



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej

dr n. farm. Justyna Stefanowicz-Hajduk

Dokumentacja o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauk farmaceutycznych

AUTOREFERAT

Gdańsk, 2021

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	2
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2. Autorzy i tytuły publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	3
4.3. Omówienie celu naukowo-badawczego ww. prac i osiągniętych wyników	5
4.3.1. Wprowadzenie	5
4.3.2. Cel badawczy	6
4.3.3. Uzyskane wyniki	7
4.3.4. Podsumowanie.....	29
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	34
5.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora	34
5.1.1. Udział w projektach naukowo-badawczych.....	35
5.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	37
5.2.1. Udział w projektach naukowo-badawczych.....	39
5.3. Staże i szkolenia	42
5.4. Recenzowanie prac eksperymentalnych i przeglądowych	43
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	44
6.1. Dydaktyka i działalność organizacyjna	44
6.2. Współpraca z otoczeniem społecznym i gospodarczym	45
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.	45
7.1. Praca w aptekach	45
7.2. Nagrody i wyróżnienia	45
7.3. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego habilitanta	46

1. Imię i nazwisko

Justyna Stefanowicz-Hajduk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

07. 2017 dyplom ukończenia studiów podyplomowych na kierunku Kosmetologia bioestetyczna w Wyższej Szkole Zdrowia w Gdańsku

10. 2008 uzyskanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Gdańsku, praca doktorska pt: „Zróżnicowanie genetyczne oraz ocena aktywności biologicznej metabolitów wtórnych *Paris quadrifolia* L. i *Polygonatum multiflorum* (L.) All.”; Promotor: prof. dr hab. J. Renata Ochocka

2003 – 2007 doktorant Dziennego Studium Doktoranckiego w Akademii Medycznej w Gdańsku

07. 2002 uzyskanie stopnia magistra farmacji, specjalność farmacja kliniczna, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Gdańsku; Promotor: prof. dr hab. J. Renata Ochocka

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

2010 – obecnie adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

2007 – 2010 asystent w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* roślinnych surowców steroidowych i ich głównych metabolitów wtórnych”

4.2. Autorzy i tytuły publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Zgłoszona do postępowania habilitacyjnego tematyka obejmuje cykl 6 publikacji:

Lp.	Publikacja	Punktacja	
		IF	MEiN
H-1	Jerzy Gajdus, Zbigniew Kaczyński, Anna Kawiak, Ewa Łojkowska, Justyna Stefanowicz-Hajduk*, J. Renata Ochocka, Piotr Stepnowski: Isolation and identification of cytotoxic compounds from the rhizomes of <i>Paris quadrifolia</i> L. Pharmacognosy Magazine 2014, 10(38): S324-S333.	1,256	15
H-2	Justyna Stefanowicz-Hajduk*, Rafał Bartoszewski, Sylwia Bartoszewska, Kinga Kochan, Anna Adamska, Igor Kosiński, J. Renata Ochocka: Pennogenyl saponins from <i>Paris quadrifolia</i> L. induce extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. PloS One 2015, 10(8): e0135993.	3,057	40
H-3	Justyna Stefanowicz-Hajduk*, Anna Hering, Magdalena Gucwa, Rafał Hałas, Agata Soluch, Mariusz Kowalczyk, Anna Stochmal, Renata Ochocka: Biological activities of leaf extracts from selected <i>Kalanchoe</i> species and their relationship with bufadienolides content. Pharmaceutical Biology 2020, 58(1): 732-740.	2,971	70
H-4	Justyna Stefanowicz-Hajduk*, Monika Asztemborska, Mirosława Krauze-Baranowska, Sylwia Godlewska, Magdalena Gucwa, Barbara Moniuszko-Szajwaj, Anna Stochmal, J. Renata Ochocka: Identification of flavonoids and bufadienolides and cytotoxic effects of <i>Kalanchoe daigremontiana</i> extracts on human cancer cell lines. Planta Medica 2020, 86: 239-246.	2,687	100
H-5	Justyna Stefanowicz-Hajduk*, Magdalena Gucwa, Barbara Moniuszko-Szajwaj, Anna Stochmal, Anna Kawiak, J. Renata Ochocka: Bersaldegenin-1,3,5-orthoacetate induces caspase-independent cell death, DNA damage and cell cycle arrest in human cervical cancer HeLa cells. Pharmaceutical Biology, 2021, 59 (1): 54-65.	2,971	70

H-6	Justyna Stefanowicz-Hajduk, Barbara Król-Kogus, Barbara Sparzak-Stefanowska, Katarzyna Kimel, J. Renata Ochocka, Mirosława Krauze-Baranowska: Cytotoxic activity of standardized extracts, a fraction and individual secondary metabolites from fenugreek seeds against SKOV-3, HeLa and MOLT-4 cell lines. <i>Pharmaceutical Biology</i> 2021, 59 (1): 424-437.	2,971	70
------------	--	-------	----

* autor korespondencyjny

Szczegółowy udział Autorów w poszczególnych pracach podano w *Wykazie osiągnięć naukowych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny*.

Sumaryczna punktacja IF osiągnięcia: **15,913**; sumaryczna punktacja MEiN osiągnięcia: **365**.

Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia wszystkich współautorów publikacji, określające indywidualny wkład merytoryczny każdego z nich w ich powstanie.

4.3. Omówienie celu naukowo-badawczego ww. prac i osiągniętych wyników

4.3.1. Wprowadzenie

Choroby nowotworowe stanowią drugą, obok chorób układu krążenia przyczynę zgonów na świecie. Wśród skutecznych terapii przeciwnowotworowych stosuje się obecnie chemioterapię, radioterapię, hormonoterapię, immunoterapię i leczenie celowane. Chemioterapia jest najczęściej stosowana w skojarzeniu z innymi metodami leczenia onkologicznego, gdyż wyłączone stosowanie cytostatyków pozwala na wyleczenie jedynie małego odsetka chorych [Stąg-Lemanowicz i Leppert, 2014]. Wśród cytostatyków w leczeniu nowotworów najczęściej stosowanymi są takie związki jak: cyklofosfamid, chlorambucyl, karmustyna, cisplatyna, karboplatyna, busulfan, hydroksykarbamid, 5-fluorouracyl, metotreksat i mitoksantron. Dużą grupę stanowią również związki otrzymane z roślin leczniczych tj. winkrystyna, winblastyna, etopozyd, czy też paklitaksel. Mechanizmy działania wymienionych cytostatyków prowadzą do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych i ostatecznie do ich śmierci. W leczeniu nowotworów stosuje się najczęściej zestawy leków mające wpływ na różne czynniki komórkowe - punkty uchwytu, co ma na celu zwiększenie skuteczności terapii.

Obecnie trwają intensywne poszukiwania nowych związków syntetycznych oraz naturalnych – wyizolowanych z roślin, które mogłyby być stosowane w leczeniu nowotworów. Wśród wielu grup metabolitów roślinnych istotne znaczenie odgrywają związki steroidowe, które są znane i wykorzystywane jako prekursory hormonów, mających zastosowanie w lecznictwie jako hormony płciowe. Większość steroidów stosowanych w terapii jest otrzymywana w drodze półsyntezy z naturalnych produktów: saponin, fitosteroli, cholesterolu i kwasów żółciowych [Hostettmann i Marston 1995]. Dostępne wyniki wskazują na to, że związki steroidowe charakteryzują się również aktywnością przeciwnowotworową. Jednym z bardziej popularnych jest diosgenina – ważna saponina z ekonomicznego punktu widzenia. Metabolit ten występuje w kilku rodzinach roślin, jednakże w większości jest pozyskiwany z gatunków rodzaju *Dioscorea*. Inne gatunki wykorzystywane jako źródło steroidowych sapogenin to: *Solanum* sp., *Trigonella foenum-graecum* oraz *Allium* sp. [Franz i Jatisatienr 1983; Kravets i wsp. 1990; Selim i Jaouni 2015].

Diosgenina, jak i jej glikozydy wykazują działanie cytotoksyczne na ludzkie komórki raka: wątroby, piersi, układu krwiotwórczego, płuc, jelita grubego, czy też tkanki kostnej

[Corbiere i wsp. 2004; Lepage i wsp. 2011; Li i wsp. 2010; Li i wsp. 2013; Liu i wsp. 2005; Melo i wsp. 2004; Moalic i wsp. 2001; Raju i Bird 2007].

Pomimo licznych prowadzonych badań dotyczących aktywności cytotoksycznej związków naturalnych, działanie na komórki nowotworowe wielu metabolitów steroidowych występujących w świecie roślinnym wciąż nie jest poznane. Niewiele jest danych na temat aktywności przeciwnowotworowej takich sapogenin steroidowych, jak: jamogenina, tigogenina, pennogenina (i ich glikozydów), czy też związków bufadienolidowych [Yamagishi i wsp. 1989; Corbiere i wsp. 2003; Trouillas i wsp. 2005; Wu i wsp. 2006; Li i wsp. 2013; Huang i wsp. 2013; Chen i wsp. 2014; Zhang i wsp. 2014; Long i wsp. 2015]. Dotyczy to zarówno ich siły efektu cytotoksycznego, jak i mechanizmów determinujących działanie przeciwnowotworowe. Oprócz badania wyizolowanych metabolitów ważna jest również aktywność ekstraktów roślinnych, czy też ich frakcji, również w kontekście zawartości głównych związków w materiale roślinnym i ich możliwego wzajemnego synergistycznego/antagonistycznego wpływu na działanie biologiczne w komórkach. Obecnie wiele gatunków roślinnych jest odkrywanych na nowo ze względu na posiadane właściwości przeciwnowotworowe. Dotyczy to między innymi gatunków *Kalanchoe* (żyworódki), które zostały opisane w pracach zgłoszonych do mojego osiągnięcia naukowego. Gatunki te są coraz bardziej popularne i od dawna stosowane w medycynie ludowej w krajach tropikalnych jako środki przeciwzapalne, regenerujące oraz przeciwbakteryjne [Nassis i wsp. 1992; Willcox i Bodeker 2004; Ojewole 2005; Nayak i wsp. 2010; Sarkar i wsp. 2015; Kolodziejczyk-Czepas i Stochmal 2017]. Prace dotyczące działania gatunków *Kalanchoe* opisują także właściwości przeciwnowotworowe, zarówno ich ekstraktów [Nahar i wsp. 2008; Mahata i wsp. 2012; Bogucka-Kocka i wsp. 2018], jak i samych wyizolowanych metabolitów steroidowych [Supratman i wsp. 2001; Wu i wsp. 2006; Huang i wsp. 2013]. Wiedza na temat tego działania (szczególnie pochodnych bersaldegeniny) wciąż wymaga jednak uzupełnienia.

Zgłoszone do osiągnięcia naukowego prace dotyczą surowców roślinnych zawierających związki steroidowe, które posiadają aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych i mogą stać się potencjalnymi kandydatami do dalszych badań *in vivo* i zastosowania w terapii.

4.3.2. Cel badawczy

Głównym celem podjętych przeze mnie badań opisanych w zgłoszonych do tematyki osiągnięcia habilitacyjnego pracach było określenie działania cytotoksycznego *in vitro*

różnych surowców roślinnych zawierających związki steroidowe. Badania miały na celu otrzymanie ekstraktów, frakcji i głównych metabolitów steroidowych oraz poznanie siły ich działania w komórkach nowotworowych. Istotnym celem badawczym było określenie mechanizmów działania cytotoksycznego w komórkach wybranych wyizolowanych metabolitów steroidowych, mogących mieć wpływ na efekt działania przeciwnowotworowego ekstraktów.

Szczegółowe cele badawcze obejmują:

– poznanie zawartości związków steroidowych pochodnych pennogeniny w ekstraktach *Paris quadrifolia* L. oraz określenie aktywności cytotoksycznej frakcji i wyizolowanych glikozydów pennogeniny w komórkach nowotworowych, a także określenie mechanizmów działania najbardziej aktywnych glikozydów w komórkach raka szyjki macicy HeLa [Gajdus i wsp. 2014: **H-1** oraz Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2015: **H-2**];

– poznanie zawartości bufadienolidów w ekstraktach trzech gatunków *Kalanchoe* oraz określenie aktywności cytotoksycznej ekstraktów, ich frakcji oraz metabolitu bufadienolidowego – 1,3,5-ortoocetanu bersaldehydenu w komórkach nowotworowych, a także poznanie mechanizmów działania tego metabolitu w komórkach raka szyjki macicy HeLa [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2020: **H-3, H-4, H-5**];

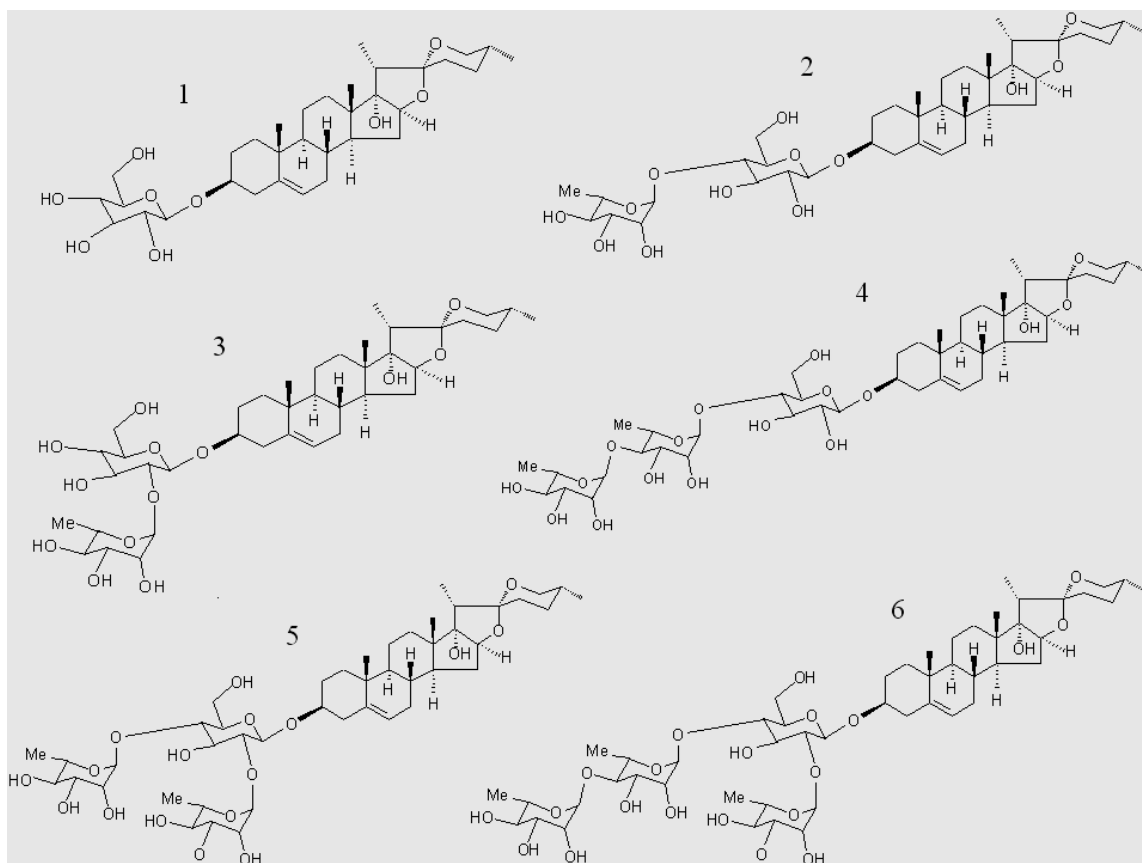
– identyfikacja związków flawonoidowych w aktywnych cytotoksycznie ekstraktach *Kalanchoe daigremontiana* [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2020: **H-4**];

- określenie działania cytotoksycznego ekstraktów oraz frakcji *Trigonella foenum-graecum* L. na liniach komórek nowotworowych w kontekście zawartości w nich frakcji związków steroidowych oraz flawonoidów (C-glikozydów flawonu), a także poznanie roli wybranych czynników komórkowych biorących udział w śmierci komórek raka szyjki macicy HeLa oraz raka jajnika SKOV-3 wywołanej działaniem frakcji zawierającej saponiny steroidowe; określenie aktywności cytotoksycznej wybranych saponin steroidowych [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2021: **H-6**].

4.3.3. Uzyskane wyniki

Pierwszym etapem moich badań było określenie składu jakościowego i ilościowego związków steroidowych występujących w kłączach *Paris quadrifolia* L. Dzięki nawiązanej współpracy z zespołem pana prof. Piotra Stepnowskiego z Katedry Analizy Środowiska na

Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, możliwa była analiza strukturalna głównych związków steroidowych pochodnych pennogeniny w ekstraktach roślinnych oraz określenie ich zawartości ilościowej. W badaniu wyizolowano sześć glikozydów pochodnych pennogeniny, wśród których cztery związki o budowie spirostanu zostały otrzymane z badanego gatunku rośliny po raz pierwszy, a struktury przedstawione w pracy **H-1** [Gajdus i wsp. 2014] (Rys. 1).



Rysunek 1. Wzory strukturalne metabolitów pochodnych pennogeniny wyizolowane z kłączy *Paris quadrifolia*. 3-O-β-D-glukopiranozyd pennogeniny (1), 3-O-α-L-ramnopiranozylo-(1→4)-β-D-glukopiranozyd pennogeniny (2), 3-O-α-L-ramnopiranozylo-(1→2)-β-D-glukopiranozyd pennogeniny (3), 3-O-α-L-ramnopiranozylo-(1→4)-α-L-ramnopiranozylo-(1→4)-β-D-glukopiranozyd pennogeniny (4), 3-O-α-L-ramnopiranozylo-(1→4)-[α-L-ramnopiranozylo-(1→2)]-β-D-glukopiranozyd pennogeniny (5), 3-O-α-L-ramnopiranozylo-(1→4)-α-L-ramnopiranozylo-(1→4)-[α-L-ramnopiranozylo-(1→2)]-β-D-glukopiranozyd pennogeniny (6).

Dzięki współpracy z panią prof. Ewą Łojkowską oraz dr Anną Kawiak z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego możliwe było zbadanie efektu cytotoksycznego frakcji

steroidowych oraz pochodnych pennogeniny w komórkach ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60, komórkach raka szyjki macicy HeLa oraz komórkach raka piersi MCF-7. Spośród wszystkich testowanych związków, dwa były znacząco aktywne cytotoksycznie ($IC_{50} \leq 3,0 \mu\text{g/ml}$), tj.: 3-O- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd pennogeniny (związek nr 5) oraz 3-O- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd pennogeniny (związek nr 6) (Tab. 1). Oba związki zostały otrzymane z frakcji steroidowych *P. quadrifolia*, w których zawartość ich była największa. Frakcje, które zawierały głównie związek 5 i 6 wykazały silną aktywność cytotoksyczną wobec komórek HL-60 oraz HeLa ($IC_{50} < 9,0 \mu\text{g/ml}$) [Gajdus i wsp. 2014: H-1].

Tabela 1. Wartości IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) metabolitów *P. quadrifolia* określone na trzech liniach ludzkich komórek nowotworowych.

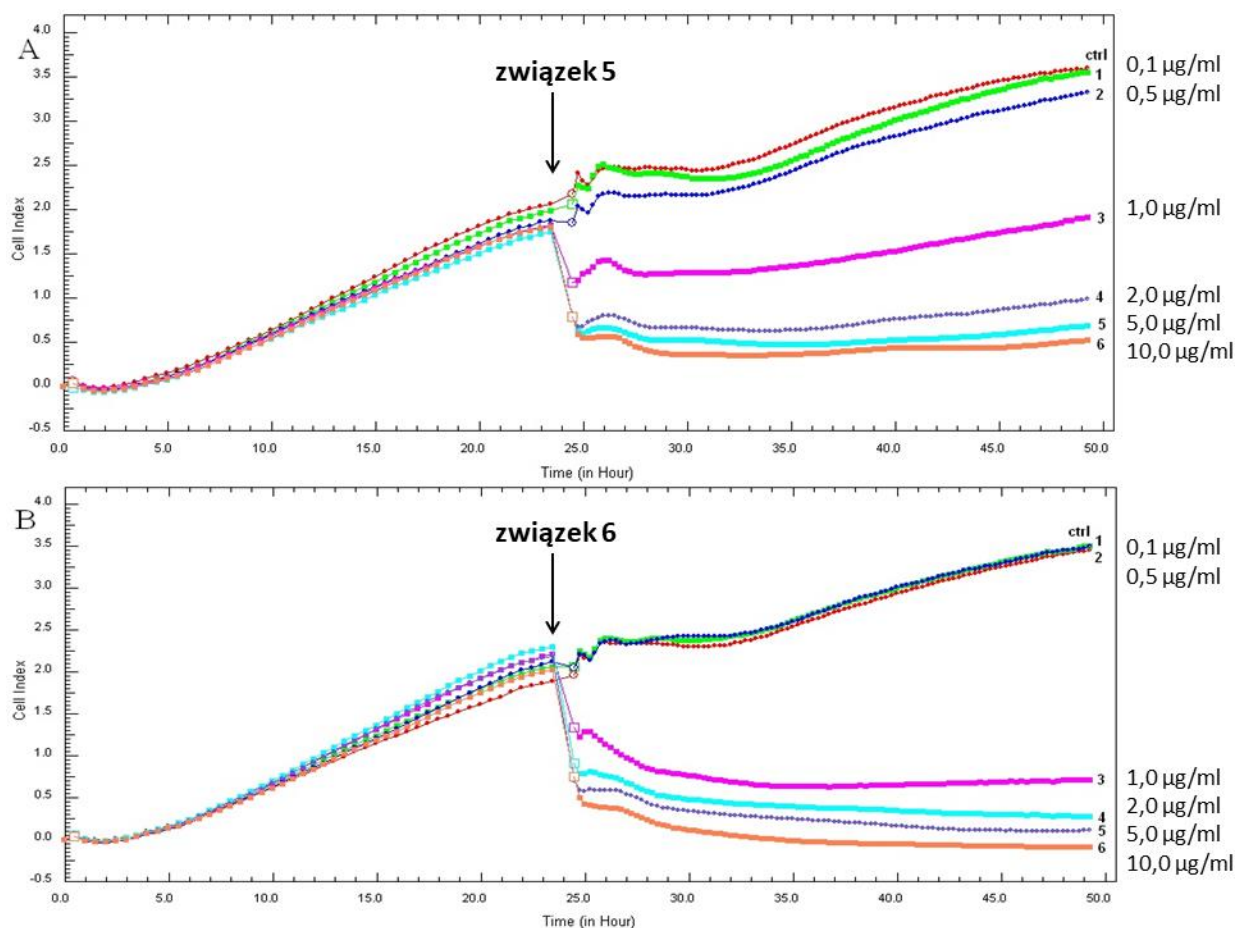
Glikozyd pennogeniny	Linia komórkowa		
	HeLa	MCF-7	HL-60
1	>50	nt.	>50
2	>50	nt.	47 \pm 2,8
3	18 \pm 0,9	25 \pm 1,5	16 \pm 0,8
4	>50	nt.	>50
5	1,8 \pm 0,072	2,4 \pm 0,096	1,0 \pm 0,04
6	2,5 \pm 0,125	3,2 \pm 0,128	2,0 \pm 0,08
Etopozyd*	>50	>50	0,45 \pm 0,022
Mitoksantron*	0,4 \pm 0,012	0,2 \pm 0,008	0,06 \pm 0,004

nt. – nietestowany; *związki kontrolne; średnie wartości IC_{50} zostały uzyskane z trzech niezależnych powtórzeń

Dalszy etap moich badań związany z aktywnością cytotoksyczną pochodnych pennogeniny został przeprowadzony w utworzonym w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Laboratorium Hodowli Komórkowej. Rozpoczęcie przeze mnie tego rodzaju badań było możliwe dzięki odbyciu w 2009 roku szkolenia w zespole prof. Jacka Witkowskiego (pod bezpośrednią opieką dr Agnieszki Józwik) z technik hodowli komórkowej *in vitro* oraz obsługi cytometrii przepływowej dostępnej w Katedrze i Zakładzie Fizjopatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zdobyta wiedza i umiejętności praktyczne pozwoliły na podjęcie badań mających na celu określenie mechanizmów działania

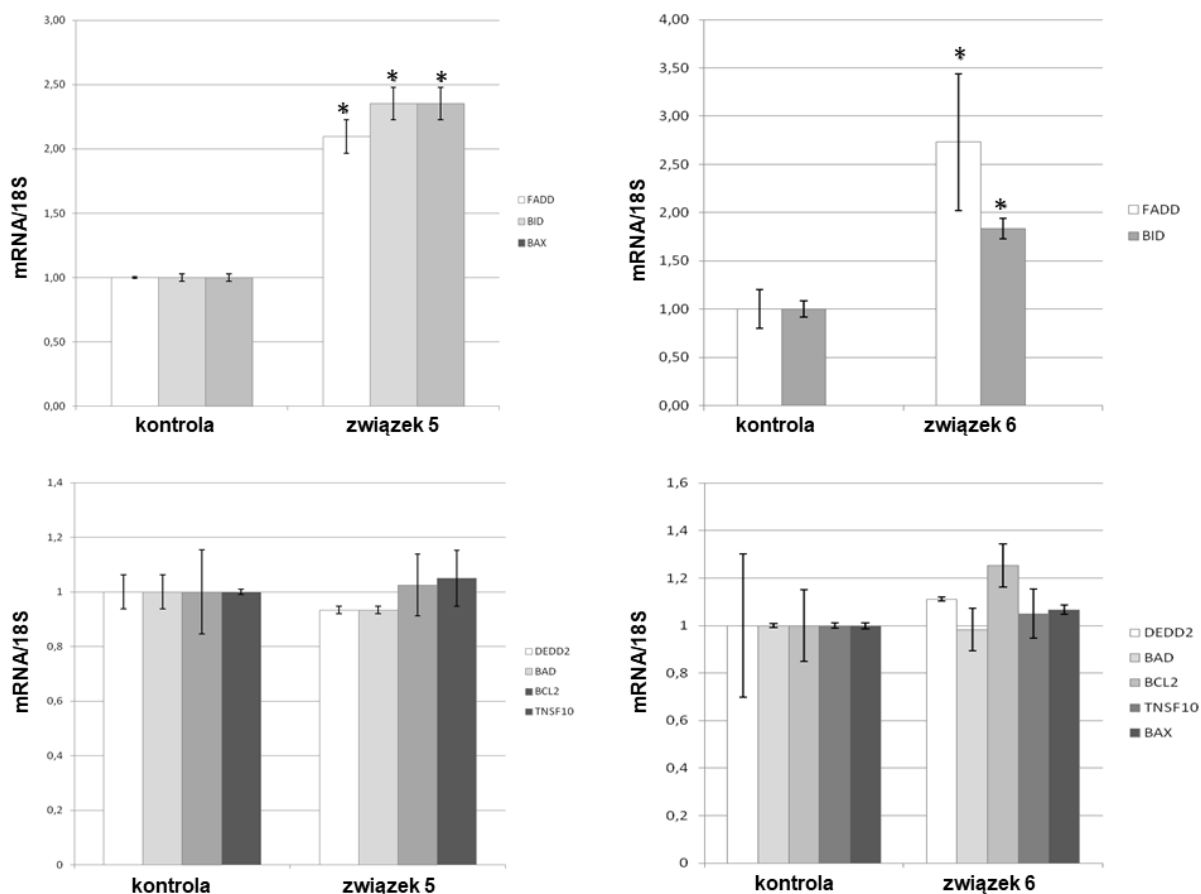
w komórkach nowotworowych najbardziej aktywnych związków *P. quadrifolia* – 5 oraz 6. Jako linię standardową i uniwersalnie stosowaną w tego typu badaniach *in vitro* wybrałam komórki raka szyjki macicy HeLa. Otrzymane wyniki dotyczące mechanizmów działania dwóch glikozydów saponinowych zostały opisane w czasopiśmie indeksowanym z listy JCR [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2015: **H-2**]. Pomimo istniejących wielu badań opisujących aktywność różnych związków steroidowych w komórkach nowotworowych, mechanizmy dotyczące pochodnych pennogeniny były tylko częściowo poznane [Zhang i wsp. 2014]. Prowadzone przeze mnie badania nad w/w związkami znacząco uzupełniły wiedzę na temat działania cytotoksycznego i mechanizmów indukcji śmierci komórkowej wywołanej przez pochodne pennogeniny i pokazały, że związki te mogą być potencjalnymi kandydatami brnymi pod uwagę w terapii przeciwnowotworowej.

W powyższym badaniu wykazałam, że oba związki (5 i 6), które zawierają dwie oraz trzy reszty ramnozy w swojej cząsteczce mają zbliżoną aktywność cytotoksyczną w komórkach HeLa (IC_{50} wyniósł odpowiednio $1,11 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$ oraz $0,87 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$) (Wyk. 1). Siła działania wynika z rozpuszczalności związków i łatwiejszego przenikania do komórek pochodnych pennogeniny zawierającej więcej niż jedną resztę cukrową [Gonzalez i wsp. 2003; Trouillas i wsp. 2005; Yun i wsp. 2007]. Czynnikiem determinującym największą aktywność tych związków jest ponadto obecność ramnozy przyłączonej do glukozy w pozycji 1→2.

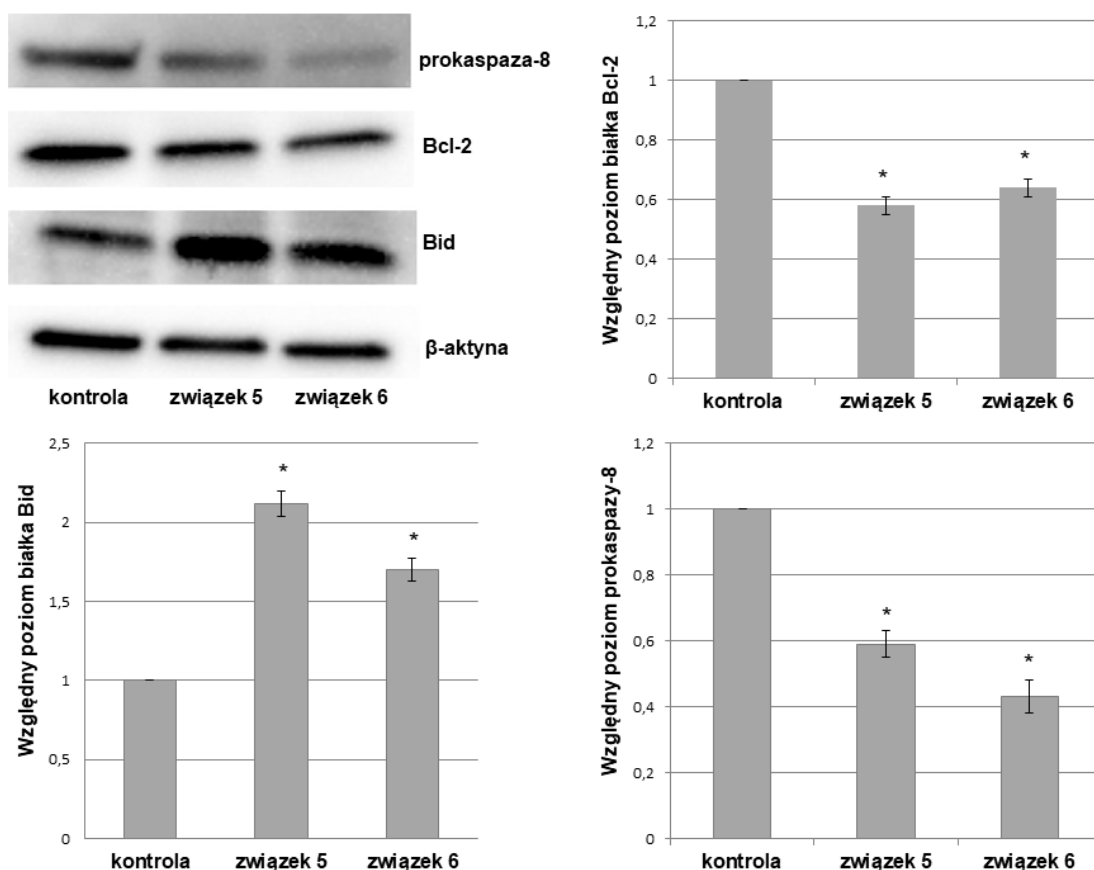


Wykres 1. Krzywe proliferacji komórek HeLa inkubowanych ze związkiem nr 5 i 6 uzyskane za pomocą systemu Real-Time xCELLigence (RTCA).

Opisane związki wywołały śmierć komórek HeLa i indukowały ich apoptozę [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2015: **H-2**]. Badania wykazały, że głównymi szlakami biorącymi udział w procesie apoptozy były zarówno zewnętrzna droga receptorowa, jak i wewnętrzna tzw. mitochondrialna. Droga zewnętrzna inicjowana jest w komórkach poprzez receptor FADD (Wyk. 2) i prowadzi do aktywacji kaspazy-8, a następnie białka Bid (Wyk. 3), którego aktywna forma przechodzi do mitochondrium, gdzie oddziałuje z proapoptotycznymi białkami Bax oraz Bak, które z kolei powodują uwolnienie aktywnych proapoptotycznych czynników z mitochondrium [Luo i wsp. 1998; Scaffidi i wsp. 1998; Wang 2001]. Błona tego organellum, jak pokazały wyniki moich badań, uległa depolaryzacji we wczesnej fazie apoptozy komórek HeLa [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2015: **H-2**].



Wykres 2. Poziom mRNA genów komórek HeLa inkubowanych ze związkiem 5 (1,0 $\mu\text{g/ml}$) i 6 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) przez 24 h. Średnie wyniki (\pm SD) zostały otrzymane z dwóch powtórzeń za pomocą RT-PCR. Względna ilość mRNA została znormalizowana do 18S rRNA i obliczona w stosunku do kontroli (0,1% DMSO). Istotnie statystycznie różnice względem kontroli są oznaczone jako „*” ($p < 0,05$).



Wykres 3. Ekspresja białek w komórkach HeLa inkubowanych ze związkami 5 i 6 (1,0 µg/ml) przez 5 h i uzyskana za pomocą Western Blot. Średnie wyniki (\pm SD) zostały otrzymane z trzech powtórzeń. Poziom ekspresji białek został obliczony w stosunku do kontroli (0,1% DMSO). Istotnie statystycznie różnice względem kontroli są oznaczone jako „*” ($p < 0,05$).

Podsumowując badania nad związkami pochodnymi pennogeniny, uzyskane przeze mnie dane pozwoliły na uzupełnienie wiedzy o strukturze i zawartości związków steroidowych w *P. quadrifolia* [Gajdus i wsp. 2014: **H-1**], a także o aktywności cytotoksycznej związków i mechanizmach śmierci komórkowej indukowanej przez te metabolity. W pracy **H-2** wykazałam, że zarówno wewnętrzny mitochondrialny szlak apoptozy, jak i zewnętrzny receptorowy biorą udział w apoptozie komórek nowotworowych HeLa. Droga receptorowa apoptozy wywołana przez badane glikozydy pennogeniny została przedstawiona w tej publikacji po raz pierwszy [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2015: **H-2**].

Kolejnym etapem moich badań były gatunki z rodzaju *Kalanchoe* (Fot. 1). Rośliny te zawierają silnie działające farmakologicznie związki steroidowe – bufadienolidy. Grupa tych

metabolitów jest dość dobrze poznana w odniesieniu do działania nasercowego, natomiast badania biologiczne dotyczące tych związków, zwłaszcza odnoszące się do efektu antyproliferacyjnego w komórkach nowotworowych, wciąż wymagają uzupełnienia.



Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers.



Kalanchoe daigremontiana
Raym.-Hamet & H. Perrier



Kalanchoe blossfeldiana Poelln.

zdjęcie wyk. J. Stefanowicz-Hajduk

Fot. 1. Gatunki z rodzaju *Kalanchoe*.

Jednym z moich celów badawczych było określenie działania cytotoksycznego ekstraktów wodnych i etanolowych trzech gatunków *Kalanchoe* – *K. daigremontiana*, *K. pinnata* oraz *K. blossfeldiana*. Aktywność *in vitro* ekstraktów została określona na czterech liniach ludzkich komórek nowotworowych – raku szyjki macicy HeLa, raku jajnika SKOV-3, raku piersi MCF-7 oraz komórkach czerniaka A375 [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2020: **H-3**]. Otrzymane przeze mnie wyniki wykazały, że najbardziej aktywne cytotoksycznie były ekstrakty wodne *K. daigremontiana* oraz etanolowe *K. blossfeldiana*. Największą aktywność wykazały one na komórkach HeLa oraz SKOV-3 ($IC_{50} < 19 \mu\text{g/ml}$ w przypadku *K. daigremontiana* oraz $IC_{50} < 9 \mu\text{g/ml}$ w przypadku *K. blossfeldiana*) (Tab. 2). Ponadto, dzięki współpracy z dr. Rafałem Hałasą z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego została określona aktywność przeciwbakteryjna oraz przeciwgrzybicza ekstraktów *Kalanchoe* [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2020: **H-3**].

Tabela 2. Wartości IC₅₀ (μg/ml) wodnych i etanolowych ekstraktów *Kalanchoe* określone na różnych liniach komórek nowotworowych.

Linia komórkowa	Ekstrakt	RTCA		MTT		RTCA		MTT		RTCA Winblastyna*
		<i>K. daigremontiana</i>	<i>K. daigremontiana</i>	<i>K. pinnata</i>	<i>K. pinnata</i>	<i>K. blossfeldiana</i>	<i>K. blossfeldiana</i>			
HeLa	etanolowy	>100 R ² =0,86	>100	61,67±2,34 R ² =0,96	>100	8,28±0,29 R ² =0,97	9,63±1,07			
	wodny	18,86±0,29 R ² =0,86	11,48±0,43	>100 R ² =0,79	>100	>100	>100	4,55 ⁻⁰³ R ² =0,94		
SKOV-3	etanolowy	>100 R ² =0,83	>100	49,03±2,63 R ² =0,97	>50	8,98±0,1 R ² =0,98	11,44±0,35			
	wodny	14,39±3,59 R ² =0,86	10,12±0,28	>100 R ² =0,86	>100	>100	>100	7,64 ⁻⁰³ R ² =0,93		
MCF-7	etanolowy	45,93±2,94 R ² =0,90	>50	>100 R ² =0,98	>100	53,27±5,37 R ² =0,96	>50			
	wodny	>100 R ² =0,96	>100	>100 R ² =0,81	>100	>100	>100	7,49 ⁻⁰³ R ² =0,95		
A375	etanolowy	>100 R ² =0,83	>100	>100 R ² =0,99	>100	52,08±9,67 R ² =0,97	36,79±1,27			
	wodny	35,32±0,33 R ² =0,98	36,05±3,15	>100 R ² =0,98	>100	>100	>100	7,72 ⁻⁰³ R ² =0,92		

R² – współczynnik determinacji; średnie wartości IC₅₀ uzyskano z sześciu powtórzeń w przypadku metody RTCA (3x2) oraz dwunastu w przypadku testu MTT (2x6); *związek kontrolny

Tabela 3. Zawartość bufadienolidów w ekstraktach *Kalanchoe* oznaczona za pomocą analizy HR-QTOF-MS.

Nr	Metabolit	Rt (min)	Meas. m/z [M+H]	Wzór sumaryczny	Obecność/Zawartość [mg/g] (średnia ± SD)			
					K.p. EtOH	K.d. EtOH	K.d. H ₂ O	K.b. EtOH
1	3-octan bersaldehyny	6,81	475,2341	C ₂₆ H ₃₄ O ₈	0,59 ± 0,17	(-)	(-)	(-)
2	octan 16-hydroksybersaldehyny	10,02	491,2273	C ₂₆ H ₃₄ O ₉	0,97 ± 0,04	0,77 ± 0,09	0,13 ± 0,03	(-)
3	4-octan bersaldehyny	11,44	475,2321	C ₂₆ H ₃₄ O ₈	0,15 ± 0,05	(-)	(-)	(-)
4	5-octan bersaldehyny	13,69	475,2335	C ₂₆ H ₃₄ O ₈	1,14 ± 0,11	(-)	(-)	(-)
5	briofilina B	13,88	489,2107	C ₂₆ H ₃₂ O ₉	(-)	(< LLOD)	(< LLOD)	(-)
6	briofilina A	14,66	473,2174	C ₂₆ H ₃₂ O ₈	0,97 ± 0,07	0,34 ± 0,06	0,20 ± 0,01	(-)
7	1-octan bersaldehyny	15,04	475,2332	C ₂₆ H ₃₄ O ₈	0,14 ± 0,04	0,81 ± 0,03	(-)	(-)
8	2-octan bersaldehyny	16,40	475,2331	C ₂₆ H ₃₄ O ₉	1,11 ± 0,05	0,34 ± 0,04	0,18 ± 0,01	(-)
9	daigremontianina	17,50	487,1944	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	(-)	0,53 ± 0,04	0,24 ± 0,02	(-)
10	1,3,5-ortoocan bersaldehyny	20,62	457,2220	C ₂₆ H ₃₂ O ₇	0,17 ± 0,04	4,33 ± 0,15	2,12 ± 0,04	(-)
Całkowita zawartość					5,24 ± 0,23	7,12 ± 0,20	2,87 ± 0,05	(-)

(-) nie stwierdzono obecności; (< LLOD) poniżej granicy wykrywalności; K. p. EtOH – ekstrakt etanolowy *Kalanchoe pinnata*, K. d. EtOH – ekstrakt etanolowy *Kalanchoe daigremontiana*, K. d. H₂O – ekstrakt wodny *Kalanchoe daigremontiana*, K. b. EtOH – ekstrakt etanolowy *Kalanchoe blossfeldiana*.

Współpracując z zespołem pani prof. Anny Stochmal z Zakładu Biochemii i Jakości Plonów Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach możliwe było określenie zawartości bufadienolidów w otrzymanych ekstraktach z trzech gatunków *Kalanchoe* (Tab. 3) oraz izolacja jednego z głównych bufadienolidów (1,3,5-ortoocyanu bersaldehydenu) występującego w największej ilości w ekstraktach *K. daigremontiana*. Do badań fitochemicznych wybrałam tylko te ekstrakty etanolowe i wodne *Kalanchoe*, które wobec komórek nowotworowych wykazały wartość IC_{50} poniżej 100 $\mu\text{g/ml}$ [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2020: **H-3**].

Przeprowadzona analiza fitochemiczna bufadienolidów w ekstraktach wykazała, że najsilniej działający ekstrakt etanolowy *K. blossfeldiana* nie zawierał w swoim składzie tych metabolitów, natomiast największą ilość związków steroidowych stwierdzono w nieaktywnym cytotoksycznie ekstrakcie etanolowym *K. daigremontiana* ($7,12 \pm 0,20$ mg/g). Z kolei ekstrakt wodny *K. daigremontiana*, który był cytotoksyczny w komórkach HeLa oraz SKOV-3 ($IC_{50} < 19$ $\mu\text{g/ml}$) zawierał znacznie mniej bufadienolidów niż ekstrakt etanolowy tego gatunku ($2,87 \pm 0,05$ mg/g, Tab. 3).

Biorąc pod uwagę wyniki analizy fitochemicznej oraz badań cytotoksyczności mogłam stwierdzić, że końcowy efekt antyproliferacyjny ekstraktów *Kalanchoe* w komórkach nowotworowych nie wynika bezpośrednio z zawartości bufadienolidów. Występowanie innych aktywnych cytotoksycznie związków w gatunkach *Kalanchoe* (m.in. flawonoidów) może wpływać na silne działanie ekstraktów w komórkach w wyniku ich wzajemnego działania. W pracy **H-3** zostało po raz pierwszy przedstawione zestawienie aktywności biologicznych różnych ekstraktów trzech gatunków z rodzaju *Kalanchoe* w powiązaniu z zawartością głównych związków steroidowych.

Obok bufadienolidów w liściach *K. daigremontiana* została stwierdzona obecność flawonoidów. Badania te prowadziłam we współpracy z zespołem pani prof. Mirosławy Krauze-Baranowskiej z Katedry i Zakładu Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dr Moniką Asztemborską z Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Za pomocą techniki HPLC-DAD-ESI-MS zidentyfikowano sześć bufadienolidów oraz dziewiętnaście flawonoidów, z których aż szesnaście nie było do tej pory stwierdzonych w badanym gatunku rośliny [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2020: **H-4**]. Większość zidentyfikowanych flawonoidów była pochodnymi kemferolu, trzy - pochodnymi kwercetyny, mirycetyny i izoramnetyny oraz jeden - patuletyny (Tab. 4). Związki flawonoidowe występowały zarówno w ekstrakcie etanolowym *K. daigremontiana*, jak i we frakcji wodnej, którą uzyskałam z ekstraktu. Natomiast obecność bufadienolidów

potwierdzona została we frakcji dichlorometanowej (Tab. 4), która wykazała wśród badanych ekstraktów najsilniejszą aktywność cytotoksyczną wobec ludzkich komórek nowotworowych linii HeLa, SKOV-3, MCF-7 oraz A375 (Tab. 5).

Tabela 4. Zidentyfikowane bufadienolidy we frakcji dichlorometanowej oraz flawonoidy w wodnym oraz etanolowym ekstrakcie *Kalanchoe daigremontiana*.

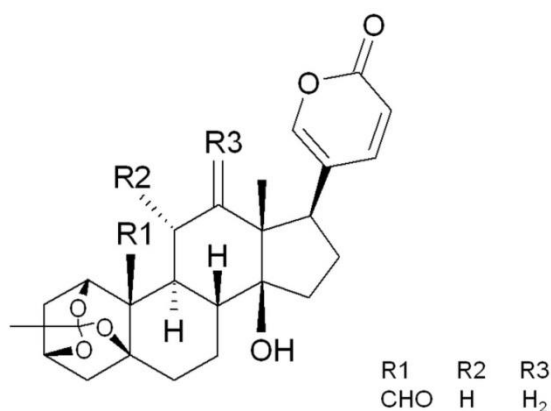
Metabolity <i>Kalanchoe</i>	
Bufadienolidy	
B1-B6	briofilina A; briofilina C; 3-ortoocetan bersaldegeniny; daigremontianina; daigremontian metylu; 1,3,5-ortoocetan bersaldegeniny
Flawonoidy	
F1-F19	<i>O</i> -triglikozyd kwercetyny (pentozyd-ramnozyd-heksozyd); 3- <i>O</i> -ksylozylo-ramnozyd-7- <i>O</i> -glukozyd kemferolu (daigremontiozyd); <i>O</i> -diglukozyd mirycetyny (heksozyd-ramnozyd); <i>O</i> -heksozyd mirycetyny; nieznany izoflawon; <i>O</i> -ramnozyd mirycetyny; nieznany flawonoid; <i>O</i> -diglukozyd izoramnetyny (heksozyd-ramnozyd); 3- <i>O</i> -glukozyd kwercetyny; <i>O</i> -pentozyd patuletyny (lub 8-metoksykwercetyny); nieznany izoflawon; 3,7- <i>O</i> -diramnozyd kemferolu (kemferytryna); <i>O</i> -heksozyd izoramnetyny; 3- <i>O</i> -ksylozylo-ramnozyd kwercetyny; <i>O</i> -octan-ramnozyd kemferolu; 3- <i>O</i> -arabinozylo-ramnozyd kemferolu; <i>O</i> -diglukozyd izoramnetyny (pentozyd-ramnozyd); 3- <i>O</i> -ksylozylo-ramnozyd kemferolu; <i>O</i> -diglukozyd kemferolu (heksozyd-octan-ramnozyd)

Tabela 5. Wartości IC₅₀ (µg/ml) frakcji wodnej, dichlorometanowej oraz ortoocyanu bersaldegeniny uzyskanych z ekstraktu etanolowego *Kalanchoe daigremontiana*.

Linia komórkowa	Frakcja dichlorometanowa		Frakcja wodna		1,3,5-ortoocyan bersaldegeniny	Winblastyna**
	MTT*	RTCA*	MTT*	RTCA*	RTCA*	RTCA*
HeLa	6,42 (6,18-6,66)	8,53 (7,47-9,59); R ² =0,95	>100	92,02 (87,28-96,76); R ² =0,84	0,50 (0,44-0,56); R ² =0,85	4,55 ⁻⁰³ (4,29-4,81 ⁻⁰³); R ² =0,94
SKOV-3	5,42 (5,31-5,53)	9,31 (9,13-9,49); R ² =0,89	>100	100,42 (98,95-101,89); R ² =0,92	0,77 (0,72-0,82); R ² =0,96	7,64 ⁻⁰³ (7,62-7,66 ⁻⁰³); R ² =0,93
MCF-7	8,02 (7,93-8,11)	9,07 (7,34-10,80); R ² =0,96	>100	117,73 (107,75-127,71); R ² =0,97	1,38 (1,24-1,52); R ² =0,98	7,49 ⁻⁰³ (7,43-7,55 ⁻⁰³); R ² =0,95
A-375	7,72 (7,41-8,03)	10,27 (9,72-10,82); R ² =0,81	>100	181,73 (176,38-187,08); R ² =0,97	0,99 (0,97-1,01); R ² =0,83	7,72 ⁻⁰³ (7,64-7,80 ⁻⁰³); R ² =0,92
HaCaT	7,39 (7,23-7,55)	9,10 (9,09-9,10); R ² =0,95	>50	73,65 (69,89-77,41); R ² =0,80	0,09 (0,08-0,10); R ² =0,95	15,46 ⁻⁰³ (15,00-15,92 ⁻⁰³); R ² =0,98

*średnia z wyników uzyskanych z sześciu powtórzeń za pomocą systemu RTCA (3x2) oraz osiemnastu powtórzeń za pomocą testu MTT (3x6); R²-współczynnik determinacji; **winblastyna użyta jako kontrola pozytywna; HaCaT - kontrolna linia ludzkich keratynocytów

Działanie cytotoksyczne frakcji dichlorometanowej spowodowane obecnością kompleksu bufadienolidów ($IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/ml}$) było zgodne z dostępnymi danymi literaturowymi opisującymi ich silną aktywność biologiczną [Huang i wsp. 2013; Supratman i wsp. 2001; Yamagishi i wsp. 1989; Wu i wsp. 2006]. Powyższe wyniki były podstawą do podjęcia przeze mnie dalszych badań nad działaniem cytotoksycznym w komórkach jednego z tych związków. W tym celu wybrałam główny metabolit bufadienolidowy *K. daigremontiana* – 1,3,5-ortoocetan bersaldegeniny (Rys. 2), który występuje w tym gatunku rośliny w największej ilości spośród analizowanych związków z tej grupy (Tab. 3) [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2020: **H-3** i **H-4**]. Dzięki współpracy z zespołem pani prof. Anny Stochmal w Puławach, otrzymałam wyizolowany związek i określiłam jego aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek HeLa, SKOV-3, MCF-7 oraz A375 [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2020: **H-4**]. Uzyskane wyniki wykazały silne działanie antyproliferacyjne związku na wszystkie rodzaje testowanych komórek nowotworowych ($IC_{50} \leq 1,5 \mu\text{g/ml}$) (Tab. 5).

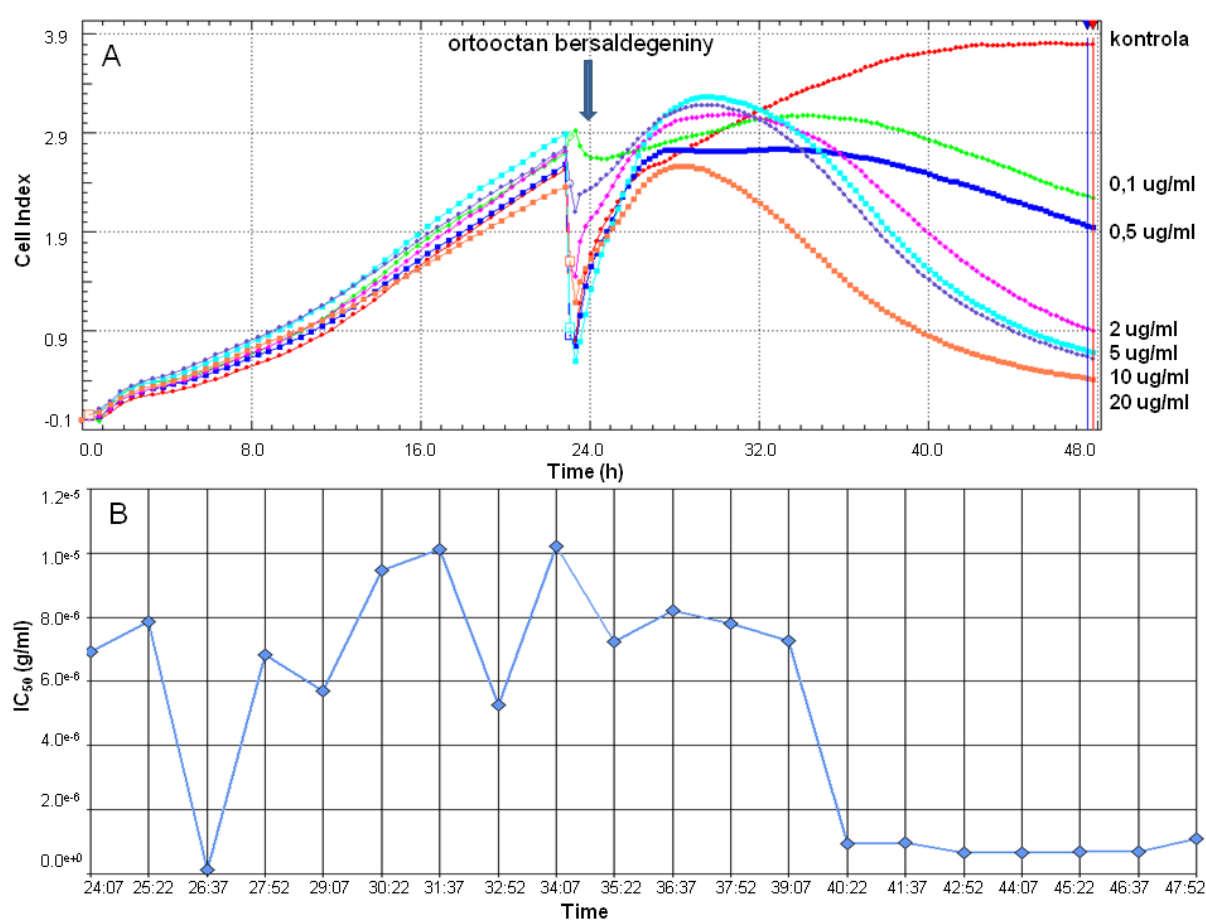


Rysunek 2. Wzór strukturalny 1,3,5-ortoocetanu bersaldegeniny.

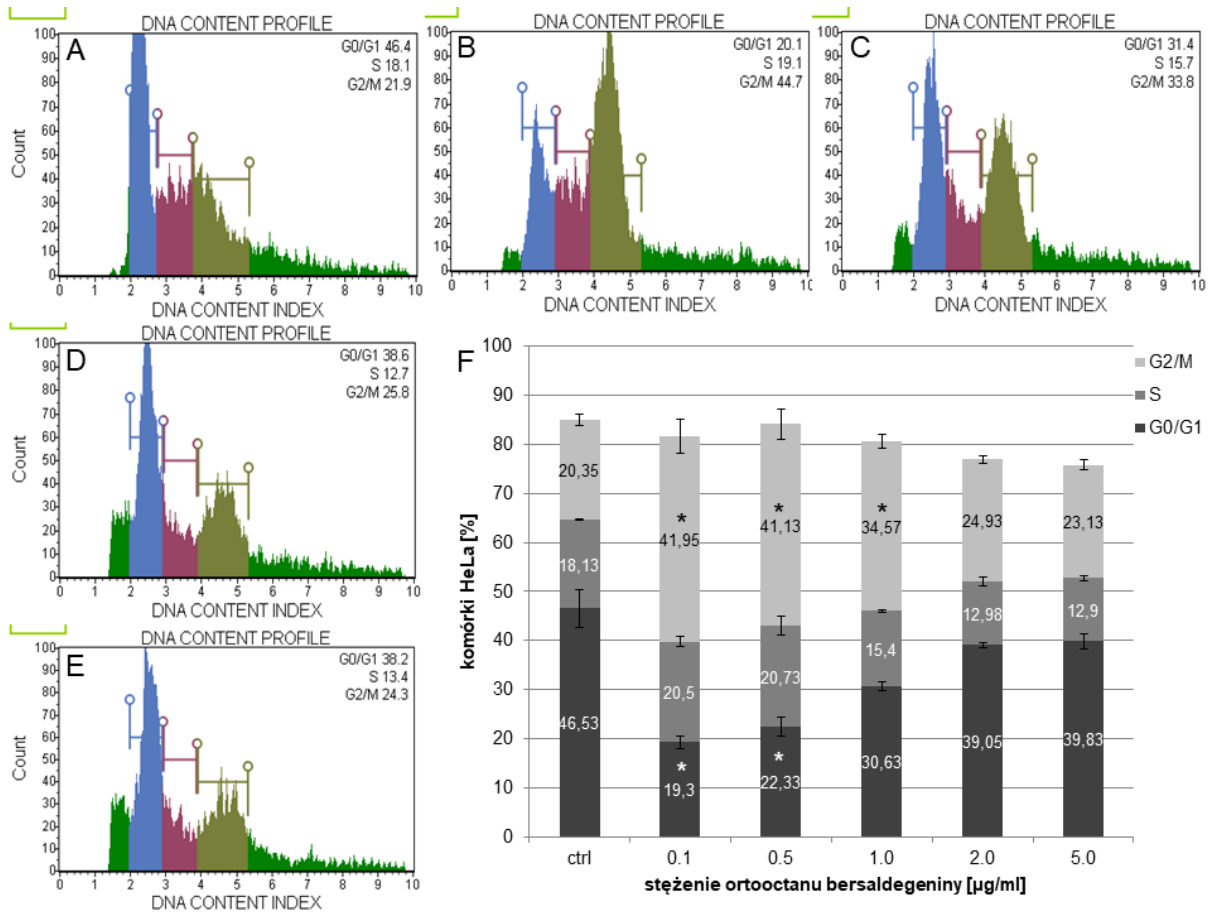
Największą aktywność 1,3,5-ortoocetanu bersaldegeniny zaobserwowano wobec komórek HeLa (IC_{50} był w zakresie stężeń 0,44-0,56 $\mu\text{g/ml}$), które zostały wykorzystane w kolejnym etapie badań *in vitro* mającym na celu określenie mechanizmów indukcji śmierci komórkowej wywołanej działaniem metabolitu. Do tej pory poznane były jedynie mechanizmy działania bufadienolidów takich jak: cinobufagina, gamabufotalina, czy bufalina [Baek i wsp. 2015; Zhang i wsp. 2016; Yuan i wsp. 2019; Wu i wsp. 2017], natomiast rola czynników komórkowych biorących udział w śmierci komórkowej spowodowanej działaniem pochodnych bersaldegeniny była nieznaną.

Wyniki moich przeprowadzonych badań z użyciem 1,3,5-ortoocetanu bersaldegeniny i komórek nowotworowych HeLa pokazały, że związek ten działa antyproliferacyjnie (Wyk.

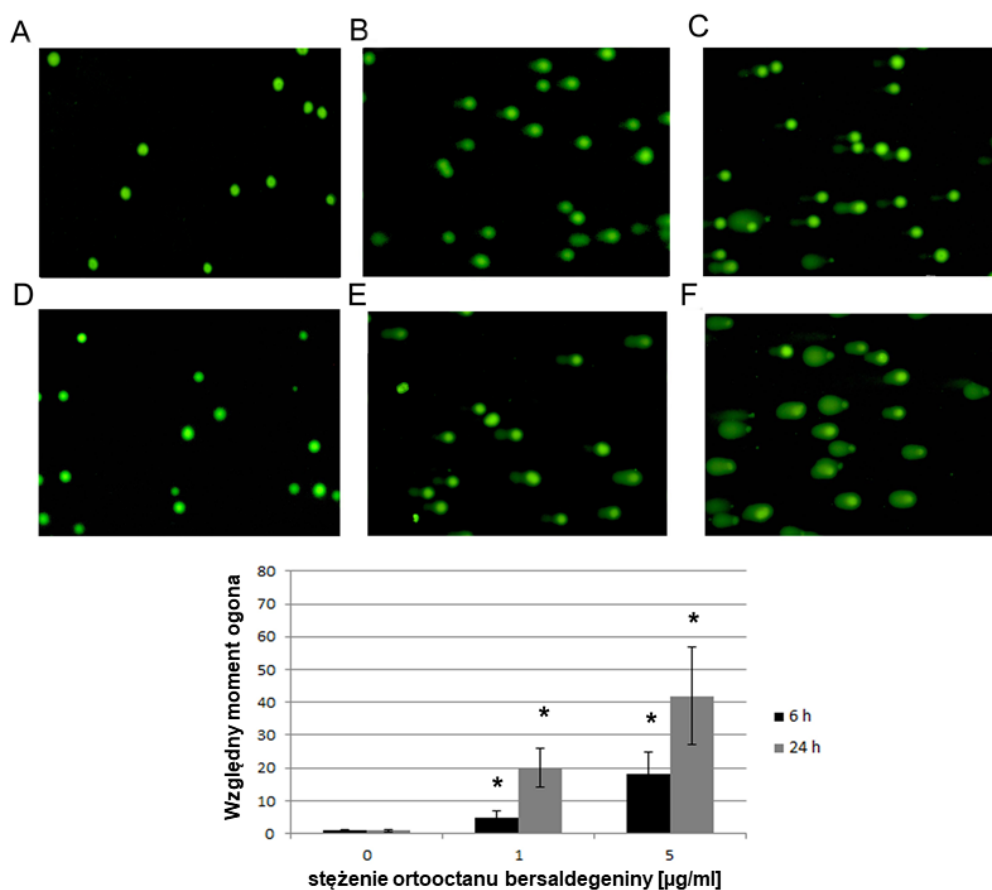
4), wywołuje silne zahamowanie wzrostu komórek w fazie G2/M (Wyk. 5) oraz indukuje śmierć komórkową poprzez wzrost poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach oraz uszkodzenie podwójnej nici dsDNA (double-stranded DNA) już w 6 godzinie inkubacji komórek z metabolitem (Fot. 2 i 3) [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2021: H-5]. W badaniu stwierdziłam zwiększoną liczbę komórek zawierających jądro z fosforylowanym histonem H2A.X (γ H2AX) w pozycji Ser139, który obecny jest w jądrze wówczas, gdy dochodzi do uszkodzeń podwójnej nici DNA (Fot. 3) [Jackson i Bartek 2009]. Uszkodzenia te (pęknięcia DNA) zostały potwierdzone przeprowadzonym testem kometowym, w którym tzw. „ogon” stanowiły fragmenty nici DNA uwolnione ze struktur jądrowych (Fot. 2).



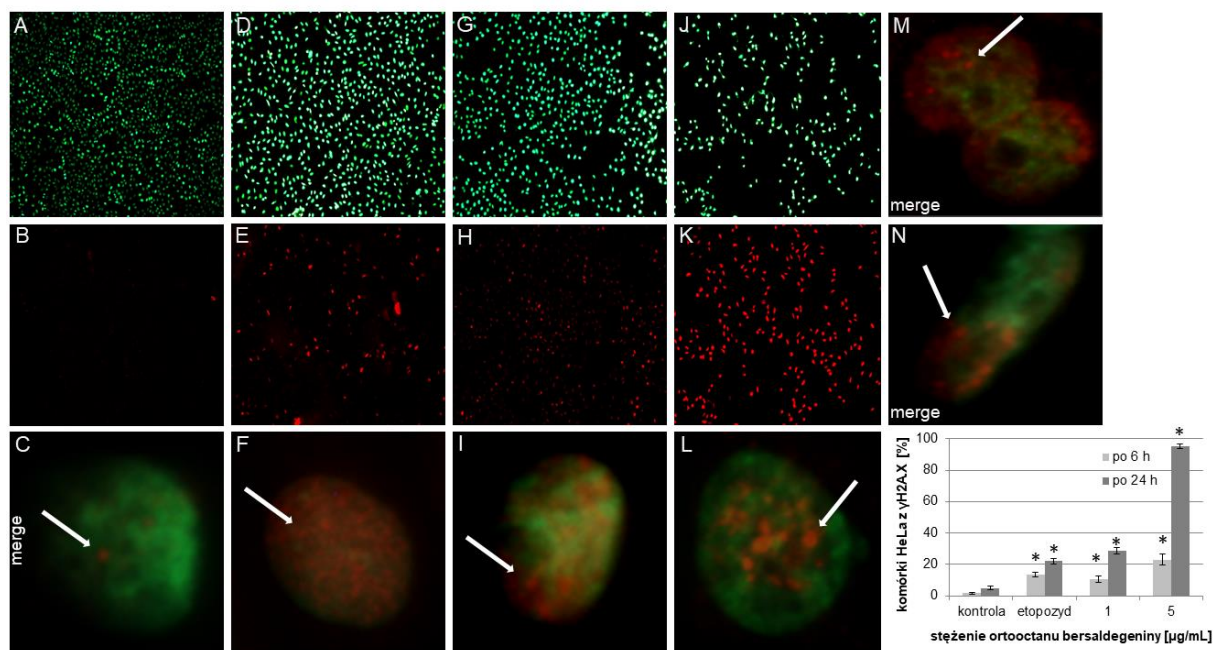
Wykres 4. Krzywe proliferacji komórek HeLa inkubowanych z ortooctanem bersaldegeniny przez 24 h otrzymane za pomocą systemu Real-Time xCELLigence. Do komórek dodano związek w zakresie stężeń 0,1-20,0 μ g/ml (A). Wartości IC_{50} otrzymano za pomocą oprogramowania RTCA software v.1.2.1. (B).



Wykres 5. Ortooctan bersaldegeniny indukuje zahamowanie cyklu komórek HeLa po 48 h inkubacji. Do komórek dodano DMSO (A-kontrola) oraz związek w stężeniach 0,1-5,0 µg/ml (0,1, B-0,5, C-1,0, D-2,0, E-5,0 µg/ml). Liczbę komórek (%) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego przedstawiono w porównaniu do kontroli (F). Wyniki są średnią z trzech powtórzeń ± SD i oznaczone jako „*” są istotnie statystycznie różne w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$).

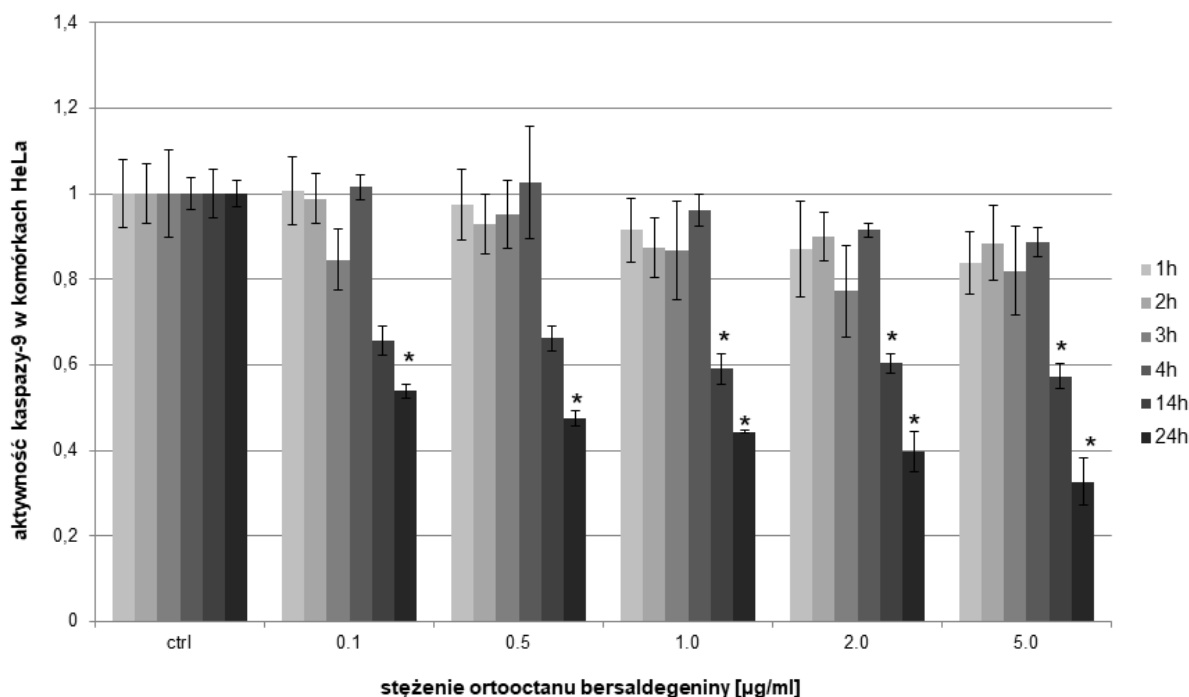


Fot. 2. Ortoocctan bersaldegeniny indukuje uszkodzenie DNA w komórkach HeLa. Do komórek dodano DMSO (A, D, kontrola) oraz związek w stężeniu 1,0 (B, E) oraz 5,0 µg/ml (C, F) i przeprowadzono inkubację przez 6 h (A, B, C) oraz 24 h (D, E, F). Na wykresie przedstawiono względny moment ogona DNA uzyskany z komórek inkubowanych ze związkiem w porównaniu z DNA komórek kontrolnych. Wyniki są średnią z trzech powtórzeń \pm SD i oznaczone jako „*” są istotnie statystycznie różne w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$).



Fot. 3. Ortoocetan bersaldegeniny indukuje fosforylację histonu H2A.X w jądrze komórek HeLa. Do komórek dodano DMSO (0,25% v/v, negatywna kontrola, A-C), etopozyd (10 µM, pozytywna kontrola, D-F) i ortoocetan bersaldegeniny w stężeniach 1 µg/ml (G-I) i 5 µg/ml (J-L); komórki inkubowano przez 24 h. M i N – jądro komórek HeLa po 6 h inkubacji z pochodną bersaldegeniny w stężeniach 1 µg/ml (M) i 5 µg/ml (N). Jądra komórkowe po inkubacji ze związkami wybarwiono barwnikiem Hoechst 33342 (A, D, G, J, M, N) i przeciwciałem anti-fosfo-H2A.X (Ser139) Alexa Fluor 555 (B, E, H, K, M, N). Białe strzałki wskazują obecność γ H2A.X foci w jądrach komórkowych. Wykres przedstawia procentowy udział jąder komórkowych z γ H2A.X. Wyniki uzyskano z dwóch powtórzeń \pm SD i oznaczono „*” jako istotnie statystycznie różne w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$). Zdjęcia wykonano z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x i 630x).

Ponadto w badaniu stwierdziłam brak udziału kaspaz pełniących kluczową rolę w apoptozie (kaspazy-9 oraz kaspaz wykonawczych-3 i -7) w komórkach inkubowanych z badanym związkiem (Wyk. 6), co wskazuje na inny niż apoptoza rodzaj śmierci komórkowej, który może być związany w dużej mierze z NF-kappa inhibitorami, których rolę wykazała przeprowadzona analiza ekspresji genów [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2021: **H-5**].



Wykres 6. Aktywność kaspazy-9 w komórkach HeLa po 1-24 godzinnej inkubacji z ortoocetanem bersaldegeniny. Wyniki są średnią z trzech powtórzeń \pm SD i oznaczone jako „*” są istotnie statystycznie różne w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$).

Podsumowując, powyższe mechanizmy śmierci komórkowej przedstawione po raz pierwszy w pracy **H-5** i dotyczące wpływu pochodnej bersaldegeniny na komórki nowotworowe stanowią podstawę do dalszych badań mających na celu dogłębne poznanie szlaków molekularnych prowadzących do śmierci komórek i do określenia związku jako potencjalnego kandydata do zastosowania w terapii przeciwnowotworowej.

Kolejnym etapem moich zainteresowań badawczych były związki steroidowe występujące w *Trigonella foenum-graecum*. Dzięki współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego możliwe było przeprowadzenie badań fitochemicznych i aktywności cytotoksycznej ekstraktów roślinnych otrzymanych z nasion, jak również frakcji oraz głównych metabolitów wtórnych na liniach komórek nowotworowych. Ocenie efektu cytotoksycznego na komórkach nowotworowych zostały poddane dwa ekstrakty kozieradki pospolitej – wodny i metanolowy, frakcja metanolowa, saponiny steroidowe (jamogenina, tigogenina, diosgenina), C-glikozydy flawonu (witeksyna, orientyna, izoorientyna, wicenina-1,-2,-3) oraz alkaloid trigonellina [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2021: **H-6**]. Badania przeprowadziłam na trzech ludzkich liniach komórek nowotworowych – raka jajnika SKOV-4, raka szyjki macicy HeLa oraz komórkach białaczki limfoblastycznej MOLT-4 (Tab. 6).

Tabela 6. Wartości IC₅₀ (µg/ml) ekstraktów oraz metabolitów wtórnych *Trigonella foenum-graecum* na różnych ludzkich liniach komórkowych.

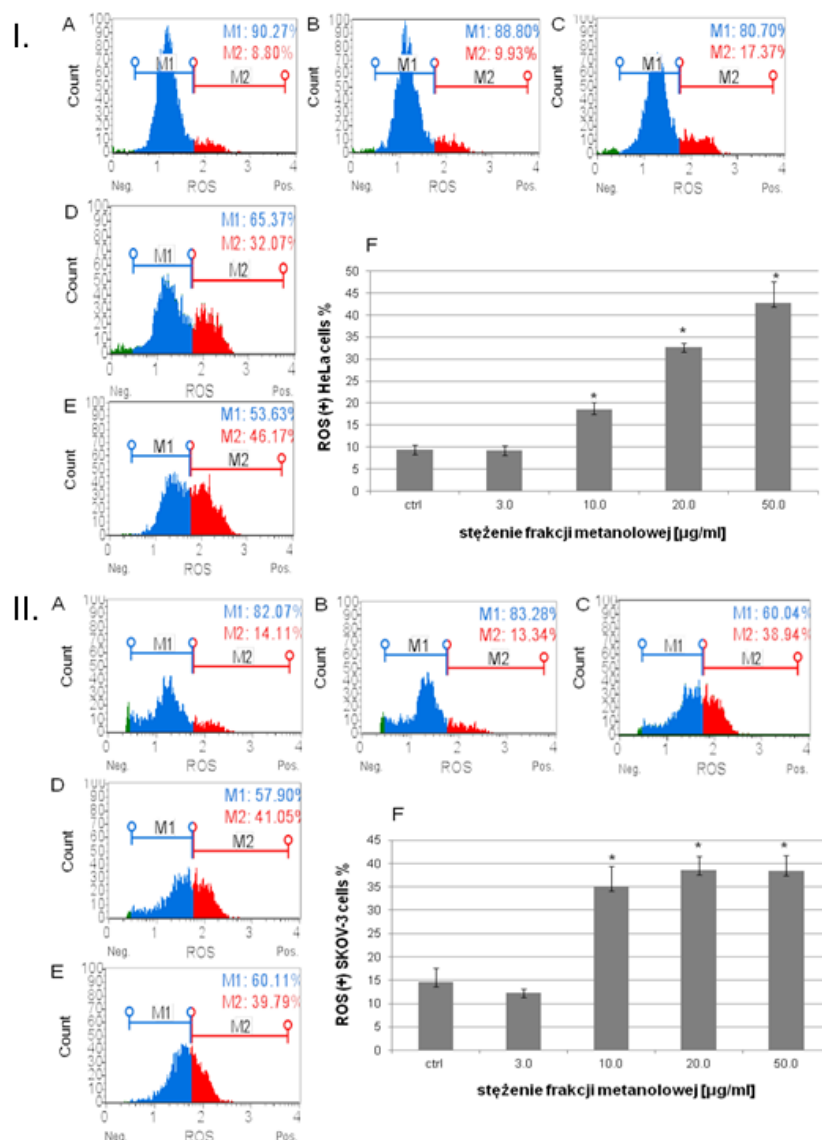
Ekstrakty/metabolity <i>T. foenum-graecum</i>		IC ₅₀ (µg/ml) ± SD			
		HaCaT	HeLa	SKOV-3	MOLT-4
ekstrakt	70% metanolowy	3.58 ± 0.21	13.47 ± 0.62	10.34 ± 0.16	16.18 ± 1.14
	wodny	16.67 ± 0.22	17.43 ± 0.3	16.68 ± 0.6	26.55 ± 0.07
	frakcja metanolowa	3.94 ± 0.04	3.91 ± 0.03	3.97 ± 0.07	7.75 ± 0.37
saponiny steroidowe	jamogenina	9.70 ± 0.91	16.5 ± 0.59	16.70 ± 0.08	nt.
	tigogenina	31.10 ± 2.31	35.60 ± 3.69	>50	nt.
	diosgenina	12.40 ± 0.5	16.30 ± 0.26	19.30 ± 0.97	nt.
C-glikozydy flawonu	witeksyna	>50	nt.	>50	nt.
	orientyna	>50	>50	>50	nt.
	izorientyna	>50	>50	>50	nt.
	wicenina-1	>50	>50	>50	nt.
	wicenina-2	>50	>50	>50	nt.
	wicenina-3	>50	>50	>50	nt.
alkaloid	trigonellina	>50	>50	>50	nt.

nt. – nietestowany, HaCaT – kontrolna linia ludzkich keratynocytów

Wyniki aktywności cytotoksycznej kozieradki na linii SKOV-3 oraz MOLT-4, jak również efekt jamogeniny, tigogeniny oraz diosgeniny na linii SKOV-3 oraz HeLa zostały opisane po raz pierwszy w pracy zgłoszonej do mojego osiągnięcia naukowego [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2021: **H-6**]. Najsilniejszą aktywność cytotoksyczną wykazała frakcja metanolowa, która zawierała w swoim składzie $163,18 \pm 11,03$ µg/mg saponin steroidowych, jak również $820,18 \pm 0,05$ µg/mg C-glikozydów flawonu. Zbliżona zawartość saponin steroidowych była również w ekstrakcie metanolowym ($135,16 \pm 4,74$ µg/mg), zaś flawonoidy stanowiły $113,37 \pm 0,12$ µg/mg. Z kolei ekstrakt wodny zawierał znacznie mniej saponin ($63,13 \pm 8,14$ µg/mg) oraz flawonoidów ($36,77 \pm 0,29$ µg/mg) w porównaniu z frakcją. Ekstrakty wykazały około 3-4 razy mniejszą aktywność przeciwnowotworową niż frakcja, co wskazuje na znaczny wpływ grupy flawonoidów na proliferację komórek.

Frakcja metanolowa została dodatkowo zbadana pod kątem wpływu na aktywność kaspaz wykonawczych-3/7, zmian potencjału mitochondrialnego, a także poziomu ROS (reaktywnych form tlenu) w komórkach linii SKOV-3 oraz HeLa. Uzyskane przeze mnie wyniki aktywności cytotoksycznej frakcji *T. foenum-graecum* wskazały na silne działanie

synergistyczne kompleksu saponin steroidowych oraz flawonoidów. Poszczególne badane flawonoidy nie wykazały aktywności *in vitro*, natomiast saponiny posiadały znacznie mniejszą aktywność niż frakcja metanolowa, która indukowała proces apoptozy w komórkach nowotworowych wywołanej znacznym wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu (Wyk. 7).



Wykres 7. Wpływ frakcji metanolowej na poziom reaktywnych form tlenu ROS w komórkach HeLa (I) oraz SKOV-3 (II). Komórki inkubowano z metanolem (1% (v/v) – kontrola A) oraz frakcją metanolową w stężeniach 3 (B), 10 (C), 20 (D) oraz 50 μg/ml (E). Wyniki (F) są średnią z trzech powtórzeń ± SD i oznaczone jako „*” są istotnie statystycznie różne w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$).

Podsumowując, badania aktywności cytotoksycznej *T. foenum-graecum* pozwoliły na uzupełnienie wiedzy na temat działania na komórki nowotworowe tej rośliny leczniczej, a w szczególności jej efektu wobec komórek raka jajnika oraz białaczki limfoblastycznej. Wyniki tej części badań pokazały także silny synergistyczny efekt biologiczny saponin steroidowych oraz flawonoidów wobec testowanych komórek. Istotne jest poznanie mechanizmów działania aglikonu jamogeniny w komórkach, której aktywność cytotoksyczna jest również przedstawiona po raz pierwszy w pracy **H-6**. Znaczące jej działanie skłania do podjęcia dalszych badań nad tym związkami i nad jego wpływem na czynniki komórkowe biorące udział w zahamowaniu proliferacji komórek i ich śmierci.

4.3.4. Podsumowanie

Najważniejsze osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych badań opisanych w cyklu sześciu publikacji zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego:

1. Przedstawiłam aktywność cytotoksyczną sześciu glikozydów pochodnych pennogeniny otrzymanych z *Paris quadrifolia*, wśród których cztery związki o budowie spirostanu zostały wyizolowane z badanego gatunku rośliny po raz pierwszy. Dwie pochodne pennogeniny 3-*O*- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd pennogeniny (związek nr 5) oraz 3-*O*- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd pennogeniny (związek nr 6) wykazały znaczącą aktywność przeciwnowotworową *in vitro* (publikacja **H-1**).
2. Określiłam mechanizmy działania związków pochodnych pennogeniny (związku 5 i 6) w komórkach nowotworowych i wykazałam, że zarówno wewnętrzna droga mitochondrialna apoptozy, jak i zewnętrzna – receptorowa pełni rolę w śmierci komórkowej wywołanej działaniem badanych metabolitów. Indukowanie drogi zewnętrznej apoptozy przez związki zostało opisane po raz pierwszy (publikacja **H-2**).
3. Przedstawiłam aktywność cytotoksyczną ekstraktów *Kalanchoe daigremontiana*, *K. pinnata* oraz *K. blossfeldiana* na różnych liniach komórek nowotworowych, a także wykazałam po raz pierwszy, że aktywność ta nie jest bezpośrednio związana z zawartością bufadienolidów w badanych ekstraktach *Kalanchoe* (publikacja **H-3**).
4. Określiłam aktywność cytotoksyczną frakcji ekstraktu etanolowego *K. daigremontiana*, w których stwierdzono obecność bufadienolidów oraz dziewiętnastu związków

flawonoidowych, z których aż szesnaście nie zostało do tej pory zidentyfikowanych w badanym gatunku rośliny. Wykazałam także silną aktywność cytotoksyczną otrzymanego metabolitu *Kalanchoe* – 1,3,5-ortoocyanu bersaldegeniny w komórkach nowotworowych (publikacja **H-4**).

5. Przedstawiłam po raz pierwszy mechanizmy działania 1,3,5-ortoocyanu bersaldegeniny w komórkach nowotworowych i wykazałam, że związek silnie indukuje zahamowanie cyklu komórek w fazie G2/M oraz ich śmierć poprzez wzrost poziomu stresu oksydacyjnego oraz uszkodzenia podwójnej nici DNA (dsDNA) (publikacja **H-5**).
6. Określiłam aktywność cytotoksyczną ekstraktów *Trigonella foenum-graecum* oraz głównych metabolitów rośliny – saponin steroidowych i C-glikozydów flawonu na różnych liniach komórek nowotworowych. Wyniki aktywności cytotoksycznej kozieradki na linii SKOV-3 oraz MOLT-4, jak również efekt jamogeniny, tigogeniny oraz diosgeniny na linii SKOV-3 oraz HeLa zostały opisane po raz pierwszy. Badania pokazały także silny synergistyczny efekt biologiczny saponin steroidowych oraz flawonoidów wobec testowanych komórek (publikacja **H-6**).

Piśmiennictwo

1. Baek SH, Kim C, Lee JH, Nam D, Lee J, Lee SG, Chung WS, Jang HJ, Kim SH, Ahn KS. 2015. Cinobufagin exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects through the modulation ROS-mediated MAPKs signalling pathway. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 37: 265-273.
2. Bogucka-Kocka A, Zidorn C, Kasprzycka M, Szymczak G, Szewczyk K. 2018. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species. *Saudi J Biol Sci.* 25: 622-630.
3. Chen Y-S, He Y, Chen C, Zeng Y, Xue D, Wen FY, Wang L, Zhang H, Du JR. 2014. Growth inhibition by pennogenyl saponins from *Rhizoma paridis* on hepatoma xenografts in nude mice. *Steroids* 83: 39-44.
4. Corbiere C, Liagre B, Bianchi A, Bordji K, Dauça M, Netter P, Beneytout JL. 2003. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 22: 899-905.
5. Corbiere C, Liagre B, Terro F, Beneytout JL. 2004. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell Res.* 14: 188-196.
6. Franz C, Jatisatienr A. 1983. Pflanzliche Steroid-Rohstoffe. *Dtsch Apoth Ztg.* 123: 1069-1072.
7. Gajdus J, Kaczyński Z, Kawiak A, Łojkowska E, Stefanowicz-Hajduk J, Ochocka JR, Stepnowski P. 2014. Isolation and identification of cytotoxic compounds from the rhizomes of *Paris quadrifolia* L. *Pharmacogn Mag.* 10: S324-S333.

8. Gonzalez AG, Hernandez JC, Leon F, Padron JI, Estevez F, Quintana J, Bermejo J. 2003. Steroidal saponins from the bark of *Dracaena draco* and their cytotoxic activities. *J Nat Prod.* 66: 793-798.
9. Hostettmann K, Marston A. Saponins. 1995. Cambridge University Press, New York.
10. Huang HC, Lin MK, Yang HL, Hseu YC, Liaw CC, Tseng YH, Tsuzuki M, Kuo YH. 2013. Cardenolides and bufadienolide glycosides from *Kalanchoe tubiflora* and evaluation of cytotoxicity. *Planta Med.* 79: 1362-1369.
11. Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 461: 1071-1078.
12. Kolodziejczyk-Czepas J, Stochmal A. 2017. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. *Phytochem Rev.* 16: 1155-1171.
13. Kravets SD, Vollerner YS, Gorovits MB, Abubakirov NK. 1990. Steroids of the spirostan and furostan series from plants of the genus *Allium*. *Chem Nat Compd* 26: 359-373.
14. Lepage C, Léger DY, Bertrand J, Martin F, Beneytout JL, Liagre B. 2011. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett.* 301: 193-202.
15. Li F, Fernandez PP, Rajendran P, Hui KM, Sethi G. 2010. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* 292: 197-207.
16. Li Y, Gu J-F, Zou X, Wu J, Zhang M-H, Jiang J, Qin D, Zhou JY, Liu BX, Zhu YT, Jia XB, Feng L, Wang RP. 2013. The anti-lung cancer activities of steroidal saponins of *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara through enhanced immunostimulation in experimental Lewis tumor-bearing C57BL/6 mice and induction of apoptosis in the A549 cell line. *Molecules* 18: 12916-12936.
17. Liu MJ, Wang Z, Ju Y, Wong RNS, Wu QY. 2005. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 55: 79-90.
18. Long F-Y, Chen Y-S, Zhang L, Kuang X, Yu Y, Wang LF, Liu X-J, Wang L, Zhou Y, Sang N, Du J-R. 2015. Pennogenyl saponins induce cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J Ethnopharmacol* 162: 112-120.
19. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490.
20. Mahata S, Maru S, Shukla S, Pandey A, Mugeshe G, Das B, Bharti AC. 2012. Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complement Alter Med.* 12: 15.
21. Melo PS, De Azevedo MBM, Zullo MAT, Fabrin-Neto JB, Haun M. 2004. Cytotoxicity of the phytosterol diosgenin and its derivatives in rat cultured hepatocytes and V79 fibroblasts. *Hum Exp Toxicol.* 23: 487-493.
22. Moalic S, Liagre B, Corbière C, Bianchi A, Dauça M, Bordji K, Beneytout JL. 2001. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Lett.* 506: 225-230.

23. Nahar K, Khan MGU, Rahman MS, Begum B, Rashid MA. 2008. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Bryophyllum daigremontianum*. J Pharmacol Science. 7:99-101.
24. Nassis CZ, Haebisch EM, Giesbrecht AM. 1992. Antihistamine activity of *Bryophyllum calycinum*. Braz J Med Biol Res. 25: 929-936.
25. Nayak BS, Marshall JR, Isitor G. 2010. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. leaf – a preliminary study. Indian J Exp Biol. 48: 572-576.
26. Ojewole JA. 2005. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. J Ethnopharmacol. 99: 13-19.
27. Raju J, Bird RP. 2007. Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. Cancer Lett. 255: 194-204.
28. Sarkar R, Mondal C, Bera R, Chakraborty S, Barik R, Roy P, Kumar A, Yadav KK, Choudhury J, Chaudhary SK, Samanta SK, Karmakar S, Das S, Mukherjee PK, Mukherjee J, Sen T. 2015. Antimicrobial properties of *Kalanchoe blossfeldiana*: a focus on drug resistance with particular reference to quorum sensing-mediated bacterial biofilm formation. J Pharm Pharmacol. 67: 951-962.
29. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. 17: 1675-1687.
30. Selim S, Al Jaouni S. 2015. Anticancer and apoptotic effects on cell proliferation of diosgenin isolated from *Costus speciosus* (Koen.) BMC Complement Altern Med. 15: 301-307.
31. Stefanowicz-Hajduk J, Asztemborska M, Krauze-Baranowska M, Godlewska S, Gucwa M, Moniuszko-Szajwaj B, Stochmal A, Ochocka JR. 2020. Identification of flavonoids and bufadienolides and cytotoxic effects of *Kalanchoe daigremontiana* extracts on human cancer cell lines. Planta Med. 86: 239-246.
32. Stefanowicz-Hajduk J, Bartoszewski R, Bartoszewska S, Kochan K, Adamska A, Kosiński I, Ochocka JR. 2015. Pennogenyl saponins from *Paris quadrifolia* L. induce extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. PLoS One 10(8): e0135993.
33. Stefanowicz-Hajduk J, Gucwa M, Moniuszko-Szajwaj B, Stochmal A, Kawiak A, Ochocka JR. 2021. Bersaldegennin-1,3,5-orthoacetate induces caspase-independent cell death, DNA damage and cell cycle arrest in human cervical cancer HeLa cells. Pharm Biol. 59: 54-65.
34. Stefanowicz-Hajduk J, Hering A, Gucwa M, Hałasa R, Soluch A, Kowalczyk M, Stochmal A, Ochocka JR. 2020. Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. Pharm Biol. 58: 732-740.
35. Stefanowicz-Hajduk J, Król-Kogus B, Sparzak-Stefanowska B, Kimel K, Ochocka JR, Krauze-Baranowska M. 2021. Cytotoxic activity of standardized extracts, a fraction and individual secondary metabolites from fenugreek seeds against SKOV-3, HeLa and MOLT-4 cell lines. Pharm Biol. 59: 424-437.

36. Strąg-Lemanowicz A, Leppert W. 2014. Rola onkologicznego leczenia systemowego u pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową. *Medycyna Paliatywna w Praktyce* 8: 11-22.
37. Supratman U, Fujita T, Akiyama K, Hayashi H, Murakami A, Sakai H, Koshimizu K, Ohigashi H. 2001. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana x tubiflora*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65: 947-949.
38. Trouillas P, Corbière C, Liagre B, Duroux JL, Beneytout JL. 2005. Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: A molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg Med Chem.* 13: 1141-1149.
39. Wang X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15: 2922-2933.
40. Willcox ML, Bodeker G. 2004. Traditional herbal medicines for malaria. *Brit Med J.* 329: 1156-1159.
41. Wu PL, Hsu YL, Wu TS, Bastow KF, Lee KH. 2006. Kalanchosides A-C, new cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of *Kalanchoe gracilis*. *Org Lett.* 8: 5207-5210.
42. Wu SH, Bau DT, Hsiao YT, Lu KW, Hsia TC, Lien JC, Ko YC, Hsu WH, Yang ST, Huang YP, Chung JG. 2017. Bufalin induces apoptosis *in vitro* and has antitumor activity against human lung cancer xenografts *in vivo*. *Environ Toxicol.* 4: 1305-1317.
43. Yamagishi T, Haruna M, Yan XZ, Chang JJ, Lee KH. 1989. Antitumor agents, 110, bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*. *J Nat Prod.* 52: 1071-1079.
44. Yuan B, Shimada R, Xu K, Han L, Si N, Zhao H, Bian B, Hayashi H, Okazaki M, Takagi N. 2019. Multiple cytotoxic effects of gamabufotalin against human glioblastoma cell line U-87. *Chem Biol Interact.* 314: 108849.
45. Yun H, Lijian C, Wenhong Z, Yuhong D, Yongli W, Qiang W, Ding Z. 2007. Separation and identification of steroidal compounds with cytotoxic activity against human gastric cancer cell lines *in vitro* from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis*. *Chem Nat Comp.* 43: 672-677.
46. Zhang G, Wang C, Sun M, Li J, Wang B, Jin C, Hua P, Song G, Zhang Y, Nguyen LLH, Cui R, Liu R, Wang L, Zhang X. 2016. Cinobufagin inhibits tumor growth by inducing intrinsic apoptosis through AKT signalling pathway in human nonsmall cell lung cancer cells. *Oncotarget* 7: 28935-28946.
47. Zhang W, Zhang D, Ma X, Liu Z, Li F, Wu D. 2014. Paris saponin VII suppressed the growth of human cervical cancer HeLa cells. *Eur J Med Res.* 19: 41-47.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Po skończonych studiach farmaceutycznych brałam udział w projekcie kończącym tematykę mojej pracy magisterskiej dotyczącej identyfikacji molekularnej gatunków *Viscum* pochodzących z różnych rejonów Polski i Europy. Wyniki tej pracy zostały opublikowane w czasopiśmie międzynarodowym znajdującym się na liście JCR [Piotrowski i wsp. 2003: A-1].

W okresie studiów w Dziennym Studium Doktoranckim rozpoczęłam badania nad dwoma gatunkami roślin leczniczych *Paris quadrifolia* L. oraz *Polygonatum multiflorum* (L.) All., które obejmowały określenie zróżnicowania genetycznego populacji roślin występujących na terenie północnej Polski. Podczas prowadzenia badań odbyłam szkolenie dotyczące zastosowania metod genetyki molekularnej w badaniach ekologicznych, które zorganizowane zostało przez pana prof. Wiesława Bogdanowicza i odbyło się w 2004 roku w Muzeum i Instytucie Zoologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Zdobyta wiedza i umiejętności praktyczne z zakresu metod izolacji kwasów nukleinowych, technik PCR, metod badań zróżnicowania genetycznego gatunków oraz statystycznej analizy danych molekularnych umożliwiły przeprowadzenie przeze mnie badań zmienności genetycznej populacji dwóch gatunków roślin [Stefanowicz i Ochocka 2005: A-3]. Ponadto dzięki nawiązaniu współpracy z panią dr Aleksandrą Dybikowską z Pomorskiego Parku Naukowo-Technologicznego (PPNT) w Gdyni możliwe było przeprowadzenie analizy zmienności genetycznej inter- oraz intrapopulacyjnej gatunku *Paris quadrifolia* w wyniku zastosowania techniki selektywnej amplifikacji fragmentów restrykcyjnych (ang. AFLP, amplified fragment length polymorphism) i ich rozdziale za pomocą sekwenatora dostępnego w PPNT.

W tym okresie nawiązałam również współpracę z panem prof. Piotrem Stepnowskim i dr. Jerzym Gajdusem z Katedry Analizy Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, dzięki którym możliwa była wstępna jakościowa analiza fitochemiczna glikozydów saponinowych występujących w *Paris quadrifolia*. Za pomocą dostępnego w Katedrze sprzętu HPLC z refraktometrycznym detektorem RIDK 102 oraz spektrometru mas BIFLEX III MalDI TOF zidentyfikowano niektóre z głównych saponozydów występujących w ekstrakcie badanego gatunku (dwie pochodne diosgeniny i dwie pochodne pennogeniny). Dalsze zaawansowane prace nad izolacją i identyfikacją związków pochodnych pennogeniny kontynuowałam po obronie pracy doktorskiej.

Ekstrakty *P. multiflorum* oraz *P. quadrifolia* zostały również ocenione pod kątem działania cytotoksycznego *in vitro* na komórki nowotworowe. Badania te możliwe były dzięki rozpoczęciu współpracy z panią prof. Ewą Łojkowską oraz dr Anną Kawiak z Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku. Ekstrakty roślinne obu gatunków zostały przebadane na ludzkich liniach komórek nowotworowych – raku szyjki macicy HeLa oraz białaczce promielocytowej HL-60 [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2006: A-5]. Obiecujące wyniki powyższych badań stanowiły podstawę i początek moich późniejszych zainteresowań naukowych dotyczących aktywności przeciwnowotworowej roślinnych surowców steroidowych i ich metabolitów.

Wymienione powyżej badania i uzyskane wyniki zostały przedstawione w mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Zróżnicowanie genetyczne oraz ocena aktywności biologicznej metabolitów wtórnych *Paris quadrifolia* L. i *Polygonatum multiflorum* (L.) All.” oraz częściowo w artykułach naukowych, które ukazały się po uzyskaniu stopnia doktora (Kosiński i wsp. 2009: B-1 oraz Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2011: B-3).

5.1.1. Udział w projektach naukowo-badawczych

Wykonywanie badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej było możliwe między innymi dzięki udziałowi jako wykonawca w **grancie promotorskim** finansowanym przez **Komitet Badań Naukowych** (kierownik: prof. J. Renata Ochocka, nr KBN: 2P05F01129) zatytułowanym „Badania genetyczne i fitochemiczne *Polygonatum multiflorum* (L.) All. oraz *Paris quadrifolia* L. z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej oraz aktywność biologiczna wybranych saponozydów steroidowych” realizowanym w latach 2005-2008.

W latach 2005-2007 byłam również kierownikiem i wykonawcą **zadania badawczego Akademii Medycznej w Gdańsku** finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr AMG: W-741) zatytułowanego „Badanie zróżnicowania genetycznego populacji *Paris quadrifolia* L. metodą AFLP”.

Prace będące wynikiem zainteresowań naukowych oraz badań realizowanych przed uzyskaniem stopnia doktora:

A-1. Arkadiusz Piotrowski, J. Renata Ochocka, Justyna Stefanowicz, Maria Łuczkiwicz. Molecular genetic survey of European mistletoe (*Viscum album*) subspecies with allele-specific and dCAPS type markers specific for chloroplast and nuclear DNA sequences. *Planta Medica* 2003, 69(10): 939-944.

A-2. Justyna Stefanowicz, J. Renata Ochocka. Kokoryczka wielokwiatowa *Polygonatum multiflorum* (L.) All. - pospolita roślina lecznicza naszych lasów. *Postępy Fitoterapii* 2004, 4(14): 163-168.

A-3. Justyna Stefanowicz, J. Renata Ochocka. Genetyczna i fitochemiczna analiza *Polygonatum multiflorum* (L.) All. *Herba Polonica* 2005, 51(1): 248-249.

A-4. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Adam Hajduk, J. Renata Ochocka, Jacek Sein Anand. Zatrucia roślinami wyższymi występującymi w Polsce. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 2006, 39(3): 271-276.

A-5. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Anna Kawiak, Ewa Łojkowska, J. Renata Ochocka. Określenie działania cytotoksycznego *in vitro* ekstraktów *Polygonatum multiflorum* oraz *Paris quadrifolia* na wybranych liniach komórkowych - ludzkich fibroblastach skóry, komórkach raka szyjki macicy HeLa oraz komórkach białaczki szpikowej (HL-60). *Herba Polonica* 2006, 52(3): 107-108.

A-6. Justyna Stefanowicz-Hajduk, J. Renata Ochocka. Saponiny steroidowe - występowanie, właściwości i zastosowanie w lecznictwie. *Postępy Fitoterapii* 2006, 7(1): 36-40.

Od czasu rozpoczęcia studiów doktoranckich oraz zatrudnienia w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym przebieg mojego rozwoju naukowego odbywał się z wyłączeniem okresu przebywania na urloпах macierzyńskich (11.2006-03.2007 oraz 01.2012-06.2012).

5.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora dokończyłam prace dotyczące zmienności genetycznej *P. quadrifolia* oraz *P. multiflorum*, a także wykorzystania elektroforezy kapilarnej CE (ang. capillary electrophoresis) w separacji fragmentów DNA w żelu poliakryloamidowym. Wyniki tej części moich badań zostały opisane w dwóch pracach [Kosiński i wsp. 2009: B-1 oraz Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2009: B-2]. Pobyt w Belgii (Analis, Namur) pozwolił na poszerzenie moich umiejętności z zakresu zastosowania techniki CE w analizie różnego rodzaju związków (tj. DNA, związków syntetycznych i metabolitów roślinnych).

Moje prace eksperymentalne w tym okresie obejmowały głównie poszukiwania aktywnych cytotoksycznie ekstraktów roślinnych oraz ich głównych metabolitów. Badania dotyczyły nie tylko ekstraktów i związków steroidowych, których wyniki zgłosiłam do mojego postępowania habilitacyjnego, ale również związków polifenolowych z gatunków *Cyclopia* sp. [Bartoszewski i wsp. 2014: B-4], alkaloidów *Phyllanthus glaucus* [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2016: B-6] i saponin triterpenowych z gatunku *Nigella sativa* [Adamska i wsp. 2019: B-11]. Ekstrakty wymienionych powyżej gatunków roślin były badane na linii raka szyjki macicy HeLa oraz jajnika SKOV-3. O ile same ekstrakty nie wykazały znaczącej aktywności cytotoksycznej, badane główne metabolity charakteryzowały się silnym działaniem *in vitro* na komórki. W tych badaniach brałam udział w określeniu mechanizmów działania metabolitów roślinnych (tj. mangiferyna i hesperydyna z *Cyclopia* sp., sekurydyna z *Phyllanthus glaucus* oraz α -hederyna z *Nigella sativa*) w komórkach nowotworowych.

W przypadku metabolitu - mangiferyny brałam także udział w badaniach dotyczących jej działania w skórze i zdolności hamowania aktywności enzymów skórnych [Ochocka i wsp. 2017: B-9]. Podjęte i ukończone w 2017 roku studia podyplomowe na kierunku Kosmetologia bioestetyczna w Wyższej Szkole Zdrowia w Gdańsku pozwoliły na poszerzenie mojej wiedzy i umiejętności z zakresu działania związków bioaktywnych w skórze. Tematykę tą zamierzam kontynuować w kolejnych moich badaniach naukowych.

Badania aktywności cytotoksycznej ekstraktów/metabolitów roślinnych prowadziłam z zastosowaniem systemu Real-Time Cell Analyzer (RTCA), bazującego na pomiarze zmian impedancji w mikrosensorach płytek E-plate, do których wysiewane są testowane komórki oraz dodawany jest ekstrakt/metabolit. Urządzenie pozwala na obserwację badanych komórek w czasie rzeczywistym i na rejestrację nawet niewielkich zmian w ich morfologii, tempie

proliferaacji i żywotności, a tym samym na oszacowanie przeżywalności komórek pod wpływem działania ekstraktu/związku. Oprogramowanie RTCA pozwala na wyznaczenie wartości IC_{50} pokazującej siłę aktywności cytotoksycznej ekstraktu/związku w komórkach w dowolnym punkcie pomiarowym eksperymentu. W toku moich badań zarówno ekstraktów, jak i metabolitów roślinnych, opracowałam przy współudziale metodę regeneracji płytek w systemie RTCA, które zgodnie z zaleceniami producenta mogą być użyte jednokrotnie. Biorąc pod uwagę duże koszty eksperymentów z zastosowaniem tych płytek, powtórne ich wykorzystanie ma swoje uzasadnienie. Procedurę regeneracji przedstawiłam w pracy B-7 [Stefanowicz-Hajduk i wsp. 2016: B-7], w której zastosowałam winblastynę używaną w moich badaniach jako związek kontrolny (kontrola pozytywna). Powtarzalność wyników w zastosowanej procedurze regeneracji płytek została sprawdzona na dwóch liniach komórkowych (HeLa oraz MCF-7). W badaniach wykazałam, że wyniki otrzymane z użyciem regenerowanych płytek są powtarzalne, a metodykę tą można z powodzeniem stosować w przypadku różnych linii komórkowych, co znacząco wpływa na zmniejszenie kosztów prowadzenia badań.

Użycie systemu RTCA w badaniach cytotoksyczności opisałam również w pracy przeglądowej, w której przedstawiłam zarówno wady, jak i zalety stosowania tej technologii i porównałam ją z powszechnie stosowanymi w tego typu badaniach testami opartymi na przekształceniu soli tetrazolowych przez komórki [Stefanowicz-Hajduk i Ochocka 2020, B-13].

Podjęta w tym czasie współpraca z zespołem pani prof. Małgorzaty Sznitowskiej z Katedry i Zakładu Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zaowocowała przeprowadzeniem badań układów dyspersyjnych (mogących służyć jako nośniki leków podawanych parenteralnie do organizmu) pod kątem ich działania cytotoksycznego na komórki nienowotworowe i tym samym ich bezpieczeństwa stosowania w praktyce [Płaczek i wsp. 2019: B-12]. Badania dotyczyły siedmiu układów dyspersyjnych opartych na fosfolipidach – liposomów, emulsji oraz wodnych dyspersji lecytyny. Uzyskane przeze mnie wyniki aktywności cytotoksycznej potwierdziły biokompatybilność wszystkich testowanych preparatów, w tym nowo opracowanych dyspersji lecytyny, które można uznać za bezpieczne pozajelitowe nośniki leków.

W 2018 roku odbyłam staż naukowy w Laboratorium Diagnostyki Molekularnej Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, gdzie zapoznałam się z technikami przydatnymi w określaniu mechanizmów działania cytotoksycznego związków w komórkach. Laboratorium dysponuje sprzętem do wykonywania m.in. analiz Real-Time PCR, Western Blot, cytometrii przepływowej oraz

mikroskopii elektronowej. Pobyt w Laboratorium pozwolił mi na uzupełnienie wiedzy z zakresu wykorzystania technik w ocenie aktywności biologicznej *in vitro* ekstraktów i aktywnych związków.

5.2.1. Udział w projektach naukowo-badawczych

W latach 2008-2010 byłam kierownikiem i wykonawcą **zadania badawczego Akademii Medycznej w Gdańsku** finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr AMG: W-741) zatytułowanego „Określenie aktywności cytotoksycznej *in vitro* wyizolowanych frakcji i związków z ekstraktu *Paris quadrifolia* L. na różnych liniach komórek nowotworowych”.

W latach 2011-2013 byłam kierownikiem i wykonawcą **zadania badawczego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego** finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr GUMed: MN-01-28/08) zatytułowanego „Badania aktywności cytotoksycznej metabolitów wtórnych”.

Wyniki uzyskane podczas wykonywania pracy doktorskiej, związane z aktywnością cytotoksyczną *Paris quadrifolia* były podstawą do otrzymania i realizacji **projektu badawczego własnego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki** dotyczącego działania przeciwnowotworowego *in vitro* metabolitów *Paris quadrifolia* oraz *Trigonella foenum-graecum*. W powyższym projekcie zatytułowanym „Mechanizmy aktywności cytotoksycznej *Paris quadrifolia* L. oraz *Trigonella foenum-graecum* L.” brałam udział jako główny wykonawca w latach 2011-2015 (kierownik projektu: prof. J. Renata Ochocka, nr NCN: N N405 669140).

W okresie 2014-2015 realizowałam **zadanie badawcze dofinansowane w ramach dotacji dla Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW)** na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zatytułowane „Izolacja i identyfikacja strukturalna metabolitów gatunku *Paris quadrifolia* L.”.

Od 2021-obecnie jestem kierownikiem **działania naukowego Narodowego Centrum Nauki – MINIATURA-4** zatytułowanego „Cytotoksyczność ekstraktu *Kalanchoe*

daigremontiana w komórkach ludzkiego raka jajnika SKOV-3 oraz jego działanie *in vitro* z lekami cytostatycznymi stosowanymi w terapii przeciwnowotworowej” (nr NCN: DEC 2020/04/X/NZ7/00428/2).

Rezultaty podjętych współprac oraz udziału w projektach badawczych zostały przedstawione w cyklu 6 prac wchodzących w zakres tematyki mojego postępowania habilitacyjnego [**H-1 - H-6**], a także innych prac wchodzących w skład mojego dorobku naukowo-badawczego [**B-1 - B-14**].

Lista publikacji niewchodzących w skład cyklu prac zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego:

B-1. Igor Kosiński, Justyna Stefanowicz-Hajduk, Renata Ochocka. Demographic *Versus* genetic (RAPD) variation between and within two populations of the clonal plant *Paris quadrifolia* L. (Liliaceae). Polish Journal of Ecology 2009, 57(2): 303-311.

B-2. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Natalia Filipowicz, Igor Kosiński, J. Renata Ochocka. Capillary electrophoresis with dual laser detection in separation of amplified fragment length polymorphism fragments. Journal of Separation Science 2009, 32(22): 3539-3543.

B-3. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Anna Kawiak, Jerzy Gajdus, J. Renata Ochocka, Monika Paszkiewicz, Piotr Stepnowski, Ewa Łojkowska. Cytotoxic activity of *Paris quadrifolia* extract and isolated saponin fractions against human tumor cell lines. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 2011, 53(2): 127-131.

B-4. Rafał Bartoszewski, Anna Hering, Marcin Marszał, Justyna Stefanowicz-Hajduk, Sylwia Bartoszevska, Niren Kapoor, Kinga Kochan, Renata Ochocka. Mangiferin has an additive effect on the apoptotic properties of hesperidin in *Cyclopia* sp. tea extracts. PLoS ONE 2014, 9(3): 1-12.

B-5. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Barbara Król-Kogus, Mirosława Krauze-Baranowska, J. Renata Ochocka. *In vitro* evaluation of cytotoxic activity of *Trigonella foenum-graecum* on human cervical cancer HeLa cells. Planta Medica 2015, 81(16): PM-37.

B-6. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Barbara Sparzak-Stefanowska, Mirosława Krauze-Baranowska, J. Renata Ochocka. Securinine from *Phyllanthus glaucus* induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. PLoS ONE 2016, 11(10): 1-19.

B-7. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Anna Adamska, Rafał Bartoszewski, J. Renata Ochocka. Reuse of E-plate cell sensor arrays in the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. BioTechniques 2016, 61: 117-122.

B-8. Marcin Płaczek, Joanna Czasnowicz, Justyna Pagiela, Justyna Stefanowicz-Hajduk, J. Renata Ochocka, Ewa Iżycka-Świeszewska, Małgorzata Sznitowska. *In vitro* and *in vivo* toxicity of lecithin dispersions intended for parenteral administration. Arhiv za Farmaciju 2016, 66: 279-280.

B-9. Renata Ochocka, Anna Hering, Justyna Stefanowicz-Hajduk, Krzysztof Cal, Helena Barańska. The effect of mangiferin on skin - penetration, permeation and inhibition of ECM enzymes. PLoS ONE 2017, 12: 1-16.

B-10. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Magdalena Gucwa, Adam Hajduk, J. Renata Ochocka. *Kalanchoe blossfeldiana* extract induces cell cycle arrest and necrosis in human cervical cancer cells. Pharmacognosy Magazine 2019, 15(66, suppl. 3): S527-S537.

B-11. Anna Adamska, Justyna Stefanowicz-Hajduk, J. Renata Ochocka. Alpha-hederin, the active saponin of *Nigella sativa*, as an anticancer agent inducing apoptosis in the SKOV-3 cell line. Molecules 2019, 24(16): 1-17.

B-12. Marcin Płaczek, Dorota Wątróbska-Świetlikowska, Justyna Stefanowicz-Hajduk, Markus Drechsler, J. Renata Ochocka, Małgorzata Sznitowska. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity among phospholipid-based parenteral drug delivery systems: emulsions, liposomes and aqueous lecithin dispersions (WLDs). European Journal of Pharmaceutical Sciences 2019, 127: 92-101.

B-13. Justyna Stefanowicz-Hajduk, J. Renata Ochocka. Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: usefulness and comparison with tetrazolium salt assays. Toxicology Reports 2020, 7: 335-344.

B-14. Justyna Stefanowicz-Hajduk, Anna Hering, Magdalena Gucwa, Rafał Hałasa, J. Renata Ochocka. Comparative study on antibacterial and cytotoxic properties of selected *Kalanchoe* species. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics 2020, 8(2): 8.

5.3. Staże i szkolenia

Rok	Jednostka	Poznane zagadnienia i techniki badawcze
2004	Muzeum i Instytut Zoologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie	„Zastosowanie metod molekularnych w badaniach ekologicznych” (certyfikat). Zapoznanie się z technikami izolacji kwasów nukleinowych, metodami badań polimorfizmu DNA oraz statystyczną analizą danych.
Od 2005	Ośrodek Szkolenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; Studium Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu; Polskie Towarzystwo Lekarskie; Instytut Roślin i Przetworów Zielarskich w Poznaniu	Uczestnictwo w szkoleniach i kursach dla farmaceutów w ramach ciągłego kształcenia farmaceutów (zaświadczenia).
2008	Ośrodek Usług Pedagogicznych i Socjalnych ZNP w Gdańsku	Kurs kwalifikacyjny pedagogiczny dla czynnych zawodowo nauczycieli (świadcstwo).
2008	Analisis, Belgia	„Hands-on small molecules” oraz “P/ACE MDQ/32 Karat Software” (certyfikaty). Poznanie technik rozdzielania metabolitów roślinnych oraz kwasów nukleinowych za pomocą elektroforezy kapilarnej.
2009	Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego	Warsztaty “Workshop on plant molecular biotechnology” (certyfikat). Poznanie technik molekularnych stosowanych w analizie bioróżnorodności gatunków roślinnych.

2009	Katedra i Zakład Fizjopatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego	Staż naukowy - zapoznanie się z technikami hodowli komórek <i>in vitro</i> oraz techniką cytometrii przepływowej.
2014	Śląskie Międzyuczelniane Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych w Chorzowie	Warsztaty - „Terapia fotodynamiczna, związki cytotoksyczne, genomika i transkryptomika nowotworów – w badaniach ukierunkowanych na diagnostykę i terapię nowotworów”. Zapoznanie się z terapią fotodynamiczną, technikami oceny działania cytotoksycznego związków w komórkach nowotworowych.
2018	Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie	Staż naukowy w Laboratorium Diagnostyki Molekularnej (zaświadczenie). Zapoznanie się z mikroskopią elektronową oraz technikami służącymi do oceny działania cytotoksycznego związków w komórkach.
2019	Szkolenie organizowane przez firmę Gamma w Warszawie	Szkolenie „Ocena bezpieczeństwa kosmetyków w teorii i praktyce” (certyfikat); szacowanie ekspozycji dla produktów kosmetycznych, określanie dziennego narażenia systemowego dla składników, tworzenie raportu bezpieczeństwa produktu kosmetycznego.

5.4. Recenzowanie prac eksperymentalnych i przeglądowych

Przeprowadziłam recenzje artykułów naukowych w takich czasopismach, jak: Antioxidants, Plos One, Molecules, Steroids, Life, Scientia Pharmaceutica, Cell Proliferation, Natural Product Research, Cellular and Molecular Biology Letters, Scientific Reports, Foods, Biomolecules, Heliyon, Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, Processes, Sensors and Materials, European Journal of Inflammation, Israel Journal of Plant Sciences, Biotechnology

and Applied Biochemistry, Chemico-Biological Interactions, Integrative Cancer Therapies, Nutrition and Cancer, International Journal of Molecular Sciences, Applied Sciences.

Od 2017 jestem członkiem zespołu recenzentów w czasopiśmie MDPI oraz członkiem Reviewer Board w *Separation i Chemistry*.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Dydaktyka i działalność organizacyjna

Od 2003 roku prowadzę zajęcia dydaktyczne w Katedrze Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z biologii, parazytologii oraz botaniki dla studentów I roku kierunku farmaceutycznego (ćwiczenia), z biologii dla studentów I roku kierunku medycyny laboratoryjnej (ćwiczenia). Dodatkowo prowadzę zajęcia fakultatywne z biologii oraz botaniki dla studentów I roku przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego, dla studentów I i II roku kierunku farmaceutycznego „Składniki naturalne stosowane w kosmologii” (fakultet autorski) oraz dla studentów IV roku kierunku farmaceutycznego „Metody biologii molekularnej w identyfikacji leczniczych surowców roślinnych”.

Od 2018 roku prowadzę ćwiczenia z biologii, parazytologii oraz botaniki dla studentów I roku English Division Master of Pharmacy w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

W latach 2007-2008 prowadziłam zajęcia dydaktyczne z botaniki i farmakognozji dla słuchaczy I roku kierunku technik farmaceutyczny w szkole Towarzystwa Edukacji Bankowej w Gdańsku oraz Gdyni.

Opiekun prac magisterskich:

W latach 2005-2019 byłam bezpośrednim opiekunem siedemnastu prac magisterskich eksperymentalnych wykonywanych przez studentów V roku kierunku farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Działalność organizacyjna:

– 2014 - 2015 pełniłam funkcję zastępcy opiekuna studentów I roku kierunku farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

- 2015 - 2020 pełniłam funkcję opiekuna studentów I roku kierunku farmaceutycznego;
- 2020 - obecnie pełnię funkcję zastępcy opiekuna studentów I roku kierunku farmaceutycznego.

6.2. Współpraca z otoczeniem społecznym i gospodarczym

W 2004 roku prowadziłam tygodniowe szkolenie z towaroznawstwa zielarskiego pt.: „Podstawy botaniki - budowa komórki roślinnej, wybrane tkanki roślinne” organizowanym przez Ośrodek Szkolenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku.

W latach 2013 oraz 2014 brałam czynny udział w popularyzacji nauki podczas Medycznego Dnia Nauki organizowanego przez Gdański Uniwersytet Medyczny w Gdańsku oraz Gdyni.

Od 2015 roku prowadzę również warsztaty dla uczniów szkoły podstawowej z zagadnień obejmujących parazytologię lekarską.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Praca w aptekach

W latach 2002-2003 odbyłam roczny staż podyplomowy w aptece otwartej w Olsztynie. W 2003 roku uzyskałam prawo wykonywania zawodu farmaceuty (nr 05015412). Od 2003 roku jestem członkiem Izby Aptekarskiej w Gdańsku. W latach 2003-2007 pracowałam w aptekach otwartych w Gdańsku i Sopocie na stanowisku farmaceuty.

W okresie marzec-maj 2020 pracowałam w ramach wolontariatu w Aptece Szpitalnej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku.

7.2. Nagrody i wyróżnienia

- ✓ nagrodzone (I miejsce) wystąpienie ustne oraz poster podczas XXVIII Ogólnopolskiego Sympozjum Bromatologicznego, Gdańsk 2020;

- ✓ 2018 – nagroda naukowa zespołowa II-go stopnia Rektora GUMed za badania nad kluczowymi ludzkimi enzymami determinującymi adaptację do środowiska zewnętrznego i odpowiedź na stres;
- ✓ 2017 – nagroda naukowa zespołowa II-go stopnia Rektora GUMed za badania aktywności cytotoksycznej związków czynnych roślin leczniczych;
- ✓ 2015 – nagroda naukowa zespołowa I-go stopnia Rektora GUMed za badania nad znaczeniem potranslacyjnej regulacji komórkowych szlaków metabolicznych;
- ✓ 2010 – nagroda naukowa zespołowa II-go stopnia Rektora GUMed za badania polimorfizmu genetycznego i fitochemicznego wybranych gatunków roślin leczniczych.

7.3. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego habilitanta

Informacja o punktacji Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny).

Całkowity dorobek: 40,321, w tym punktacja IF za cykl prac zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego wynosi 15,913.

Informacja o liczbie cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań.

Web of Science: 132 , bez autocytowań: 117

Scopus: 123, bez autocytowań: 110

Informacja o posiadanym indeksie Hirscha.

Web of Science: 7

Scopus: 8

Informacja o liczbie punktów MEiN.

Całkowity dorobek: 930,5, w tym liczba punktów za cykl prac zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego wynosi 365.

Justyna Stefanowicz-Hajduk