



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Farmaceutyczny

Zakład Chemii Leków

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D

Tel. (85) 748-57-06, FAX (85) 748-58-66

pal@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Jerzy Pałka

Białystok, 19.05.2022.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

PT.: "Badania wpływu nowych pochodnych kwasu oleanolowego na ścieżki sygnałowe Nrf2 i NF-κB w modelu in vitro" wykonanej przez mgr Marię Narożną w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Mgr Maria Narożna jest absolwentką kierunku Farmacja, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego (UM) w Poznaniu. Studia ukończyła w 2017 roku, prawo wykonywania zawodu farmaceuty uzyskała w 2018 roku po czym rozpoczęła 4 letnie studia doktoranckie w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UM w Poznaniu, a także podjęła pracę w aptekach „Pharmacon” w Poznaniu (2018-2021). Od lat studenckich związana jest z działalnością naukową Uczelni, zwłaszcza Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej, jako kierownik (2016-2017) i wykonawca (2017-2021) projektów badawczych. W latach 2019-2020 zatrudniona była przy realizacji projektu Uczelnianego w ramach programu Operacyjnego „Wiedza, Edukacja, Rozwój”. Od 2020 roku jest asystentem naukowo-dydaktycznym w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UM w Poznaniu. W latach 2021-2022 odbyła roczny staż naukowy w Oklahoma Medical Research Foundation (USA) w ramach programu BioLab Polsko-Amerykańskiej Komisji Fulbrighta. Aktualnie uczestniczy w realizacji projektu finansowanego przez Oklahoma Center for Adult Stem Cell Research (USA). Dotychczasowy dorobek naukowy stanowi 19 prac, w tym 8 opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych o sumarycznym **IF=40.971 (940 punktów MEiN)**. Za działalność naukową została wyróżniona wieloma nagrodami JM Rektora UM w Poznaniu i Komitetów Naukowych wielu Zjazdów i Konferencji.

Tematyka badawcza Doktorantki stanowi kontynuację problematyki naukowo-badawczej Zakładu Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, dotyczącej między innymi oceny molekularnych mechanizmów działania leków, zwłaszcza przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych. Przedmiotem badań stanowiących treść niniejszej pracy doktorskiej jest ocena wpływu nowych syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego (triterpenoidów) i ich koniugatów z niektórymi niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ) na ekspresję białek regulowanych przez czynniki transkrypcyjne Nrf2 i NF-κB, głównie w modelu komórkowym raka wątrobowo-komórkowego, a także raka trzustki oraz komórkach prawidłowych trzustki i hepatocytach. Cechą wspólną obydwu nowotworowych linii komórkowych jest ich etiologia zapalna. Wybór triterpenoidów i ich

koniugatów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych uzasadniają wcześniejsze doniesienia o ich działaniu przeciwzapalnym.

Poszukiwanie leków przeciwnowotworowych w tej grupie związków jest zatem szczególnie pożądane w eksperymentalnej terapii raka wątroby i trzustki o etiologii zapalnej. Z tego względu uważam, że podjęty temat badawczy jest ważny zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i potencjalnie aplikacyjnego.

Rozprawę doktorską mgr Marii Narożny stanowi cykl 5 monotematycznych prac doświadczalnych opublikowanych w latach 2019-2022, o łącznym współczynniku oddziaływania **IF=26,913; 540 punktów MEIN**. W 4 spośród tych prac Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej dalszym współautorem. We wszystkich pracach z pierwszym współautorstwem, dominująca rola mgr Marii Narożny w opracowaniu koncepcji, organizacji pracy i przeprowadzeniu doświadczeń została potwierdzona stosowymi oświadczeniami współautorów. Na przeprowadzenie niektórych badań z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych Doktorantka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej Do spraw Doświadczeń Na Zwierzętach.

Powyższe prace stanowią dokumentację obszernego zakresu badań nad oceną wpływu pochodnych kwasu oleanolowego i ich koniugatów z aspiryną, indometacyną i diklofenakiem na proliferację, apoptozę, generowanie reaktywnych form tlenu i ekspresję białek szlaków sygnałowych Nrf2 i NF- κ B w omawianych nowotworowych linii komórkowych i komórkach prawidłowych.

Doktorantka wykorzystwała wieloletnie doświadczenie zespołu badawczego Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UM w Poznaniu, a także wielu innych badaczy z zakresu biochemii nowotworów, biologii komórki, biologii molekularnej, chemii organicznej i chemii analitycznej. Świadczy o tym aktualna i poprawnie dobrana literatura dotycząca tych zagadnień, zamieszczona w cyklu publikacji oraz piśmiennictwie rozprawy doktorskiej. Na jej podstawie Doktorantka opracowała syntetyczny wstęp i jasno sformułowała cel badań.

Podstawowym wyzwaniem niniejszych badań było poszukiwanie wśród 16 pochodnych triterpenoidów i ich koniugatów z NLPZ związków upośledzających prozapalne szlaki sygnałowe indukowane przez NF- κ B wpływając na procesy cytoprotekcyjne i antyoksydacyjne regulowane przez Nrf2. Niektóre z badanych związków, np. morfolid kwasu oleanowego i jego koniugat z kwasem acetylosalicylowym okazał się inhibitorem funkcji transkrypcyjnej NF- κ B i induktorem Nrf2 prowadząc do upośledzenia proliferacji, zahamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M i indukcji apoptozy w komórkach raka wątrobowo-komórkowego. Na tej podstawie Doktorantka wysunęła hipotezę, że omawiane związki mogą mieć zastosowanie w chemoprewencji raka wątroby. Szczególnie interesujące są wyniki badań nad cytotoksycznością koniugatów pochodnych kwasu oleanolowego z indometacyną. Związki te silnie hamowały aktywność transkrypcyjną Nrf2 i NF- κ B (test wiązania Nrf2/NF- κ B do specyficznego fragmentu DNA) w komórkach raka wątroby czemu towarzyszył efekt antyproliferacyjny i pro-apoptotyczny. W hepatocytach, związek ten równie silnie hamował funkcje NF- κ B, podczas gdy pobudzał funkcje Nrf2. Uważam, że odkrycie inhibitorowego działania koniugatów pochodnych kwasu oleanolowego z indometacyną na funkcje transkrypcyjne Nrf2

i NF-kB stanowi podłoże do kontynuacji badań in vivo i niesie spory potencjał aplikacyjny w terapii raka wątrobowo-komórkowego.

Podobne efekty (hamowanie funkcji transkrypcyjnych Nrf2 i NF-kB) wykazywały koniugaty pochodnych triterpenoidów z diklofenakiem, hamując proliferację i indukując apoptozę w komórkach nowotworowych. Potwierdziły to badania na modelu mysich ksenograftów. Prawdopodobny mechanizm hamowania funkcji Nrf2 przedstawiono przy użyciu metody dokowania molekularnego Nrf2 z białkiem inhibitorowym Keap1.

Skuteczność przeciwnowotworowa badanych związków, zwłaszcza koniugatów pochodnych kwasu oleanolowego z indometacyną i diklofenakiem, wykazana w modelu raka wątrobowo-komórkowego została potwierdzona w modelu komórkowym raka trzustki. Doktorantka wykazała, że mechanizm tego procesu polega na hamowaniu przez badane związki szlaków sygnałowych Nrf2 i NF-kB. Zagadnieniu temu poświęcono sporo miejsca wykazując powiązanie omawianych szlaków sygnałowych ze szlakiem MAP kinazowym.

Wyniki przedstawione w cyklu publikacji sugerują, że omawiane związki chemiczne wykazują nieco odmienny wpływ na szlaki sygnałowe Nrf2 i NF-kB. O ile koniugaty morfolidu kwasu oleanolowego z indometacyną lub diklofenakiem silnie hamowały obydwa szlaki sygnałowe, sugerując mechanizm przeciwnowotworowego ich działania, to koniugat morfolidu kwasu oleanolowego z aspiryną odmiennie wpływał na szlak Nrf2, sugerując jego potencjał chemoprewencyjny. Wyniki tych badań stanowią zatem oryginalne rozwiązanie problemu badawczego postawionego w temacie pracy doktorskiej i przyczyniły się do rozwoju reprezentowanej przez Doktorantkę dyscypliny badawczej.

Na szczególną uwagę zasługuje opanowanie przez Doktorantkę nowoczesnego warsztatu badawczego, zwłaszcza technik biologii molekularnej, biologii komórki, biochemii, biologii raka, chemii organicznej i chemii analitycznej. Uwagę zwraca profesjonalna dokumentacja wyników badań, która pozwoliła zapewnić wysoką jakość i rzetelność badań i opublikowanie ich w renomowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych.

Na podstawie wyników obszernych badań Doktorantka sformułowała 6 wniosków. Odzwierciedlają one najistotniejsze elementy poznawcze pracy.

Dyskusja zawarta w pracach cyklu publikacji zawiera konkluzje przedstawione w części doświadczalnej oraz interpretuje uzyskane wyniki badań na podstawie aktualnej literatury przedmiotu. Pozwala to bardzo pozytywnie ocenić specjalistyczną wiedzę Doktorantki, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników.

Niemniej jednak niektóre zagadnienia zamieszczone w rozprawie doktorskiej mogą stanowić przedmiot dalszej dyskusji, na przykład:

1. Potencjalny mechanizm działania omawianych koniugatów pochodnych kwasu oleanolowego z NLPZ Doktorantka interpretuje w niektórych przypadkach z punktu widzenia dwufunkcyjności tych związków, w niektórych jako związki jednofunkcyjne. Czy zatem składniki koniugatów zachowują pierwotną aktywność jako związki indywidualne? Czy w warunkach doświadczenia koniugaty są trwałe?
2. Niezbyt jasno opisano w pracy IV i rozprawie doktorskiej (str. 34) znaczenie koniugatu morfolidu kwasu oleanolowego z diklofenakiem w regulacji funkcji Nrf2 na podstawie wirtualnej analizy dokowania molekularnego. Jeśli koniugat 4d

„blokuje możliwość wiązania się białka Keap1 do Nrf2” to oznacza, że umożliwia translokację Nrf2 do jądra komórkowego i wypełnienie funkcji transkrypcyjnej, której efektem jest pobudzenie procesów antyoksydacyjnych sprzyjając procesom pro-przeżyciowym komórek nowotworowych. Wiadomo jednak, że ten koniugat indukuje apoptozę w badanych komórkach nowotworowych.

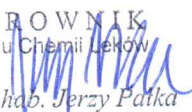
3. Czy nie należałoby więcej miejsca poświęcić w dyskusjach omawianych prac krytycznej analizie wyników zwłaszcza w aspekcie zróżnicowanego wpływu niektórych koniugatów na omawiane procesy ?

Powyższe pytania nie mają oczywiście charakteru uwag krytycznych, mogą natomiast stanowić inspirację do dyskusji nad funkcjonalnym znaczeniem wyników badań.

Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Marii Narożny, stanowiąca cykl 5 publikacji, jest pracą wartościową, poprawnie przygotowaną warsztatowo i wnosi nowe elementy poznawcze do wiedzy o mechanizmie działania przeciwnowotworowego niektórych koniugatów pochodnych kwasu oleanolowego z NLPZ. Wyniki tych badań mają charakter badań przedklinicznych i wysoki potencjał aplikacyjny w terapii raka wątroby i trzustki. Informuję ponadto, że bardzo wysoka ocena przedmiotowej rozprawy doktorskiej skłoniła mnie do złożenia wniosku do Kolegium Nauk Farmaceutycznych UM w Poznaniu o jej wyróżnienie (wniosek w załączeniu).

Oświadczam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z 20 lipca 2018, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z póź. zm. i na tej podstawie składam wniosek do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Marii Narożny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

19. 05. 2022.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Leków

prof. dr hab. Jerzy Pałka