwięźle przedstawił uzasadnienie podjęcia tematu pracy. Cel ogólny oraz cele szczegółowe zostały sformułowane w sposób prawidłowy. Nie znalazłam w opracowaniu jasno określonej hipotezy badawczej. Doktorant zwięźle zaprezentował zastosowaną metodologię (m.in. PCR w czasie rzeczywistym przy pomocy sond TaqMan do określenia względnego poziomu mRNA, test redukcji resazuryny, test kometowy w wersji alkalicznej, test Caspase-Glo 3/7 Assay kit, wykorzystanie sondy H₂DCF-DA do określania RFT, test SOD Assay Kit-WST), osiągnięcia badawcze, podsumowanie wyników oraz wnioski. Spis literatury (35 pozycji) jest związany z tematyką prac będących podstawą rozprawy doktorskiej. Całość kończy rzeczowo zredagowane streszczenie w języku polskim i angielskim. Do opracowania autorskiego dołączono kopie publikacji przedstawionych do oceny. W opracowaniu zaprezentowano także pozostały dorobek naukowy Doktoranta, tj. 8 współautorskich artykułów opublikowanych w latach 2018-2022: 7 oryginalnych w języku angielskim i 1 przeglądowego w języku polskim (ze streszczeniem w języku angielskim). Są to publikacje z listy JCR, których sumaryczny 5-letni *Impact Factor* wynosi 31,941 wg listy z 16 sierpnia 2022 r. oraz 680 pkt. MEiN. Doktorant jest również współautorem 11 komunikatów konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym i krajowym. **Sumaryczny 5-letni *Impact Factor* całego dorobku naukowego Doktoranta to 50,652 (wg listy z 16 sierpnia 2022 r.) oraz 1240 pkt. MEiN.** Według bazy Web of Science liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) wynosi 54 (stan z 15.05.2023 r.), a wartość indexu Hirscha 5. Przedstawione do oceny osiągnięcia świadczą o ciągłym pogłębianiu warsztatu naukowego Doktoranta. Opracowanie

autorskie zostało przedstawione w sposób staranny, choć zawiera kilka drobnych usterek technicznych, na przykład na str. 6 nieprawidłowo wyliczono punkty IF pozostałego dorobku naukowego Doktoranta (tzn. jest suma IF: 30,853; IF 5-letni: 32,493, a powinno być: IF: 30,901; IF 5-letni: 31,941), jednakże w żaden sposób nie wpływa to na jakość pracy przedstawionej do oceny.

Badania realizowane w niniejszej rozprawie doktorskiej Doktorant wykonywał w zakresie dotacji celowej służącej rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, we współpracy z Katedrą Chemii Organicznej oraz Katedrą Chemii Fizycznej Wydziału Chemii UŁ, a także z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi.

Ocena merytoryczna pracy

Główną częścią rozprawy doktorskiej jest zbiór pięciu współautorskich artykułów naukowych, które zostały wcześniej poddane procesowi recenzowania naukowego.

W publikacji nr 1 (przeglądowej) pt.: „Właściwości przeciwnowotworowe związków rutenu – NAMI-A i KP1019” opublikowanej w *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2020, 74:12-19 (IF 5-letni: 1,049) Doktorant opracował koncepcję rozprawy doktorskiej dokonując opisu dotychczasowego stanu wiedzy na temat związków rutenowych, ze szczególnym uwzględnieniem dwóch najszerzej zbadanych pod kątem ich zastosowania terapeutycznego, tj. NAMI-A oraz KP1019.

W publikacji (doświadczalnej) **nr 2** pt.: „DNA damage and antioxidant properties of CORM-2 in normal and cancer cells” opublikowanej w *Scientific Reports* 2020, 10(1):12200 (IF 5-letni: 5,133) Doktorant dokonał oceny właściwości biologicznych kompleksów CORM-2 oraz iCORM-2. Badania te obejmowały analizę żywotności zdrowych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) oraz komórek ostrej białaczki promielocytowej (HL-60) testem redukcji rezasuryny, analizę uszkodzeń DNA (również oksydacyjnych) oraz kinetyki naprawy DNA z zastosowaniem wersji alkalicznej testu kometowego, ocenę poziomu RFT za pomocą sondy H₂DCF-DA, a także określenie poziomu ekspresji genu *HMOX1* kodującego oksygenazę hemową 1 zaangażowaną w odpowiedź antyoksydacyjną komórek. Doktorant wykazał m.in., że oba związki powodowały spadek żywotności komórek po 24h ekspozycji, istotnie statystyczny wzrost uszkodzeń DNA w komórkach HL-60, znaczną różnicę w poziomie uszkodzeń DNA indukowanych w obu typach komórek przez badane związki po inkubacji naprawczej, zmniejszenie poziomu uszkodzeń oksydacyjnych DNA w obu typach komórek oraz spadek poziomu RFT w przypadku komórek PBMC.

Kolejna **publikacja** (doświadczalna) **nr 3** pt.: „Cytotoxicity of piano-stool ruthenium cyclopentadienyl complexes bearing different imidato ligands” opublikowana w *Applied Organometallic Chemistry* 2022, 36(4):e6595 (IF 5-letni: 3,515) dotyczy badania właściwości biologicznych czterech kompleksów rutenu z zastosowaniem tych samych linii komórkowych. Badania obejmowały ocenę ich cytotoksyczności (określenie wartości IC_{50}) i genotoksyczności oraz zdolności do indukcji apoptozy. Doktorant wykazał m.in., iż kompleks 1 jest najbardziej cytotoksyczny dla obu typów komórek, jednakże w komórkach HL-60 powodował 10-krotnie wyższą cytotoksyczność, niż w komórkach PBMC. Kompleks 1 okazał się również najbardziej genotoksyczny dla obu typów komórek. Jednakże w komórkach nowotworowych HL-60 uszkodzenia DNA obserwowane były już od stężenia badanego $2,5 \mu\text{M}$, podczas gdy w komórkach zdrowych PBMC uszkodzenia DNA zaobserwowano dopiero w stężeniu 10-krotnie wyższym ($25 \mu\text{M}$). Kompleks 1 indukował również apoptozę w komórkach HL-60.

W **publikacji** (doświadczalnej) **nr 4** pt.: „Antioxidant Activity of Ruthenium Cyclopentadienyl Complexes Bearing Succinimidato and Phthalimidato Ligands” opublikowanej w *Molecules* 2022, 27(9):2803 (IF 5-letni: 5,110) Doktorant poddał ocenie właściwości antyoksydacyjne trzech kompleksów rutenu tj. 1, 2 i 3 oraz sukcyimidu, których wybór do dalszych badań uzasadnił. Przed eksperymentami dokonywał preinkubacji komórek z kompleksami, a następnie inkubacji z nadtlenkiem wodoru jako induktorem stresu oksydacyjnego. Doktorant dowiódł, iż zastosowana preinkubacja w sposób istotny statystycznie zwiększała żywotność badanych komórek oraz istotnie statystycznie zmniejszała populację komórek apoptotycznych. Genotoksyczność oraz poziom indukowanych RFT zmieniały się w zróżnicowany sposób i zależały od badanego związku, jego stężenia oraz linii komórkowej. Wszystkie badane związki przywracały aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach HL-60.

W kolejnej **publikacji** (doświadczalnej) **nr 5** „Piano-stool ruthenium(II) complexes with maleimide and phosphine or phosphite ligands: synthesis and activity against normal and cancer cells” opublikowanej w *Dalton Transactions* 2023, 52(13)4237-4250 (IF 5-letni: 3,904) Doktorant skupił się na badaniu aktywności biologicznej 5 innych/nowych kompleksów rutenu oznaczonych jako 2a, 2b, 3a, 3b oraz 3c. Oprócz wcześniej wymienionych linii komórkowych do badań włączono zmodyfikowaną linię komórek białaczkowych HL-60, tj. HL-60/DR oporną na doksorubicynę. Zastosowane kompleksy wykazywały zróżnicowaną cytotoksyczność, genotoksyczność, zdolność do indukcji apoptozy oraz RFT wobec badanych linii komórkowych.

Analiza aktywności biologicznej nowych kompleksów rutenu przeprowadzona przez Doktoranta umożliwiła wyselekcjonowanie związków o potencjale przeciwnowotworowym wobec komórek HL-60 oraz kompleksów o potencjale antyoksydacyjnym. Doktorant przeanalizował i przedyskutował uzyskane wyniki w świetle badań innych autorów, co świadczy o dużej wiedzy w dyscyplinie nauk biologicznych oraz umiejętności Doktoranta do prowadzenia pracy naukowej. Metody badawcze zastosowane przez Doktoranta zostały dobrane odpowiednio, umożliwiając realizację celów i założeń prac doświadczalnych wchodzących w skład cyklu publikacji. Wyniki zostały omówione w sposób zwięzły i przejrzysty. Całość opracowania wieńczy ponad 2-stronicowe podsumowanie wyników. Doktorant prawidłowo sformułował również 5 wniosków końcowych.

Reasumując, wyniki uzyskane przez Doktoranta wnoszą nowe informacje na temat aktywności biologicznej kompleksów rutenu wobec komórek prawidłowych i nowotworowych, są wartościowe zarówno pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym. Przedstawioną do oceny pracę przeczytałam z dużym entuzjazmem. Przedłożony do recenzji cykl publikacji jest spójny i stanowi oryginalne rozwiązanie określonego problemu. Uważam, iż cel naukowy został zrealizowany. **Rozprawę doktorską oceniam pozytywnie.**

Uwagi i pytania

1. Uważam, że Doktorant słabo podkreślił innowacyjność podjętych badań, zarówno w publikacjach, jak i w opracowaniu.
2. Nie znalazłam w opracowaniu wyraźnie zarysowanej hipotezy badawczej. Proszę o ustosunkowanie się Doktoranta do tej uwagi.
3. Dlaczego do badań Doktorant wybrał komórki krwi?
4. Dotyczy komentarza do publikacji nr 2 na str. 15. Doktorant zauważa, iż „zaobserwowano wzrost żywotności komórek po 2 godz. inkubacji z CORM-2 w stężeniu 100 μ M dla obu rodzajów komórek”. Jak można wytłumaczyć wzrost żywotności komórek?
5. W aspekcie aplikacyjnym, który związek/kompleks jest najbardziej obiecujący w świetle przeprowadzonych badań? Czy synteza chemiczna takich związków jest opłacalna?
6. Jaka jest przyszłość podjętych badań? Czy będą one kontynuowane?
7. Na str. 6 nieprawidłowo wyliczono punkty IF pozostałego dorobku naukowego Doktoranta, tzn. jest suma IF: 30,853 oraz IF 5-letni: 32,493, a wg moich kalkulacji

powinno być: IF: 30,901 oraz IF 5-letni: 31,941. Proszę o ustosunkowanie się Doktoranta do tej uwagi.

Wnioski końcowe

Praca doktorska Pana mgr Michała Juszczaaka podejmuje niezwykle ważny temat dotyczący poszukiwania nowych substancji terapeutycznych o charakterze przeciwnowotworowym, a z drugiej strony o silnym potencjale antyoksydacyjnym. Praca zawiera wiele elementów innowacyjności, ponadto ma charakter nie tylko poznawczy, ale w przyszłości również aplikacyjny. Według wiedzy Recenzentki, po przeanalizowaniu bazy PubMed, temat badań podjęty przez Doktoranta w takim układzie eksperymentalnym jest unikatowy i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

W mojej opinii przedstawiony do recenzji zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie pięciu artykułów naukowych spełnia wymagania merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187 (Dz.U. z 2022 r., poz. 574).

Zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr Michała Juszczaaka do dalszych etapów w postępowaniu doktorskim.

Wniosek o wyróżnienie

Praca doktorska Pana Michała Juszczaaka jest nowatorska, cechuje się wysoką jakością badań, metod i narzędzi badawczych zarówno na poziomie komórkowym, jak i molekularnym. Potwierdzeniem warsztatu badawczego Doktoranta jest cykl 5 bardzo dobrych publikacji w czasopismach znaczących w dyscyplinie nauk biologicznych i im pokrewnych, w których Doktorant jest pierwszym autorem z dominującym udziałem. Na szczególne wyróżnienie zasługuje artykuł opublikowany w *Scientific Reports* (publikacja nr 2) wydawnictwa *Nature Publishing Group*, które wydaje jedno z najbardziej prestiżowych i wyspecjalizowanych czasopism naukowych na świecie (IF 5-letni: 5,133). Również publikacje nr 3 i nr 5 ukazały się odpowiednio w czasopismach *Applied Organometallic Chemistry* (IF: 3,515) oraz *Dalton Transactions* (IF 5-letni 3,904) wydawanych przez prestiżowe wydawnictwa, tj. *John Wiley & Sons Inc.* oraz *Royal Society of Chemistry*. Nowatorski i aplikacyjny charakter badań oraz szczegółowa ocena pracy zawarta w przedłożonej recenzji są podstawą do złożenia wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Michała Juszczaaka.

Wnioskuje zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie zaprezentowanej mi do oceny rozprawy doktorskiej Pana mgr Michała Juszcza pt.: „*Ocena właściwości biologicznych kompleksów rutenu w badaniach in vitro*”.



dr hab. Adriana Nowak, prof. PŁ