

Łódź dn 16.06.2023

Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzeziańska-Lasota

Zakład Biomedycyny i Genetyki

Katedra Biologii i Mikrobiologii Medycznej UM w Łodzi

Ocena

pracy doktorskiej mgr Michała Juszcza

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

Praca doktorska wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej

Instytutu Biochemii UŁ

pod kierunkiem

prof. dr hab. Katarzyny Woźniak

Z opublikowanych jak dotąd wyników badań dotyczących właściwości biologicznych różnych kompleksów rutenu wynika, że mogą one oddziaływać na komórki na różnych etapach transformacji nowotworowej. W zależności od struktury i właściwości fizykochemicznych kompleksów rutenu mogą one zmieniać potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych, ich właściwości adhezyjne, zdolność komórek nowotworowych do apoptozy czy zwiększać ich przenikanie ze światła naczyń krwionośnych/limfatycznych do otaczających tkanek. Obserwowane efekty biologiczne kompleksów rutenu, mają związek z modulowaniem szeregu procesów biologicznych, kluczowych w transformacji nowotworowej takich jak m. in wpływ na procesy przejścia epitelialno-mezenchymalnego (*epithelial-mesenchymal transition* — EMT)/ czy mezenchymalno-epitelialnego (*mesenchymal-epithelial transition* —MET), które warunkują plastyczność komórek nowotworowych, ich migrację oraz potencjał przerzutowania. Co ważne, kompleksy rutenu mają zdolność oddziaływania na mikrośrodowisko guza.

Dzięki powyższym antynowotworowym właściwościom metalofarmaceutyków, w tym rutenu, możliwe będzie opracowanie skuteczniejszych terapii w dawkach znacznie ograniczających cytotoksyczność. Pomimo iż eksperymenty *in vitro* mają szereg ograniczeń a ich wyniki powinny być zweryfikowane w eksperymentach *in vivo*, i ostatecznie w badaniach klinicznych, mnogość procesów biologicznych, które kompleksy rutenu zdolne są modyfikować, czynią je potencjalnymi celami terapeutycznymi, interesującymi kandydatami do projektowania nowych leków przeciwnowotworowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Michała Juszcza jest wynikiem badań realizowanych we współpracy z Katedrą Chemii Organicznej UŁ, Katedrą Chemii Fizycznej UŁ oraz Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Na dysertację mgr Michała Juszcza składa się cykl 5-ciu prac spójnych tematycznie, w skład którego wchodzi jedna publikacja przeglądowa napisana w języku polskim oraz 4 prace naukowe oryginalne, napisane w języku angielskim i opublikowane w recenzowanych pismach o zasięgu międzynarodowym. Wszystkie artykuły naukowe są opracowaniami zbiorowymi, gdzie Doktorant jest pierwszym autorem pracy. Współczynnik oddziaływania (IF) prac wchodzących w skład dysertacji wynosi IF: 18,858; a punktacja MNiSW wynosi 560 pkt. W pracy doktorskiej, Doktorant dokonał oceny właściwości biologicznych w warunkach *in vitro* 10 zróżnicowanych pod względem struktury chemicznej kompleksów rutenu, w tym nowo zsyntetyzowanych kompleksów rutenu, zawierających ligandy, takie jak maleimid, sukcyrimid, ftalimid czy też ligandy fosforoorganiczne i fosforynowe.

Rozprawa liczy 132 strony i ma **typowy układ**. Składa się ze wstępu (str. 8), celu pracy (str. 10), materiałów i metod (str. 10-11), opisu wyników (str. 12), podsumowania wyników (str. 22), wniosków (str. 25), literatury uzupełniającej (str. 26) oraz streszczeń w języku polskim (str. 30) i angielskim (str. 32). Literatura uzupełniająca liczy 35 pozycji anglojęzycznych, aktualnych, trafnie dobranych dla przedstawionego w dysertacji tematu badawczego. **Wstęp** wprowadza w tematykę rozprawy, przedstawia historię rozwoju badań nad metalofarmaceutykami ze szczególnym uwzględnieniem badań nad biologicznymi właściwościami rutenu i jego kompleksów, które mogą być pomocne w tworzeniu terapii przeciwnowotworowej. Następnie Doktorant przedstawił cele pracy, gdzie celem głównym była ocena w warunkach *in vitro* właściwości biologicznych kompleksów rutenu a celami szczegółowymi było określenie ich właściwości cytotoksycznych, genotoksycznych, możliwości indukcji apoptozy, wpływu na cykl komórkowy oraz potencjału pro- i

antyoksydacyjnego, jak również zbadanie zdolności do bezpośredniej interakcji kompleksów z DNA. W pracy zastosowano szeroki wachlarz **metod badawczych** z biologii molekularnej i genetyki, obejmujących m.in. analizę uszkodzeń DNA metodą kometową, testem relaksacji plazmidu i dokowania molekularnego, analizę indukcji apoptozy metodą cytometryczną z wykorzystaniem barwienia oraz komercyjnego testu Caspase-Glo[®]3/7 Assay kit, ocenę poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) z użyciem sondy H₂DCF-DA, czy analizę ekspresji genów w wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym (z użyciem sond TaqMan). Badania prowadzone były na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC), na komórkach HL-60 oraz na komórkach opornych na doksorubicynę (HL-60/DR). **Powyższe metody** świadczą o doskonałym przygotowaniu Doktoranta do pracy eksperymentalnej. **Wyniki pracy** Doktorant przedstawił syntetycznie, wspomagając się 5 rycinami wzorów strukturalnych badanych kompleksów rutenu. Uzyskane przez Doktoranta wyniki udowodniły, że badane kompleksy rutenu wykazują zróżnicowane - zależnie od rodzaju ligandów- działanie biologiczne względem komórek prawidłowych (PBMC) oraz komórek nowotworowych (HL-60, HL-60/DR) *in vitro*. Udowodniony przez Doktoranta potencjał antynowotworowy badanych kompleksów rutenu, warto byłoby potwierdzić w przyszłości warunkach *in vivo*. Wyniki badań, pozwoliły w pełni na realizację założonych w pracy celów badawczych.

Ważnym ostatecznym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest to, że kompleksy rutenu zawierające ligand maleimidowy wykazują silniejsze właściwości cyto- oraz genotoksyczne w porównaniu do kompleksów z ligandem sukcyminidowym oraz ftalimidowym oraz fakt, że kompleksy rutenu zawierające ligand maleimidowy oraz ligandy fosforoorganiczne – fosfinowy i fosforynowy są cyto i genotoksyczne tylko dla komórek nowotworowych HL-60, co ma istotne znaczenie w aspekcie zastosowania terapeutycznego.

Cykl prac przedłożonych do recenzji otwiera artykuł przeglądowy (publikacja nr 1): **Juszczak M, Kluska M, Wysokiński D, Woźniak K. Właściwości przeciwnowotworowe związków rutenu – NAMI-A i KP1019**”, opublikowany w *Postępowach Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2020; w którym Doktorant dokonał przeglądu aktualnej wiedzy o związkach rutenowych, a także przybliżył dwa związki rutenowe, najszerzej zbadane pod względem zastosowania terapeutycznego: NAMI-A oraz KP1019. W opracowaniu Doktorant podkreśla, że najważniejszą w aspekcie terapii nowotworów właściwością NAMI-A jest jego selektywny transport do wnętrza komórek nowotworowych a także właściwości antymetastatyczne.

W kolejnej pracy oryginalnej (publikacja nr 2): **Juszczak M, Kluska M, Wysokiński D, Woźniak K. DNA damage and antioxidant properties of CORM-2 in normal and cancer cells**”, opublikowanej w *Scientific Reports*, 2020, Doktorant dokonał na modelu komórek

jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) oraz komórkach HL-60 analizy właściwości biologicznych kompleksu CORM-2 (ang. *tricarbonyldichlororuthenium(II)dimer*), należącego do grupy związków uwalniających tlenek węgla – CORMs (ang. *carbonmonoxide-releasing molecules*). Ważnym wynikiem tej pracy była obserwacja, że zarówno CORM-2, jak i iCORM-2, zmniejszają poziom uszkodzeń oksydacyjnych DNA w obu typach badanych komórek, a dodatkowo CORM-2 ma wyższy potencjał redukcji poziomu uszkodzeń DNA oraz wyższy potencjał antyoksydacyjny w porównaniu z iCORM-2, szczególnie w komórkach HL-60.

Następna publikacja wchodząca w skład niniejszej dysertacji (publikacja nr 3) : **Juszczak M, Kluska M, Kosińska A, Palusiak M, Rybarczyk-Pirek AJ, Wzgarda-Raj K, Rudolf B, Woźniak K.** Cytotoxicity of piano-stool ruthenium cyclopentadienyl complexes bearing different imidato ligands „, opublikowana w *Applied Organometallic Chemistry*, 2022, dotyczyła badań właściwości biologicznych (cytotoksyczności, genotoksyczności oraz aktywności apoptogennej) czterech kompleksów rutenu, do którego przyłączone zostały ligandy : kompleks 1 – z ligandem maleimidowym; kompleks 2 (η^5 -cyclopentadienyl)Ru(CO)₂-*N*-methoxysuccinimidato, kompleks 3 – z ligandem sukcyinimidowym; oraz kompleks 4 – z ligandem ftalimidowym. Analizowano także rolę ligandów maleimidu oraz sukcyinimidu w odniesieniu do komórek nowotworowych. Doktorant udowodnił, że ligand maleimidowy był cytotoksyczny na poziomie porównywalnym do kompleksu 1, który wykazał także największy potencjał genotoksyczny. Oba związki indukowały uszkodzenia DNA, a maleimid wykazał silnie właściwości indukujące apoptozę względem komórek HL-60.

W kolejnej publikacji z cyklu (publikacja nr 4): **Juszczak M, Kluska M, Kosińska A, Rudolf B, Woźniak K.** Antioxidant Activity of Ruthenium Cyclopentadienyl Complexes Bearing Succinimidato and Phthalimidato Ligands, opublikowanej w *Molecules*, 2022; Doktorant dokonał oceny właściwości antyoksydacyjnych trzech kompleksów rutenu. Istotnym wynikiem pracy w odniesieniu do komórek nowotworowych (HL-60), była obserwacja że kompleks 1-3 i sukcyinimid obniżył poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA i poziom RFT. Wszystkie badane kompleksy przywróciły aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach HL-60.

Cykl prac zamyka publikacja 5.: **Juszczak M, Das S, Kosińska A, Rybarczyk-Pirek AJ, Wzgarda-Raj K, Tokarz P, Vasudevan S, Chworos A, Woźniak K, Rudolf B.** Piano-stool ruthenium(II) complexes with maleimide and phosphine or phosphite ligands: synthesis and activity against normal and cancer cells” opublikowana w czasopiśmie *Dalton Transactions* 2023; gdzie Doktorant badał (na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, komórkach HL-60 oraz na komórkach HL-60/DR -opornych na doksorubicynę) właściwości biologiczne

pięciu nowych kompleksów rutenu z dołączonymi ligandami: maleimidowym oraz ligandami fosforoorganicznymi. Wykazano genotoksyczność oraz apoptozogenność kompleksu 1, 2a oraz 3a w komórkach nowotworowych HL-60, jednak żaden z kompleksów nie indukował uszkodzeń DNA ani apoptozy w komórkach HL-60/DR. Doktorant wykazał, że w przypadku badanych kompleksów 1, 2a oraz 3a, geno- i cytotoksyczność nie jest związana z mechanizmem indukcji RFT. W końcowej fazie badań Doktorant wykazał znaczny potencjał badanych kompleksów rutenu do wiązania się z uszkodzonym DNA.

Podsumowując, przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska na którą składa się cykl 5-ciu publikacji oraz wprowadzająca część opisowa jest syntetycznym i rzeczowym opracowaniem bardzo ciekawych i innowacyjnych badań. Realizacja założonych celów wymagała od Doktoranta bardzo dobrego przygotowania merytorycznego i praktycznego, na co wskazują zastosowane metody badawcze i jakość otrzymanych wyników. Każda z prac wchodzących w skład cyklu, została oceniona przez niezależnych recenzentów i opublikowana w wysoko punktowanych czasopismach o wysokim wskaźniku wpływu. Opublikowane przez Doktoranta prace badawcze mają charakter nowatorski i wnoszą ważny wkład w rozwój nauk biologicznych jak i znajdują niewątpliwie zastosowanie kliniczne w tworzeniu nowych celów terapeutycznych dla niektórych typów nowotworów u ludzi.

Pragnę pogratulować Doktorantowi bardzo ciekawych i nowatorskich wyników badań, jednocześnie z obowiązku Recenzenta, proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do kilku kwestii:

1. Z literatury tematu wynika, że wysoki poziom stresu oksydacyjnego indukowany przez kompleksy rutenu koreluje z jego wysoką cytotoksycznością. Zatem śmierć komórkowa powodowana przez te kompleksy ma najprawdopodobniej związek z indukcją dużej ilości RFT w komórkach nowotworowych. W badaniach własnych Doktorant wykazał geno- i cytotoksyczność badanych kompleksów rutenu, lecz nie związaną z mechanizmem indukcji RFT. Zatem, w przypadku badań własnych jakie mechanizmy komórkowe mogą być kluczowe w warunkowaniu geno-/cytotoksyczności komórek ?.
2. Jakie według wiedzy Doktoranta mechanizmy komórkowe mogą odpowiadać za chemooporność linii komórkowej HL-60/DR?
3. Z czego wynikały różnice w ilości komórek linii HL-60 nanoszonych na 96-dołkowe płytki w zastosowanej tej samej metodzie oceny żywotności komórek (*cell-viability*) w eksperymentach opisanych w artykule 5 („Piano-stool ruthenium(ii) complexes with maleimide and phosphine or phosphite ligands: synthesis and activity against normal and

cancer cells”) i artykule 4 (“Antioxidant Activity of Ruthenium Cyclopentadienyl Complexes Bearing Succinimidato and Phthalimidato Ligands”)- zróżnicowanie 1000 komórek/dołek - 15,000/dołek ?

4. Dodatkowo, zastosowano w tym samym badaniu taka samą liczbę komórek dla linii HL-60 i HL-60/DR na dołek 96- dołkowej płytki hodowlanej. Czy wykonano dla komórek linii HL-60/DR oddzielną krzywą wzorcową do wyznaczenia ilości komórek, czy wyniki odczytywano dla tej samej krzywej, co dla linii komórkowej HL-60?
5. Czy ocenę żywotności komórek wykonywano w medium suplementowanym czy bez suplementacji FBS, jakie ma to znaczenie ?

Ze względu na fakt, że wyniki badań zostały już opublikowane w dobrych recenzowanych pismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, stwierdzam, że Doktorant całkowicie zrealizował założone w pracy cele badawcze Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668). Z prawdziwą przyjemnością przedkładam Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne wniosek o dopuszczenie mgr Michała Juszcza do dalszych etapów postępowania doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Wnioskuje także o wyróżnienie rozprawy z uwagi na jej nowatorstwo, walory poznawcze i dużą wartość merytoryczną.

Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzezińska-Lasota

KIEROWNIK ZAKŁADU
Biomedycyny i Genetyki
Katedry Biologii i Mikrobiologii Medycznej
Wydziału Lekarskiego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzezińska-Lasota