

Wrocław 5.01.2024

dr hab. n. med. Adam Maciejczyk

Kierownik Zakładu Radioterapii

Dolnośląskiego Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii

we Wrocławiu

Kierownik Kliniki Radioterapii Katedry Onkologii

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

**Ocena dorobku naukowego i osiągnięcia naukowego, który stanowi cykl pięciu prac zatytułowany: „Identyfikacja mechanizmów działania wybranych pochodnych triterpenoidów w różnych podtypach molekularnych raka piersi *in vitro*”**

**w postępowaniu habilitacyjnym dr n. farm. Natalia Lisiak**

### **1. Informacje podstawowe o kandydacie:**

Dr Natalia Lisiak (z domu Szymanowska) tytuł magistra analityki medycznej uzyskała na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu - Wydział Farmaceutyczny, Oddział Analityki Medycznej, w dniu 06 września 2007 roku. Pracę magisterską pt.: „Detekcja i charakteryzacja chromosomalnych złamań punktowych wpływających na IGH locus w chłoniaku Hodgkina za pomocą immunofluorescencji i cytogenetyki interfazowej (technika FICTION)” zrealizowała w Institut für Humangenetik Christian Albrechts Universität w Kilonii oraz w Zakładzie Chemii Klinicznej, Katedry Biochemii Farmaceutycznej. Promotor pracy był prof. Reiner Siebert i prof. dr hab. Maria Rybczyńska.

W dniu 31 stycznia 2008 roku, uchwałą Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych w Warszawie (Uchwała Nr 14-P/II/2008), otrzymała Prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego (Nr 11790).

### **2. Charakterystyka dorobku naukowego:**

W swojej pracy badawczej dr Natalia Lisiak od samego początku była zaangażowana w badania dotyczące oceny aktywności biologicznej różnego rodzaju związków pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznych. Jedną z grup związków, w badanie których aktywności została włączona, były produkty oksydacji papaweryny. Badania te wykazały aktywność ligandu 1 i wiązanie do jednoniciowych kwadrupleksów guaniny (G4), bogatych w G 3'-nawiasów telomerowego DNA, i zostały opublikowane w czasopiśmie *Investigational of New*

Drugs w 2009. Z uwagi na zainteresowania badawcze, w szczególności ocenę właściwości przeciwnowotworowych związków pochodzenia naturalnego, została włączona w zadania badawcze prowadzone we współpracy z Katedrą i Zakładem Botaniki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Celem tej współpracy była ocena aktywności biologicznej zapotyny, związku naturalnego wyizolowanego z pierwiosnka lekarskiego. W badaniach tych jako model badawczy wykorzystano komórki raka szyjki macicy z konstytutywnie aktywną PKC $\epsilon$ . Przeprowadzone badania wykazały, że PKC $\epsilon$  wzmacnia antyproliferacyjny efekt zapotyny, a ponadto związek aktywuje apoptozę. Wyniki otrzymane w toku realizacji tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *European Journal of Pharmacology* w 2012 roku. Jednocześnie Dr Natalia Lisiak, wykorzystując wiedzę oraz swoje zainteresowania, włączała się w badania prowadzone w Zakładzie Chemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, dotyczące częstości występowania polimorfizmów genu *ABCBI* w polskiej populacji pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem piersi. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Pharmacological Reports* w 2012 roku. Dodatkowym obszarem zainteresowań naukowym dr Lisiak było znaczenia telomerazy w chorobie nowotworowej. Badania miały na celu analizę konsekwencji wyciszania genów kodujących kluczowe podjednostki kompleksu telomerazy: TERT, TERC i TP1 w ludzkich komórkach raka piersi *in vitro*. Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w *Molecular Biology Reports* w 2013 roku. Wraz z rozwojem naukowym dr Lisiak coraz bardziej skupiała się na analizie procesu nowotworzenia w obrębie komórek raka piersi. Konsekwencją połączenia tej tematyki oraz oceny aktywności biologicznej związków pochodzenia naturalnego oraz syntetycznych było przygotowanie projektu badawczego promotorskiego, który dotyczył oceny aktywności biologicznej czterech pochodnych kwasu oleanolowego (DIOXOL, HIMOXOL, HIMOXAZOL i Br-HIMOLID) w komórkach raka piersi. Projekt ten stał się wiodącym tematem pracy doktorskiej dr Lisiak (projekt PRELUDIUM – NCN, 2011/01/N/NZ4/03433). Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej skupiły się na ocenie aktywności cytotoksycznej, cyklu komórkowego, autofagii oraz wpływu na migrację kwasu oleanolowego i jego czterech syntetycznych pochodnych na komórki raka piersi. Uzyskane wyniki zaprezentowano w dwóch publikacjach w czasopismach *Chemico-Biological Interactions* oraz *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* oraz na konferencji międzynarodowej EACR (European Association for Cancer Research) w Barcelonie, Hiszpania, w 2012 roku. W dniu 11 grudnia 2013 roku dr Natalia Lisiak uzyskała na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego (UMP) w Poznaniu stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych - dyplom przyznano z wyróżnieniem. Dysertacja pt. „Badanie mechanizmu działania pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi”, realizowana była w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP, promotorem pracy była prof. dr hab. Maria Rybczyńska.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych dr Natalia Lisiak konsekwentnie realizowała swoją działalność naukowo-badawczą w zakresie oceny aktywności biologicznej wybranych naturalnych oraz syntetycznych związków w komórkach nowotworowych. Aktywnie współpracowała z zespołem Katedry Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w badaniach grupy związków należących do benzanilidów i tiobenzanilidów. Trzy spośród badanych związków wykazały selektywną aktywność antyproliferacyjną oraz właściwości estrogenowe w stosunku do komórek estrogenowo-zależnych raka piersi. W kolejnym badaniu analizie poddano mechanizm działania pochodnej thiobenzanilidu- N, N'(1,2-fenylen)bis3,4,5-trifluorobenztioamidu (63T) w komórkach ludzkiego raka płuca oraz komórkach prawidłowych wywodzących się z płuc *in vitro*. Analiza morfologii komórek, dystrybucji komórek w fazach cyklu komórkowego, a ponadto procesu apoptozy, nekrozy i autofagii wykazały selektywność działania związku 63T na indukcję śmierci komórek

nowotworowych zależną od kaspaz oraz indukcję procesu autofagii w komórkach raka płuca bez wpływu na komórki nienowotworowe płuca.

W swojej pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora dr Lisiak była zaangażowana również we współpracę z zespołem Zakładu Botaniki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania te objęły dwie grupy związków naturalnych. Pierwszy typ badań obejmował ocenę aktywności biologicznej kwasu 3-O-acetylaeuritoloowego (3-O-AAA), wyizolowanego z rosziczki łyżeczkowatej (*Drosera spatulata*), w komórkach raka szyjki macicy, raka jelita grubego, raka piersi oraz komórkach nienowotworowych gruczołu piersiowego. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano cytostatyczne oraz anty-migracyjne właściwości 3-O-AAA. Wykazano również zdolność związku do modulacji ścieżki autofagii z udziałem białek regulatorowych tego procesu mTOR/beklina-1/Atg5. Drugą grupę badaną stanowiły związki wyizolowane z biomasy produkowanej za pomocą technik biotechnologicznych stosowanych w hodowli roślin różnych gatunków mikołajka (*Eryngium*): kwas rozmarynowy (RA) oraz 4'-O- $\beta$ -glukopiranozyd kwasu rozmarynowego (RAG4'). Wykazano wyższą cytotoksyczną aktywność RA w stosunku do wszystkich badanych komórek nowotworowych, natomiast najwyższą efektywność drugiego związku (RAG4') stwierdzono w stosunku do komórek raka jelita grubego. RAG4' nie wykazał natomiast aktywności w stosunku do komórek nienowotworowych, co wskazuje na jego bezpieczeństwo stosowania w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych.

Dr Lisiak kontynuowała również swoje prace badawcze w zakresie oceny udziału telomerazy w mechanizmie nowotworzenia w komórkach raka piersi. Działalność ta zaowocowała współautorstwem w kilku pracach, w których opisano wpływ wysokiej aktywności enzymu w komórkach nowotworowych na obniżoną wrażliwością komórek na terapię oraz wskazano nowe kierunki rozwoju terapii skojarzonych, w tym z udziałem inhibitorów telomerazy i immunoterapii ukierunkowanej na telomerazę. Autofagia to proces, który od początku pracy naukowej dr Lisiak znajdował się w kręgu jej zainteresowań. Z uwagi na swoją aktywność i doświadczenie naukowe Habilitantka została dołączona do grona współautorów 4 wydania przewodnika po autofagii, wytycznych umożliwiających prawidłowe przeprowadzenie, pod względem metodycznym, badań tego procesu. Aktualną wiedzę na temat tego złożonego procesu i jego udziału w nowotworzeniu dodatkowo opisała w publikacji z 2014 roku, w czasopiśmie Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. Z racji zainteresowania nowotworem piersi, w poszukiwaniu nowych celów molekularnych dla tej zróżnicowanej jednostki chorobowej, dr Lisiak zwróciła również uwagę na białko mammaglobina A. Rezultaty swoich badań i obserwacji przedstawiła w publikacji naukowej oraz zaprezentowała podczas kongresu EACR w Bergamo, Italy, w 2020 roku. Wykorzystując doświadczenie z zakresu hodowli komórkowej oraz technik biologii molekularnej dr Lisiak 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. Wstępne wyniki badań wskazują, że wybrane miRNA są dobrymi kandydatami na markery odpowiedzi komórek raka piersi na doksorubicynę lub cisplatinę.

Podsumowując bogaty dorobek naukowy dr Natalii Lisiak należy podkreślić konsekwencje w poszukiwaniu badawczym możliwości wykorzystania w diagnostyce i terapii nowotworów nowych związków pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznych. W 5 na 24 opublikowanych artykułów była pierwszym współautorem. Łączna punktacja dorobku naukowego dr Natalii Lisiak, poza cyklem stanowiącym osiągnięcie naukowe, wynosi 65,706 IF (1367 pkt. MEiN). Należy podkreślić dużą liczbę cytowań publikacji - 891 (bez autocytowań 863) oraz wysoki H-indeks, który wynosi 11.

**3. Ocena rozprawy habilitacyjnej lub zestawu publikacji składających się na habilitację wraz z uzasadnieniem, co przeprowadzone badania wnoszą do nauki.**

Na osiągnięcie naukowe dr Lisiak składa się monotematyczny cykl pięciu prac (czterech publikacji oryginalnych i jednej poglądowej), opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). W pracach przedstawiono wyniki badań dotyczących oceny aktywności biologicznej pochodnych triterpenów z grupy ekdysteroidów oraz pochodnych kwasu oleanolowego, w różnych pod kątem molekularnym komórkach raka piersi *in vitro*. Osiągnięcie dotyczy badania szlaków i celów molekularnych oddziaływania badanych związków, uwzględniając proces autofagii, apoptozy oraz migracji komórek nowotworowych gruczołu piersiowego.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Lisiak Natalia**, Totoń Ewa, Rybczyńska Maria. Autophagy as a potential therapeutic target in breast cancer treatment. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2018, 18, 7, 629-639 – autor korespondencyjny. **Impact Factor: 2.720**, Punktacja MEiN: 35.
2. Romaniuk-Drapała Aleksandra\*, **Lisiak Natalia\***, Totoń Ewa, Matysiak Anita, Nawrot Joanna, Nowak Gerard, Kaczmarek Mariusz, Rybczyńska Maria, Rubiś Błażej. Proapoptotic and proautophagic activity of 20-hydroxyecdysone in breast cancer cells *in vitro*. *Chem. Biol. Interact.* 2021, 342, 109479, 1-8 – autor korespondencyjny. \* **equal**. **Impact Factor: 5.168**; Punktacja MEiN: 100.
3. **Lisiak Natalia**, Paszel-Jaworska Anna, Totoń Ewa, Rubiś Błażej, Pakuła Martyna, Bednarczyk-Cwynar Barbara, Zaprutko Lucjusz, Rybczyńska Maria. Semisynthetic oleanane triterpenoids inhibit migration and invasion of human breast cancer cells through downregulated expression of the *ITGB1/PTK2/PXN* pathway. *Chem. Biol. Interact.* 2017, 268, 136-147 – autor korespondencyjny. **Impact Factor: 3.296**; Punktacja MEiN: 30.
4. **Natalia Lisiak**, Patrycja Dzikowska, Urszula Wisniewska, Mariusz Kaczmarek, Barbara Bednarczyk-Cwynar, Lucjusz Zaprutko, Błażej Rubiś. Biological activity of oleanolic acid derivatives HIMOXOL and Br-HIMOLID in breast cancer cells is mediated by ER and EGFR. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 5099, 1-20. **Impact Factor: 6.208**; Punktacja MEiN: 140.
5. **Lisiak Natalia Magdalena**, Lewicka Izabela, Kaczmarek Mariusz, Kujawski Jacek, Bednarczyk-Cwynar Barbara, Zaprutko Lucjusz, Rubiś Błażej. Oleanolic acid's semisynthetic derivatives HIMOXOL and Br-HIMOLID show proautophagic potential and inhibit migration of HER2-positive breast cancer cells *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11273, 1-20 – autor korespondencyjny. **Impact Factor: 6.208**; Punktacja MEiN: 140.

**Łączny Impact Factor dla tych pięciu prac wynosi: 23.6, punktacja MEiN wynosi: 445.**

**Łączna liczba cytowań wg Web of Science (WoS): 33.**

Publikacja poglądowa - *Autophagy as a potential therapeutic target in breast cancer treatment. Curr. Cancer Drug Targets*, 2018 oraz publikacja *Proapoptotic and proautophagic*

*activity of 20-hydroxyecdysone in breast cancer cells in vitro. Chem. Biol. Interact. 2021* były finansowane z funduszu przeznaczanego na działalność statutową Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wyniki badań, zawarte w publikacji *Semisynthetic oleanane triterpenoids inhibit migration and invasion of human breast cancer cells through downregulated expression of the ITGB1/PTK2/PXN pathway. Chem. Biol. Interact. 2017* były finansowane z funduszu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu PRELUDIUM, którego dr Lisiak była kierownikiem (grant 2011/01/N/NZ4/03433) oraz dodatkowo z funduszu przeznaczonych na działalność statutową Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania zawarte w publikacjach *Biological activity of oleanolic acid derivatives HIMOXOL and Br-HIMOLID in breast cancer cells is mediated by ER and EGFR. Int. J. Mol. Sci. 2023* i *Oleanolic acid's semisynthetic derivatives HIMOXOL and Br-HIMOLID show proautophagic potential and inhibit migration of HER2-positive breast cancer cells in vitro* były prowadzone w ramach dwóch niezależnych, kierowanych przez dr Natalię Lisiak 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).

#### Opisowa ocena osiągnięcia naukowego

Cykl publikacji zaprezentowany przez dr Natalię Lisiak skupia się na terapii raka piersi, która aktualnie uwarunkowana jest głównie podtypem molekularnym nowotworu. Niestety nowotwory rozwijają różnego rodzaju mechanizmy chroniące przed eliminacją komórek z organizmu. Jednym z takich mechanizmów jest oporność wielolekowa, która jest jedną z głównych przyczyn nieskuteczności terapii. W związku z tym konieczne jest poszukiwanie nowych, bardziej efektywnych w terapii leków. Obecność receptorów ER/PR oraz receptorów należących do rodziny HER jest szczególnie ważna zarówno dla diagnostyki jak i terapii pacjentów z rakiem piersi. Identyfikacja cząsteczek lub związków o potencjale do blokowania sygnalizacji z udziałem tych właśnie receptorów jest kluczowym elementem skutecznej strategii leczenia przeciwnowotworowego.

Interesującą i obiecującą pod kątem biologicznym grupą związków są triterpeny. Są to związki organiczne, heksamery izoprenu będące podgrupą terpenów. Dotychczas opisano ponad 4000 triterpenów i triterpenoidów (ich pochodnych). Triterpenoidy to duża klasa produktów naturalnych o szerokim spektrum bioaktywności. Do grupy triterpenoidów zaliczane są ekdysteroidy, wtórne metabolity, szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin i zwierząt. Związki te posiadają szeroki zakres aktywności farmakologicznej, z których większość jest korzystna dla człowieka. Stały się więc interesującymi związkami dla przemysłu farmaceutycznego, ze względu na wciąż badane działanie adaptogenne, anaboliczne, hipoglikemiczne, hipocholesterolemiczne i przeciwdrobnoustrojowe. Niestety niewiele wiadomo na temat ich aktywności przeciwnowotworowej, dlatego celem przeprowadzonych badań była ocena aktywności biologicznej wybranych ekdysonów w komórkach raka piersi o różnych podtypach molekularnych. Innym interesującym przedstawicielem triterpenoidów jest kwas oleanolowy (OA), pentacykliczny triterpenoid szeroko rozpowszechniony w świecie

roślin. Dane literaturowe wskazują na potencjalne działanie terapeutyczne OA w różnych jednostkach chorobowych, takich jak: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, stwardnienie rozsiane, zaburzenia metaboliczne, cukrzyca, zapalenie wątroby i różne nowotwory. Co więcej, kwas oleanolowy służy również jako związek macierzysty dla syntezy nowych triterpenoidów, które mogą okazać się niezbędne w znalezieniu skutecznych metod terapeutycznych dla różnych dolegliwości. Widoczne są również postępy w projektowaniu i syntezie chemicznych pochodnych OA w celu zwiększenia ich rozpuszczalności, biodostępności i siły działania. Niektóre z tych pochodnych były również kandydatami na nowe leki w wielu badaniach klinicznych. Aktywność przeciwnowotworowa triterpenoidów jest związana z aktywacją różnego rodzaju ścieżek, tj. proliferacja, migracja, apoptoza czy autofagia. Szczególnie ten ostatni proces jest interesujący w kontekście jego modulacji i zastosowania terapeutycznego.

Celem osiągnięcia naukowego obejmującego cykl prac jest 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-MB231 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).

W pierwszej pracy z cyklu autorka opisuje proces autofagii, jego wpływ na stan zdrowia, ale również jest przyczyną rozwoju różnych jednostek chorobowych, w tym nowotworów. W kontekście nowotworzenia należy ten proces rozpatrywać dwukierunkowo. Mianowicie, z jednej strony autofagia zapobiega transformacji nowotworowej komórek, a z drugiej zapewnia możliwość adaptacji do niekorzystnych warunków, takich jak hipoksja, czy niedobór substancji odżywczych. Przedstawione w publikacji informacje wskazują jak ważny jest mechanizm autofagii w rozwoju i progresji choroby nowotworowej, podkreślając, że ścieżki zaangażowane w przesyłanie sygnału do autofagii mogą stanowić interesujący cel terapeutyczny. Zdolność leków do oddziaływania ze szlakami zaangażowanymi w indukcję bądź zahamowanie tego procesu mogą stanowić istotny element w procesie wyboru odpowiedniego postępowania terapeutycznego w raku piersi.

W kolejnej swojej publikacji, w pierwszym badaniu eksperymentalnym, dr Lisiak skupiła się na identyfikacji mechanizmów działania pochodnych ekdysteroidów w komórkach raka piersi. Przedstawiła aktywność biologiczną grupy trzech triterpenoidów, zaliczanych do ekdysteroidów (ekdysonów): 20hydroksyekdysonu (20-HE), ajugasteronu C i polipodyny B. Związki te posiadają udokumentowaną aktywność hipoglikemiczną, anaboliczną i przeciwzapalną, natomiast w odniesieniu do ich aktywności przeciwnowotworowej niewiele wiadomo. Przeprowadzono badania na trzech liniach komórek raka piersi, dwóch reprezentujących podtyp luminalny oraz jednej linii reprezentującej podtyp bazalny, a także na linii komórek nienowotworowych gruczołu piersiowego. W przeprowadzonym eksperymencie wykazała bardziej specyficzny przeciwnowotworowy potencjał działania ekdysteroidów w komórkach pozbawionych receptorów steroidowych i HER2. Przeprowadzone przez dr Lisiak badania potwierdzają, że aktywność biologiczna ekdysonów jest mocno związana z lokalizacją grup funkcyjnych i rodzajem modyfikacji. Struktura stereochemiczna rdzenia grupy związków może być taka sama, natomiast efekt anaboliczny ich oddziaływania zależy od pozycji i liczby grup hydroksylowych. Ponadto w przeprowadzonych badaniach 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.

Drugą grupą związków, których aktywność opisała dr Lisiak był kwas oleanolowy oraz jego pochodne (publikacja z cyklu: Lisiak Natalia, Paszel-Jaworska Anna, Toton Ewa, Rubiś Błażej, Pakuła Martyna, Bednarczyk-Cwynar Barbara, Zaprutko Lucjusz, Rybczyńska Maria.

*Semisynthetic oleanane triterpenoids inhibit migration and invasion of human breast cancer cells through downregulated expression of the ITGB1/PTK2/PXN pathway. Chem. Biol. Interact. 2017, 268, 136-147.* Badania przedstawione w publikacji stanowią kontynuację prac badawczych prowadzonych w ramach pracy doktorskiej Habilitantki. W publikacji zaprezentowano 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 $\alpha$ -bromo-3-hydroksyiminoolean-28-owego (Br-HIMOLID) na proces migracji i inwazji komórek raka piersi *in vitro*. W badaniach oceniono wpływ pochodnych HIMOXOL i Br-HIMOLID na komórki estrogenowo-zależne, komórki potrójnie-ujemne/podtyp bazalny oraz komórki nienowotworowe, gruczołu piersiowego. W badaniach przedstawionych w tej publikacji dr Lisiak wykazała, że oba analogi OA posiadają większy potencjał od związku macierzystego do hamowania migracji komórek i charakteryzują się wyższą efektywnością działania niż sam związek macierzysty OA. Habilitantka podkreśliła, że 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 zdecydowanie wyższa niż w komórkach o podtypie bazalnym. Oba analogi OA wykazują wyższy potencjał działania w komórkach najbardziej inwazyjnych, obniżając poziom integryny  $\beta$ 1, markera inwazyjności. Ciekawą obserwacją jest odmienny efekt działania związków na komórki należące do tego samego podtypu nowotworu: MCF7 i T-47D. Choć obie linie należą do podtypu luminalnego raka piersi, to jednak charakteryzują się różną ekspresją genów i wykazują różny potencjał proliferacyjny, za które odpowiedzialne są białka zaangażowane w stymulację wzrostu komórek, mechanizm anty-apoptotyczny i kancerogenezę. Te różnice mogą być przyczyną zróżnicowanej odpowiedzi komórek nowotworowych w obrębie tego samego podtypu na działanie badanych związków. W pracy tej dodatkowo wykazano brak wpływu badanych analogów OA na migrację komórek nienowotworowych gruczołu piersiowego, co jest pożądanym efektem w kontekście terapii przeciwnowotworowej i wskazuje na selektywność działania badanych związków.

W kolejnej publikacji z cyklu (*Natalia Lisiak, Patrycja Dzikowska, Urszula Wisniewska, Mariusz Kaczmarek, Barbara Bednarczyk-Cwynar, Lucjusz Zaprutko, Blazej Rubis. Biological activity of oleanolic acid derivatives HIMOXOL and Br-HIMOLID in breast cancer cells is mediated by ER and EGFR. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 5099, 1-20*) Habilitantka przedstawiła ocenę udziału estrogenów i szlaku ER oraz receptora EGFR w mechanizmie odpowiedzi różnych pod kątem molekularnym komórek raka piersi na działanie związków. Autorka stworzyła model eksperymentalny, w których receptor estrogenowy w komórkach MCF7 zablokował wykorzystując fulwestrant, lek który jest stosowanym w klinice, który jest antagonistą ER. Drugim modelem badawczym były komórki MDA-MB-231 z zablokowanym EGFR, które uzyskano poprzez zastosowanie gefitinibu, leku stosowanego w terapii nowotworów, hamującego aktywność kinazy tyrozynowej EGFR. W publikacji tej wykazano, że blokowanie szlaków, w których pośredniczą ER lub EGFR, prowadzi do zmniejszenia potencjału anti-migracyjnego pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach MCF7 i MDA-MB-231. W komórkach MCF7/ER+ i MDA-MB231/EGFR+ HIMOXOL i Br-HIMOLID istotnie zmniejszyły potencjał migracyjny tych komórek, natomiast w komórkach MCF7 ER- i MDA-MB-231 EGFR- wystąpiło jedynie nieznaczne działanie anti-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, co z kolei koreluje z wynikami otrzymanymi w teście klonogennym. W przeprowadzonym badaniu dr Lisiak wykazała, że oba receptory mogą znacząco zmieniać odpowiedź komórek nowotworowych na badane triterpenoidy. Ma to duże znaczenie, ponieważ wiadomo, że oba receptory wpływają na kluczowe procesy komórkowe, takie jak proliferacja, apoptoza, autofagia i migracja. Zatem celowanie w te receptory pozostaje obiecującą strategią w walce z rakiem. Być może taka terapia mogłaby być wsparta podawaniem pewnych triterpenoidów, które powinny wzmocnić efekt terapeutyczny i poprawić wyniki pacjentów. Dr Lisiak wykazała w tym badaniu, 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.

W ostatniej publikacji z cyklu (*Lisiak Natalia, Lewicka Izabela, Kaczmarek Mariusz, Kujawski Jacek, Bednarczyk-Cwynar Barbara, Zaprutko Lucjusz, Rubiś Błażej. Oleanolic acid's semisynthetic derivatives HIMOXOL and Br-HIMOLID show proautophagic potential and inhibit migration of HER2positive breast cancer cells in vitro. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 11273, 1-20*) Habilitantka przedstawiła ocenę aktywności biologicznej pochodnych kwasu oleanolowego, HIMOXOL i Br-HIMOLID w komórkach raka piersi HER2-dodatnich, które charakteryzują się agresywnym fenotypem. W badaniach zawartych w tej publikacji wykazała wyższą cytotoksyczność HIMOXOL i Br-HIMOLID względem komórek nowotworu w porównaniu do OA. Dodatkowo, za pomocą analizy cytometrycznej cyklu komórkowego wykazała właściwości cytostatyczne obu pochodnych OA z niewielką aktywnością proapoptotyczną Br-HIMOLID. Biorąc pod uwagę przesłanki płynące z poprzednich badań, przeprowadzonych na innych liniach nowotworowych raka piersi, skoncentrowała się na analizie zdolności związków do indukcji procesu autofagii w komórkach raka piersi HER-2 dodatnich. W przedstawionej publikacji 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. HIMOXOL i Br-HIMOLID mogą stanowić ważny element planowania strategii terapeutycznej również w grupie HER2-dodatnich raków piersi.

#### Podsumowanie najważniejszych osiągnięć wynikających z przeprowadzonych badań

- Wykazanie znamiennej aktywności ekdysteroidów 20-HE i ajugasteronu C w różnych pod kątem statusu receptorów podtypach raka piersi wraz z dodatkowym wykazaniem bardziej specyficznego przeciwnowotworowego potencjału działania ekdysteroidów w komórkach pozbawionych receptorów steroidowych (ER/PR) oraz HER2.
- Udokumentowanie odmiennego, zależnego od struktury chemicznej związków, mechanizmu działania 20-HE (antyproliferacyjny) i ajugasteronu C (proproliferacyjny) oraz brak aktywności polipodiny B izolowanych z liści sierpika koronowatego w komórkach raka piersi podtypu bazalnego i luminalnego.
- Wskazanie, że analogi kwasu oleanolowego (HIMOXOL i Br-HIMOLID) wykazują wyższy potencjał działania w komórkach najbardziej inwazyjnych, potrójnie ujemnych.
- Udowodnienie, 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.

- Wykazanie, że blokowanie szlaków, w których pośredniczą receptory ER lub EGFR, prowadzi do zmniejszenia potencjału anti-migracyjnego pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi podtypu luminalnego oraz bazalnego.
- Wykazanie, 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.
- Udowodnienie, że spośród badanych dwóch analogów OA, Br-HIMOLID wykazuje wyższą efektywność działania w stosunku do komórek HER-2 dodatnich, co przebiega z obniżeniem białka receptorowego HER2, i w związku z tym może stanowić potencjalny lek w terapii raka HER2-dodatniego.

Podsumowując analizę prac należy stwierdzić, że uzyskane przez dr Natalię Lisiak wyniki wskazują, że badane grupy triterpenów: ekdysteroidy oraz pochodne kwasu oleanolowego, wykazują selektywną aktywność przeciwnowotworową, nie wykazując jednocześnie wpływu na komórki nienowotworowe gruczołu piersiowego i mogą stanowić ważny element planowania nowej strategii terapeutycznej raka piersi. Na podkreślenie zasługuje konsekwencja w projektowaniu i realizacji projektów badawczych, która daje nadzieję na wzbogacenie w przyszłości obecnie stosowanego standardu leczenia o nowe związki, których aktywność udowodniła na poziomie nauk podstawowych dr Natalia Lisiak.

#### **4. Aktywność naukowa realizowana w ramach współpracy krajowej i zagranicznej**

W ramach współpracy międzynarodowej Dr Natalia Lisiak odbyła 5-miesięczny staż pod kierownictwem prof. Reinera Sieberta w Humangenetik Christain Albrechts Universitat zu Kiel, w Niemczech, w trakcie którego powstała wspólna publikacja i doniesienie zjazdowe. Współpracowała również naukowo z prof. Johann Hofmann z Biocenter, Division of Medical Biochemistry, Medical University, Innsbruck, w Austrii publikując wspólnie 2 prace i przygotowując 3 doniesienia konferencyjne.

Współpraca krajowa skupiła się na ośrodkach naukowych z Poznania:

- Zakład Chemii Bioanalitycznej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (dr hab. Anna Dembska, prof. UAM); Instytut Chemii Bioorganicznej PAN - zgłoszenie patentowe 2022 rok;
- Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu - - współpraca naukowa w ramach projektu badawczego;
- Fundacja Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Poznański Park Naukowo-Technologiczny - współpraca naukowa w ramach projektu badawczego

W ramach rozwoju współpracy naukowej dr Lisiak odbyła staż naukowy w Katedrze Nauk Podstawowych prowadzonej przez dr hab. Dorotę Diakowską, prof. UM, z Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

## 5. Charakterystyka dorobku dydaktycznego i osiągnięcia organizacyjne:

Dr Natalia Lisiak przedstawiła w swoim autoreferacie bogate doświadczenie w zakresie działalności dydaktycznej oraz zaangażowanie w działalność organizacyjną Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Habilitantka od początku swojej pracy zawodowej jest zaangażowana w realizację zajęć dydaktycznych organizowanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Prowadzi zajęcia dla studentów analityki medycznej z biologii i diagnostyki molekularnej, a także wykłady i ćwiczenia z chemii klinicznej oraz diagnostyki izotopowej. Dodatkowo prowadzi zajęcia (wykłady, seminaria i ćwiczenia) z zakresu biochemii klinicznej dla studentów biotechnologii medycznej. W trakcie swojej pracy zawodowej sprawowała opiekę nad 6 pracami magisterskimi, była promotorem 14 prac magisterskich oraz 1 pracy inżynierskiej.

Działalność organizacyjna dr Lisiak związana była z pełnieniem dodatkowych funkcji w strukturze uczelni (np. opiekun roku kierunku analityka medyczna, udział w komisjach wewnętrznych Uniwersytetu) oraz działaniami bezpośrednio wspierającymi aktywność studentów (jako recenzentka prac magisterskich lub wniosków projektowych STN Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu). Zaangażowana również była w działania popularyzujące naukę poza uczelnią - warsztaty i konferencje organizowane dla szerszego odbiorcy, głównie uczniów liceum. Na uwagę zasługuje zaangażowanie dr Lisiak w proces kształcenia podyplomowego – Habilitantka sprawowała opiekę naukową nad 20 stażystami będącymi w trakcie specjalizacji z zakresu diagnostyki laboratoryjnej.

**Całokształt przedstawionego przez dr Natalię Lisiak dorobku naukowego, organizacyjnego, dydaktycznego oraz przedstawioną rozprawę habilitacyjną oceniam jednoznacznie bardzo wysoko. Jest to wartościowy dorobek naukowy zawierający prace wnoszące nowe wartości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.**

**Mam zaszczyt wystąpić z wnioskiem do Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o nadanie dr Natalii Lisiak stopnia doktora habilitowanego.**

  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Katedra Onkologii  
KLINIKA RADIOTERAPII  
kierownik  
dr hab. n. med. Adam Maciejczyk