

Prof. dr hab. Wiesława Byłka
Katedra i Zakład Farmakognozji
Uniwersytetu Medycznego
im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 10 kwietnia 2019 r.

Recenzja osiągnięcia naukowego

„*Rhaponticum carthamoides* w kulturze *in vitro*, potencjalne źródło pochodnych kwasów kawoilochinowych i olejku eterycznego oraz właściwości biologiczne tego gatunku” oraz dorobku naukowego i dydaktyczno-organizacyjnego w postępowaniu habilitacyjnym dr nauk farmaceutycznych Ewy Dagmary Skały

Dr **Ewa Dagmara Skała** uzyskała tytuł magistra biologii w 1999 r. na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, a stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych w 2009 r., na podstawie rozprawy pt. „*Salvia przewalskii* Maxim. w kulturze *in vitro* - mikrorozmnażanie, wytwarzanie tanszynonów i olejku eterycznego” wykonanej w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej UM w Łodzi, pod promotorstwem prof. dr hab. Haliny Wysokińskiej. W 2016 r. ukończyła studia podyplomowe „Biologia sądowa”, organizowane przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Od ukończenia studiów do chwili obecnej jest zatrudniona w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej WF w Łodzi, kolejno na etacie starszego referenta inżynierijsko-technicznego, następnie starszego referenta technicznego, asystenta i adiunkta.

Ocena osiągnięcia naukowego

Ocena formalna

Ocena została przeprowadzona na podstawie złożonej przez dr **Ewę Skałę** wymaganej ustawą dokumentacji w skład której wchodzi: autoreferat, odbitki publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wraz z oświadczeniami współautorów publikacji, analiza bibliometryczna dorobku naukowego opracowana przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, wykaz opublikowanych prac naukowych, informacja o działalności dydaktycznej i popularyzatorskiej, a także dane o których stanowi Ustawa z dnia 14 marca

2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz.U. z 2003 r, nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe, będące podstawą do wszczęcia postępowania habilitacyjnego, stanowi cykl prac składający się z powiązanych tematycznie ośmiu publikacji oryginalnych opublikowanych w latach 2015-2019 w czasopismach cytowanych w bazie *Journal Citation Reports* (JCR), o łącznej wartości współczynnika **IF= 24,329 (MNIŚW=215 pkt)**. Dr Skała wszystkie prace wykonała we współautorstwie, przy czym ich pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, a Jej udział w pracach wynosi 65-80%. Wyniki prezentowała też na konferencjach naukowych.

Ocena merytoryczna

Zainteresowanie Habilitantki *Rhaponticum carthamoides* (szczodrak krokoszowaty), cenionym w tradycyjnej medycynie wschodniej, a aktualnie w lecznictwie europejskim uzasadnione jest właściwościami farmakologicznymi tego gatunku. Korzenie są znanym źródłem 20-hydroksyekdysonu, determinującego aktywność adaptogenną, z ukierunkowaniem na polepszenie wydolności fizycznej, zwiększenie masy mięśniowej. Inne wykryte dotąd właściwości to przeciwutleniająca, immunomodulująca, przeciwnowotworowa, przeciwbakteryjna, wzmacniająca układ sercowo-naczyniowy, obniżająca poziom glukozy we krwi. *R. carthamoides* jest gatunkiem rzadkim i zagrożonym wyginięciem, więc w pełni uzasadnione było podjęcie badań nad wdrożeniem metod biotechnologicznych pozyskania tego surowca. Wartość uzyskanego materiału roślinnego, oceniano poprzez badania obecności i zawartości niektórych grup związków czynnych (kwasy kawoilochinowe, 20-hydroksyekdyson, flawonoidy, olejek eteryczny), a także przez ocenę wielokierunkowej aktywności biologicznej (cytotoksycznej, przeciwdrobnoustrojowej, antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej). Materiałem odniesienia były korzenie roślin uprawianych w gruncie lub korzenie i części nadziemne roślin rosnących w szklarni na terenie Ogrodzie Roślin Leczniczych Zakładu Farmakognozji UM w Łodzi.

Szczególnie pozytywnie oceniam wieloaspektowość opublikowanych prac. Obejmują one badania biotechnologiczne, fitochemiczne oraz ocenę aktywności biologicznej, co wymagało od Habilitantki nie tylko znajomości metod stosowanych w kulturach *in vitro*, których prowadzenie jest możliwe przy dużej wiedzy, doświadczeniu, ale też opanowania różnych

technik stosowanych w pracach identyfikacyjnych, biochemicznych, genetycznych, toksykologicznych i innych.

W zakresie prac biotechnologicznych dr Skała stosując różne metody przebadła pędy zregenerowane przez organogenezę pośrednią oraz organogenezę bezpośrednią. Otrzymane opracowaną metodą rośliny *R. carthamoides* aklimatyzowała w szklarni. Udowodniła że materiał otrzymany przez organogenezę bezpośrednią wykazywał wysoki stopień podobieństwa (0,94) (oceniano metodą ISSR-PRC i RAPID - PCR) do roślin macierzystych oraz podobną do nich zawartość DNA, podczas gdy uzyskane organogenezę pośrednią znacznie się różniły [P. 2]. Pozytywne wyniki uzyskała w pracach nad transformacją genetyczną badanego gatunku przy użyciu dwóch szczepów bakterii glebowej *Agrobacterium rhizogenes*. Transformację genetyczną uzyskanych o wysokiej biomasy korzeni potwierdziła stosując metodę PCR oraz hybrydyzację Southern [P. 1, P.8]. Udowodniła wpływ warunków hodowli na zdolności regeneracyjne korzeni transformowanych do indukcji pędów. Podkreślenia wymaga uzyskanie z ukorzenionych transformowanych pędów po aklimatyzacji w szklarni, roślin o wyższej biomasy zwłaszcza korzeni, niż hodowane z nasion [P. 1].

Badaniami fitochemicznymi objęła pędy zregenerowane przez organogenezę pośrednią, organogenezę bezpośrednią, korzenie transformowane i rośliny z nich zregenerowane. Zajął się analizą aktywnych związków w uzyskanym materiale roślinnych: 20-hydroksyekdysonu, kwasów kawoilochinowych, flawonoidów. Niewątpliwym osiągnięciem było wykrycie po raz pierwszy w gatunku kwasów 1,5- oraz 3,4- a także 3,5- i 4,5 - dikawoilochinowych oraz kwasu 1,4,5-trikawoilochinowego. Identyfikacja nie byłaby możliwa bez znajomości nowoczesnych metod spektralnych UHPLC-DAD, UPLC-PDA-ESI-MS [P.1, P.2, P.8]. Analizie poddała olejek eteryczny uzyskany z korzeni transformowanych [P.5]. Przeprowadziła badania ilościowe, których wyniki wskazywały na obecność kwasu chlorogenowego i 20-hydroksyekdysonu, podobnie jak w przypadku roślin uprawianych z nasion. Ciekawym i użytecznym wynikiem prac było wykazanie różnic w zawartości kwasu chlorogenowego (wyższa w liściach otrzymanych przez organogenezę bezpośrednią) oraz 20-hydroksyekdysonu (wyższa w rośliny zregenerowane z tkanki kalusowej). W korzeniach transformowanych zidentyfikowała (UPLC-ESI-MS) kwasy mono-, di- i trikawoilochinowe i ich pochodne, jak również określiła ich zawartość w materiale hodowanym w różnych warunkach, która była jednak niższa w porównaniu do gruntowych. Wykazała, że rośliny hodowane na świetle syntetyzowały więcej

kwasów kawoilochinowych i że tylko te wytwarzały glikozydy flawonoidowe [P-1]. W różnych ekstraktach otrzymanych z roślin zregenerowanych z korzeni transformowanych [P-8] wykrył, że transformacja zwiększała zawartość metabolitów wtórnych, jak kwasy kawoilochinowe w porównaniu do roślin wyhodowanych z nasion, te ostatnie różniły się obecnością 20-hydroksyekdysonu. Wykazała, że skład olejków eterycznych otrzymanych z korzeni transformowanych i korzeni roślin rosnących w gruncie był zasadniczo różny [P-4].

W ramach badań biologicznych dokonała oceny działania cytotoksycznego wyciągów z korzeni transformowanych, części nadziemnych i korzeni roślin zregenerowanych z korzeni transformowanych wobec komórek glejaka U87MG uzyskanych z guzów pacjentów w różnym stadium choroby, wobec linii ludzkiej białaczki szpikowej K562 i limfoblastycznej CCRF-CEM, komórek nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549, a także wobec komórek ludzkiego czerniaka A2058. Te ostatnie były najbardziej wrażliwe na badane ekstrakty. Wartości IC50 wobec badanych linii wykazywały dodatnią korelację z zawartością kwasów kawoilochinowych. W pracach nie ograniczyła do wykrycia cytotoksyczności, ale zajęła się też problemem poznania mechanizmu działania, określając metodą cytometrii przepływowej sposób wywoływania apoptozy. Wyniki zawarła w cyklu prac [P-3, P-5, P-6, P-7, P-8].

Wykazała aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z części nadziemnych i korzeni roślin zregenerowanych z korzeni transformowanych oraz olejków eterycznych z korzeni transformowanych i z korzeni roślin rosnących w gruncie [P-8]. W przypadku tych olejków określiła ich działanie przeciwzapalne (poziom IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF w ludzkich astrocytach stymulowanych LPS, metody ELISA i RT-PCR) oraz wykryła, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktów jest silniejsza wobec wybranych bakterii niż grzybów.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiony dorobek dr Skąty jest spójny tematycznie, świadczy o zaangażowaniu Habilitantki a wyniki prac ujętych w habilitacji są oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego i opublikowane zostały w czasopismach posiadających wskaźnik IF. Habilitantka zrealizowała ambitnie szeroki i wielokierunkowy cel założonych badań, włączając w nie tylko prace biotechnologiczne w tym biotransformację genetyczną, ale też badania fitochemiczne oraz ocenę aktywności biologicznej (cytotoksycznej, antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej, przeciwdrobnoustrojowej).

3yl

Wyniki badań świadczą o dogłębnej wiedzy na temat stosowania różnych technik w hodowli *in vitro* jako alternatywnego źródła otrzymywania materiału roślinnego zawierającego aktywne związki i wykazującego działanie biologiczne. Udowodniła, że posiada wiedzę i dowodzą umiejętności w zaplanowaniu i realizowaniu problemów związanych z otrzymaniem wartościowego materiału roślinnego metodami *in vitro*. Uzyskane przez dr Skałą wyniki wnoszą duży wkład w rozwój metod biotechnologicznych, a jednocześnie praca zawiera treści farmaceutyczne, począwszy od wyboru gatunku o właściwościach leczniczych po ocenę aktywności biologicznej uzyskanego tą drogą materiału. Zaznaczyć należy, że przedstawione osiągnięcie naukowe, nie powstałoby bez umiejętności nawiązywania kontaktów i współpracy z wieloma ośrodkami naukowymi.

**Ocena działalności naukowo-badawczej i organizacyjnej
innej niż włączona do rozprawy habilitacyjnej**

Działalność przed uzyskaniem stopnia doktora

Dr Skała po zakończeniu studiów podjęła pracę w macierzystej katedrze i od początku zawodowej działalności zajęła się zagadnieniem stosowania metod biotechnologicznych w hodowli roślin. Pierwsze publikacje dotyczyły 4 gatunków szalwii [A-1 do A-4], z których trzy ukazały się w czasopismach o łącznym IF=1,744. Praca doktorska pt. „*Salvia przewalskii* Maxim. w kulturze *in vitro* - mikrorozmnażanie, wytwarzanie tanszynonów i olejku eterycznego” obejmowała oprócz opracowania metod mikrorozmnażania, ocenę zawartości tanszynonów, olejku eterycznego w otrzymanych kulturach oraz badanie jego działania cytotoksycznego i przeciwdrobnoustrojowego. Wyniki prac prezentowała na 11 konferencjach krajowych i międzynarodowych

Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia dr kontynuowała pracę nad gatunkiem *S. przewalskii*, dotyczącą wzrostu kultur kalusowych i zawieszinowych oraz wytwarzania przez nie tanszynonów [A-5; IF=0,73] również badania w zakresie poznania biosyntezy tanszynonów przy zastosowaniu nowych dla autorki technik analizy molekularnej roślin [A-11, IF=0,917; A-14, IF=0,774]. Analizę molekularną wykorzystała przy badaniach transformacji genetycznych *Rehmania glutinosa*, *Dracocephalum moldavica* i *Salvia viridis*, których wyniki zamieściła w 3 publikacjach w czasopismach o wysokim IF [A-6, IF=2,390; A-10, IF=3,181; A-16, IF=3,849].

Był

W tym okresie zainteresowała się dwoma gatunkami o właściwościach adaptogennych *R. carthamoides* oraz *Codonopsis pilosula*. Wyniki badań nad *R. carthamoides* stanowią przedmiot habilitacji [P-1 do P-8] oraz pracy A-9 [IF=4,593], dotyczącej wpływu ekstraktu z korzeni transformowanych na zmniejszenie uszkodzeń oksydacyjnych DNA.

Inny interesujący kierunkiem badań prowadzonych przez dr Skałą dotyczył otrzymania w kulturach *in vitro* korzeni transformowanych, kultur pędów *Leonurus sibiricus* i badania biologiczne otrzymanego materiału (efekt ochronny i naprawczy DNA, antyoksydacyjny, cytotoksyczny, apoptoza) a także analizę olejku eterycznego z korzeni transformowanych i nietransformowanych. Z tego zakresu ukazało się dziewięć publikacji o wysokim IF [A-7, IF=4,593; A-8, IF=3,650; A-15, IF=1,815; A-19, IF=3,849; A-12, IF=1,935; A-13, IF=4,936; A-17, IF=2,772; A-20, IF=3,098; A-21, IF=1,461].

Przedmiotem wielu komunikatów zjazdowych były wyniki badań nad efektem ochronnym i naprawczym DNA, wpływem na poziom ekspresji genów antyoksydacyjnych, cytokin zapalnych, indukowaniem apoptozy w komórkach glejaka przez ekstrakty z kultur korzeni transformowanych *Salvia miltiorriza* oraz ocena aktywności cytotoksycznej i określenie mechanizmu apoptozy przez diterpeny otrzymane z *Plectranthus*. Należy się spodziewać, że zebrany materiał będzie stanowił przedmiot kolejnych publikacji.

Podsumowując, po uzyskaniu stopnia doktora aktywność naukowa i publikacyjna dr Ewy Skały znacznie wzrosła. W latach 2009-2019 opublikowała, poza pracami ujętymi w habilitacji, 20 publikacji oryginalnych przeważnie w czasopismach o wysokim IF (łącznie IF=46,688; MNiSW=462), jedną monografię naukową zagraniczną była współautorem jednego rozdziału w książce oraz prezentowała wyniki prac na 44 konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Inne osiągnięcia

Udział w projektach badawczych. Dr Skała była wykonawcą dwóch projektów finansowanych przez KBN (2003-2006) oraz przez NCN (2011-2014) a także badań własnych i statutowych finansowanych ze środków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Staże. Dr Skała odbyła kursy na temat wysokosprawnej chromatografii cieczowej w Lublinie, a także z metodyki nauczania w uczelniach biomedycznych oraz "Ready to Teach" w UM w Łodzi. Tutaj polemizowałabym z Habilitantką czy kursy można zaliczyć do staży, jednak myślę,

3yf

że brak staży rekompensuje szeroka współpraca z ośrodkami zagranicznymi i krajowymi, przy podjęciu której musiała zapoznać się z tematyką i z metodyką badań stosowanych w pracach z zakresu biochemii, genetyki, immunologii, toksykologii, mikrobiologii, fitochemii.

Współpraca. Podejmowała współpracę z naukowcami macierzystej katedry, innymi ośrodkami UM w Łodzi (Zakład Immunopatologii, Zakład Farmakognozji, Zakład Biochemii Medycznej, Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin), Uniwersytetu Łódzkiego (Katedra Biofizyki Molekularnej Katedry Biochemii Ogólnej), Politechniki Łódzkiej (Instytut Podstaw Chemii Żywności) a także z innych ośrodków naukowych, jak Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii, Warszawskiego UM, Laboratorium Genetyki Medycznej, Szpitalami (Klinika Neurochirurgii, Chirurgii Kręgosłupa i Nerwów Obwodowych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Łodzi). Podejmowała także liczną współpracę naukową z ośrodkami zagranicznymi w Portugalii, Francji, USA (Philadelphia, South Carolina (Patricia Rijo, Laurent Picot, Tomasz Skorski, Dariusz Pytel).

Recenzje. Wykonała recenzje prac publikowanych w czasopismach z IF: Acta Physiologiae Plantarum (2), Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (1), Applied Biochemistry and Biotechnology (1), Journal of Agricultural Science and Technology (1), Molecular and Cellular Biochemistry (1), Scientific Reports (1), OncoTargets and Therapy (1), BMC Complementary and Alternative Medicine (1), Industrial Crops and Products (1).

Działalność dydaktyczna. Działalność dydaktyczna dr Skały obejmowała przedmioty obligatoryjne i fakultatywne: "Biologia i genetyka" (dla studentów farmacji – koordynator przedmiotu, wykłady ćwiczenia oraz kosmetologii - wykłady i seminaria, na oddziale medycyny laboratoryjnej - ćwiczenia); "Diagnostyka parazytologiczna" (dla studentów medycyny laboratoryjnej - wykłady, seminaria, ćwiczenia); "Botanika farmaceutyczna" (dla studentów farmacji - ćwiczenia). Uczestniczyła w przeprowadzaniu egzaminów z przedmiotu "Biologia i genetyka", a także zajęć terenowych, zajęć fakultatywnych dla studentów farmacji i medycyny laboratoryjnej, ćwiczeń z „Biotechnologii roślin leczniczych” dla studentów Politechniki Łódzkiej. Brała udział w prowadzeniu kursu na Oddziale Kształcenia Podyplomowego UM w Łodzi oraz kursu zielarsko-medycznego zorganizowanego przez Katedrę Farmakognozji UM w Łodzi. Współpracowała ze studentami w ramach SKN i Młoda Farmacja. Była opiekunem 12 prac i promotorem 1 pracy magisterskiej oraz 1 pracy licencjackiej na WF UM.

Był

Popularyzacja nauki. W ramach działalności popularyzatorskiej wygłosiła wykład "Roślinne kultury *in vitro*" na uroczystościach z okazji jubileuszu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, a także prowadziła zajęcia w terenie Łódzkiego Ogrodu Botanicznego. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Genetycznego oraz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Nagrody. Uzyskała nagrody naukowe Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi: I stopnia (trzykrotnie), III stopnia (dwukrotnie) oraz II stopnia (jeden raz) oraz była nagradzana nagrodą Rektora UM w Łodzi za osiągnięcia w pracy zawodowej dla pracowników niebędących nauczycielami akademickimi.

Podsumowując osiągnięcia naukowo-badawcze i dydaktyczno-organizacyjne stwierdzam, że dr Ewa Dagmara Skała:

- **posiada znaczące osiągnięcia naukowe** wnoszące istotny wkład w rozwój metod biotechnologicznych w roślinnych hodowlach *in vitro*, a także metod oceny uzyskanego tą drogą materiału roślinnego – przez analizę składu chemicznego oraz ocenę aktywności biologicznej w wielu kierunkach,
- **posiada wartościowy dorobek** naukowo-badawczy. Całkowity dorobek obejmuje **28** prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (3 prace przed i 25 po doktoracie),
- sumaryczny IF wszystkich publikacji według listy *Journal Citation Reports* (zgodnie z rokiem ich opublikowania) wynosi **IF=72,761, MNiSW=707**,
- pierwszym autorem była w **13** pracach (**IF=31,396 MNiSW=292**), przed uzyskaniem stopnia dr w 3 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora w 10),
- **dr Skała jest** współautorem **1** monografii zagranicznej (MNiSW=4 pkt), rozdziału w książce zagranicznej oraz **1** publikacji naukowej w suplemencie czasopisma(2 pkt)
- **wyniki prezentowała w formie 44** komunikatów zjazdowych na konferencjach krajowych (**17**) i międzynarodowych (**27**),
- brała udział w realizacji 2 grantów badawczych finansowanych przez MNiSW/KBN oraz NCN, 2 projektów badawczych finansowanych z funduszu Prace własne oraz 1 projektu finansowanego z funduszy statutowych macierzystej katedry,
- przedstawiła wartościowe osiągnięcie naukowe pt. „*Rhaponticum carthamoides* w kulturze *in vitro*, potencjalne źródło pochodnych kwasów kawoilochinowych i

olejku eterycznego oraz właściwości biologiczne tego gatunku” składające się z cyklu ośmiu publikacji oryginalnych powiązanych tematycznie, o łącznej wartości współczynnika **IF=24,329, MNiSW=215,**

- całkowita liczba cytowań wg bazy *ISI Web of Science Core Collection* wynosi **121**; wg bazy *Scopus* **165**; indeks Hirscha (h-index) wg *ISI Web of Science Core Collection* wynosi **7**; wg bazy *Scopus* wynosi **8,**
- **posiada doświadczenie dydaktyczne** (wykłady i ćwiczenia studentów), była promotorem prac magisterskich i licencjackich,
- **uzyskała nagrody** za działalność naukową. Legitymuje się wielokierunkową **współpracą** z licznymi ośrodkami badawczymi w Polsce, udokumentowaną publikacjami.
- wykonała **10 recenzji** prac do czasopism naukowych ze współczynnikiem z IF.

Na podstawie analizy osiągnięcia naukowego oraz dorobku naukowo-dydaktycznego i organizacyjnego stwierdzam, że dr n. farm. **Ewa Dagmara Skała**, spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego, określone obowiązującą ustawą o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki. Wnoszę więc o poparcie przez Komisję Habilitacyjną wniosku Habilitantki o nadanie przez Radę Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk farmaceutycznych.

Wioletta Ryba