UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

dr hab. n. farm. Daniel Załuski, prof. UMK
Katedra Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
daniel.zaluski@cm.umk.pl

Bydgoszcz, 29 grudnia 2021 r.

Recenzja dorobku naukowego

dr n. farm. Justyny Stefanowicz-Hajduk oraz cyklu publikacji pt.

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

27 kwietnia 2021 roku pani dr Justyna Stefanowicz-Hajduk wystąpiła do Rady Doskonałości Naukowej z wnioskiem o wszczęcie postępowania w sprawie nadania jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych, wskazując Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego jako jednostkę do przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego.

Niniejsza recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo pana prof. dra hab. Wiesława Sawickiego, przewodniczącego Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 19 października 2021 roku (WFD-501-H-108/2021) w oparciu o dokumentację, którą otrzymałem w dniu 5 listopada 2021 r. Zestaw dokumentów stanowiących załącznik do w/w wniosku pani dr Justyny Stefanowicz-Hajduk jest kompletny i zgodny z wymogami formalnymi określonymi w obowiązujących przepisach.

Informacje ogólne o przebiegu edukacji i kariery zawodowej Habilitantki

Pani doktor J. Stefanowicz-Hajduk jest absolwentką Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku, na kierunku farmacja oraz absolwentką Wyższej Szkoły Zdrowia w Gdańsku, na kierunku kosmetologia (studia podyplomowe). Stopień doktora nauk farmaceutycznych otrzymała w październiku 2008 roku na podstawie obronionej rozprawy pt.: „Zróżnicowanie genetyczne oraz ocena aktywności biologicznej metabolitów wtórnych *Paris quadrifolia* L. i *Polygonatum multiflorum* (L.) All". Od roku 2007 jest zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Ponadto pani doktor, w latach 2002-2007, pracowała w aptekach otwartych w Gdańsku i Sopocie na stanowisku farmaceuty. Od 2003 roku jest członkiem Izby Aptekarskiej w Gdańsku. Rozwój zawodowy Habilitantki można obserwować nie tylko na podstawie opublikowanych badań, ale również uwzględniając kursy i szkolenia, w których brała udział. Dotyczyły one metod molekularnych stosowanych w badaniach ekologicznych, technik hodowli komórek *in vitro* czy elektroforezy kapilarnej.

Ocena dorobku naukowego
stanowiącego podstawę o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Badania Habilitantki są kontynuacją działalności naukowej od lat prowadzonej w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dotyczącej poszukiwania struktur chemicznych pochodzenia roślinnego o wielokierunkowej aktywności farmakologicznej z uwzględnieniem metod ich identyfikacji. Zainteresowania naukowe Habilitantki uwzględniające aktywność przeciwnowotworową związków roślinnych zrodziły się na początku pierwszej dekady XXI wieku [cytując Habilitantkę: „obiecujące wyniki powyższych badań stanowiły podstawę i początek moich późniejszych zainteresowań naukowych dotyczących aktywności przeciwnowotworowej roślinnych surowców steroidowych i ich metabolitów"]. W opinii Recenzenta temat monocyklu stanowi konsekwentną ścieżkę badań naukowych realizowanych od początku kariery zawodowej Habilitantki i jest dowodem jej głębokiej znajomości podjętej problematyki. Tematyka naukowa uległa co prawda ewolucji, którą uzasadnić można ogólnoświatowym rozwojem w dziedzinie fitochemii i farmakologii, jak również poszerzaniem wiedzy i doświadczenia zawodowego pani doktor Justyny Stefanowicz-Hajduk. Habilitantka w swojej pracy podejmuje ciekawe i aktualne zagadnienia naukowe, które jednocześnie zwiększają Jej kompetencje w zakresie opanowania nowego warsztatu naukowego.

W uzasadnieniu do starań o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego doktor J. Stefanowicz-Hajduk przedstawiła cykl 6 publikacji, wydanych po doktoracie w latach 2014-2021. Publikacje posiadają łączny IF 15,913 (365 pkt MEiN) i zostały opublikowane w wiodących czasopismach znajdujących się w bazie JCR (Pharmacognosy Magazine, PloS One, Pharmaceutical Botany, Planta Medica). W 5 pracach Habilitantka jest autorką korespondencyjną, jak również w 5 pracach jest pierwszą autorką. Ze względu na

interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań, uzasadniony jest fakt, że publikacje są współautorskie, czego potwierdzeniem są dołączone do dokumentacji oświadczenia współautorów. Na podstawie informacji zamieszczonych w oświadczeniach można z pełnym przekonaniem stwierdzić, że pani dr Stefanowicz-Hajduk pełniła wiodącą rolę od początkowej fazy planowania doświadczeń i stawiania hipotez, aż do wykonania pracochłonnych etapów badań i edytowania manuskryptów.

Poprawność merytoryczna i oryginalny charakter wyników badań zostały już ocenione i zaakceptowane przez niezależnych recenzentów powołanych przez redakcje czasopism. Uwzględniając koncepcję całego cyklu, w opinii Recenzenta jest on spójny, przejrzysty i stanowi logiczny ciąg przyczynowo-skutkowy. Oprócz wartości czysto poznawczej, ma wartość aplikacyjną. Spełnia standardy współczesnych badań farmakognostycznych, fitochemicznych i fito-farmakologicznych ukierunkowanych na kompleksową analizę chemiczną i biologiczną z badaniami *in vitro* i *in vivo* włącznie. Koncepcja wpisuje się w ogólne założenia współczesnej fitoterapii, m.in. poprzez uznanie natury jako źródła związków o potencjale leczniczym i dostarczenie naukowych podstaw słuszności stosowania wielu surowców roślinnych w etnomedycynie.

W świetle przedstawionych prac naukowych zasadne jest podjęcie przez Habilitantkę badań nad oceną cytotoksycznego działania surowców zawierających związki steroidowe jak i izolatów z wzięciem pod uwagę mechanizmu działania. Jako gatunki modelowe Habilitantka wybrała czworolist pospolity (*Paris quadrifolia* L.), kozieradkę pospolitą (*Trigonella foenum-graecum* L.) oraz trzy gatunki z rodzaju *Kalanchoe*. Źródła etnofarmakologiczne donoszą o stosowaniu tych gatunków w leczeniu/zapobieganiu chorób układu pokarmowego, zapalenia stawów czy jako środek przeciwkaszlowy. Nieliczne źródła literaturowe donoszą o działaniu cytotoksycznym badanych gatunków wobec komórek nowotworowych. Z tego względu wybór tych gatunków jako obiektu badań uważam za bardzo trafny, ważny i uzasadniony. Surowce te od dawna były stosowane w polskiej tradycyjnej medycynie ludowej. Obecnie istnieje potrzeba naukowego potwierdzenia ich działania z zastosowaniem współczesnych narzędzi badawczych i technik analitycznych do szybkiego i wiarygodnego określenia składu chemicznego.

Cel pracy, czyli uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy wspomniane wyżej gatunki roślin wykazują działanie cytostatyczne wobec ludzkich linii komórek nowotworowych, takich jak rak szyjki macicy (HeLa), rak jajnika (SKOV-3), ludzka białaczka promielocytowa (HL-60), rak piersi (MCF-7), czerniak (A375), został sformułowany w sposób czytelny i logiczny. Cel nadrzędny został osiągnięty poprzez realizację celów podrzędnych, uwzględniających optymalizację warunków rozdziału chromatograficznego, identyfikację związków o wysokim potencjale cytostatycznym oraz poznanie mechanizmów warunkujących śmierć komórek nowotworowych.

Strona metodologiczna prac nie budzi zastrzeżeń, Habilitantka stosowała techniki chromatograficzne w sprzężeniu z detekcją mas (wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC-DAD-ESI-MS) jak również techniki z zakresu spektroskopii (NMR, IR). Ponadto wykazała się szeroką znajomością technik z zakresu biologii molekularnej i hodowli komórek *in vitro*. W tym miejscu chciałbym podkreślić umiejętność współpracy, jaką dr Stefanowicz-

Hajduk nawiązała z kilkoma ośrodkami naukowymi w Polsce i kontynuowała ją przez kilka lat (Uniwersytet Gdański, Gdański Uniwersytet Medyczny, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach).

Nurt badawczy zainteresowań Habilitantki obejmuje analizę fitochemiczną i analizę aktywności cytostatycznej ekstraktów i wyizolowanych związków. W pierwszym etapie badań Habilitantka dokonała analizy jakościowej i ilościowej steroidów w kłączach *Paris quadrifolia* L. oraz podjęła się izolacji sześciu glikozydów pochodnych pennogeniny [H-1]. Ponadto skupiła się na składzie fitochemicznym trzech gatunków *Kalanchoe* (analiza ilościowa i izolacja bufadienolidów i flawonoidów), [H-3, H-4]. Na szczególną uwagę zasługuje wyizolowanie i identyfikacja, po raz pierwszy, w kłączu *Paris quadrifolia* L. czterech glikozydów o budowie spirostanu, natomiast w liściach *Kalanchoe daigremontiana*, także po raz pierwszy, szesnastu flawonoidów, pochodnych m.in.: kwercetyny, kemferolu, mirycetyny czy patuletyny. Habilitantka również rozwijała swój warsztat naukowy, poszerzając wiedzę i doświadczenie o analizę związków steroidowych i flawonoidowych (glikozydy z wiązaniem typu C-glikozydowego) obecnych w nasionach kozieradki [H-6].

Kolejnym etapem badań, jednocześnie stanowiącym drugi nurt badawczy, była analiza aktywności cytostatycznej ekstraktów, frakcji, wyizolowanych związków czy substancji referencyjnych wobec komórek nowotworowych linii HL-60, HeLa, MCF-7, SKOV-3 i A375. Etapy dociekań biologicznych są konsekwencją omówionych wyżej badań fitochemicznych i stanowią logicznie zaplanowany ciąg analiz opartych na redukcji liczby próbek najmniej aktywnych i wytypowania ekstraktów, następnie frakcji i izolatów charakteryzujących się niską wartością współczynnika IC_{50}. Warto zwrócić uwagę na fakt, że na tym etapie badań Habilitantka kierowała się wytycznymi the National Cancer Institute (NCI) odnośnie zależności pomiędzy wartością IC_{50} związku i jego potencjalnym zastosowaniem do dalszych badań cytostatycznych (IC_{50} poniżej 20-30 μg/mL). Wysoką wartość naukową stanowi poznanie mechanizmów działania izolatów na poziomie molekularnym i biochemicznym.

Habilitantka na podstawie otrzymanych wyników badań po raz pierwszy wykazała silne działanie cytotoksyczne (wobec HeLa, MCF-7, HL-60) pochodnych pennogeniny wyizolowanych z kłącza *Paris quadrifolia* dla których wartości IC_{50} oscylowały w granicach od 1,0 do 3,2 μg/mL. Silne działanie cytotoksyczne posiadał również 1,3,5-ortooctan bersaldegeniny, wyizolowany z etanolowego ekstraktu z liści *Kalanchoe daigremontiana*, najsilniej działał wobec komórek HeLa przy wartości IC_{50} równej 0,5 μg/mL. Spośród metabolitów obecnych w nasionach kozieradki, jamogenina i diosgenina, charakteryzowały się znacznym potencjałem cytotoksycznym wobec komórek HeLa i SKOV-3, wartości IC_{50} były poniżej 20 μg/mL.

Następstwem przeprowadzonych badań było sprawdzenie, jakie mechanizmy molekularne i biochemiczne są aktywowane w komórkach nowotworowych po ich stymulacji dwiema pochodnymi pennogeniny wyizolowanych z kłącza *Paris quadrifolia* [H-2] oraz 1,3,5-ortooctanu bersaldegeniny wyizolowanej z etanolowego ekstraktu z liści *Kalanchoe daigremontiana* [H-5]. Po raz pierwszy wykazano, że pochodne pennogeniny indukowały

apoptozę komórek HeLa poprzez aktywację kaspazy-8 i białka Bid. Inny mechanizm śmierci komórki był indukowany po ich stymulacji przez 1,3,5-ortooctan bersaldegeniny, który polegał na zwiększeniu poziomu stresu oksydacyjnego i uszkodzeniu podwójnej nici DNA. Nie wykazano udziału kaspaz w tym mechanizmie.

W opinii Recenzenta wyselekcjonowane związki powinny być wzięte pod uwagę w dalszej karierze naukowej Habilitantki jako potencjalni kandydaci do badań w modelu *in vivo*. Dlatego też należy zauważyć i docenić potencjalny charakter aplikacyjny uzyskanych wyników badań. Szacuje się, że struktury chemiczne ponad 40% obecnie stosowanych leków przeciwnowotworowych pierwotnie zostały wyizolowane z surowca roślinnego. Tym bardziej, uzyskane wyniki budzą nadzieję na wykorzystanie tych związków w terapii chorób nowotworowych i zachęcają do kontynuowania tego typu działań badawczych.

W ocenie końcowej stwierdzam, że osiągnięcia naukowo-badawcze przedstawione jako monotematyczny cykl publikacji spełniają wymagania stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora habilitowanego. Badania Habilitantki poszerzają wiedzę w zakresie surowców i związków pochodzenia roślinnego, zostały dostrzeżone przez międzynarodowe środowisko naukowe.

Opinia o całościowym dorobku naukowym, działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzującej naukę

Rozwój naukowy pani dr J. Stefanowicz-Hajduk od prawie 20 lat związany jest z tematyką realizowaną w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod opieką mentorską pani prof. dr hab. Renaty Ochockiej. Tematyka badań prowadzonych przez Habilitantkę, przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, obejmuje genetyczną zmienność wybranych gatunków roślin leczniczych, ich profil chemotaksonomiczny jak również aktywność cytotoksyczną w modelu *in vitro*. Ponadto Habilitantka poszerzyła swoje zainteresowania naukowe o układy dyspersyjne i ich potencjalne zastosowanie jako nośniki leków. Uczestniczyła w badaniach mających na celu określenie wpływu mangiferyny na aktywność enzymów skórnych, takich jak kolagenaza i elastaza. Jednakże na podstawie lektury przedłożonych do oceny dokumentów jasno wynika, że nadrzędnym obszarem zainteresowań Habilitantki są zagadnienia związane z cytotoksycznością związków pochodzenia naturalnego, włączając w to mechanizmy ich działania. Efektem podjętych działań było opublikowanie 20 publikacji o zasięgu krajowym i międzynarodowym (wykluczając te zgłoszone do postępowania habilitacyjnego), o wartości współczynnika wpływu (IF) równym 24,408.

Kolejnym i jednym z najważniejszych obowiązków nauczyciela akademickiego jest kształcenie młodych pokoleń w danej dyscyplinie. Pani dr Stafanowicz-Hajduk prowadzi zajęcia dydaktyczne z biologii, parazytologii i botaniki dla studentów I roku na kierunku farmacja oraz z biologii dla studentów I roku na kierunku medycyna laboratoryjna. Ponadto swoje umiejętności dydaktyczne Habilitantka rozwija, prowadząc zajęcia fakultatywne, np. Metody biologii molekularnej w identyfikacji leczniczych surowców roślinnych. Jej doświadczenia dydaktyczne obejmują również zajęcia ze studentami English Division Master

of Pharmacy na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, jak również ze słuchaczami na kierunku technik farmaceutyczny w szkole Towarzystwa Edukacji Bankowej w Gdańsku i Gdyni. Tak zróżnicowane audytorium świadczy o dużych umiejętnościach dostosowania treści zajęć do różnych grup odbiorców. Poza działalnością dydaktyczną kierowaną do studentów szkół wyższych Jej słuchaczami byli także uczniowie szkół podstawowych. W tym miejscu warto wspomnieć, że Habilitantka w ramach popularyzacji nauki aktywnie uczestniczyła w wydarzeniach organizowanych przez Gdański Uniwersytet Medyczny, takich jak Medyczny Dzień Nauki.

Istotny jest również dorobek Habilitantki związany z opieką naukową nad studentami V roku na kierunku farmacja. Habilitantka była mentorką siedemnastu prac naukowych o charakterze eksperymentalnym.

Działalność organizacyjna powiązana z aktywnością dydaktyczną obejmuje kilkakrotne pełnienie funkcji opiekunki studentów I roku na kierunku farmacja (2015-2020) i jej zastępczyni (2014-2015, 2020-obecnie). Dowodzi to wysokich zdolności interpersonalnych pani dr Stefanowicz-Hajduk, Jej talentu organizacyjnego, jak również świadczy o nienagannym wywiązywaniu się z powierzonych obowiązków, dzięki czemu pełni tę funkcję już ponad 8 lat.

Następnym elementem aktywności organizacyjnej ściśle powiązanym z nauką jest koordynowanie i udział jako wykonawczyni w grantach badawczych finansowanych z funduszy krajowych (NCN, MNiE). Habilitantka od początku swojej kariery naukowej aktywnie stara się pozyskiwać fundusze na badania naukowe. W latach 2005-2007 była kierowniczką zadania badawczego (Akademia Medyczna w Gdańsku) finansowanego przez MNiSW, jak również w latach 2005-2008 była wykonawczynią w grancie promotorskim (Komitet Badań Naukowych). W tym czasie swoje zainteresowania i umiejętności badawcze rozwijała pod opieką pani prof. Renaty Ochockiej. Spośród kolejnych pięciu projektów, na podkreślenie zasługuje kierownictwo projektu NCN – Miniatura -4 (od 2020), kierownictwo dwóch zadań badawczych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (2008-2010 i 2011-2013), rola głównej wykonawczyni w projekcie NCN – (2011-2015), jak również realizacja zadania badawczego w ramach dotacji dla Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) – Gdański Uniwersytet Medyczny (2014-2015). Zgodnie z informacjami dostarczonymi przez Habilitantkę większość wyników badań uzyskanych w ramach realizacji powyższych projektów została już opublikowana.

Rozwój naukowy związany jest ze stałą pracą nad umiejętnościami metodycznymi, warsztatem naukowym i z poszerzaniem kompetencji merytorycznych. W tym zakresie pani dr Stefanowicz-Hajduk także dba o ciągłe aktualizowanie swojej wiedzy i dokształcanie się, świadczy o tym regularny udział w licznych (łącznie 9) szkoleniach i kursach od roku 2004.

Jedną z cech naukowca, która predysponuje go do uzyskania statusu samodzielnego pracownika nauki, jest jego rozpoznawalność w międzynarodowym środowisku naukowym. Niezaprzeczalnym dowodem na osiągnięcia Habilitantki w tym zakresie jest przygotowywanie przez Nią recenzji artykułów o światowym zasięgu jak również członkostwo w zespole recenzentów (*Reviewer Board*). Doktor Stefanowicz-Hajduk jest członkinią Zespołu Recenzentów (Reviewer Board) w czasopismach MDPI jak również przygotowała 24 recenzje dla innych niezależnych czasopism wymienionych na liście JCR.

Zbliżając się do końca oceny dorobku naukowego, szczególnie pragnę podkreślić wyróżnienia, będące wyrazem uznania Władz Rektorskich dla działalności Habilitantki, a mianowicie jest nimi czterokrotne otrzymanie zespołowych nagród naukowych Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w tym nagroda zespołowa I-go stopnia w 2015 roku, oraz 3 nagrody zespołowe II-go stopnia (2018, 2017, 2010). Uwzględniając działalność naukowczyni i osiągnięcia w tym zakresie o charakterze ogólnopolskim, należy dodać, że pani dr Stefanowicz-Hajduk została nagrodzona (I miejsce) za wystąpienie ustne i poster podczas XXVIII Ogólnopolskiego Sympozjum Bromatologicznego, Gdańsk 2020.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując ocenę osiągnięć naukowych w dziedzinie badań nad związkami roślinnymi o działaniu cytostatycznym, stwierdzam z pełną odpowiedzialnością, że pani dr Justyna Stefanowicz-Hajduk jest naukowczynią w pełni przygotowaną do prowadzenia samodzielnych prac naukowych. Posiada umiejętność nawiązywania współpracy z krajowymi ośrodkami naukowymi, potrafi zorganizować warsztat badawczy, podejmuje próby pozyskania funduszy na realizację zadań badawczych. Ponadto warto zwrócić uwagę na to, co najistotniejsze w pracy samodzielnego pracownika nauki, a więc konsekwentne dążenie do realizacji celu badawczego i poszukiwanie odpowiedzi na postawione pytanie. W przypadku Habilitantki, określenie celu badań naukowych miało miejsce prawie 20 lat temu i wiązało się z pytaniem, czy rośliny w świetle nowoczesnych badań fitofarmakologicznych, posiadają metabolity wtórne o działaniu cytostatycznym.

W opinii końcowej dorobek dr Stefanowicz-Hajduk oceniam wysoko, w swoim rozwoju naukowym osiągnęła bardzo dobry poziom samodzielności na wszystkich etapach swojej działalności. Habilitantka wykazała się autonomią poczynając od zakreślenia pola badawczego, przez postawienie pytania badawczego, sformułowanie problemu badawczego po rozwiązanie go, na formułowaniu wniosków kończąc.

W związku z powyższym, mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Doskonałości Naukowej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie pani dr Justyny Stefanowicz-Hajduk do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

Kierownik
Katedry Botaniki Farmaceutycznej
i Farmakognozji
dr hab. Daniel Załuski, prof. UMK