



Zofia Szweykowska-Kulińska, prof. dr hab.

Poznań, 27.12.2016

Zakład Ekspresji Genów

Recenzja osiągnięcia naukowego, pozostałego dorobku naukowego, dydaktycznego, organizacyjnego i popularyzatorskiego dr Edyty Gendaszewskiej-Darmach w związku z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego nauk technicznych w dyscyplinie biotechnologia

Uwagi wstępne

Dr Edyta Gendaszewska-Darmach ukończyła studia w 1995 roku na Uniwersytecie Łódzkim na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi i uzyskała tytuł magistra biologii. Stopień naukowy doktora nauk chemicznych w zakresie chemii bioorganicznej otrzymała w 2002 roku na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Wpływ mononukleotydów i ich tiofosforanowych analogów na wzrost wybranych linii komórkowych – rola 5'-nukleotydazy”. Pracę tę obroniła przed Radą Naukową Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN. W latach 1995-2005 pracowała w tym Centrum w Zakładzie Chemii Bioorganicznej jako asystent, następnie w latach 2006-2007 również jako asystent w Instytucie Biochemii Technicznej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, a od roku 2007 w tym samym miejscu pracuje do dzisiaj jako adiunkt. Obecnie Kandydatka ubiega się o stopień doktora habilitowanego nauk technicznych w dyscyplinie biotechnologia. Stwierdzam, że dostarczona dokumentacja jest pełna i spełnia kryteria formalne do ubiegania się o rzeczony stopień naukowy.

Ocena osiągnięcia naukowego

Jako osiągnięcie naukowe Kandydatka przedstawia cykl dziewięciu prac opatrzonych wspólnym tytułem „Tiofosforanowe analogi nukleotydów i lizofosfolipidów jako stabilne modulatory szlaków sygnałowych”. We wszystkich tych pracach spoiwem są modyfikowane siarką analogi nukleotydów i lizofosfolipidów jako ligandów receptorów nukleotydowych błon komórkowych sprzężonych z białkami G (GPCR). W pracach tych w systematyczny sposób Autorka badała wpływ analogów nukleotydów i lizofosfolipidów na długofalowe zmiany zachowań komórek ludzkich. Badania te mają charakter zarówno podstawowy jak i aplikacyjny. W pierwszej pracy (H1) porównała wpływ stosowanego medium hodowlanego na zachowanie dwóch typów komórek (HeLa i HUVEC), przy czym zastosowane media albo

zawierały enzymy degradujące nukleotydy i pochodne nukleotydów (surowica) albo ich obecność została ograniczona jedynie do ekto-enzymów komórkowych (do medium hodowlanego dodawano substytut surowicy TCH). Choć rzeczywiście udało się osiągnąć znaczące wydłużenie czasu trwania analogów nukleotydów to jednak zamiana medium miała zaskakujące efekty na przeżywalność komórek, chociażby z uwagi na kumulowanie się toksycznej adenozyiny w przypadku medium TCH z uwagi na brak deaminazy adenozynowej. Co prawda obecność w płynie hodowlanym surowicy bardziej przypomina warunki wzrostu komórek *in vivo*, ale zastosowanie substytutu surowicy pozwoliło na charakterystykę ekto-enzymów hydrolizujących nukleotydy i ich analogi i na stwierdzenie istotnych różnic jakościowych enzymów występujących na powierzchni komórek HeLa i HUVEC. Ponieważ wiadomym było, że nukleotydy zewnątrzkomórkowe biorą udział we wszystkich etapach gojenia się ran, w pracach H2 i H7 Autorka badała wpływ analogów tiofosforanowych (zwłaszcza pirymidynowych) na te procesy, zwłaszcza w przypadku przewlekłe gojących się ran cukrzycowych. Jedną z nich jest praca przeglądowa, a druga opisuje stworzenie warsztatu badawczego czyli warunków hodowli kilku typów komórek ludzkich *in vitro* w warunkach hiperglikemicznych symulujących warunki wzrostu komórek u chorych na cukrzycę. Badano przeżywalność komórek, zdolności proliferacyjne i wydajność produkcji VEGF – kluczowego czynnika wzrostu w procesie angiogenezy. Największy wpływ na proliferację komórek ludzkich badając analogi jak i naturalne nukleotydy pirymidynowe stwierdzono w przypadku keratynocytów HaCaT, przy czym największe zdolności proliferacyjne wykazano dla trifosforanu i α -tiotrifosforanu urydyny (zarówno w warunkach standardowego jak i podwyższonego stężenia glukozy), natomiast ATP i jego analogi nie miały wpływu na te zdolności keratynocytów. W komórkach tej samej linii uzyskano potwierdzenie stymulującego znaczenia pochodnych tiofosforanowych UTP na produkcję VEGF, również w warunkach podwyższonego stężenia glukozy. Udowodniono również stymulujący efekt UTP γ S i ATP γ S na migrację keratynocytów, co ma duże znaczenie w procesie gojenia się ran. Bardziej szczegółowa analiza analogów 5'-O-monotiofosforanów nukleozydów wykazała nieoczekiwany stymulujący efekt (TMPS, UMPS, CMPS i AMPS) na przeżywalność, migrację i produkcję VEGF komórek linii badanych keratynocytów, a także sugerowała hipotezę, że ligandy te mogą wiązać się do receptorów nukleotydowych z podklasy P2Y. Analiza proangiogennych właściwości TMPS *in vivo* na szczurach z wykorzystaniem wszywanych podskórnymi płatków bionanocelulozy wykazała silne ukrwienie bez odczynów zapalnych wypreparowanych płatków BNC po 30 dniach od wszycia.

W pracach H8-H9 Autorka konsekwentnie postanowiła sprawdzić mechanizm stymulującego działania monotiofosforanów nukleozydów na proces gojenia się ran. Autorka udowodniła, że TMPS jest selektywnym agonistą receptorów P2Y₆, a nie ma właściwości wiążących

pozostałych z typu P2Y receptorów. Wynik ten potwierdziła dodatkowo innym doświadczeniem, w którym wykazała, że wyciszenie ekspresji P2Y₆ w komórkach znosi efekt migracji komórek wywołany przez TMPS. Warto podkreślić, że badanie aktywności receptora P2Y₆ poprzez wyrzut wapnia do cytoplazmy komórki pokazało, że agonistami tego kanału są wszystkie tiomono-modyfikowane nukleozydy pirymidynowe, natomiast nie są nimi tak samo modyfikowane nukleozydy purynowe, a co ciekawe również nie są nimi naturalne 5'-monofosforany nukleozydów pirymidynowych. Warto jednak podkreślić, że tylko TMPS jest selektywnym agonistą receptora P2Y₆, a pozostałe pochodne pirymidynowych nukleotydów takiej selektywności nie wykazywały. TMPS okazał się również selektywnym antagonistą innego receptora nukleotydów – P2Y₁₄. Receptor ten reguluje aktywność komórek tucznych, zatem TMPS może jawić się jako nowy regulator aktywności tych komórek. Autorka potwierdziła antagonistyczne działanie TMPS badając aktywność P2Y₁₄ mastocytów (komórek tucznych) pod wpływem tego analogu. Otwiera to nowe możliwości badań i rozwoju terapii antyalergiczných i przeciwzapalnych.

Z kolei w pracach H3-H6 Autorka przebadala funkcje biologiczne 1-*O*-acylo-2-*O*-metylo-3-*O*-fosfodiesterowych i 1-*O*-acylo-2-*O*-metylo-3-*O*-tiofosforanowych pochodnych lizofosfolipidów (LPL). Wiadomo, że lizofosfolipidy, zbudowane ze szkieletu glicerolowego i posiadające tylko jedną resztę kwasu tłuszczowego tworzą grupę cząsteczek sygnałowych regulujących cały szereg procesów komórkowych. Zaburzenia w działaniu cząsteczek LPL wiąże się z rozwojem takich chorób jak nowotwory, cukrzyca i miażdżyca. Badania nad LPL jako cząsteczkami sygnałowymi liczą sobie dopiero 20 lat, gdy po raz pierwszy wykazano, że kwas lizofosfatydowy (LPA) wiąże się z receptorami GPCR i kontroluje, podobnie jak nukleotydy, procesy migracji, proliferacji i angiogenezy. Kandydatka postanowiła zbadać wpływ analogów LPL w formie tiofosforanów na wyżej opisane procesy. Kandydatka brała udział w syntezie licznych pochodnych LPL zawierających siarkę i badała na początku ich cytotoksyczność. Autotaksyna jest lizofosfolipazą D i związana jest z produkcją LPA. Autotaksyna jest wydzielana do surowicy i jej obecność wiąże się obecnie z rozwojem i przerzutami wielu nowotworów. Dr Gendaszewska-Darmach postanowiła zatem poszukiwać inhibitorów tego enzymu wśród tiopochodnych lizofosfolipidów. Wśród zsyntetyzowanych analogów zidentyfikowano kilka, które wydają się być obiecujące jako inhibitory autotaksyny. Najlepszym okazał się być analog LPA z kwasem oleinowym w pozycji *sn*-1 i z grupą metoksylową w pozycji *sn*-2. W przypadku 1-*O*-acylo-2-*O*-metylo-3-*O*-fosfodiesterowych i 1-*O*-acylo-2-*O*-metylo-3-*O*-tiofosforanowych pochodnych LPA zauważono regułę, że im dłuższy łańcuch kwasu tłuszczowego tym lepsze właściwości inhibitorowe pochodnej, natomiast wprowadzenie grupy tiofosforanowej nie wpływało na



właściwości inhibitorowe cząsteczek. Stwierdzono również, że obecność grupy metoksyłowej w pozycji *syn*-2 pochodnych LPL znacząco podwyższa ich stabilność.

Kolejnym zagadnieniem badawczym było przebadanie tiofosofranowych pochodnych lizofosfatydylocholiny (LPC) na stymulację receptorów GPCR komórek beta wysypek Langerhansa trzustki w celu stymulacji produkcji insuliny. Zsyntetyzowano tioestrowe i fosfodiostrowe analogi lizofosfatydylocholiny z różnej długości i o różnym stopniu nasycenia kwasami tłuszczowymi i badano wpływ tych analogów na aktywność receptorów GPR119/55. Badania prowadzono na mysim modelu komórkowym komórek beta trzustki. Wykazano, że tioestrowe i ditioestrowe pochodne LPC charakteryzowały się znikomą cytotoksycznością w stosunku do badanych komórek, zwłaszcza w porównaniu do niemodyfikowanych LPC. Wprowadzanie właśnie już pojedynczych atomów siarki obniżało cytotoksyczność cząsteczek LPC. Ponadto, tiopochodne LPC stymulują bardziej komórki beta trzustki (ale inny model komórkowy niż wcześniej używany) niż niemodyfikowana LPC.

Przedstawione wyniki, zawarte w pracach doświadczalnych i opisane niezwykle obszernie (wręcz zbyt szczegółowo) w autoreferacie są zawarte w wieloautorskich pracach, gdzie Kandydatka jest pierwszą, kolejną lub kilka razy ostatnią i korespondującą autorką tekstów. Oświadczenia współautorów są kompatybilne z oświadczeniami Kandydatki i nie wzbudzają zastrzeżeń. W moim przekonaniu uzyskane wyniki są ciekawe, niektóre z nich są ważne z potencjalnie aplikacyjnego charakteru i znacząco poszerzają wiedzę w zakresie biotechnologii medycznej. Stąd też pozytywnie oceniam osiągnięcie naukowe dr Edyty Gendaszewskiej-Darmach.

Ocena pozostałego dorobku naukowego

Na pozostały dorobek naukowy dr Gendaszewskiej-Darmach składa się 10 publikacji eksperymentalnych, które ukazały się w dobrych/bardzo dobrych czasopismach z listy JCR, z czego pięć ukazało się przed obroną pracy doktorskiej, a pięć pozostałych już po doktoracie. Prace te są wieloautorskie, a Kandydatka swoją rolę w nich opisuje jako wykonawcę doświadczeń po tworzenie koncepcji. Im później ukazywała się praca tym większy jest widoczny wkład intelektualny i koncepcyjny dr Edyty Gendaszewskiej-Darmach w jej realizację. Prace te ukazały się w takich czasopismach jak *Antisense Nucleic Acids Drug Dev.* (obecnie *Nucleic Acids Therapeutics*), *Blood*, *Nucleosides and Nucleotides*, *Curr. Org. Chem.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* i kilka prac w *Acta Biochim. Polon.* Ponadto w skład dorobku naukowego Kandydatki wchodzi cztery rozdziały w monografiach lub artykuły przeglądowe w języku polskim. Ich wartość oceniam wysoko z uwagi na ich dydaktyczny i popularyzatorski charakter.



Prace z pozostałego dorobku naukowego dotyczą w duże mierze badań nad wyciszaniem ekspresji genów przy zastosowaniu antysensownych sond oligonukleotydowych zawierających modyfikowane deoksynukleotydy podstawione atomem siarki (tio-pochodne, w których atom tlenu w pozycji niemostkowej jest zastąpiony atomem siarki). Badania te uważam za ważne z uwagi na ich potencjał terapeutyczny. Wyniki badań pokazały, że takie tio-oligonukleotydy są nieco bardziej stabilne niż normalne sondy oligonukleotydowe, jednak nadal były degradowane przez enzymy wewnątrzkomórkowe jak i ekto-enzymy. Ponadto Kandydatka wykazała, że produkty degradacji (tiopochodne deoksynukleotydów jak i normalne dNTP) mogą wpływać na niespecyficzne efekty towarzyszące podawaniu tego typu sond antysensownych w postaci apoptozy, zahamowania podziałów komórkowych bądź wręcz pro-mitotycznie. Postawiona została wówczas hipoteza o obecności na powierzchni komórek receptorów dla dNTP. Innym ciekawym wątkiem badawczym, w którym bierze udział Kandydatka jest izolacja i charakterystyka związków roślinnych pod kątem ich prozdrowotnego, a głównie antycukrzycowego wpływu. Chodzi głównie o związki polifenolowe i ich właściwości przeciwutleniające. Związki te były badane pod kątem ich funkcji na komórkach różnych linii komórek ludzkich i mysich, między innymi na komórkach beta trzustki (insulinoma), keratynocytach, fibroblastach i komórkach śródbłonna żyły pępowinowej. Uzyskano ekstrakty roślinne o proangiogennym wpływie, pomocne w procesach gojenia się ran.

Uważam, że wyniki prac wchodzących w skład pozostałego dorobku naukowego są cenne, w dużej mierze kompatybilne do wyników z osiągnięcia naukowego. Co dla mnie istotne - wyraźnie zarysowują się nowe horyzonty prowadzenia badań nad innymi związkami o potencjalnym charakterze terapeutycznym, takimi jak lizofosfolipidy czy też polifenole.

Podsumowując ilościowo dorobek naukowy dr Edyty Gendaszewskiej-Darmach stwierdzam, że są to 24 prace, doświadczalne i przeglądowe, których sumaryczny współczynnik oddziaływania wynosi ponad 50, co przekłada się na 490 punktów MNiSW. Liczba cytowań (bez autocytowań) wynosi 157, a indeks Hirscha 9. Są to dobre parametry bibliometryczne na tym etapie kariery naukowej.

W moim przekonaniu pozostały dorobek naukowy dr Edyty Gendaszewskiej-Darmach również zasługuje na ocenę pozytywną.

Ocena działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzatorskiej

Dr Edyta Gendaszewska-Darmach była kierownikiem jednego grantu NCN i wielokrotnie głównym wykonawcą/wykonawcą w innych grantach. Kierownikiem grantu była w latach



2009- 2012. Martwi mnie trochę brak dalszych sukcesów w zdobywaniu funduszy na projekty badawcze, własne, a raczej skłanianie się do bycia wykonawcą w projektach innych badaczy. Nie wiem, czy Kandydatka składa projekty i ich nie otrzymuje czy też woli brać udział w badaniach innych jako współpracownik. Zachęcałabym do bardziej aktywnego starania się o własne środki na badania naukowe.

Habilitantka aktywnie uczestniczy w konferencjach naukowych, sama trzy razy prezentowała wyniki badań na międzynarodowych konferencjach (Walencja, Kraków, Częstochowa), a 28 razy była na konferencjach naukowych z plakatem omawiającym wyniki badawcze. Jest osobą rozpoznawaną na arenie międzynarodowej – była edytorem gościnnym tomu czasopisma Current Topics in Medicinal Chemistry (IF 2,9) wydawanego przez Bentham Science Publishers .

Największym mankamentem tego wniosku habilitacyjnego jest brak stażu, nawet najkrótszego, w innym, zagranicznym lub krajowym ośrodku naukowym. Przypuszczam, że stoją za tym kwestie rodzinne niemniej jednak z obowiązku recenzenta podnoszę ten problem i uważam to za poważny brak w karierze zawodowej Kandydatki. Natomiast Habilitantka kilkakrotnie recenzowała prace dla zagranicznych czasopism i koordynowała współpracę z instytutem badawczym ITESM w Meksyku. Także nie można powiedzieć, że Kandydatka nie ma naukowych kontaktów międzynarodowych czy też nie jest rozpoznawana na międzynarodowej arenie naukowej ale to jest niestety za mało.

Zwraca uwagę Jej bardzo duże zaangażowanie w prace organizacyjne i w proces kształcenia. Tu dorobek dr Edyty Gendaszewskiej-Darmach oceniam bardzo wysoko. Zorganizowała pracownię hodowli komórek zwierzęcych w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ, jest członkiem zespołu przygotowującego rozbudowę BioNanoParku w Łódzkim Regionalnym Parku Naukowo-Technologicznym. Jest członkiem różnych komisji na poziomie Wydziału Biotechnologii i Nauki o Żywności PŁ.

Habilitantka brała udział w opracowaniu treści i prowadzi liczne wykłady/ćwiczenia dla studentów Biotechnologii PŁ. Sprawowała opiekę nad 31 pracami dyplomowymi, w tym pracami inżynierskimi i magisterskimi. Jest promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich i opiekunem naukowym w dwóch innych pracach doktorskich.

Podsumowując, tę domenę aktywności naukowej dr Edyty Gendaszewskiej-Darmach oceniam całłościowo pozytywnie, pomimo braku stażu podoktorskiego i niewielkiej aktywności w pozyskiwaniu środków na badania naukowe.



Ocena końcowa

Osiągnięcie naukowe i pozostały dorobek naukowy dr Edyty Gendaszewskiej-Darmach oceniłam bardzo pozytywnie gdyż zawierają one wiele nowych, oryginalnych i ciekawych dla rozwoju nauki i potencjalnych terapii medycznych wyników. Działalność dydaktyczna (głównie mam na myśli udział w indywidualnym procesie kształcenia młodej kadry naukowej) i organizacyjna Kandydatki jest wręcz znakomita. Jedyne zastrzeżenia budzą we mnie brak stażu podoktorskiego i niewielkie sukcesy w zdobywaniu środków na badania naukowe. Niemniej jednak uważam, że najważniejsza jest ocena osiągnięcia naukowego i pozostałego dorobku naukowego, a do tych nie mam zastrzeżeń. Dlatego zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o nadanie dr Edycie Gendaszewskiej-Darmach stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk technicznych w dyscyplinie biotechnologia.


Zofia Szweykowska-Kulińska