



Dr hab. Barbara Thiem

Poznań, 05.08.2019r.

RECENZJA

Osiągnięcia naukowego i całego dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego
Dr. Ewy Agnieszki Kochan w związku z postępowaniem o nadanie stopnia
doktora habilitowanego

Sylwetka zawodowa Kandydatki

Pani dr Ewa Kochan ukończyła studia w 1994 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi, uzyskując tytuł magistra biologii. Pracę magisterską pt. „Wpływ kwasu salicylowego i zakażeń *Botrytis cinerea* na zawartość fenoli i aktywność peroksydazy w liściach truskawki namnażanych techniką *in vitro*” zrealizowała w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem pracy był prof. dr. hab. Henryk Urbanek.

Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na podstawie rozprawy „Hodowla *in vitro* i badania fitochemiczne *Panax quinquefolium*” wykonanej w Zakładzie Biosyntezy Środków Leczniczych (obecnie Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej). Promotorem rozprawy był prof. dr hab. Aleksander Chmiel.

Pani dr Ewa Kochan ukończyła także Studia Podyplomowe Komercjalizacji Nauki i Technologii Uniwersytetu Łódzkiego (14.04.2014 r.) uzyskując również certyfikat Uniwersytetu Teksasńskiego w Austin (9.11. 2013 r.).

Od stycznia 1996 roku do chwili obecnej Habilitantka jest zatrudniona w Zakładzie Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, początkowo na stanowisku asystenta, a od roku 2012 do chwili obecnej, na stanowisku adiunkta.

Ocena osiągnięcia naukowego pt.:

„Optymalizacja warunków hodowli i biosyntezy ginsenozydów w kulturach korzeni transformowanych żeńszenia północnoamerykańskiego prowadzonych w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym ”.

Ocena formalna

Ocena została przeprowadzona na podstawie złożonej przez dr Ewę Kochan, wymaganej ustawą dokumentacji, na którą składają się: autoreferat, 7 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 nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, informacja o działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzatorskiej oraz dane, o których stanowi Ustawa o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami Dz.U. z 2017 r. poz. 1789).

Podstawę ubiegania się dr. Ewy Kochan o nadanie stopnia doktora habilitowanego stanowi cykl siedmiu prac oryginalnych, opublikowanych w latach 2012-2019, pod wspólnym tytułem: „Optymalizacja warunków hodowli i biosyntezy ginsenozydów w kulturach korzeni transformowanych zeńszenia północnoamerykańskiego prowadzonych w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym”. Wskazane jako osiągnięcie naukowe prace są wieloautorskie (od trzech do siedmiu autorów), w których dr Ewa Kochan jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym. Własna deklaracja udziału w zespołowych pracach wynosi 70-85%, co świadczy o dominującym autorstwie Habilitantki. Wkład dr Ewy Kochan polegał na opracowaniu koncepcji prac, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonaniu eksperymentów biotechnologicznych (zapoczątkowanie kultur korzeni transformowanych, prowadzenie hodowli kultur w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym, na optymalizowanych podłożach w małej i powiększonej skali, wyznaczenie krzywej wzrostu i biosyntezy ginsenozydów), części badań fitochemicznych (przygotowanie ekstraktów, izolacja ginsenozydów z otrzymanej biomasy, udział w oznaczaniu saponin i analizie ilościowej metodą HPLC) oraz przeprowadzeniu badań metodami molekularnymi (izolacja genomowego DNA, metody PCR, charakterystyka *in silico* uzyskanych promotorów), zebraniu wyników i ich interpretacji oraz redakcji manuskryptów. Przedstawione prace oryginalne opublikowane są w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, z listy filadelfijskiej. Łączna wartość współczynnika oddziaływania Impact Factor prac wynosi IF =17,96; punktacja MNiSW = 205 .

Ocena merytoryczna osiągnięcia

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi następujące publikacje:

H1. **Kochan Ewa**, Królicka Aleksandra, Chmiel Aleksander. Growth and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy roots cultivated in flasks and nutrient sprinkle bioreactor. Acta Physiol Plant 2012, 34:1513-1518.

H2. **Kochan Ewa**, Szymańska Grażyna, Szymczyk Piotr. Effect of sugar concentration on ginsenoside biosynthesis in hairy root cultures of *Panax quinquefolium* cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactor Acta Physiol Plant 2014, 36, 3: 613-619

H3. **Kochan Ewa**, Szymczyk Piotr, Kuźma Łukasz, Szymańska Grażyna. Nitrogen and phosphorus as the factors affecting ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax quinquefolium* cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactor. Acta Physiol Plant 2016, 38, 6:49

H4. **Kochan Ewa**, Szymczyk Piotr, Kuźma Łukasz, Lipert Anna, Szymańska Grażyna. Yeast extract stimulates ginsenoside production in hairy root cultures of American

ginseng cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactors. *Molecules* 2017, 22,6: E880

H5. **Kochan Ewa**, Szymczyk Piotr, Kuźma Łukasz, Szymańska Grażyna, Wajs-Bonikowska Anna, Bonikowski Radosław, Sienkiewicz Monika. The increase of triterpene saponin production by *trans* - anethole in hairy root cultures of *Panax quinquefolium*. *Molecules* 2018, 23:2674

H6. **Kochan Ewa**, Balcerczak Ewa, Lipert Anna, Szymańska Grażyna, Szymczyk Piotr. Methyl jasmonate as a control factor of the synthase squalene gene promoter and ginsenoside production in American ginseng hairy root cultured in shake flasks and a nutrient sprinkle bioreactor. *Ind Crops Prod* 2018, 115:182 – 193

H7. **Kochan Ewa**, Szymczyk Piotr, Sienkiewicz Monika, Zielińska-Bliźniewska Hanna, Szymańska Grażyna. Abscisic acid regulates the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene promoter and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy root cultures. *Int J Mol Sci* 2019, 20:1310

Zgłoszone do oceny osiągnięcie naukowe w postaci siedmiu publikacji stanowi bardzo spójny tematycznie cykl prac, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych. Badania zostały wykonane we współpracy z pracownikami macierzystej jednostki, Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz kilkoma krajowymi ośrodkami uniwersyteckimi.

Nadrzędnym celem badań składających się na rozprawę habilitacyjną dr Ewy Kochan była weryfikacja założenia o możliwości zastosowań wybranych biotechnologicznych metod do pozyskiwania wysokiej jakości biomasy żeńszenia północnoamerykańskiego o dużej zdolności do wytwarzania metabolitów biologicznie czynnych (ginsenozydów). Do jego realizacji Habilitantka zaplanowała kilka kompleksowych zadań badawczych. Eksperymenty rozpoczęła od stworzenia narzędzia badawczego - otrzymała korzenie transformowane *Panax quinquefolium* przy użyciu *Agrobacterium rhizogenes*. Podjęty temat badań jest bardzo interesujący i oprócz wysokiej wartości naukowej, posiada walory aplikacyjne.

Panax quinquefolium (żeńszien pięciolistny, żeńszien amerykański) jest gatunkiem o wielokierunkowym działaniu leczniczym. Gatunki z rodzaju *Panax* znane są w medycynie tradycyjnej krajów Dalekiego Wschodu oraz Ameryki Północnej. Dane z piśmiennictwa świadczące o licznych właściwościach terapeutycznych ekstraktów tego taksonu zainteresowały dr Ewę, Kochan, która wybrała *P.quinquefolium* jako obiekt badań biotechnologicznych i fitochemicznych. Amerykański gatunek coraz rzadziej występuje na naturalnych stanowiskach. Szeroki zakres działania żeńszenia, spowodował wzrost zapotrzebowania na surowiec. Z uwagi na fakt, że pozyskiwanie roślin z upraw polowych stwarza wiele problemów, Habilitantka rozpoczęła badania nad poszukiwaniem alternatywnego źródła substancji czynnych żeńszenia pięciolistnego, już podczas realizacji pracy doktorskiej. Obecnie, otrzymane korzenie transformowane żeńszenia pięciolistnego są przedmiotem badań biotechnologicznych, molekularnych i fitochemicznych w pracach

habilitacyjnych dr Ewy Kochan, która widzi w tym systemie *in vitro* interesujący potencjał farmakologiczny.

W pierwszej pracy habilitacyjnej [H1] opracowano po raz pierwszy metodę otrzymywania korzeni transformowanych *Panax quinquefolium*. Korzenie włośnikowate, uzyskane w wyniku agroinfekcji *A.rhizogenes* szczepem ATCC 15834, wykazywały intensywny wzrost na pożywce Gamborga B5. Ten system wzrostowy, o potwierdzonej transformacji, otrzymany po raz pierwszy dla badanego gatunku, stał się narzędziem badawczym w kilku kolejnych projektach badawczych opublikowanych i zgłoszonych jako osiągnięcie naukowe. Eksperymenty prowadzono dla kultur w kolbach Erlenmeyera o pojemności 300 ml. Kolejnym wyzwaniem badawczym było powiększanie skali hodowli korzeni z kultury prowadzonej w kolbach do hodowli w 10 l bioreaktorze rozpyłowym. W uzyskanych systemach *in vitro* korzeni *P.quinquefolium* zidentyfikowano i oznaczono ilościowo triterpenowe saponiny metodą HPLC: pochodne protopanaksadiolu i protopanaksatriolu. Określono dynamikę produkcji saponin, która korelowała z krzywą wzrostu korzeni. Najwyższą produkcję sumy ginsenozydów odnotowano w 30-tym dniu hodowli. W następnych projektach [H2, H3], w doświadczeniach nad optymalizacją warunków wzrostu i otrzymaniem wysokiej biomasy korzeni włośnikowatych, jak również zoptymalizowania warunków biosyntezy ginsenozydów, testowano skład pożywki: regulowano stężenie sacharozy, ilość azotu i jego źródła oraz ilość fosforu. Część wcześniej uzyskanych wyników optymalizacji podłoża zastosowano do hodowli w bioreaktorze [H1,H2,H3]. Po 30-dniowej hodowli odnotowano 5-krotny przyrost suchej masy w stosunku do inokulum, co było niższym wynikiem niż w kolbach. Mimo mniejszej biomasy, produkcja sumy ginsenozydów w bioreaktorze była dwukrotnie wyższa. Podobnie, biosynteza poszczególnych saponin osiągała wyższy poziom w bioreaktorze.

Habilitantka podjęła także interesujące badania z zakresu genetyki i biologii molekularnej. W celu poznania czynników wpływających na regulację ekspresji genów kodujących kluczowe enzymy szlaku biosyntezy ginsenozydów u żeńszeni: reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMGR) i syntazy skwalenu (SSq), wyizolowała i scharakteryzowała promotory dwóch genów metodą analizy *in silico* i RT-PCR [H6, H7]. Sukcesem tych badań było także zgłoszenie sekwencji nukleotydowej promotorów genów HMGR i SSq do GenBanku.

W kolejnych projektach [H4-H7] przedstawiono wyniki badań nad próbami zwiększania akumulacji ginsenozydów w kulturze korzeni transformowanych *P.quinquefolium* z zastosowaniem czterech elicytorów, w tym po raz pierwszy z użyciem do elicytacji kultur *trans*-anetolu, wtórnego metabolitu roślin [H5]. Przed zastosowaniem elicytacji korzeni transformowanych Habilitantka, korzystając z bazy danych PlantCARE, sprawdziła czy w obrębie badanych promotorów są obecne sekwencje regulatorowe wrażliwe na działanie wybranych elicytorów. Wybór jasmonianu metylu i kwasu abscysynowego podyktowany był pozytywnymi wynikami analiz *in silico* promotorów genów kodujących powstawanie reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A i syntazy skwalenu oraz wynikami analizy RT-PCR, które potwierdzały wpływ obu związków na badane geny [H6, H7]. Te związki, jak i ekstrakt drożdżowy to powszechnie stosowane w kulturach *in vitro* elicytory, natomiast zaproponowanie *trans*-anetolu do elicytacji korzeni transformowanych

P. quinquefolium było podejściem innowacyjnym i bardzo trafnym. Habilitantka doświadczalnie dobierała stężenia i czas ekspozycji elicytorów w szerokiej gamie prób. Proces elicytacji prowadzono dla korzeni włóśnikowatych rosnących w kolbach i w przypadku jasmonianu metylu i ekstraktu drożdżowego, także w bioreaktorze rozpyłowym. Wymiernym efektem eksperymentów było trzykrotne zwiększenie całkowitej zawartości ginsenozydów po zastosowaniu jasmonianu metylu w stężeniu 250 μ M [H6], dwukrotny wzrost akumulacji, po 1-dniowym traktowaniu kultur 1 μ M *trans*-anetolem [H5]. Zastosowanie biotycznego elicytora w postaci ekstraktu drożdżowego (50 mg \cdot L⁻¹) – zwiększyło sumę saponin 1,57 razy w hodowli w kolbach w porównaniu z kontrolą, a w bioreaktorze osiągając całkowitą zawartość ginsenozydów 32,25 mg \cdot g⁻¹ suchej masy [H4]. Kwas abscysynowy (ABA, 1mg \cdot L⁻¹) wpływał wybiórczo na ginsenozydy, zwiększając zawartość pochodnych protopanaxatriolu po 28 dniowej elicytacji [H7].

Wszystkie zastosowane elicytory, wybrane przez Habilitantkę na podstawie przeglądu piśmiennictwa i własnych analiz, korzystnie wpływały na akumulację saponin w badanych korzeniach, w zależności od stężenia, warunków podania i czasu ich oddziaływania na kulturę.

W cyklu prac habilitacyjnych można wyróżnić trzy obszary badawcze: biotechnologiczny, fitochemiczny oraz biologii molekularnej, które dr Ewa Kochan rozwijała równolegle na bazie współpracy wieloosrodkowej. Habilitantka otrzymała dwa systemy wzrostowe *in vitro* badanego gatunku, korzenie transformowane rosnące w 300 ml kolbach Erlenmeyera w skali laboratoryjnej oraz w 10 l bioreaktorze rozpyłowym. Należy podkreślić, że otrzymanie i utrzymywanie kultur korzeni włóśnikowatych jest trudnym i pracochłonnym procesem, który dr Ewa Kochan z sukcesem prowadziła przez długi okres. Te kultury stały się narzędziem badawczym Kandydatki w kolejnych eksperymentach, które przyniosły bardzo interesujące wyniki naukowe o znaczeniu aplikacyjnym. Zastosowała wybrane strategie biotechnologiczne dla uzyskania zwiększonej biomasy i wyższej produkcji ginsenozydów, co zweryfikowała metodami biologii molekularnej. Badania były wsparte grantami uczelnianymi oraz finansami przeznaczonymi na badania statutowe.

O dużej dojrzałości i doświadczeniu dr Ewy Kochan w prowadzeniu badań naukowych świadczy także syntetyczne i trafne wskazanie najważniejszych elementów Osiągnięcia Naukowego:

- Uzyskanie kultur korzeni transformowanych zeńszenia północnoamerykańskiego *P. quinquefolium*, które produkują ginsenozydy na poziomie trzyletnich korzeni roślin uprawianych w gruncie, a w warunkach kultury *in vitro* czas potrzebny do takiej akumulacji saponin wynosi tylko 4 tygodnie.
- Zoptymalizowanie składu podłoża do otrzymania najwyższej biomasy oraz wydajnej biosyntezy sumy ginsenozydów w badanych systemach wzrostowych
- Wyizolowanie i scharakteryzowanie po raz pierwszy promotorów genów kodujących reduktazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMGR) oraz syntazę skwalenu (SSq), kluczowych enzymów szlaku biosyntezy ginsenozydów

- Powiększenie skali procesu hodowli korzeni transformowanych *P. quinquefolium* akumulujących wysoki poziom saponin, z jednoczesnym uzyskaniem wyższej produkcji ginsenozydów w bioreaktorze rozpyłowym niż w kulturze w kolbach wstrząsanych
- Pionierskie, a zarazem skuteczne zastosowanie *trans*-anetolu, wtórnego metabolitu roślin, jako potencjalnego elicytora, który dwukrotnie zwiększył produkcję ginsenozydów, już przy 24-godzinnym traktowaniu kultur.

Dużym osiągnięciem Habilitantki jest otrzymanie kultury korzeni włóśnikowatych i opracowanie warunków wydajnego systemu wzrostowego korzeni transformowanych *P. quinquefolium* z wysoką zdolnością do produkcji ginsenozydów, w powiększonej skali hodowli, w bioreaktorze rozpyłowym. Na wysoką jakość i nowatorskie opracowanie rezultatów prac dr Ewy Kochan dotyczących żeńszenia północnoamerykańskiego zwróciły uwagę dwie firmy europejskie zajmujące się przemysłowym pozyskiwaniem masy roślinnej i wartościowych metabolitów z wykorzystaniem kultur *in vitro*. Ta perspektywa komercyjnego zastosowania kultur korzeni włóśnikowatych i pozyskiwania ginsenozydów skłoniła Habilitantkę do dalszych badań określających właściwości biologiczne otrzymanych kultur. W najnowszej publikacji (*Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2019,138:353*) oceniła potencjał antyoksydacyjny i cytotoksyczny ekstraktów z biomasy różnych systemów wzrostowych *P. quinquefolium*. Moim zdaniem, ukończenie Studiów Podyplomowych Komercjalizacji Nauki i Technologii UŁ pozwoliły Pani dr Ewie Kochan racjonalnie zaplanować i realizować kompleksowe badania o znaczeniu aplikacyjnym, co jest widoczne we wszystkich projektach związanych z żeńszem. Ponadto, dużym sukcesem był trafny wybór *trans*-anetolu i udowodnienie jego właściwości jako elicytora. Natomiast znaczącym wynikiem prac molekularno-genetycznych jest zgłoszenie i zdeponowanie sekwencji nukleotydowej promotorów genów kodujących wybrane enzymy szlaku biosyntezy ginsenozydów (HMGR i SSq) do bazy NCBI GenBanku.

Jedną z wartościowych cech prac habilitacyjnych Pani dr Ewy Kochan jest różnorodność stosowanych metod, które łączą badania w spójną całość. Prace te odślaniają liczne umiejętności warsztatowe Habilitantki, wpisujące się w nowoczesny nurt badań biotechnologicznych i molekularno-genetycznych. Do swoich eksperymentów, oprócz wcześniej stosowanych zaawansowanych technik kultur *in vitro*, włączyła metody izolacji DNA i RNA z materiału roślinnego, technikę łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), metodę klonowania genów przy pomocy wektorów ekspresyjnych w komórkach *Escherichia coli*. Nabyła umiejętności korzystania z platform bioinformatycznych i posługiwania programami i aplikacjami komputerowymi, wykorzystywanymi w badaniach molekularnych. W zakresie badań fitochemicznych – oprócz odpowiedniego przygotowywania próbek do analiz chemicznych, poszerzyła swój warsztat metodyczny o identyfikację i oznaczanie zawartości metabolitów za pomocą nowoczesnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Podsumowując ocenę powyższych prac stwierdzam, że uzyskane wyniki przedstawione w osiągnięciu naukowym pt. „Optymalizacja warunków hodowli i biosyntezy ginsenozydów w kulturach korzeni transformowanych żeńszenia północnoamerykańskiego prowadzonych w

kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym” cechują się oryginalnością i nowatorskim opracowaniem. Opublikowane wyniki badań dr. Ewy Kochan istotnie poszerzają aktualną wiedzę na temat możliwości pozyskiwania metodami biotechnologicznymi nowego surowca bogatego w metabolity wtórne o znanej, szerokiej aktywności biologicznej. Zgłoszone do oceny osiągnięcie naukowe w postaci cyklu siedmiu prac stanowi bardzo wartościowy i oryginalny wkład Autorki w rozwój dyscypliny naukowej w rozumieniu Art. 16 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.). Przedstawione osiągnięcie naukowe dr Ewy Kochan upoważnia ją do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

Ocena aktywności naukowej ogólnej i pozahabilitacyjnej.

Dowodem dużej aktywności naukowej Habilitantki jest całkowity dorobek naukowy, który obejmuje 29 oryginalnych pełnotekstowych prac współautorskich, 1 przeglądową oraz 1 monografię, 29 komunikatów naukowych prezentowanych na ogólnopolskich i międzynarodowych konferencjach. W tym dorobku, 19 prac opublikowano w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). W 18 pracach Habilitantka jest pierwszym autorem. Dr Ewa Kochan osiągnęła łączną wysoką liczbę punktów MNiSW = 479 oraz wysoki współczynnik oddziaływania $IF=32,825$; Indeks Hirscha $h=6$ (wg Web of Science Core Collection). Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science wynosi 84, natomiast wg bazy Scopus: 96.

Bardzo wysoką ocenę prac habilitacyjnych dr Ewy Kochan przedstawiłam w pierwszej części recenzji. Podobnie wysoko oceniam pozostały dorobek naukowo-badawczy Habilitantki. Oprócz przedstawionego cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe, dorobek naukowy dr Ewy Kochan jest obszerny. W ramach aktywności pozahabilitacyjnej Kandydatka opublikowała 22 prace oryginalne, 1 pracę przeglądową oraz 1 monografię, spoza cyklu składającego się na osiągnięcie naukowe. Łączna punktacja tych prac w czasopismach (z wyłączeniem prac habilitacyjnych) wynosi: punktacja MNiSW = 274, a $IF = 14,840$.

Działalność naukowo-badawcza Habilitantki przed uzyskaniem stopnia doktora koncentrowała się wokół biotechnologii roślin leczniczych. Już temat pracy magisterskiej pt.: ”Wpływ kwasu salicylowego i zakażeń *Botrytis cinerea* na zawartość fenoli i aktywność peroksydazy w liściach truskawki namnażanych techniką *in vitro*” wskazywał na zainteresowania badaniami roślinnych kultur *in vitro*, także traktowanych czynnikami i substancjami stosowanymi w hodowli. Poznana podczas studiów tematyka pozwoliła Kandydatce na szybkie włączenie się w problematykę badań realizowanych w Samodzielnej Pracowni Biosyntezy Środków Leczniczych/Zakładu Biosyntezy Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie w 1996 roku rozpoczęła pracę jako asystent. Na początku kariery naukowej, w ramach współpracy z Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Dr Ewa Kochan podjęła badania nad gatunkiem *Hyssopus officinalis*, opracowując warunki hodowli kultur kalusowych i komórkowych oraz kultur organów transformowanych, w których oznaczyła zawartość olejku eterycznego i kwasu rozmarynowego. W tym okresie Habilitantka włączyła się w pionierskie w skali kraju prace

doświadczalne zespołu, zmierzające do powiększenia skali kultur *in vitro*. Testowała prace prototypowych bioreaktorów o pojemności 5 L i 10 L oraz warunki wzrostu badanych korzeni: *Paulownia tomentosa*, *Arnica montana* oraz *H.officinalis*. Drugim obszarem działalności naukowej Kandydatki były badania fitochemiczne roślin gruntowych *P.quinquefolium* w aspekcie izolacji oraz oznaczeń jakościowych i ilościowych saponin triterpenowych, przy zastosowaniu metod chromatografii cienkowsarstwowej, metod spektrofotometrycznych i metodą HPLC. Równolegle, Habilitantka z sukcesem wprowadziła żeńszeń pięciolistny do kultur *in vitro*, opracowując warunki kultury różnych systemów wzrostowych, w których oznaczała zawartość ginsenozydów w porównaniu z ich poziomem w roślinach gruntowych. Badania te były opisane w pracy doktorskiej.

W okresie przed doktoratem Habilitantka opublikowała 7 prac oryginalnych i 1 poglądową. W czterech jest pierwszym autorem. Dorobek ten uzupełnia współautorstwo 16 komunikatów prezentowanych na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych. Łączna wartość punktacji z tego okresu wynosi: IF=0,748; MNiSW = 22.

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora tematyka badań Habilitantki, dotyczyła również biotechnologii roślin, lecz z wyraźnym poszerzeniem zagadnień z zakresu genetyki i biologii molekularnej. Nadal prowadziła badania fitochemiczne ekstraktów z otrzymanych kultur oraz określała ich potencjał biologiczny w zakresie właściwości antyoksydacyjnych. Nowym kierunkiem naukowych zainteresowań dr. Ewy Kochan były badania aktywności przeciwdrobnoustrojowych substancji roślinnych. W tym okresie dorobek naukowy wzrósł w sposób znaczący. Większość prac Habilitantki zostało opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora: była współautorem 16 publikacji oryginalnych, 1 pracy poglądowej, 2 monografii oraz 13 komunikatów naukowych. Łączna punktacja tych prac w czasopismach (z wyłączeniem prac habilitacyjnych) wynosi: punktacja MNiSW=252, a IF=14,092 W dziesięciu z tych prac Habilitantka jest pierwszym autorem. Powyższe dane świadczą o znacznej aktywności naukowej i rozwoju dr Ewy Kochan w okresie po uzyskaniu stopnia doktora. Wyniki tych wartościowych prac opublikowano w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, m.in.: *Acta Physiologiae Plantarum*, *Plant Growth Regulation*, *In Vitro Cell Development Biology-Plant*, *Phytochemistry Letters*, *Microbial Drug Resistance*, *Industrial Crops and Products*, *Molecules*, *International Journal of Molecular Science*. Szereg publikacji zostało docenionych także w postaci zespołowych nagród rektorskich Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Niezwykle wartościowe wyniki omówionych badań, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, powstały po podjęciu przez dr Ewę Kochan szerokiej współpracy z wieloma naukowcami. Należy podkreślić duże umiejętności nawiązywania efektywnej współpracy w proponowanej przez Habilitantkę tematyce z dziedziny biotechnologii roślin leczniczych, o czym świadczy obecność w publikacjach współautorów z krajowych jednostek naukowych. Kandydatka uczestniczyła w międzynarodowych i krajowych konferencjach, co pozwoliło Jej nawiązać liczne kontakty naukowe, które zapewne ułatwiły zaplanować ambitne projekty badawcze, opracować koncepcje prac i dobrze zaplanować eksperymenty. Pani Ewa Kochan wyprowadziła kultury tkankowe, komórkowe i kultury korzeni transformowanych wybranych gatunków roślin leczniczych: *Hyssopus officinalis*, *Paulownia*

tomentosa, a przede wszystkim *Panax quinquefolium* i opracowała ich różnorodne systemy wzrostowe, wykorzystując pełny potencjał eksperymentów biotechnologicznych. Dalszym celem badań była poprawa potencjału biosyntetycznego namnażanych biomas w zakresie wybranych klas metabolitów wtórnych, głównie triterpenowych saponin. Habilitantka rozwinęła warsztat biotechnologiczny o strategię elicytacji biotycznej i abiotycznej kultur. W tym zakresie, wraz z zespołem badawczym uzyskała duże sukcesy w produkcji *in vitro* ginsenozydów u *P. quinquefolium*. Jednocześnie, z wykorzystaniem bioreaktora rozpyłowego, prowadziła hodowle korzeni włóśnikowatych i pędów zwykłych różnych gatunków roślin leczniczych bogatych w związki fenolowe.

Zainteresowania naukowo-badawcze Habilitantki obejmują także zagadnienia z zakresu badań aktywności przeciwdrobnoustrojowych roślinnych metabolitów, głównie olejków eterycznych lub ich składników wobec wielolekoopornych szczepów klinicznych bakterii. Habilitantka oceniała szereg olejków eterycznych pod kątem właściwości przeciwbakteryjnych, a także zwiększających aktywność referencyjnych leków przeciwdrobnoustrojowych.

Uważam, że do najważniejszych osiągnięć dr Ewy Kochan po doktoracie należą badania molekularno-genetyczne, wpisujące się w nurt nowatorskich badań. Do warsztatu naukowego włączyła metodę izolacji DNA, RNA, technikę łańcuchowej reakcji polimerazy– PCR oraz metodę klonowania genów przy pomocy wektorów ekspresyjnych w kompetentnych komórkach *Escherichia coli*. Podjęcie powyższych badań wiązało się z korzystaniem z platform bioinformatycznych i zdobyciem biegłości w posługiwaniu się programami czy aplikacjami komputerowymi. Habilitantka opanowała powyższe techniki i wyodrębniła, zsekwencjonowała oraz zcharakteryzowała promotory genów kodujących kluczowe enzymy w szlakach biosyntezy biologicznie czynnych metabolitów. Efektem tych prac są zgłoszenia do GenBanku sekwencji promotorów kilku genów, kodujących wybrane enzymy szlaków biosyntezy tanszinoonów i alkaloidów indolowych metabolitów roślinnych, występujących w szalwii czerwonokorzeniowej i barwinku różowym. Duże znaczenie tych badań wynika z możliwości indukowania lub hamowania aktywności enzymów biorących udział w szlakach metabolicznych, co przekłada się na regulację biosyntezy metabolitów wtórnych na poziomie ekspresji genów.

Nie są to wszystkie tematy badawcze i nie wszystkie gatunki roślin, które były przedmiotem badań Habilitantki, a jedynie wybrane przykłady. Szeroka tematyka badań ilustruje potencjał i wysokie kompetencje Kandydatki. Przedstawiony dorobek naukowy, oprócz charakteru poznawczego, stwarza możliwości praktycznego zastosowania, co wskazuje na istotny wkład Pani dr. Ewy Kochan w rozwój nauk farmaceutycznych. Świadczą o tym 4 nagrody zespołowe III stopnia przyznane przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za osiągnięcia naukowe w 2015r, 2016r oraz dwukrotnie w 2017r. Ponadto, jako absolwentka studiów podyplomowych „Komercjalizacja nauki i technologii”, w ramach nagrody za wyróżniające się wyniki, odbyła tygodniową wizytę studyjną w Uniwersytecie w Lund, w Szwecji. Szkoda jednak, że Pani dr Ewa Kochan nie odbyła dłuższego zagranicznego stażu naukowego. Habilitantka jest aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Botanicznego.

Podsumowując działalność naukowo-badawczą Pani dr. Ewy Kochan pragnę podkreślić Jej dużą aktywność badawczą przez cały okres swojej pracy naukowej, jak również

wielokierunkowość tematyki badań. Bogaty warsztat naukowo-badawczy Pani Doktor zdobyła pracując od początku swojej kariery zawodowej pod kierunkiem prof. Aleksandra Chmiela, kierownika Samodzielnej Pracowni Biosyntezy Środków Leczniczych AM w Łodzi/ Zakładu Biotechnologii Farmaceutycznej AM w Łodzi, w wiodącym w kraju ośrodku badań nad kulturami korzeni transformowanych. Habilitantka miała możliwość prowadzić hodowle korzeni włóśnikowatych nie tylko w skali laboratoryjnej ale także w skali powiększonej, z zastosowaniem prototypów bioreaktorów zaprojektowanych przez prof. Aleksandra Chmiela i skonstruowanych przy udziale zespołu. Te nowatorskie rozwiązania i testowanie pracy bioreaktora i warunków wzrostu korzeni były także udziałem Pani Ewy Kochan. Wraz z zespołem Profesora stworzyła nowoczesny warsztat badawczy, który konsekwentnie wykorzystywała w swoich badaniach.

W mojej opinii, dorobek Habilitantki, z wyłączeniem osiągnięcia naukowego zgłoszonego do postępowania habilitacyjnego, jest oryginalny i znaczący, posiada istotną wartość naukową, poznawczą i aplikacyjną. Dr Ewa Kochan jest wartościowym pracownikiem naukowo-badawczym, publikującym wyniki swoich badań głównie w czasopiśmie o szerokim zasięgu oddziaływania.

Ocena działalności dydaktycznej, organizacyjnej i w zakresie popularyzacji nauki

Obok bogatej działalności naukowo-badawczej dr Ewa Kochan wykazuje wielokierunkową dużą aktywność dydaktyczną. Jest doświadczonym nauczycielem akademickim, prowadząc różnorodne formy zajęć dydaktycznych: ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotu „Biotechnologia farmaceutyczna” dla studentów III roku Farmacji, seminaria magisterskie i ćwiczenia specjalistyczne i metodologia badań dla studentów IV i V roku dwóch kierunków (Farmacja i Dietetyka), pięć różnych zajęć fakultatywnych o tematyce biotechnologicznej na Wydziale Farmaceutycznym. Angażuje się w prace ze studentami, pełniąc funkcję opiekuna Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Zakładzie Biotechnologii Farmaceutycznej. Habilitantka była promotorem 20 prac magisterskich i dwóch prac licencjackich na trzech Wydziałach: Farmaceutycznym, Wojskowo-Lekarskim i Nauk o Zdrowiu, oraz opiekunem 20 prac magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym, kierunku Farmacja. Recenzowała 54 prace dyplomowe i uczestniczyła w 94 egzaminach dyplomowych.

Kandydatka brała udział w licznych kursach i szkoleniach (16), w tym w szeregu z zakresu metodyki nauczania, podnosząc swoje kwalifikacje jako nauczyciel akademicki.

W ramach działalności organizacyjnej Habilitantka od kilku lat pełni na Uczelni funkcję koordynatora w programie Wirtualna Uczelnia UXP.

Istotnym wkładem Habilitantki na rzecz środowiska naukowego, w wymiarze międzynarodowym, są recenzje artykułów, które wykonała dla ośmiu czasopism naukowych: *Industrial Crops and Products*, *Plant Cell Report*, *Protoplasma*, *Plant Physiology and Biochemistry*, *Plant Gene*, *Burns*, *Studies in Natural Products Chemistry*, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Powierzenie dr. Ewie Kochan recenzji do renomowanych czasopism, świadczy o międzynarodowym uznaniu dorobku naukowego i wysokiej oceny kompetencji naukowych Habilitantki.

W zakresie działalności popularyzującej naukę dr Ewa Kochan jest współautorem czterech artykułów w języku polskim oraz 29 doniesień naukowych i posterów prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

W mojej ocenie Dr Ewa Kochan posiada niewątpliwie bogaty i wartościowy dorobek dydaktyczny.

Wniosek końcowy

Podsumowując moją ocenę Osiągnięcia Naukowego oraz pozostały dorobek naukowy, dydaktyczny i organizacyjny dr. Ewy Kochan stwierdzam, że Kandydatka spełnia wszystkie kryteria oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego określone w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami Dz.U. z 2017 r. poz. 1789).

Wnoszę zatem o nadanie dr Ewie Agnieszce Kochan stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk farmaceutycznych.

Poznań, 05.08.2019 r.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej
i Biotechnologii Roślin


dr hab. Barbara Thiem, prof. UM

/ dr hab. Barbara Thiem/