

Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Zakład Biochemii
tel. (42) 272 57 14
e-mail: urszula.lewandowska@umed.lodz.pl

Dr hab. Urszula Lewandowska, prof. nadzw. UM

Łódź, 14 sierpnia 2018 r.

RECENZJA

osiągnięcia naukowego zatytułowanego "*Receptorowe i niereceptorowe oddziaływanie kwasu L- i D-mlekowego na komórki nowotworowe raka szyjki macicy oraz komórki związane z mikrośrodowiskiem guza*" oraz dorobku naukowo-dydaktycznego i organizacyjnego w postępowaniu habilitacyjnym dr n. med. Waldemara Wagnera z Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

1. Sylwetka Habilitanta

Doktor n. med. Waldemar Wagner uzyskał dyplom magistra biologii w 1997 r. na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego.

Rozwój zawodowy Kandydata jest praktycznie od samego początku związany z Polską Akademią Nauk w Łodzi. I tak w latach 1997-2003 pracował jako asystent naukowo-badawczy w Zakładzie Amin Biogennych, następnie w Centrum Biologii Medycznej PAN jako adiunkt, a od 2008 roku po dzień dzisiejszy pracuje w Instytucie Biologii Medycznej PAN (Pracownia Immunologii Komórkowej) w Łodzi.

Stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej uzyskał w 2003 r. na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznej w Łodzi. Rozprawę doktorską pt. "*Układ histaminowy w gruczole mlekowym myszy. Odpowiedź na blokowanie ekspresji genu dekarboksylazy histydynowej*" wykonał w Zakładzie Amin Biogennych PAN Łodzi pod kierunkiem Pani prof. dr hab. W. Agnieszki Fogel.

2. Ocena dorobku naukowego poza rozprawą habilitacyjną

Przed uzyskaniem stopnia doktora Habilitant był członkiem Zespołu naukowego kierowanego przez prof. W.A. Fogel i uczestniczył w badaniach nad metabolizmem amin biogennych w modelu *in vivo*. Kolejne badania Habilitanta dotyczyły charakterystyki układu

histaminowego w gruczole sutkowym myszy na poziomie komórkowym i na poziomie funkcjonowania całego narządu. Badania te prowadzone były w ramach grantu promotorskiego KBN (6PO5A 067 21; 2001-2003). Wyniki badań Habilitanta wykazały obecność histaminy i dekarboksylazy L-histydyny (HDC) w populacji komórek tucznych i w komórkach nabłonkowych, tworzących struktury pęcherzykowe gruczołu mlekowego. Zaobserwowane zmiany ekspresji/aktywności HDC i poziomu histaminy w warunkach *in vitro* korelowały zarówno ze zmianami aktywności układu histaminowego *in vivo*, jak i tempem procesów fizjologicznych zachodzących w gruczole, sugerując zaangażowanie histaminy w proces dojrzewania gruczołu. Ponadto, badania molekularne gruczołu mlekowego (soczynkowego i ciężowego) wykazały obecność mRNA receptorów histaminowych (H1, H2 i H3) na komórkach nabłonkowych, co może świadczyć o jego auto-/parakrynowej regulacji. W celu zweryfikowania tezy nt. roli wydzielanej lokalnie przez komórki nabłonkowe histaminy w regulacji prawidłowego wzrostu, różnicowania i funkcjonowania gruczołu, Habilitant zastosował model ograniczenia syntezy histaminy poprzez hamowanie specyficznej dekarboksylazy L-histydynowej za pomocą oligonukleotydów antysensownych wobec mRNA HDC. Efektem powyższych badań jest rozprawa doktorska (RWL Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2003) oraz pięć oryginalnych publikacji w takich czasopismach jak: *Inflamm Res.* (2001; 2002; 2003), *J Physiol Pharmacol.* (2003) i *Amino Acids* (2004). Należy podkreślić, że we wszystkich pracach Habilitant jest pierwszym autorem, napisał wstępne wersje manuskryptów, a Jego wkład pracy w powstawanie tych publikacji wynosił 75-90%.

W Pracowni Immunologii Komórkowej Centrum Biologii Medycznej PAN w Łodzi pod kierownictwem prof. Jarosława Dastycha w latach 2004-2011 Habilitant włączył się w kolejny ważny obszar badań z zakresu nowych technologii. Stało się to dzięki Jego uczestnictwu w dwóch projektach "Fluoryzujący "Cell Chip" (FCC)-wdrożenie nowej technologii do wykrywania substancji immunotoksycznych i immunomodulujących" (PBZ-MIN-0071P0412003) oraz "Biosensory komórkowe dla zautomatyzowanego monitoringu zanieczyszczeń środowiskowych" finansowany ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego (PL0107). W pierwszym projekcie Habilitant opracował metodę analizy dużej liczby próbek związków, miniaturyzując i automatyzując pomiar przy pomocy płytek 96-dołkowych i cytometru przepływowego Cytomix FC500 MPL. Tak opracowana technologia FCC pozwala na wydajne identyfikowanie substancji o działaniu immunotoksycznym oraz zastąpienie testów z użyciem zwierząt laboratoryjnych. W drugim, poprzez udoskonalenie i adaptację istniejących testów, rozwinął platformę pomiarową immunotoksyczności-FCC na potrzeby monitorowania skażeń środowiskowych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w znaczących czasopismach (*Toxicol Lett.*, 2006 i *Toxicol In Vitro*, 2011), jako dwa artykuły oryginalne, w których dr Wagner jest pierwszym autorem.

Kolejnym przejawem dużej aktywności naukowej Habilitanta był Jego udział w badaniach nad aktywacją komórek tucznych przez tymozynę $\beta 4$ i mechanizmem regulacji czynnika transkrypcyjnego HIF1 α w tych komórkach. Wyniki wspomnianych badań zostały upowszechnione, jako dwa artykuły oryginalne w *Peptides* (2007) i *J Immunol.* (2008).

Następny obszar badań Habilitanta dotyczy przeciwnowotworowych aktywności ekstraktów roślinnych bogatych w związki polifenolowe. Przebadano dwa ekstrakty z owoców pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica* L.) i nasion wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* H.). Doktor Wagner stosując nowoczesne techniki badawcze takie jak

wieloparametryczną analizą obrazu (*high content screening*, HCS) przy użyciu cytometru obrazowego i przepływowego ocenił apoptotyczną aktywność wyżej wymienionych ekstraktów w komórkach raka jelita grubego Caco-2 i HT-29. Wyniki badań zostały opublikowane, jako dwa artykuły oryginalne w *J Agric Food Chem.* (2011) i *Nutr&Cancer* (2011).

W latach 2007-2011 Habilitant realizując główny nurt badań (Receptorowe i niereceptorowe oddziaływanie kwasu mlekowego na komórki nowotworowe oraz komórki związane z mikrośrodowiskiem guza) zaangażowany był równocześnie w liczne badania naukowe. Efektem tej części działalności naukowej jest pięć publikacji oryginalnych w których dr Wagner jest współautorem lub pierwszym autorem. Zostały one opublikowane w następujących czasopismach: *Arch Med Sci.* (2013), *J Appl Biomed.* (2014), *J Mol Neurosci.* (2014), *Ann Allerg Asthma Immunol.* (2016) i *Cell Signal.* (2017).

Podsumowując, dr Waldemar Wagner jest współautorem 24 publikacji oryginalnych, w tym 13 jako pierwszy autor. Warto moim zdaniem podkreślić fakt, że wszystkie te prace zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej. Czasopisma z listy JCR w których znalazły się publikacje Habilitanta posiadają wysokie współczynniki wpływu na naukę światową (od 1,210 do 6,000). Impact factor (IF) w zdecydowanej większości czasopism mieści się w granicach 2-4; co należy uznać za osiągnięcia wysokie.

Wg bibliometrycznej analizy dorobku naukowego dr W. Wagnera sumaryczny IF wynosi 59,108 , a suma pkt MNiSW= 515. Po wydzieleniu 5 prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego IF pozostałych prac wynosi 44,577 (w tym 16,481 jako pierwszy autor), a suma pkt MNiSW= 380 (w tym 147 pkt jako pierwszy autor). Artykuły naukowe współautorstwa dr Wagnera uzyskały 185 cytowań oraz indeks Hirscha 9 wg bazy ISI Web of Science, a wg bazy Scopus 202 cytowania oraz indeks Hirscha 10.

W dorobku publikacyjnym Habilitanta brak jest patentów i zgłoszeń patentowych, a w Jego karierze naukowej odbycia dłuższego stażu naukowego. Wysoką aktywność naukową dr Wagnera w zakresie upowszechniania wyników prowadzonych badań, potwierdza natomiast udział w 21 krajowych i międzynarodowych zjazdach i konferencjach naukowych.

Habilitant był kierownikiem projektu naukowego "Efekt receptorowego oddziaływania L- i D-mleczanu na komórki raka szyjki macicy. Modulacja przez mleczan naprawy uszkodzeń komórkowego DNA wywołanych chemioterapeutykami" (2012-2015), Narodowe Centrum Nauki -projekt OPUS. Był również wykonawcą w sześciu projektach (w tym dwóch współfinansowanych m.in. ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka /2009-2013, Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego /2008-2011) oraz w Programie Operacyjnym Innowacyjna Gospodarka (POIG – InterMolMed /2010-2013). Tematyka realizowanych projektów jest ściśle związana z całościowym dorobkiem naukowym Habilitanta, co istotne; kierownictwo i realizacja projektów obejmuje granty, których wynikiem są rezultaty badań zaprezentowane w publikacjach stanowiących "osiągnięcie habilitacyjne".

Ponadto, dr W. Wagner był recenzentem 8 manuskryptów m.in. dla czasopism: *Oncotarget*, *DNA Repair*, *Cell Communication and Signaling*, *OncoTargets and Therapy*, *International Journal of Nanomedicine*, co należy uznać za wysoki dorobek i wart zauważenia.

Wartość Jego pracy naukowej została doceniona przez przyznanie m.in. stypendium od European Histamine Research Society w 2001 roku, drugiej nagrody: Best poster presentation contest (Gliwice Scientific Meetings) w 2014 roku oraz Nagrody uznaniowej I stopnia Dyrektora Instytutu Biologii Medycznej PAN w 20017 roku.

Z powyższego zestawienia widać wyraźnie, że aktywność naukowa dr Wagnera jest znacząca. Sumaryczny dorobek naukowy jest duży i wskazuje na planowany i dynamiczny rozwój naukowy Habilitanta. W podsumowaniu tej części recenzji stwierdzam, że osiągnięcia naukowe Pana dr Waldemara Wagnera, niewchodzące w skład Jego rozprawy habilitacyjnej, spełniają z nawiązką wymagania formalne obowiązującej w tym względzie ustawy o tytułach i stopniach naukowych.

3. Ocena rozprawy habilitacyjnej

Przedmiotem oceny jest osiągnięcie naukowe zatytułowane "Receptorowe i niereceptorowe oddziaływanie kwasu L- i D-mlekowego na komórki nowotworowe raka szyjki macicy oraz komórki związane z mikrośrodowiskiem guza".

Podstawę rozprawy dr Wagnera stanowi cykl 5 monotematycznych oryginalnych artykułów, które zostały opublikowane w latach 2014-2017, co niewątpliwie świadczy o ich aktualności i kompatybilności z materiałem publikacyjnym innych autorów, pracujących w zbliżonej tematyce badawczej. Dorobek ten jest tematycznie spójny. Co więcej, artykuły te zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu światowym: dwie prace w *J Interferon Cytokine Res.* (IF = 2,000 /2,377, MNiSW = 20 /25), jedna praca w *Cell Commun Signal.* (IF = 3,661, MNiSW = 30), jedna praca w *DNA Repair (Amst).* (IF = 3,610, MNiSW = 35) oraz jedna w *J Physiol Pharmacol.* (IF = 2,883, MNiSW = 25). Łączny impact factor cyklu publikacji wynosi 14,531 przy sumie pkt MNiSW = 135. W czterech z tych publikacji dr Wagner jest pierwszym autorem, a w trzech korespondencyjnym autorem. Wszystkie badania, które zostały wykonane w ramach rozprawy przebiegały z udziałem wielu autorów i udzielili oni pisemnej zgody na włączenie omawianych publikacji do dorobku habilitacyjnego dr Wagnera, a także opisali swój udział. Z opisów tych wynika jednoznacznie, że dr Wagner odgrywał dominującą rolę na etapie planowania badań, jak również na etapie ich wykonywania i opracowywania wyników. Należy z uznaniem podkreślić fakt, że w trzech pracach będących podstawą habilitacji, dr Wagner przeprowadził cały proces publikacyjny. Wnioskuje, więc że wkład Habilitanta w badania, jak i w powstawanie publikacji stanowiących podstawę Jego rozprawy habilitacyjnej jest bardzo znaczny.

Recenzowana rozprawa dotyczy badań nad oddziaływaniem kwasu mlekowego, pseudo-hormonu koordynującego procesy metaboliczne na poziomie komórkowym i systemowym, z komórkami immunologicznymi i nowotworowymi w aspekcie rozwoju oporności komórek nowotworowych na chemioterapię.

Za najbardziej istotne osiągnięcia Habilitanta uważam:

1. Wykazanie, że kwasy L- i D-mlekowy stymulują produkcję i wydzielanie IL-4 i IL-13 w pobudzonych limfocytach T ludzkich (linia komórkowa HuT-78, Jurkat).

2. Wykazanie, przy użyciu mysich linii reporterowych zawierających transgeny IL4-EGFP lub Ifn γ -EGFP, że kwas mlekowy indukuje produkcję i wydzielanie IL-4 w limfocytach T mysich (linia komórkowa EL-4).

3. Udowodnienie, że proces indukcji cytokin (IL-4 i IL-13) jest zależny od aktywności błonowych transporterów monokarboksylowych (MCT1). Aktywność MCT1 wpływa na wewnątrzkomórkową obecność mleczanów, która wiąże się ze wzrostem acetylacji białek jądrowych co sugeruje epigenetyczną regulację genów *IL-4* i *IL-13*.

4. Wykazanie, że IL-4 stymuluje naprawę DNA w mysich fibroblastach oraz w liniach komórkowych glejaka (M059K i M059J), a proces tej stymulacji związany jest ze wzrostem aktywności PARP-zależnego systemu naprawy DNA (tzw. B-NHEJ) zarówno w komórkach normalnych i nowotworowych.

5. Opisanie szeregu receptorowych i niereceptorowych mechanizmów działania kwasu L- i D-mlekowego zwiększającego oporność komórek nowotworowych na chemioterapeutyki (zwiększenie potencjału naprawczego DNA w komórkach, indukcja białek BRCA1, Nibrin, DNA-PKcs, białka oporności wielolekowej ABCB1 /Pgp).

Podsumowując ocenę rozprawy habilitacyjnej dr Waldemara Wagnera stwierdzam, że wyniki Jego badań nad oddziaływaniem kwasu mlekowego z komórkami immunologicznymi i nowotworowymi wniosły istotny wkład do wiedzy na temat jego stymulującego efektu w procesie naprawy DNA komórek. Efekt ten może odzwierciedlać problem kliniczny zwiększonej oporności komórek nowotworowych szyjki macicy na radio- i chemioterapię. Rezultaty badań stanowią wartość w zakresie biochemii, immunologii i biologii molekularnej oraz dają podwaliny do poszukiwania nowych strategii terapii przeciwnowotworowych np: neutralizacji działania mleczanu poprzez blokowanie receptora HCARI na czas radio- i chemioterapii raka szyjki macicy.

4. Charakterystyka działalności dydaktycznej i popularyzatorskiej

Wymiernym, ważnym dla dalszego rozwoju naukowego i dydaktycznego dr W. Wagnera jest Jego opieka na przebiegiem i realizacją części doświadczalnej prac:

- doktorskiej dr Wojciecha M. Ciszewskiego, Instytut Biologii Medycznej PAN / Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska (2014)
Tytuł "Wpływ inhibitora DNA-zależnej kinazy białkowej NU74441 na przeżywalność komórek raka piersi narażonych na działanie czynników uszkadzających DNA"
- magisterskiej mgr Michała Teodorowicza, Uniwersytet Łódzki |Wydział Biologii i Ochrony Środowiska (2006)
Tytuł " Cytokiny jako sygnał stresu komórkowego"
- magisterskiej mgr Magdaleny Zimoń, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, (2008)
Tytuł " Zastosowanie Real-Time PCR w badaniach nad ekspresją genów związanych ze ścieżkami transdukcji sygnału".

Dr Wagner przygotowywał i prowadził warsztaty dla uczniów szkół podczas Dni Otwartych w IBM PAN w ramach Festiwalu Nauki.

5. Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z przedstawionymi przez dr n. med. Waldemara Wagnera całokształtem dorobku naukowego, osiągnięciem naukowym oraz działalnością dydaktyczną, stwierdzam, że Habilitant spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym z roku 2003 z późniejszymi zmianami. Przygotowana przez dr Wagnera rozprawa habilitacyjna stanowi dzieło stojące na wysokim poziomie naukowym, który wynika ze stosowania nowoczesnych technik badawczych z zakresu biologii i genetyki molekularnej, a także z ważności tematyki badań. Wyniki Jego pracy są istotnym wkładem do wiedzy o receptorowych i niereceptorowych mechanizmach działania kwasu L- i D-mlekowego. Jego osiągnięcia naukowe, ilość publikacji oraz projektów, w których uczestniczył, a także dorobek dydaktyczny świadczą o dojrzałości naukowej. Mam przekonanie, że jako samodzielny pracownik naukowy dr Waldemar Wagner będzie z powodzeniem rozwijał swoje badania oraz skutecznie kierował pracą naukową młodych pracowników nauki. Opierając się na argumentach przedstawionych w poprzednich punktach recenzji zwracam się do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie dr Waldemara Wagnera do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Zakład Biochemii
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Dr hab. n. med. prof. nadzw. Urszula Lewandowska

Łódź, 14 sierpnia 2018 r.