



Łódź 26. 06. 2019

Prof. dr hab. Aleksandra Olma
Instytut Chemii Organicznej
Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej
e-mail: aleksandra.olma@p.lodz.pl
tel. 42 6313155

OCENA

całokształtu dorobku naukowego, dydaktycznego, organizacyjnego oraz osiągnięcia naukowego dr. Jarosława Ruczyńskiego

„Galanina, transportan i koniugaty peptydów penetrujących komórkę – chemiczna synteza i badania ich właściwości farmakologicznych” w związku z wnioskiem o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Dr Jarosław Ruczyński uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 2003 na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „*Galanina-projektowanie i chemiczna synteza analogów N-końcowego fragmentu*”. Promotorem rozprawy doktorskiej, jak również pracy magisterskich zatytułowanej „*Synteza analogów N-końcowego fragmentu galaniny*” był prof. dr hab. Piotr Rekowski. Jego praca doktorska uzyskała wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Chemicznego za Najlepszą Pracę Doktorską na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Dr Ruczyński był zatrudniony od 2002 jako asystent, a od 2003 roku jest zatrudniony na stanowisku adiunkta na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Ocena całokształtu dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego

Zainteresowania dr Jarosława Ruczyńskiego, od początku jego działalności naukowej, skupiają się na syntezie modyfikowanych peptydów, głównie N-końcowego fragmentu 1-15 neuropeptydu galaniny oraz bivalentnych ligandów z innymi bioaktywnymi peptydami, badaniu ich aktywności biologicznej i możliwości wykorzystania w terapii chorób i zaburzeń wywołanych aktywnością galaniny. Habilitant włączył się również w syntezę oraz wykorzystanie peptydowych kwasów nukleinowych (PNAs) do analizy budowy endogennych wirusów z rodziny HERV oraz do badań oddziaływań allelo-specyficznych PNA z DNA. Kolejnym obszarem zainteresowań dr. Ruczyńskiego była 1,3-dipolarna cykloaddycja Huisgena, tzw „reakcja klik”, którą wykorzystał do syntezy koniugatu systeminy z 3'-azydo-2',3'-dideoksytymidyną oraz do otrzymywania aminokwasów triazolowych, wykorzystywanych w syntezie peptydomimetyków.

W skład całkowitego dorobku naukowego habilitanta wchodzi 30 publikacji, które ukazały się w czasopiśmie z JCR o sumarycznym współczynniku oddziaływania 53.182, z czego 21 opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora posiada IF=45,433, co daje dobrą średnią (2,163) na jedną pracę. Publikacje były cytowane 145 razy (wg. Bazy Web of Science, bez autocytowań). Indeks Hirscha dr Ruczyńskiego wynosi 8 (według bazy Web of Science z dnia 11.03.2019). Ponadto

ma on w swoim dorobku 14 prac opublikowanych w czasopismach spoza tzw. listy filadelfijskiej, 91 komunikatów konferencyjnych zaprezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, w tym 76 po uzyskaniu stopnia doktora oraz jeden wniosek patentowy.

Powyższe dane wyraźnie wskazują, że aktywność naukowa dr. Jarosława Ruczyńskiego jest znacząca i zasługuje na pozytywną ocenę. Jednak w działalności naukowej habilitanta zabrakło stażu podoktorskiego w dobrym ośrodku naukowym zagranicznym lub krajowym. Odbycie takiego stażu, moim zdaniem, stanowi ważny element rozwoju młodego pracownika naukowego. Poszerza jego wiedzę, horyzonty myślowe oraz pozwala na zdobycie nowych umiejętności.

W trakcie studiów doktoranckich i po uzyskaniu stopnia doktora, habilitant był zaangażowany w różne projekty badawcze, był wykonawcą w czterech grantach finansowanych przez KBN, jednym przez MNiSW, jednym przez NCN oraz kierownikiem pięciu grantów finansowanych przez Uniwersytet Gdański. Słabą stroną wniosku jest fakt, że habilitant nie był kierownikiem żadnego grantu finansowanego ze źródeł zewnętrznych.

Dr Ruczyński ma znaczące doświadczenie dydaktyczne. Prowadził i prowadzi różnorodne zajęcia, zarówno wykłady jak i ćwiczenia audytoryjne i laboratoryjne na studiach pierwszego oraz drugiego stopnia, jak również brał udział w opracowaniu zajęć i materiałów dydaktycznych. Był opiekunem siedmiu prac licencjackich i trzynastu magisterskich. Pełnił także opiekę naukową nad pięcioma doktoratami w charakterze opiekuna naukowego oraz funkcje promotora pomocniczego w jednym, zakończonym przewodzie doktorskim.

Dorobek organizacyjny habilitanta obejmuje udział w pracach Komitetu Organizacyjnego 29 Europejskiego Sympozjum Peptydowego oraz 20 Polskiego Sympozjum Peptydowego (współprzewodniczący). Od 2005 roku dr Ruczyński jest edytorem stron internetowych Polskiej Społeczności Peptydowej, a od 2014 roku edytorem stron internetowych Europejskiego Towarzystwa Peptydowego, którego członkiem jest od roku 2001. W latach 2000-2001 był beneficjentem stypendium za osiągnięcia naukowe Fundacji Rozwoju Uniwersytetu Gdańskiego.

W podsumowaniu stwierdzam, że aspekt aktywności zawodowej Kandydata obejmujący zaangażowanie w proces dydaktyczny na Wydziale, a także udział w kształceniu oraz działalności organizacyjnej zasługuje na wysoką ocenę.

Ocena jednotematycznego cyklu publikacji „Galanina, transportan i koniugaty peptydów penetrujących komórkę– chemiczna synteza i badania ich właściwości farmakologicznych”

Ocena zgodności z wymogami formalnymi

Jako podstawę postępowania habilitacyjnego dr Jarosław Ruczyński wybrał 12 prac (**H1-H12**) opublikowanych w okresie 2005-2019, w dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Pharmacol. Res.*, *J. Physiol. Pharmacol.*, *J. Pept. Sci.*, *Protein Pept. Lett.*, *Pharmacol. Reports*, *Folia Histochem. Cytobiol.*, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, *Bioconjugate Chem.*, *Sci. Rep.*). Współczynnik oddziaływania prac zaliczonych do cyklu habilitacyjnego wynosi 29,674 (średni IF na publikację 2,473). Publikacje te były cytowane (bez autocytowań) 71 razy. W siedmiu przedstawionych pracach, habilitant jest autorem korespondencyjnym (**H2-H5**, **H7**, **H10** i **H11**), a w pięciu (**H3-H5**, **H7** i **H12**) pierwszym autorem.

Materiały złożone przez habilitanta zawierają wymagane oświadczenia współautorów, określające zakres ich udziału w publikacjach będących przedmiotem postępowanie

habilitacyjnego. Habilitant również starannie opisał swój wkład w poszczególne prace (30-85%), który obejmował planowanie, syntezę, oczyszczanie, analizę fizykochemiczną analogów peptydów oraz badania ich właściwości biologicznych, a także udział w etapie opracowywania wyników.

Przedstawione prace świadczą o dobrym przygotowaniu dr. Jarosława Ruczyńskiego do roli samodzielnego pracownika naukowego, podejmującego ważne tematy badawcze z punktu widzenia poznawczego, jak i potencjalnych zastosowań. Przedstawiony do oceny materiał spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom habilitacyjnym.

Zakres i wartość merytoryczna osiągnięcia naukowego

Zbiór 12 publikacji (**H1-H12**) został opatrzony komentarzem w 53 stronicowym autoreferacie, zawierającym krótki wstęp poświęcony strukturze galaniny, jej receptorom oraz aktywności biologicznej. Autor omówił również analogi galaniny, zarówno o aktywności agonistycznej jak i antagonistycznej, w tym hybrydowe ligandy receptorów galaniny. Wśród nich ważnymi analogami są połączenie z transportanem (TP) i transportanem 10 (TP10), związkami które zostały zaliczone do peptydów penetrujących komórkę (CPP – *cell-penetrating peptides*). Właściwości CPP, zdolność przenikania bariery krew-mózg, stwarzają możliwości zastosowania ich w terapii i diagnostyce medycznej.

Pierwszym obiektem badań dr. Ruczyńskiego była galanina, peptyd wykazujący zróżnicowaną aktywność biologiczną. Problemem w rozróżnieniu efektów fizjologicznych i farmakologicznych jakie wywołuje Gal w przewodzie pokarmowym jest brak selektywnych agonistów i antagonistów jej receptorów i niewielka wiedza na temat wewnątrzkomórkowych mechanizmów jej działania. Badania podjęte w pracach **H1-H5** miały na celu znalezienie selektywnych ligandów receptorów Gal obecnych w przewodzie pokarmowym. Autor zaplanował serię 20 analogów *N*-końcowego fragmentu galaniny, modyfikowanego w pozycjach 2-4, 6, 8-12 i 14 oraz hybrydowych analogów fragmentu (Gal)1-13 (**H1**). Testy na wiązanie z receptorami Gal udowodniły, że reszty aminokwasów w pozycji 2, 3, 4, 6 i 14 odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniu z GalR. Synteza i badania nowych 12 analogów modyfikowanych w pozycjach 6, 8, 9, 10 i 11 wykazały, że miejsca te pełnią istotną rolę w oddziaływaniu z receptorami Gal. Otrzymanie peptydów o działaniu agonistycznym może prowadzić do otrzymania potencjalnych leków w terapii przewlekłego bólu, niektórych nowotworów, zaburzeń nastroju oraz epilepsji (**H2**).

Kolejnym zaprojektowanym przez habilitanta peptydem był analog Gal(1-15) modyfikowany resztą Asp oraz resztą Asi w pozycji 14, tworzącą się w warunkach SPPS (**H3**, **H4**). Opracował on warunki syntezy na nośniku polimerowym analogu zawierającego resztę kwasu asparaginowego, bez tworzenia aspartimidu. [Asi¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ okazał się selektywnym antagonistą GalR₁ i potencjalnie może być wykorzystany w terapii zaburzeń związanych z pobudzeniem GalR₁.

Dalsze badania dr. Ruczyńskiego poświęcone zostały biwalentnym ligandom, analogom otrzymanym poprzez połączenie *N*-końcowego fragmentu Gal i bioaktywnymi peptydami, takimi jak fragment endoteliny-1(6-21), galparan oraz transportan. Hybrydowy analog Gal(1-13)[Ala^{11,13}]Et-1(6-21)NH₂, zaplanowany jako antagonistą GalR, wykazywał aktywność agonistyczną w przewodzie pokarmowym (**H5**). Otrzymane zostały również biwalentne ligandy

Gal(1-13) z mastopranem oraz transportanem, ale uzyskane wyniki nie zostały opublikowane.

Kontynuując badania nad różnymi peptydami penetrującymi komórkę, habilitant swoją uwagę skupił na transportanie, transportanie 10, [Lys(AAc¹³)TP, [Lys(CAc)¹³]TP, [Lys(GAc)¹³]TP, [Lys(TAc)¹³]TP, [Lys(UAc)¹³]TP and [Lys(Ac)¹³]TP, i [Lys(AAc)¹³]TP) oraz oddziaływaniami pomiędzy nimi a naczyniowym działaniem fenylefryny (**H6**). Wstępne badania wykazały, że peptydy z rodziny CPP mogą oddziaływać z α_1 -adrenoreceptorami, a ich działanie hamujące może wywołać niedociśnienie, co powinno być brane pod uwagę przy ich użyciu do dostarczania dużych cząsteczek. Stan wiedzy na temat peptydów penetrujących komórkę dr Ruczyński przedstawił w pracy przeglądowej (**H7**). Wykorzystanie CPP w celu dostarczania terapeutyków do komórek nowotworowych jest bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia. Niezbędne było określenie cytotoksyczności TP i TP10 oraz ich biotynowych pochodnych. Badania takie zostały przeprowadzone względem dwóch linii komórkowych (HT29 –gruczołaka okrężnicy i HCT116 – raka okrężnicy) we współpracy z zespołem prof. Zbigniewa Kmiecica w Katedrze i Zakładzie Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (**H8**). Potwierdziły one potencjalne możliwości zastosowania TP i TP10 jako transporterów do komórek nowotworowych zarówno dużych cząsteczek (streptawidyna) jak i małych (siRNA), bez naruszania integralności błony komórkowej. Badania kompleksu CPP (transportanu 10 oraz PTD-4, analogu fragmentu białka Tat(47-57)-NH₂) z cisplatyną (cPt), lekiem stosowanym w leczeniu m.in. nowotworów jajnika, jądra, głowy i płuc, wykazały wzrost aktywności przeciwnowotworowej niekwalencyjnego kompleksu TP10 z cPt w porównaniu z cisplatyną. Ponadto jest on względnie bezpieczny dla linii komórek nienowotworowych (**H9**). W badaniach wykorzystano pochodne z sondą fluorescencyjną, 6-karboksytetrametylorodaminą (TAMRA), które otrzymano wykorzystując nową metodę koniugacji – specyficzną 1,3-dipolarną reakcję cykloaddycji Huisgena. Koniugat PTD-4 z peptydowym kwasem nukleinowym skutecznie penetrujący do wnętrza komórek śródbłonka i blokujący ekspresję białek może być wykorzystany w terapii wielu chorób.

Kolejnym obiektem badań habilitanta było białko SAT1, które odgrywa ważną rolę w stanach zapalnych naczyń krwionośnych i może być odpowiedzialne za miażdżycę. Otrzymano zaprojektowany kowalencyjny koniugat PTD-4 z PNA, o sekwencji komplementarnej do fragmentu antykodonu startowego AUG mRNA SAT1, połączony z sondą fluorescencyjną (**H10**). Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowanie takiego koniugatu do modulowania aktywności i ekspresji STAT1 może stworzyć szansę na nową strategię terapeutyczną w leczeniu miażdżycy.

Kontynuując badania nad biwalentnymi ligandami, dr Ruczyński zaprojektował koniugat TP10 z dopaminą (DA), który posiadałby zdolność pokonania bariery krew-mózg, wysokie powinowactwo do receptorów DA oraz zwiększoną odporność na degradację enzymatyczną. Badania otrzymanego z wykorzystaniem „reakcji klik” koniugatu wykazały, że TP10 może być wykorzystany jako transporter dopaminy do OUN, co więcej posiada on większą aktywność niż DOPA, stosowana w leczeniu choroby Parkinsona (**H11**).

Ostatnia praca wchodząca do jednotematycznego cyklu publikacji poświęcona jest zaprojektowaniu i syntezie kowalencyjnych koniugatów wankomycyny z TP10 oraz zbadaniu ich aktywności przeciwbakteryjnej i zdolności pokonywania bariery krew-mózg (**H12**). Przeprowadzone testy wykazały zwiększoną aktywność koniugatu względem szczepów MRSA niż wankomycyna, względnie niską toksyczność i możliwość przenikania do mózgu, co stwarza potencjalne możliwości stosowania w terapii zakażeń bakteryjnych OUN. Wyniki tych badań są przedmiotem zgłoszenia patentowego nr P.428782.

Podsumowując, cykl publikacji wchodzący w skład osiągnięcia naukowego obejmuje otrzymywanie, zaprojektowanie i syntezę oraz badania właściwości farmakologicznych wybranych analogów N-terminalnego fragmentu galaniny, hybrydowych ligandów receptorów galaniny oraz koniugatów z CPP. Dr Ruczyński określił, które aminokwasy w cząsteczce galaniny odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniu z receptorami galaniny. Hybrydowe analogi z peptydami penetrującymi komórkę (transportan 10, transportan i jego analogi) mają zdolność do przenoszenia do wnętrza komórki zarówno duże jak i małe cząsteczki. Otrzymane przez habilitanta kowalencyjne koniugaty TP10 z dopaminą lub z wankomycyną pokonują barierę krew-mózg i mogą być potencjalnie wykorzystane w zahamowaniu choroby Alzheimera czy w terapii zakażeń ośrodkowego układu nerwowego. Dr Ruczyński wykazał w swoich badaniach, że reakcja klik" może być skutecznie stosowana do syntezy koniugatów peptydów z innymi cząsteczkami (sondami fluorescencyjnymi, np. TAMRA oraz związkami biologicznie czynnymi, np. Van, DA, PNA).

Uzyskane w badaniach interdyscyplinarnych wyniki w istotny sposób poszerzają wiedzę na temat zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną otrzymanych pochodnych oraz ich potencjalnych zastosowań w terapii i diagnostyce medycznej. Dr Ruczyński określił również szeroko zakrojone plany obejmujące dalsze badania poświęcone biwalentnym ligandom CCP z bioaktywnymi związkami (np. z imatinibem) oraz ich zdolności penetracji bariery krew-mózg.

WNIOSEK KOŃCOWY

Dr Jarosław Ruczyński wykazał się w swoich badaniach dojrzałością naukową, zdolnością do samodzielnego rozwiązywania problemów badawczych i współpracy z innymi ośrodkami naukowymi. Posiada również znaczące doświadczenie w pracy dydaktycznej na wszystkich poziomach studiów. Osiągnięcia te spełniają wymóg Ustawy o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach naukowych w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku wraz z późniejszymi zmianami, „oryginalnego wkładu autora w rozwój dyscypliny naukowej” stawiany w postępowaniu habilitacyjnym. Dlatego wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie dr. Jarosławowi Ruczyńskiemu stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk chemicznych, w dyscyplinie chemia.

Alexandra Olma

