

**Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Gdański Uniwersytet Medyczny
Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk**

Prof.dr hab. J. Renata Ochocka

Gdańsk, 27.05. 2022

**Ocena pracy doktorskiej
mgr farm. Marii Narożnej pt. „Badanie wpływu nowych pochodnych kwasu
oleanolowego na ścieżki sygnałowe Nrf2 i NF-κB w modelu *in vitro*”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Marii Narożnej, wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. n.farm. Violetty Krajka-Kuźniak, prof. w UM w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu jest obszernym opracowaniem dotyczącym oceny aktywności przeciwnowotworowej nowych syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego (OAO) i ich koniugatów z wybranymi lekami z grupy NLPZ: aspiryną (ASP), indometacyną (IND) i diklofenakiem (DCL) wobec komórek raka wątrobowokomórkowego oraz komórek raka trzustki.

Podstawę pracy stanowi cykl 5 oryginalnych, doświadczalnych, spójnych tematycznie publikacji (P1-P5), opublikowanych w latach 2019-2022:

P1. Krajka-Kuźniak Violetta, Bednarczyk-Cwynar Barbara, Paluszczak Jarosław, Szaefer Hanna, **Narożna Maria**, Zaprutko Lucjusz, Baer-Dubowska Wanda. "Oleanolic acid oxime derivatives and their conjugates with aspirin modulate the NF-κB-mediated transcription in HepG2 hepatoma cells", Bioorg. Chem. 2019, 93, 103326. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103326.

P2. **Narożna Maria**, Krajka-Kuźniak Violetta, Kleszcz Robert, Bednarczyk-Cwynar Barbara, Szaefer Hanna, Baer-Dubowska Wanda. "Activation of the Nrf2 response by oleanolic acid oxime morpholide (3-hydroxyiminoolean-12-en-28-oic acid morpholide) is associated with its ability to induce apoptosis and inhibit proliferation in HepG2 hepatoma cells." Eur. J. Pharmacol. 2020, 883, 173307. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173307.

P3. **Narożna Maria**, Krajka-Kuźniak Violetta, Bednarczyk-Cwynar Barbara, Kleszcz Robert, Baer-Dubowska Wanda. "The effect of novel oleanolic acid oximes conjugated with indomethacin on the Nrf2-ARE and NF-κB signaling pathways in normal hepatocytes and human hepatocellular cancer cells." Pharmaceuticals 2021, 14 (1), 32. doi: 10.3390/ph14010032.

P4. **Narożna Maria**, Krajka-Kuźniak Violetta, Bednarczyk-Cwynar Barbara, Kucińska Małgorzata, Kleszcz Robert, Kujawski Jacek, Piotrowska-Kempisty Hanna, Plewiński Adam, Murias Marek, Baer-Dubowska Wanda,

"Conjugation of diclofenac with novel oleanolic acid derivatives modulate Nrf2 and NF- κ B activity in hepatic cancer cells and normal hepatocytes leading to enhancement of its therapeutic and chemopreventive potential."
Pharmaceuticals 2021, 14 (7), 688. doi: 10.3390/ph14070688.

P5. Narożna Maria, Krajka-Kuźniak Violetta, Kleszcz Robert, Baer-Dubowska Wanda. *"Indomethacin and diclofenac hybrids with oleanolic acid oximes modulate key signaling pathways in pancreatic cancer cells."*
Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(3), 1230. doi: 10.3390/ijms23031230.

Łączny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* (IF) wymienionych prac wynosi: **26,913**, łączna punktacja MNiSW wynosi: 540pkt.

Badania przeprowadzone w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu OPUS 2016/21/B/NZ7/01758.

W ocenianej pracy znajdują się wszystkie wymienione publikacje. Doktorantka przedstawiła oświadczenia wszystkich współautorów oraz swoje oświadczenia wskazujące na Jej rolę w przygotowaniu publikacji. W czterech publikacjach jest pierwszym autorem. Wyniki prowadzonych badań Doktorantka prezentowała na konferencjach naukowych (Annual Meeting of American Association for Cancer Research w latach 2020, 2021 oraz 2022, The 44th FEBS Congress -2019, The 3rd BIO Congress, w roku 2018).

Publikacje będące przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej, gdy skierowano je do redakcji czasopism naukowych, były poddane szczegółowej ocenie recenzentów – będących specjalistami z danej dziedziny. Prace zostały opublikowane w dobrych zagranicznych czasopismach, których zespoły redakcyjne są rękąmią wysokiego poziomu naukowego publikowanych wyników oraz ich oryginalności.

Rolą recenzenta rozprawy doktorskiej w formie zbioru publikacji jest krytyczne odniesienie się i przeanalizowanie całości przedstawionego materiału, stawianych hipotez, wnioskowania oraz komentarzy Doktoranta. Praca doktorska mgr Marii Narożnej oprócz kopii wymienionych publikacji obejmuje wstęp, założenia i cel pracy, omówienie osiągnięć badawczych w pracach wchodzących w skład cyklu publikacji, podsumowanie i wnioski, 57 pozycji piśmiennictwa oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca napisana jest poprawnym językiem. Omawiane zagadnienia przedstawione są w sposób jasny, klarowny i spójny.

W dużych pracach badawczych, a do takich należy przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, szczególną uwagę zwraca cel i uzasadnienie podejmowanych badań. Wybór tematu i podjęte badania są w pełni uzasadnione. Doktorantka w bardzo przekonujący sposób przedstawiła zasadność założonych badań wskazując, że w przypadku nowotworów o szczególnie złym rokowaniu, do których należą nowotwory wątroby i trzustki, mimo znaczących postępów wiedzy i coraz lepszego zrozumienia molekularnych podstaw



kancerogenezy, aktualne jest ciągle poszukiwanie aktywnych czynnych substancji mogących mieć zastosowanie w zapobieganiu i leczeniu wymienionych nowotworów. Doktorantka na podstawie aktualnych wyników badań wskazała, że w rozwoju raka wątrobowokomórkowego (HCC) i nowotworów trzustki (PC) kluczową rolę pełnią przewlekły stan zapalny i stres oksydacyjny.

Mgr Maria Narożna w bardzo dobrze napisanym wprowadzeniu, które czytałam z dużym zainteresowaniem, przedstawiła informacje na temat nowotworów wątroby i trzustki, omówiła kluczowe mediatory procesów zapalnych - ścieżki sygnałowe Nrf2-ARE i NF-κB oraz potencjalne czynniki chemoprewencyjne i terapeutyczne - kwas oleanolowy (OA) z jego syntetycznymi pochodnymi i niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Autorka założyła również, że wnikliwa analiza ścieżek sygnalizacyjnych Nrf2 i NF-κB pozwoli na wskazanie i wykorzystanie ich jako celu kandydatów na leki chemioterapeutyczne i/lub chemoprewencyjne.

Doktorantka planowane badania odnosi do nurtu badań określanego jako *anakoiosis*, który jest nowym paradygmatem w leczeniu nowotworów zakładającym, że kluczową rolę w systemach nowotworowych stanowi przeprogramowanie komunikacyjne.

W świetle przytoczonych informacji, w pełni uzasadnione jest podjęcie pracy przez Doktorantkę nad poszukiwaniem nowych struktur, działających przeciwnowotworowo.

Przedstawiony **cel badań** opisanych szczegółowo w publikacjach będących przedmiotem doktoratu, obejmuje ocenę działania serii nowych, syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego (OAO) i ich koniugatów z aspiryną (OAO-ASP), indometacyną (OAO-IND) i diklofenakiem (OAO-DCL) w komórkach prawidłowych i nowotworowych wątroby i trzustki jako induktorów lub inhibitorów białek, których ekspresja jest kontrolowana przez czynniki transkrypcyjne Nrf2 i NF-κB. Autorka postawiła sobie również za cel określenie wzajemnych zależności między badanymi ścieżkami i powiązanych z nimi innymi szlakami sygnałowymi. Celem mgr Marii Narożnej było wytypowanie optymalnie działającej, o wysokiej aktywności, struktury związku z grupy badanych pochodnych oksymów kwasu oleanowego i ich koniugatów z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi. Autorka zakładała również określenie mechanizmu ich działania.

Tak duży zakres badań i dokonań naukowych wymagał dobrego przygotowania Doktorantki. Na uznanie zasługuje również umiejętność współpracy. Autorka uzyskiwała wyniki w badaniach we współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Organicznej, Katedrą i

Zakładem Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii.

Przystępując do analizy przedstawionych rezultatów, trzeba stwierdzić, że mgr Maria Narożna dążyła do realizacji wszystkich celów pracy. Badania prowadzone przez Doktorantkę obejmowały:

- Ocenę cytotoksyczności nowych pochodnych oksymów kwasu oleanowego (OAO) oraz ich koniugatów z wybranymi lekami z grupy NLPZ: aspiryną (ASP), indometacyną (IND) i diklofenakiem (DCL) wobec komórek raka wątrobowokomórkowego linii HepG2, ludzkich immortalizowanych hepatocytów linii THLE-2, oraz komórek raka trzustki linii PSN-1 i komórek prawidłowych trzustki MS-1.
- Analizę wpływu badanych związków na aktywację i ekspresję ścieżek sygnałowych Nrf2 i NF-κB oraz na ekspresję genów pozostających pod ich kontrolą.
- Ocenę wpływu wybranych związków na poziom kinaz MAP, poziom reaktywnych form tlenu, apoptozę, cykl komórkowy i proliferację w komórkach nowotworowych.

Autorka bardzo szczegółowo podaje informacje dotyczące prowadzonych badań. Materiałem do badań były cztery pochodne oksymów kwasu oleanowego (12, 14, 16 i 18 OAO), cztery koniugaty pochodnych OAO z aspiryną (13, 15, 17 i 19 OAO-ASP), cztery koniugaty pochodnych OAO z indometacyną (3a, 3b, 3c, 3d OAO-IND) oraz cztery koniugaty pochodnych OAO z diklofenakiem (4a, 4b, 4c i 4d OAO-DCL). Należy stwierdzić, że omawiana część doświadczalna w pracy wymagała opanowania i stosowania szeregu metod biologii molekularnej (P1-P5). Z zestawienia tych prac wynika, że mgr Maria Narożna wykonała ogromną liczbę eksperymentów, co nie tylko świadczy o jej zaangażowaniu w prowadzeniu badań, lecz również wskazuje na nabycie przez Autorkę wielkiej wprawy w stosowaniu wymienionych metod, wykorzystywanych w badaniach aktywności biologicznej, związanych z osiągnięciem celu rozprawy. Na podkreślenie w tym miejscu zasługuje poprawność opisu stosowanych i wykonywanych procedur.

Omawiając efekty pracy i sukcesy Doktorantki należy podkreślić bardzo dojrzałą dyskusję i dobrze przemyślane kolejne działania badawcze. W publikacji **P1**, która była pierwszym etapem pracy, Autorka przedstawiła wyniki oceny cytotoksyczności badanych pochodnych i ich koniugatów wobec immortalizowanych hepatocytów linii THLE-2 oraz

komórek HCC za pomocą testu MTT. Przeprowadziła również ocenę aktywacji czynnika NF- κ B, stwierdzając obniżenie ekspresji podjednostki p50 NF- κ B, w najwyższym stopniu przy stosowaniu pochodnej kwasu oleanolowego z podstawnikiem morfolidowym (18 OAO) i jej koniugatu z ASP (19 OAO-ASP). Rozwinięciem badań były wyniki przedstawione w publikacji **P2**. Autorka chcąc poznać mechanizm działania OAO oraz ich koniugatów z aspiryną przeprowadziła ocenę aktywacji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w komórkach raka wątrobowokomórkowego HepG2 i porównała ten efekt z działaniem na prawidłowe hepatocyty linii THLE-2. Planując badania opierała się na danych z ostatnich lat i informacji, że inhibicja NF- κ B może wpływać hamująco na szlak sygnałowy Nrf2. Wyniki badań Doktorantki potwierdziły zwiększoną aktywację i ekspresję Nrf2 po zastosowaniu pochodnych OAO oraz w mniejszym stopniu, ich koniugatów z ASP w komórkach nowotworowych HepG2. Istotnym wynikiem badań jest wykazanie, że pochodna (18) z podstawnikiem morfolidowym w pozycji C-17 pierścienia OA, aktywowała Nrf2 w największym stopniu, prowadząc również do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M.

Osiągnięciem Doktorantki jest wykazanie, że wymienione związki mogą być potencjalnie wykorzystywane w profilaktyce stanów zapalnych wątroby i raka wątrobowokomórkowego.

W tym miejscu mam pytanie do Doktorantki o zastosowanie immortalizowanych hepatocytów linii THLE-2. Czy Doktorantka nie uważa, że bardziej korzystnym wyborem byłaby linia pierwotna?

Zgodnie z celem pracy mgr Maria Narożna prowadziła badania nowych koniugatów OAO z kolejnym nieselektywnym inhibitorem COX - indometacyną (OAO-IND). W publikacji **P3** wykazała, że wśród badanych koniugatów OAO-IND, najwyższą skutecznością inhibicji NF- κ B w obydwu badanych liniach komórkowych (HepG2 i THLE-2), odznacza się *morfolid kwasu 3-indometacynoksyiminoolean-12-en-28-owego (3d)*. Ponadto stwierdziła, że badane koniugaty OAO-IND zwiększały aktywację i ekspresję Nrf2 w prawidłowych hepatocytach, a obniżały ją w komórkach nowotworowych. Doktorantka przedstawiła istotny wniosek, że koniugaty OAO-IND, szczególnie koniugat 3d, mogą hamować wzrost i inwazyjność HCC, a jednocześnie działają chemoprewencyjnie w odniesieniu do zdrowych komórek wątroby.

Dużym **osiągnięciem** Doktorantki (**P4**) są badania uwieńczone sukcesem wyłonienia potencjalnych kandydatów na leki w terapii raka wątrobowokomórkowego. W prowadzonych badaniach koniugatów OAO z diklofenakiem wykazała najkorzystniejsze i najsilniejsze

działanie dla koniugatu **4d** (morfolid kwasu 3-diklofenakoksyiminoolean-12-en-28-owego) . Doktorantka zastosowała pełen zakres badań omawianych wcześniej, ale też poszerzyła je stosując m.in. cytometrię przepływową i Western blot przy oznaczaniu poziomu ufosforylowanej kinazy regulowanej zewnątrzkomórkowo (p-ERK) i poziomu reaktywnych form tlenu. Stwierdzoną aktywność proapoptyczną badanych koniugatów OAO-DCL z podstawnikiem benzylowym (**4c**) oraz podstawnikiem morfolidowym (**4d**), Doktorantka potwierdziła w badaniu poziomu białek Bax i kaspazy-3. Doktorantka z prowadzonych badań podaje istotne wnioski. Efektem działania koniugatu OAO-DCL z podstawnikiem morfolidowym (**4d**) w badanej linii HCC, jest zmniejszona aktywacja NF-κB, co może nasilać ekspresję genów proapoptycznych w komórkach nowotworowych. Z kolei hamowanie Nrf2 może wpływać na obniżenie proliferacji i różnicowania komórek, co może być odpowiedzialne za zatrzymanie cyklu komórkowego i indukcję apoptozy w linii HCC.

Dużą wartość mają wyniki badań *in vivo* na zwierzętach (model mysich ksenograftów NOD-SCID). Na podkreślenie zasługuje w tym aspekcie wyważona dyskusja w publikacji P4. Przy malejącej objętości guza pod wpływem badanych związków, po leczeniu u myszy z heteroprzeszczepami guza HepG2 obserwowany był stosunkowo wysoki poziom śmiertelności. Doktorantka dyskutuje i analizuje przyczyny oraz wskazuje potrzebę dalszych ukierunkowanych badań.

Wiedzę i doświadczenie zdobyte w badaniach koniugatów pochodnych OAO z NLPZ (diklofenak i indometacyna) na komórki raka wątroby, Doktorantka wykorzystwała w ocenie ich aktywności na komórki raka trzustki linii PSN-1, z zastosowanymi porównawczo liniami prawidłowymi MS-1 (**P5**). Analogicznie jak w przypadku badań komórek raka wątroby, najwyższą aktywność wykazywał koniugat morfolidu OAO z diklofenakiem (**4d**). Wyniki badań wskazały jednak, że pod wpływem koniugatu 4d, w komórkach PSN-1 dochodziło do zwiększenia aktywacji Nrf2 i braku wpływu na cykl komórkowy i proliferację komórek raka trzustki. Uzyskane wyniki są postawą do dalszych badań.

Na podkreślenie zasługuje bardzo ważna umiejętność Doktorantki oceny i wskazania najbardziej istotnych dokonań w tak szeroko prowadzonych badaniach. Mgr Maria Narożna przedstawiła sześć w pełni zasadnych, dobrze przemyślanych wniosków, co powoduje, że najistotniejsze osiągnięcia badań, są wyraźnie uwypuklone. Bardzo ważnym wynikiem pracy jest osiągnięcie takich danych, które pozwoliły na wytypowanie do dalszych badań koniugatu morfolidu OAO z diklofenakiem (**4d**). Życzę Autorce spektakularnych wyników badań przedklinicznych.



Oceniając stronę edytorską pracy chciałabym podkreślić dużą staranność z jaką została przygotowana. Oprócz pełnej dokumentacji zawartej w publikacjach (P1-P5), w całościowym ich omówieniu Doktorantka przedstawiła 3 bardzo dobre ryciny i pomocną zbiorczą tabelę, pochodnych kwasu oleanowego.

Nie mam pytań do Doktorantki dotyczących tematyki badawczej rozprawy, ponieważ jest ona bardzo dobrze przedstawiona pod względem merytorycznym. W trakcie czytania rozprawy znajdowałam w niej odpowiedzi na pojawiające się pytania.

Podczas obrony chciałabym poprosić Panią mgr Marię Narożną o odpowiedź, czy planowane były, a może są w planach badania z zastosowaniem selektywnych inhibitorów COX2. Czy brany jest również pod uwagę paracetamol?

Przedstawiona do oceny rozprawa świadczy o bardzo dobrym ogólnym przygotowaniu Autorki. Mgr Maria Narożna w wysokim stopniu opanowała umiejętność krytycznej oceny wyników, wykazując się przy tym nie tylko dobrym zrozumieniem zagadnień teoretycznych, ale także dużym doświadczeniem w stosowaniu zaawansowanych metod badań biochemicznych i metod biologii molekularnej.

Rolą recenzenta jest obiektywna ocena i uzasadnienie, że praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i że doktorant zasługuje na miano pracownika nauki. W przypadku ocenianej pracy stwierdzam, że rozprawa mgr Marii Narożnej znacznie przekracza wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora i znakomicie dokumentuje opanowany przez Doktorantkę warsztat naukowy, umożliwiający prowadzenie ważnych, poznawczych i aplikacyjnych badań obejmujących, biochemię, nauki farmaceutyczne i nauki medyczne.

Wnioski końcowe

Recenzowana pracę oceniam bardzo wysoko z uwagi na duże walory naukowe i użytkowe. Wyrażam uznanie dla mgr farm. Marii Narożnej i Promotora Pani dr hab. n. farm. Violetty Krajka-Kuźniak, prof. UM.

Uzyskane wyniki mogą być bardzo pomocne w badaniach nad nowymi lekami przeciwnowotworowymi. Stanowią również podstawę do dalszych wielokierunkowych badań.

Powyzsza ocena upoważnia mnie do postawienia wniosku o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Marii Narożnej.

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że zostały spełnione wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2022.574).

Na tej podstawie wnoszę do Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Marii Narożnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. KJEROWNIK
Katedry i Zakładu
Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
prof. dr hab. J. Renata Okocka

Jo