

Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej
tel/fax:+48 42 677-91-30
e-mail: ewa.balcerczak@umed.lodz.pl

prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak

Łódź, 18 grudnia 2023r.

Ocena

**osiągnięcia naukowego będącego podstawą o wnioskowanie o stopień naukowy
doktora habilitowanego w dziedzinie nauki medyczne i nauki o zdrowiu, w dyscyplinie
nauki farmaceutyczne pt.**

***Identyfikacja mechanizmów działania wybranych pochodnych triterpenoidów w różnych
podtypach molekularnych raka piersi in vitro***

oraz

**dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego
dr n. farm. Natalii Lisiak**

Ocenę przygotowano w związku z pismem nr KKN-818/2023 Kanclerza Kolegium Nauk Farmaceutycznych, prof. dr hab. Justyny Cieleckiej - Piontek zgodnie z Uchwałą Nr 42/2023 Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych z dnia 20.10.2023 oraz zgodnie z zapisami Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, (Dz.U. z 2023r. poz. 742 ze zm.) według których osoba ubiegająca się o stopień naukowy doktora habilitowanego powinna:

- a) posiadać stopień naukowy doktora
- b) posiadać w dorobku osiągnięcia naukowe stanowiące znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny
- c) wykazać się istotną aktywnością naukową w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

I. Informacje ogólne o Kandydatce

Doktor n. farm. Natalia Lisiak tytuł magistra analityki medycznej uzyskała dnia 06 września 2007 roku, na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydziale Farmaceutycznym, Oddziale Analityki Medycznej.

Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych (dyplom z wyróżnieniem) został nadany w dniu 11 grudnia 2013 roku, przez Uniwersytet Medyczny im. Karola

Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydział Farmaceutyczny. Dysertacja pt. „Badanie mechanizmu działania pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi”, została zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP, pod opieką Prof. dr hab. Marii Rybczyńskiej.

W roku 2007 podjęła pracę w Zakładzie Chemii Klinicznej, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, którą kontynuuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do dzisiaj. Od roku 2013 jest zatrudniona na stanowisku adiunkta.

Doktor Natalia Lisiak posiada prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego - Nr 11790 nadane w roku 2008.

II. Ocena aktywności oraz osiągnięć naukowych

Analiza bibliometryczna

W skład dorobku naukowego dr n. farm. Natalii Lisiak poza osiągnięciem naukowym wchodzi 5 publikacji opublikowanych przed doktoratem, 16 opublikowanych po doktoracie, z czego 7 to prace przeglądowe, w 5 z nich Habilitantka jest pierwszym autorem. Dodatkowo dr Lisiak jest również współautorem 3 monografii opublikowanych po doktoracie.

Sumaryczny wskaźnik oddziaływania IF prac wynosi 65,706 wg listy Journal Citation Reports (JCR) i 1367 pkt MNiE. Liczba cytowań 891/863 (bez cytowań własnych) według bazy Web of Science Core Collection, a Indeks Hirscha: 11. Ponadto, Habilitantka jest współautorem 19 komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl obejmujący 4 prace oryginalne i 1 jedną pracę przeglądową, o łącznym Impact Factor 23,6; punktacja MNiE: 445.

a) Ocena aktywności naukowej (bez rozprawy habilitacyjnej)

Ocena dorobku naukowego i działalności badawczej przed uzyskaniem stopnia dr n. farmaceutycznych

Po obronie pracy magisterskiej Habilitantka rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu i została włączona do zespołu naukowego prowadzonego przez prof. dr hab. Marię Rybczyńską w charakterze asystenta naukowego.

W roku 2008 wzięła udział w Szkole Letniej organizowanej w Poznaniu przez Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk.

W pracy badawczej od początku była zaangażowana w badania dotyczące oceny aktywności biologicznej różnego rodzaju związków, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznych. Jedną z grup związków, w których badanie aktywności została włączona, były produkty oksydacji papaweryny. Wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Investigational New Drugs* w 2009.

Z racji zainteresowań naukowych, dr Lisiak została włączona w zadania badawcze prowadzone we współpracy z prof. Jaromirem Budzianowskim z Katedry i Zakładu Botaniki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, których celem była ocena aktywności biologicznej zapotyny, związku naturalnego wyizolowanego z pierwiosnka lekarskiego (*Primula veris*). Wyniki otrzymane w toku realizacji tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *European Journal of Pharmacology* w 2012 roku.

Habilitantka brała również w badaniach prowadzonych przez prof. Błażeja Rubisia w Zakładzie Chemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, dotyczących częstości występowania polimorfizmów genu *ABCB1* w polskiej populacji pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem piersi. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Pharmacological Reports* w 2012 roku.

Jeden z obszarów zainteresowań przed doktoratem dotyczył znaczenia telomerazy w kontekście choroby nowotworowej. Badania były realizowane pod kierunkiem prof. Rubisia, w ramach projektu OPUS-NCN. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji tych badań zostały zebrane i opublikowane w czasopiśmie *Molecular Biology Reports* w 2013 roku.

Konsekwencją połączenia tematyki nowotworzenia oraz oceny aktywności biologicznej związków pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego było przygotowanie projektu badawczego promotorskiego, który dotyczył oceny aktywności biologicznej czterech pochodnych kwasu oleanolowego (DIOXOL, HIMOXOL, HIMOXAZOL i Br-HIMOLID) w komórkach raka piersi i stał się tematem pracy doktorskiej (projekt PRELUDIUM – NCN, 2011/01/N/NZ4/03433). Uzyskane wyniki opublikowano w formie rozprawy doktorskiej, w dwóch publikacjach w czasopismach *Chemico-Biological Interactions* oraz *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* oraz zaprezentowano na konferencji międzynarodowej *EACR 22nd Congress of the European Association for Cancer Research* w Barcelonie, w roku 2012.

**Ocena dorobku naukowego i działalności badawczej po uzyskaniu stopnia
dr n. medycznych**

Po uzyskaniu stopnia doktora Habilitantka swoje zainteresowania naukowe skupiła na kilku obszarach, te aspekty działalności badawczej znalazły odzwierciedlenie we współautorstwie publikacji.

Jednym z obszarów była **Analiza aktywności biologicznej wybranych naturalnych oraz syntetycznych związków w komórkach nowotworowych**. Badania prowadzono we współpracy z Zespołem Katedry Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Muriasa, na grupie związków należących do benzanilidów i tiobenzanilidów. Publikacje: *Selective anticancer activity of the novel thiobenzanilide 63T against human lung adenocarcinoma cells*, oraz *Novel promising estrogenic receptor modulators: cytotoxic and estrogenic activity of benzanilides and dithiobenzanilides* z roku 2016.

Kolejna współpraca z tego obszaru dotyczyła badań prowadzonych z zespołem Zakładu Botaniki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, pod kierownictwem prof. dr hab. Jaromira Budzianowskiego. Badania te objęły dwie grupy związków naturalnych. Pierwszy etap obejmował ocenę aktywności biologicznej kwasu 3-O-acetylaeuritolowego (3-O-AAA), wyizolowanego z rosziczki łyżeczkowatej (*Drosera spatulata*) w komórkach raka szyjki macicy (HeLaWT), komórkach raka jelita grubego (HT-29), raka piersi (MCF7) oraz komórkach nienowotworowych gruczołu piersiowego (MCF-12A), czego efektem jest publikacja w *Pharmacological Reports* z roku 2020. Drugą grupę stanowiły związki wyizolowane z biomasy produkowanej za pomocą technik biotechnologicznych stosowanych w hodowli roślin różnych gatunków mikołajka (*Eryngium*), których aktywność biologiczną zweryfikowano na komórkach raka piersi (MCF7 i MDA-MB-231), komórkach raka jelita grubego (HT-29, Caco-2), komórkach raka jajnika (OVCAR-3) i komórkach nienowotworowych (MCF-12A) - publikacja w *Industrial Crops and Products* z roku 2023.

Udział telomerazy w mechanizmie nowotworzenia w komórkach raka piersi to kolejny obszar pracy badawczej Habilitantki. Współpraca z prof. dr hab. Błażem Rubisiem zaowocowała współautorstwem prac dotyczących roli telomerazy w procesie nowotworzenia, w tym diagnostyce stopnia zaawansowania raka piersi. Celem publikacji „*The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off*” z roku 2019, było omówienie niektórych aktualnych odkryć dotyczących niezależnych od telomerów funkcji telomerazy w kontekście terapii przeciwnowotworowej i potencjalnych skutków ubocznych. Niska skuteczność terapii spowodowała poszukiwanie nowych skojarzonych i skuteczniejszych metod terapeutycznych, w tym z udziałem inhibitorów telomerazy i immunoterapii

ukierunkowanej na telomerazę. Te informacje zostały zebrane w publikacji *The role of telomerase in breast cancers response to therapy* z 2022 roku.

W kolejnej pracy z tej tematyki zweryfikowano wykorzystanie parametrów długości telomerów w diagnostyce stopnia zaawansowania raka piersi. Uzyskane wyniki sugerują, że ocena telomerów w leukocytach krwi może, przynajmniej częściowo, odpowiadać stopniowi zaawansowania raka piersi i statusowi receptora HER2 - publikacja w *Oncology Letters* z 2016 roku. Kolejnym celem badań była analiza właściwości przeciwnowotworowych kationowej porfiryny TMPyP4 w dwóch różnych liniach komórkowych ludzkiego raka piersi MCF7 i MDA-MB-231. W badaniach tych wykazano, że w krótkim okresie TMPyP4 nie wykazywał działania cytotoksycznego, ani nie uwrażliwiał MCF7 i MDA-MB-231 na doksorubicynę, ale zmieniał adhezję i migrację komórek raka piersi. Wykazano, że efekt ten może nie być związany z telomerami lub telomerazą. Wyniki opublikowano w *International Journal of Molecular Sciences* w roku 2019.

Autofagia – metody analizy procesu oraz jej znaczenie w mechanizmie rozwoju choroby nowotworowej, to kolejny obszar pracy naukowej. Habilitantka została dołączona przez edytora głównego czasopisma *Autophagy*, prof. Daniela Klionsky, do grona współautorów IV wydania przewodnika po autofagii. Czwarta edycja z 2021 przewodnika po autofagii w sposób krytyczny omawia aktualne metody oceny tego procesu.

Habilitantka opisała również aktualną wiedzę na temat procesu autofagii i jego udziału w nowotworzeniu, w publikacji z 2014 roku, która ukazała się w czasopiśmie *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*.

Kolejna publikacja z tego obszaru została przygotowana pod kierunkiem dr Ewy Totoń, gdzie opisano postępy w zrozumieniu dynamiki molekularnej i regulacji autofagii oraz omówiono rolę bekliny-1 w terapii przeciwnowotworowej; publikacja *Journal of Physiology and Pharmacology* z roku 2014.

W swoim dorobku Habilitantka posiada również publikacje dotyczące mammaglobiny Informacje zawarte w publikacji „*Mammaglobina A jako diagnostyczny marker i cel terapii w raku piersi. Mammaglobin A as a diagnostic marker and therapeutic target in breast cancer*” której jest głównym autorem, przedstawiają aktualny stan wiedzy na temat budowy mammaglobiny A, jej funkcji, roli w powstawaniu nowotworów oraz wykorzystania tego białka jako markera diagnostycznego i celu terapeutycznego w raku piersi.

Przeprowadzono badania na dwóch liniach komórek raka piersi MCF7 (ER+/PR+/HER2-) i MDA-MB-231 (ER-/PR-/HER2-), które potraktowano lekami

stosowanymi w terapii systemowej raka piersi oraz jednocześnie modulującymi proces autofagii (tamoksyfen, ewerolimus, doksorubicyna) w różnych zakresach stężeń. Podczas badań zaobserwowano korelację między poziomem białek MGB1 i LC3-II, co sugeruje, że aktywność autofagii może być związana z obecnością ludzkiej mammaglobiny A. Rezultaty tych badań zaprezentowano podczas kongresu EACR: A Matter of Life or Death: Mechanisms, Models and Therapeutic Opportunities, w Beragmo w roku 2020.

Kolejnym z obszarów zainteresowań Habilitantki były również glejaki mózgu. W artykule opublikowanym na łamach *Współczesnej Farmacji* opisano etiologię i epidemiologię glejaka wielopostaciowego mózgu, ze szczególnym uwzględnieniem historii terapii tej jednostki chorobowej i działania temozolomidu oraz omówieniem alternatywnych strategii terapeutycznych.

miRNA, jako potencjalne elementy monitorowania odpowiedzi na leczenie lekami uszkadzającymi DNA w komórkach raka piersi to ostatni z obszarów badawczych. Wykorzystując doświadczenie z zakresu hodowli komórkowej oraz technik biologii molekularnej, Habilitantka włączyła się w projekt realizowany przez Studenckie koło Naukowe Biosfera, działające przy Katedrze Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, dotyczący wykorzystania miRNA jako potencjalnych markerów monitorowania odpowiedzi na leczenie stosowane w raku piersi.

W badaniach przeprowadzonych na trzech liniach komórek raka piersi, należących do trzech różnych podtypów molekularnych (MCF7, MDA-MB-231 oraz SK-BR-3) oceniono zmiany w poziomach wybranych miRNA po traktowaniu doksorubicyną lub cisplatyną. Wyboru miRNA dokonano na podstawie danych z piśmiennictwa dotyczących najczęściej występujących zmienionych miRNA w raku piersi. Wyniki badań wskazują, że wybrane miRNA są dobrymi kandydatami na markery odpowiedzi komórek raka piersi na doksorubicynę lub cisplatynę, natomiast, co wymaga podkreślenia, są to wstępne badania wykazujące efekty, które mogą być silnie związane z samym zastosowanym lekiem i działaniem jego konkretnych stężeń; publikacja w *Genes (Basel)* z roku 2023.

Należy podkreślić, że w okresie po uzyskaniu stopnia doktora, widoczny jest istotny przyrost liczby publikacji.

b) Ocena osiągnięcia naukowego rozprawy habilitacyjnej

Rozprawę habilitacyjną zatytułowaną „Identyfikacja mechanizmów działania wybranych pochodnych triterpenoidów w różnych podtypach molekularnych raka piersi in vitro” stanowi spójny cykl pięciu prac (czterech publikacji oryginalnych i jednej poglądowej),

opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Osiągnięcie dotyczy badania szlaków i celów molekularnych oddziaływania pochodnych triterpenów z grupy ekdysteroidów oraz pochodnych kwasu oleanolowego, uwzględniając proces autofagii, apoptozy oraz migracji komórek nowotworowych gruczołu piersiowego.

W czterech publikacjach dr n. farm Natalia Lisiak jest pierwszym autorem, w jednej współautorem. Habilitantka przedstawiła oświadczenia wszystkich współautorów, które wskazują na Jej istotny udział w ich przygotowaniu i potwierdzają umiejętność pracy w zespole naukowym. Z oświadczeń współautorów wynika, że Habilitantka opracowała koncepcje prac oraz ich założenia, dokonywała przeglądy piśmiennictwa, wykonywała część eksperymentalną, opracowała uzyskane wyniki, przeprowadziła analizy statystyczne, opracowywała ryciny i brała udział w ich napisaniu i przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Publikacje będące przedmiotem rozprawy były poddane szczegółowej ocenie recenzentów i zostały opublikowane w czasopismach o IF: 2,720, 5.168, 3.296, 6.208 oraz 6.208, w których obowiązujące standardy zapewniają wysoki poziom naukowy publikowanych wyników oraz ich oryginalność. Łączny Impact Factor dla tych pięciu prac wynosi: 23.6; punktacja MEiN dla tych pięciu prac wynosi: 445; liczba cytowań według Web of Science (WoS): 33

Publikacja pogładowa była finansowana z funduszu przeznaczonego na działalność statutową Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (502-01-03318432-02496). Badania zawarte w publikacji 2 są efektem współpracy z prof. Gerardem Nowakiem z Katedry Surowców Naturalnych i Kosmetycznych UMP i były finansowane ze środków przyznanych w ramach funduszu statutowego Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (502-01-03318432-02496).

Wyniki badań, zawarte w publikacji 3 były finansowane z funduszu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu PRELUDIUM, którego dr Lisiak była kierownikiem (grant 2011/01/N/NZ4/03433) oraz funduszy przeznaczonych na działalność statutową Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Badania zawarte w publikacjach 4 i 5 były prowadzone w ramach dwóch niezależnych, kierowanych przez Habilitantkę projektów badawczych dla młodych naukowców, finansowanych z funduszy Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu: „Ocena udziału receptora estrogenowego i receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu w

mechanizmie autofagii w komórkach raka piersi traktowanych pochodnymi kwasu oleanolowego” oraz „Ocena mechanizmu działania pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi HER-2 dodatnich” (środki przyznane w latach 2016 i 2018 – nr projektu: 502-14-03318432-09182).

W badaniach wykorzystane zostały nowoczesne techniki, które zostały odpowiednio dobrane do zakresu działań. Celem prezentowanego osiągnięcia naukowego była ocena aktywności biologicznej wybranych triterpenoidów w komórkach raka piersi *in vitro*, reprezentujących trzy różne podtypy molekularne raka piersi, luminalny (ER+/PR+/HER2-/EGFR-, komórki MCF7 i T-47D), bazalny (ER-/PR-/HER2-/EGFR+, komórki MDA-MB-231 i MDA-MB-468) i HER-2 –dodatni (ER-/PR-/HER2+/EGFR-, komórki SK-BR-3) i w odniesieniu do komórek nienowotworowych gruczołu piersiowego (MCF-10A i MCF-12A).

Prace badawcze Habilitantki rozpoczęły się od publikacji *Autophagy as a potential therapeutic target in breast cancer treatment* w której zostały zebrane informacje na temat procesu autofagii, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu tego procesu i jego znaczenia w kontekście choroby nowotworowej. Opisano również etapy tego procesu oraz w jaki sposób jest on regulowany. Dane wskazują jak ważny jest mechanizm autofagii w rozwoju i progresji choroby nowotworowej, stąd też ścieżki zaangażowane w przesyłanie sygnału do autofagii mogą stanowić interesujący cel terapeutyczny. Habilitantka podkreśliła również konieczność rozwoju badań nad mechanizmami regulującymi proces autofagii, co pozwoli na udoskonalanie leków i tworzenie ich nowych kombinacji w celu zwiększenia efektywności leczenia raków piersi o różnym podtypie molekularnym.

W pierwszym etapie badań eksperymentalnych, których wyniki zostały opublikowane w pracy *Proapoptotic and proautophagic activity of 20-hydroxyecdysone in breast cancer cells in vitro* Habilitantka przeprowadziła identyfikacje mechanizmów działania pochodnych ekdysteroidów w komórkach raka piersi.

W swoich badaniach Habilitantka przedstawiła aktywność biologiczną grupy trzech triterpenoidów, zaliczanych do ekdysteroidów: 20-hydroksyekdysonu, ajugasteronu C i polipodyny B. Następnie zaprojektowała oraz przeprowadziła badania na trzech liniach komórek raka piersi, dwóch reprezentujących podtyp luminalny (MCF7 i T-47D) oraz jednej linii reprezentującej podtyp bazalny (MDA-MB-231), a także na linii komórek nienowotworowych gruczołu piersiowego (MCF-10A). Przeprowadzone przez Habilitantkę eksperymenty wykazały bardziej specyficzny przeciwnowotworowy potencjał działania ekdysteroidów w komórkach pozbawionych receptorów steroidowych i HER2. Ponadto, w przeprowadzonych badaniach dr Lisiak wykazała, że mechanizm działania 20-HE zachodzi na

drodze aktywacji ścieżki apoptozy oraz autofagii, z udziałem białek Bax/Bcl2/PARP/kaspaza-3 oraz mTOR/p62/LC3.

W kolejnej pracy: „*Semisynthetic oleanane triterpenoids inhibit migration and invasion of human breast cancer cells through downregulated expression of the ITGB1/PTK2/PXN pathway*” Habilitantka wraz z zespołem zaprezentowała wyniki dotyczące wpływu kwasu oleanolowego i jego dwóch półsyntetycznych pochodnych: ester metylowy kwasu 3-hydroksyimino-11-oksoolean-12-en-28-owego (HIMOXOL) oraz 28→13 lakton kwasu 12 α -bromo-3-hydroksyiminoolean-28-owego (Br-HIMOLID) na proces migracji i inwazji komórek raka piersi *in vitro*. W badaniach oceniła wpływ pochodnych HIMOXOL i Br-HIMOLID na komórki estrogenowo-zależne MCF7 i T-47D, komórki potrójnie-ujemne / podtyp bazalny: MDA-MB-231 i MDA-MB-468, oraz komórki nienowotworowe gruczołu piersiowego CF-12A. Badania pokazały, że adhezja podczas inwazji komórek nowotworowych zależy od komórkowych cząstek adhezyjnych z rodziny integryn. Kluczowym celem badań prezentowanych w tej publikacji była ocena potencjału metastatycznego dwóch półsyntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi i komórkach nienowotworowych gruczołu piersiowego. Habilitantka wykazała, że oba analogi HIMOXOL i Br-HIMOLID charakteryzują się wyższą efektywnością działania niż sam związek macierzysty - OA. Wysoka aktywność HIMOXOL może być związana z obecnością ugrupowania oksymowego w pozycji C11 w strukturze tego związku. Efektywność działania tego związku w komórkach estrogenowo-zależnych była wyższa niż w komórkach o podtypie bazalnym. W teście oceniającym inwazyjność zaobserwowano znaczące obniżenie potencjału inwazyjnego komórek MCF7 po potraktowaniu HIMOXOL i komórek MDA-MB-231 po potraktowaniu oboma analogami OA. W celu zweryfikowania mechanizmu działania anty-migracyjnego i anty-inwazyjnego HIMOXOL i Br-HIMOLID w komórkach MCF7, MDA-MB-231 oraz MDA-MB-468 oceniono poziom integryny β 1, FAK i paksyliny na poziomie mRNA techniką western blot oraz qPCR. Wykazano, że oba analogi OA wykazują wyższy potencjał działania w komórkach najbardziej inwazyjnych, MDA-MB-231, obniżając poziom integryny β 1, markera inwazyjności. Habilitantka wykazała brak wpływu badanych analogów OA na migrację komórek nienowotworowych gruczołu piersiowego, MCF-12A, co jest pożądanym efektem w kontekście terapii przeciwnowotworowej i wskazuje na selektywność działania badanych związków.

W kolejnym etapie, w celu oceny udziału estrogenów i szlaku ER oraz receptora EGFR w mechanizmie odpowiedzi różnych pod kątem molekularnym komórek raka piersi na działanie związków, Habilitantka przeprowadziła badania, których rezultaty opublikowała w

publikacji 4 *Biological activity of oleanolic acid derivatives HIMOXOL and Br-HIMOLID in breast cancer cells is mediated by ER and EGFR*. Dla zrealizowania zamierzonego celu, Habilitantka stworzyła model eksperymentalny, w którym receptor estrogenowy w komórkach MCF7 zablokowała wykorzystując fulwestrant. Drugim modelem badawczym były komórki MDA-MB-231 z zablokowanym EGFR, które dr Lisiak uzyskała poprzez zastosowanie gefitinibu, hamującego aktywność kinazy tyrozynowej EGFR. W komórkach z zablokowanymi receptorami ER lub EGFR (odpowiednio MCF7/ER- i MDA-MB-231/EGFR-) analiza cyklu komórkowego wykazała, że jedyną modyfikacją, którą zaobserwowała w cyklu komórkowym w komórkach MCF7/ER- po potraktowaniu wszystkimi badanymi związkami, było zatrzymanie komórek MCF7 w fazie S, z jednoczesnym spadkiem fazy G2/M oraz wzrostem fazy G0/G1.

W publikacji 4 Habilitantka wykazała również, że blokowanie szlaków, w których pośredniczą ER lub EGFR, prowadzi do zmniejszenia potencjału anty-migracyjnego pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach MCF7 i MDA-MB-231. W komórkach MCF7/ER+ i MDA-MB-231/EGFR+ HIMOXOL i Br-HIMOLID istotnie zmniejszyły potencjał migracyjny tych komórek. Natomiast w komórkach MCF7 ER- i MDA-MB-231 EGFR- wykazano jedynie nieznaczne działanie anty-migracyjne tych pochodnych. Interesującym jest fakt obniżenia w badanych komórkach poziomu fosforylacji FAK i całkowitego poziomu białka FAK, które jest związane nie tylko z adhezją, ale także z innymi procesami, takimi jak proliferacja i przeżycie.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że oba receptory mogą znacząco zmieniać odpowiedź komórek nowotworowych na badane triterpenoidy. Dr Lisiak w badaniach opisanych w publikacji 4. wykazała, że modyfikacja związku macierzystego, czyli OA, może znacząco wzmocnić aktywność biologiczną tego związku, i że efekt ten jest związany z krytycznymi procesami metabolicznymi komórek nowotworowych. Habilitantka wskazała zatem nowy kierunek i możliwości modyfikacji struktury OA, które zwiększają aktywność biologiczną tej grupy związków względem komórek nowotworowych gruczołu piersiowego z jednoczesnym wskazaniem punktów uchwytu działania tych związków (receptory ER i EGFR oraz szlak autofagii).

W ostatniej pracy oryginalnej *Oleanolic acid's semisynthetic derivatives HIMOXOL and Br-HIMOLID show proautophagic potential and inhibit migration of HER2-positive breast cancer cells in vitro* Habilitantka przedstawiła ocenę aktywności biologicznej pochodnych kwasu oleanolowego, HIMOXOL i Br-HIMOLID w komórkach raka piersi HER2-dodatnich, SK-BR-3. Doktor Lisiak wykazała wyższą cytotoksyczność HIMOXOL i

Br-HIMOLID względem komórek SK-BR-3 w porównaniu do OA. Dodatkowo, za pomocą analizy cytometrycznej cyklu komórkowego wykazała właściwości cytostatyczne obu pochodnych OA z niewielką aktywnością proapoptotyczną Br-HIMOLID.

Badania wykazały znaczące obniżenie liczby migrujących komórek (po zastosowaniu subcytotoksycznych stężeń związków) w teście zarastania wolnej przestrzeni, co Habilitantka dodatkowo potwierdziła analizą białek zaangażowanych w proces adhezji/migracji i inwazji: integryna $\beta 1$, FAK i paksylina. Ponadto w publikacji 5 przedstawiono analizę *in silico* oddziaływania pochodnych OA i samego związku macierzystego z receptorem HER2. Badanie to potwierdziło zwiększoną efektywność w porównaniu do OA, oddziaływania HIMOXOL i Br- HIMOLID z HER2 w komórkach SK-BR-3. W przedstawionej publikacji Habilitantka wykazała, że Br-HIMOLID wykazuje wyższą efektywność działania w stosunku do komórek HER-2 dodatnich, a dodatkowo obniża poziom samego receptora HER2 na poziomie białka. Habilitantka wysunęła wniosek, że HIMOXOL i Br-HIMOLID mogą stanowić ważny element planowania strategii terapeutycznej HER2-dodatnich raków piersi.

Badania i uzyskane przez Habilitantkę wyniki są niezwykle istotne i wnoszą cenny wkład w zrozumienie szlaków i celów molekularnych oddziaływania pochodnych triterpenów z grupy ekdysteroidów oraz pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego. Do najważniejszych osiągnięć Habilitantki opisanych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, należy wykazanie znamiennej aktywności ekdysteroidów 20-HE i ajugasteronu C w różnych, pod kątem statusu receptorów, podtypach raka piersi- z wykazaniem bardziej specyficznego przeciwnowotworowego potencjału działania ekdysteroidów w komórkach pozbawionych receptorów steroidowych (ER/PR) oraz HER2. Doktor Lisiak udokumentowała odmienny, zależny od struktury chemicznej związków, mechanizmu działania 20-HE (antyproliferacyjny) i ajugasteronu C (proproliferacyjny) oraz brak aktywności polipodyny B izolowanych z liści sierpika koronowatego w komórkach raka piersi podtypu bazalnego i luminalnego. Habilitantka wskazała, że analogi kwasu oleanolowego, HIMOXOL i Br-HIMOLID, wykazują wyższy potencjał działania w komórkach najbardziej inwazyjnych, potrójnie ujemnych.

Habilitantka udowodniła, że w komórkach estrogenowo-zależnych, silniejszy efekt działania wykazuje związek z ugrupowaniem oksymowym- HIMOXOL, natomiast w komórkach potrójnie ujemnych, związek z ugrupowaniem bromolaktonowym, co wytycza możliwości i wskazuje kierunek projektowania nowych leków dedykowanych do konkretnych podtypów molekularnych raka piersi.

Doktor Lisiak wykazała również, że blokowanie szlaków, w których pośredniczą ER lub EGFR, prowadzi do zmniejszenia potencjału anty-migracyjnego pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi podtypu luminalnego oraz bazalnego oraz określiła, że receptory ER i EGFR mogą znacząco zmieniać odpowiedź komórek nowotworowych na badane analogi OA. Komórki z ekspresją ER i EGFR wykazują wyższą aktywność autofagiczną niż komórki z zablokowanymi receptorami.

Bardzo istotny jest aspekt praktyczny prowadzonych badań, których wyniki prowadzą do wyjaśnienia i lepszego zrozumienia mechanizmów regulujących procesy istotne w rozwoju i przebiegu raka piersi.

III. Ocena aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Habilitantka pracę naukową rozpoczęła od stażu naukowego podczas przygotowania pracy magisterskiej, w Humangenetik Institut, Christian Albrechts Universitat, Kilonia. W 2008 odbyła również staż naukowo-szkoleniowy w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. W roku 2023 odbyła staż naukowy w Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu na Wydziale Nauk o Zdrowiu w Zakładzie Nauk Podstawowych.

Wyrazem umiejętności pracy interdyscyplinarnej Habilitantki jest publikacja numer 2 z cyklu stanowiącego dzieło, do której badania wykonano we współpracy z prof. Gerardem Nowakiem z Katedry Surowców Naturalnych i Kosmetycznych UMP oraz udział jako wykonawca w projektach realizowanych w ramach umowy konsorcjum, finansowanych przez NCN (Produkty termiczno-oksydacyjnej degradacji stigmasterolu i jego estrów - izolacja, frakcjonowanie i oraz ocena cytotoksyczności i mechanizmów działania w ludzkich komórkach prawidłowych in vitro; (2015/17/B/NZ9/01535); Znakowane pirenem sondy molekularne zbudowane z dwóch zintegrowanych części: i-motywu oraz latarni molekularnej; (2015/17/B/ST4/03627).

W dorobku naukowym Habilitantki, współpraca zagraniczna i krajowa znalazła odzwierciedlenie w odbytych stażach, publikacjach i doniesieniach naukowych oraz przygotowanym zgłoszeniem patentowym.

W przypadku współpracy zagranicznej współpraca naukowa z:

- prof. Reiner Siebert - Humangenetik Christian Albrechts Universitat zu Kiel, Niemcy – 5-miesięczny staż; 1 publikacja, 1 doniesienie zjazdowe;

- prof. Johann Hofmann - Biocenter, Division of Medical Biochemistry, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria. – 2 publikacje, 3 konferencje naukowe.

Natomiast w przypadku współpracy krajowej, współpraca z:

-dr hab. Anna Dembska, prof. UAM - Zakład Chemii Bioanalitycznej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Instytut Chemii Bioorganicznej PAN (zgłoszenie patentowe 2022 rok);

-dr hab. Dorota Diakowska, prof. UM, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Nauk Medycznych, Katedra Nauk Podstawowych (staż naukowy);

-Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu - Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego (współpraca naukowa w realizacji projektu badawczego);

-Fundacja Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Poznański Park Naukowo-Technologiczny (współpraca naukowa w realizacji projektu badawczego).

IV. Kierowanie i udział w projektach międzynarodowych i krajowych

Habilitantka w swoim dorobku naukowym wykazała udział w licznych grantach. Przed doktoratem były to dwa projekty: „Nowo syntetyzowane związki triterpenowe jako aktywatory apoptozy i/lub inhibitory proliferacji komórek nowotworowych”; Finansowane z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW; 1149/B/P01/2008/34), gdzie dr Lisiak była wykonawcą oraz „Badanie efektywności działania przeciwnowotworowego nowych syntetycznych triterpenów na poziomie indukcji autofagii oraz modulacji procesu adhezji i migracji komórek raka piersi” - 2011/01/N/NZ4/03433 - PRELUDIUM; w którym pełniła rolę kierownika.

Po doktoracie, była wykonawcą jak i realizowała badania zlecone w pięciu oraz kierownikiem w dwóch projektach finansowanych przez UMP oraz NCN. Dwa z nich omówiono wyżej.

Pozostałe projekty dotyczyły: Oceny aktywności biologicznej związków występujących w *Drosera spatulata*, wobec wybranych linii komórkowych, *projekt finansowany ze środków przyznanych w ramach funduszu statutowego Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (502-01-03318432-02496)*; Oceny udziału receptora estrogenowego i receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu w mechanizmie autofagii w komórkach raka piersi traktowanych pochodnymi kwasu oleanolowego, *projekt finansowany ze środków przyznanych na realizację badań dla młodych naukowców, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (502-14-03318432-09182)* –; *kierownik projektu*; Oceny

mechanizmu działania pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi HER-2 dodatnich, *projekt finansowany ze środków przyznanych na realizację badań dla młodych naukowców Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (502-14-03318432-09182); kierownik projektu.*

Kolejny projekt to „Badanie znaczenia regulacji telomerazy dla oporności komórek nowotworowych na leki uszkodzające DNA”; finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (2016/21/B/NZ7/01079); wykonawca projektu.

Jeden z projektów, w którym dr Lisiak pełni rolę wykonawcy jest w trakcie realizacji: „Nowe strategie w leczeniu glejaka wielopostaciowego oparte o zoptymalizowane, celowane kombinacje wielolekowe”. Finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (2020/39/D/NZ7/00789);

Habilitantka była członkiem komitetu organizacyjnego konferencji pt. *Molecular aspects of anticancer therapy*, organizowanej przez Katedrę i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, 17-20 czerwca 2008 roku oraz członkiem komitetu organizacyjnego oraz komitetu naukowego konferencji XI wykłady otwarte z cyklu „Spotkania Młodych z Nauką w Poznaniu” - udział w komitecie organizacyjnym oraz komitecie naukowym; Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, 15 kwietnia 2023 roku.

Doktor Lisiak przygotowała recenzje 12 artykułów w czasopismach z listy JCR: *Acta Biochimica Polonica* – 5 recenzji, *Chemico-Biological Interactions*, *Biomedicines* – 2 recenzje, *Histology&Histopathology*, *World Journal of Surgical Oncology*, *Pharmaceutical Biology*, *Artificial Cells*, *Nanomedicines and Biotechnology*.

Doktor Lisiak brała również udział w ocenie wniosków o finansowanie badań naukowych, złożonych przez Studenckie Towarzystwa Naukowe, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (2020-2023).

V. Ocena dorobku dydaktycznego, popularyzatorskiego, działalności organizacyjnej oraz współpracy z otoczeniem społeczno-gospodarczym

W swoim dorobku, Habilitantka posiada wniosek patentowy: P.441574: Zastosowanie 37-merowej sondy oligonukleotydowej, reagującej na zmiany pH otoczenia, jako indykatora do monitorowania zmian w metabolizmie komórek nowotworowych w odpowiedzi na zastosowane terapeutyki (czerwiec 2022).

Od początku pracy zawodowej, dr Lisiak jest zaangażowana w realizację zajęć dydaktycznych organizowanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Prowadzi zajęcia z przedmiotów: biologia molekularna – ćwiczenia dla studentów II roku kierunku analityka medyczna; diagnostyka molekularna – ćwiczenia dla studentów II roku kierunku analityka medyczna; chemia kliniczna – wykład, seminarium oraz ćwiczenia dla studentów III roku kierunku analityka medyczna; diagnostyka izotopowa – wykład oraz ćwiczenia dla studentów IV roku kierunku analityka medyczna; ćwiczenia specjalistyczne - dla studentów V roku kierunku analityka medyczna; biochemia kliniczna – koordynacja oraz prowadzenie wykładów, seminariów oraz ćwiczeń dla studentów II roku kierunku biotechnologia medyczna; biologia komórki – ćwiczenia dla studentów I roku kierunku inżynieria farmaceutyczna.

Doktor Lisiak była opiekunem 6 prac magisterskich oraz promotorem 14 prac magisterskich i 1 pracy inżynierskiej.

Habilitantka angażuje się w działalność organizacyjną na rzecz Uczelni. W latach 2016-2021 pełniła funkcję opiekuna roku kierunku analityka medyczna. W latach 2018-2023 pełniła funkcję członka Komisji ds. Nostryfikacji Dyplomów na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W latach 2018-2023 pełniła funkcję członka komisji Rekrutacyjnej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu; W roku 2018 oraz 2022 pełniła funkcję recenzenta oraz członka Jury Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W roku 2018 uczestniczyła w przygotowaniu dokumentacji oraz pomieszczeń w obrębie Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej UMP, do utworzenia oraz działalności Zakładu Inżynierii Genetycznej (decyzja Ministerstwa Środowiska Nr 154/2018).

Doktor Lisiak wniosła również wkład w popularyzację nauki. W roku 2019 została zaangażowana w przeprowadzenie warsztatów w ramach akcji pt. „Co licealista wie o laboratorium?”, koordynowanej przez Studenckie Towarzystwo Diagnostów Laboratoryjnych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W roku 2023 prowadziła warsztaty podczas konferencji Spotkania Młodych z Nauką, organizowane przez koło naukowe Biosfera przy Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP.

Pani Doktor wzięła również udział w szeregu szkoleń i kursów specjalistycznych.

Wniosek końcowy

Rozprawa habilitacyjna dr n. farm Natalii Lisiak stanowi jeden logiczny cykl tematyczny. Przedstawione wyniki prac eksperymentalnych wnoszą nowe elementy w rozwój badań w danej dziedzinie, a praca przeglądowa pozwala na usystematyzowanie obecnej wiedzy w odniesieniu do badań Habilitantki.

Osiągnięcie naukowe stanowi samodzielny i oryginalny dorobek Habilitantki, która wykazała umiejętność planowania oraz prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Należy również podkreślić umiejętność pracy Habilitantki w zespole badawczym, która pozwoliła na interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań, co w sposób istotny wpłynęło na innowacyjność otrzymanych wyników.

Doktor n. farm. N. Lisiak posiada niezwykle wartościowy dorobek, jest dojrzałym naukowcem rozpoznawalnym w środowisku krajowym i międzynarodowym. Rozpoznawalność Habilitantki wśród społeczności specjalistów dokumentuje współpraca z uznanymi zespołami badawczymi, udział w projektach naukowych, jak również wykonane recenzje publikacji.

Oceniana rozprawa habilitacyjna, przedstawiony do oceny dorobek naukowy, działalność dydaktyczna i organizacyjna, spełniają kryteria, określone w *art. 219 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Przedkładam zatem Wysokiej Kapitulie Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, wniosek o dopuszczenie dr n. farm. Natalii Lisiak do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

KIEROWNIK
Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Ewa Balcerzak
Prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerzak