

**Ocena**  
**dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej**  
**dr n. med. Agnieszki Piwowskiej adiunkta Zespołu Kliniczno-Badawczego**  
**Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN w Warszawie**

**1. Rys biograficzny**

Dr. n. med. Agnieszka Piwowska ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej w 2000 roku otrzymując tytuł magistra biotechnologii. W tym roku rozpoczęła studia doktoranckie, które kontynuowała do 2005r w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej. Rozprawę doktorską obroniła na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w 2005 r. W 2006 roku rozpoczęła pracę w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN w Gdańsku, którą kontynuuje na stanowisku adiunkta

**2. Działalność i rozwój naukowo-zawodowy**

W 2005r pod kierunkiem pana Prof. Edwarda Borowskiego Habilitantka otrzymała tytuł doktora nauk medycznych Wydziału Lekarskiego AM w Gdańsku na podstawie przewodu i rozprawy doktorskiej pt "Modulatory białek ABC i antymetabolity w badaniach nad opanowaniem problemu oporności wielolekowej komórek nowotworowych". Wyniki tych badań są przedmiotem międzynarodowego zgłoszenia patentowego

Wymienione poniżej **odbyte staże, szkolenia naukowe i zdobyte granty** pozwoliły ukształtować Jej sylwetkę naukową i zdobyć doświadczenie i opanowanie warsztatu badawczego na wyróżniającym poziomie. Były to:

- a. V Międzynarodowa Konferencja Cytometrii w Rynii,
- b. Gliwice Science Encounters, Molecular Biology in Cancer Research,
- c. "I Szkoły Cytometrii Przepływowej Becton Dickinson" Jadwisin.
- d. Ponadto firma L'Oreal przy wsparciu Polskiego Komitetu ds. UNESCO doceniając dorobek naukowy, przyznała Habilitantce stypendium w ramach konkursu „Kobiety Nauki 2003”.
- e. Brała również udział w organizacji konferencji „8th International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy”, która odbyła się w Gdańsku.
- f. Ponadto była i jest współwykonawcą i wykonawcą 12 grantów naukowo-badawczych PAN, KBN i MEN

Oceniając działalność zawodową, i rozwój należy podkreślić, iż Habilitantka stanowi przykład rozwoju naukowego absolwentów niemedycznych wydziałów ( w tym przypadku Wydziału Chemii), których doświadczenie zawodowe (znajomość nowoczesnych metod, piśmiennictwa i wiedza merytoryczna zdobyta we współpracy z doświadczonym w temacie Zespołem Specjalistów) owocują w wysoce specjalistycznym, profesjonalnym badaniem podłoża chorób w modelach doświadczalnych. Otrzymane wyniki badań dały Habilitantce asumpt do zbiorczego opracowanie i przedstawienie dorobku w postaci rozprawy habilitacyjnej.

### 3. Ocena dorobku naukowego.

Przedstawiony do oceny **dorobek naukowy** Habilitantki obejmuje 21 publikacji o łącznym IF: **53.840** (według listy Journal Citation Reports). Liczba cytowań wszystkich publikacji wg bazy Web of Science wynosi **228** (natomiast ta liczba bez autocytowań wynosi **199**). **Indeks Hirscha dla wszystkich publikacji** wg bazy Web of Science: wynosi **8**. **16 prac powstało po doktoracie** (po 2005 r.) i jest opublikowana w w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym IF = **45.912** (W 10 publikacjach Habilitantka jest pierwszym autorem). **Pięć z tych publikacji (o łącznym IF= 17,959) stanowi podstawę rozprawy habilitacyjnej.**

Ponadto Habilitantka jest autorem 24 doniesień zjazdowych prezentowanych na krajowych (11) i międzynarodowych (13) zjazdach i sympozjach naukowych.

Prowadzone **przed doktoratem** badania dotyczyły oporności wielolekowej nowotworów. Wykazano w nich m.in., że modyfikatory aktywności białek transportowych dla ksenobiotyków są związkami kompetycyjnymi w stosunku do stosowanych w klinice cytostatyków. Wyniki tych badań były przedmiotem **międzynarodowego zgłoszenia patentowego** i zostały opublikowane w impaktowanych (IF:0.600 - 2.286) czasopismach (*Acta Bioch.* 2002;2003;2005; *Pol.; Cancer Prevention and Detection* 2004; *Bioorg.Med.Biochem* 2002.)

W dorobku naukowym Habilitantki **po doktoracie** można wyróżnić dwie główne linie tematyczne badań których wyniki zostały opublikowane przeważnie w impaktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Pierwszy temat dotyczył jeszcze roli ABC-transporterów w oporności wielolekowej w onkologii (*Bioorg.Med.Chem.* 2006) jak i eliminacji organicznych anionów i leków przez podocyty (*Postępy Biochemii* 2008). Drugi temat badań pozostaje w ścisłym związku z tematem rozprawy habilitacyjnej i dotyczy badań funkcji podocytów w modelu doświadczalnym stresu oksydacyjnego (rola NAD(P)H oksydazy (*Acta Biochim. Pol.* 2013), receptorów purynergicznych, ATP, AMPK-PTEN, exo-fosfodiesterazy, w insulinowrażliwości i funkcji transportowej glukozy podocytów. Te wartościowe prace (nie zawierające pięciu poniższych) zostały opublikowane w czasopismach o IF:1.85 - 4.152 takich jak *BBA* 2010; *J.Cel .Report* 2010; *Exper.Cell Res* 2012; *BBRC* 2011; 2014; *Int.J.Biochem.Cell.Biol.*2014;

### 4. Ocena rozprawy habilitacyjnej (osiągnięcia naukowego) pod tytułem zbiorczym :

**Rola kinazy białkowej G i reaktywnych form tlenu w regulacji funkcji podocytów w warunkach fizjologicznych i wybranych stanach patofizjologicznych**

Podstawę oceny stanowi zbiór pięciu, spójnych tematycznie publikacji o sumarycznym IF= **17.959** (KBN/MNiSW = 155) omówionych szczegółowo w specjalnym akapicie autoreferatu Habilitantki.

*Autorzy publikacji, rok wydania, tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa.IF.*

- 1) **Piwkowska A**, Rogacka D, Audzeyenka I, Jankowski M, Angielski S.  
High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes J Cell Biochem. 2011, 112(6):1661-72. IF = 2.868; KBN/MNiSW = 30
- 2) **Piwkowska A**, Rogacka D, Jankowski M, Kocbuch K, Angielski S.  
Hydrogen peroxide induces dimerization of protein kinase G type I $\alpha$  subunits and increases albumin permeability in cultured rat podocytes. J Cell Physiol. 2012, 227(3):1004-16. IF = 4.218; KBN/MNiSW = 35
- 3) **Piwkowska A**, Rogacka D, Kasztan M, Angielski S, Jankowski M.  
Insulin increases glomerular filtration barrier permeability through dimerization of protein kinase G type I $\alpha$  subunits. Biochim Biophys Acta. 2013, 1832(6):791-804. IF2012 = 4.910; KBN/MNiSW = 40
- 4) **Piwkowska A**, Rogacka D, Audzeyenka I, Angielski S, Jankowski M.  
High glucose increases glomerular filtration barrier permeability by activating protein kinase G type I $\alpha$  subunits in a Nox4-dependent manner. Exp Cell Res. 2014, 320(1):144-52. IF2012 = 3.557; KBN/MNiSW = 30
- 5) **Piwkowska A**, Rogacka D, Angielski S, Jankowski M.  
Insulin stimulates glucose transport via protein kinase G type I alpha-dependent pathway in podocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2014, 446(1):328-34. IF2012 = 2.406; KBN/MNiSW = 20

## Omówienie:

### Wprowadzenie

Zagadnieniem badawczym rozprawy jest rola kinazy białkowej G typu I alfa (PKGI $\alpha$ ) i reaktywnych form tlenu w regulacji przepuszczalności bariery filtracyjnej kłębuszków i izolowanych podocytów co stanowi jeden z mechanizmów zaburzenia regulacji bariery filtracyjnej kłębuszków glomerulopatii cukrzycowej.

W bardzo szczegółowym omówieniu fizjologii podocytów przedstawione są znane mechanizmy ich fizjologii, rola receptorów i przekaźników II-rzędu dla naczynioaktywnych endogennych substancji między innymi receptorów dla angiotensyny II, prostaglandyny E2, przedsionkowego czynnika natriuretycznego (ANP), które oddziałują poprzez jony wapnia, fosfolipaza C/1,4,5-trifosforan inozytoli, cAMP, oraz szlak sygnałowy związany z cGMP. Substancje zwiększające ilość cGMP, takie jak ANP czy SNP (donor NO), powodują przegrupowanie F-aktyny. i powoduje zwiększenie przepuszczalności dla albuminy. Oznacza to, że kurczliwość komórek podocytarnych może i powinna być regulowana przez czynniki naczynioruchowe, w tym te, które prowadzą do ich relaksacji poprzez wytwarzanie cyklicznego GMP (cGMP) i aktywowanie przez ten nukleotyd kinazę białkową G typu I (PKGI). **PKGI** posiada dwie izoformy,  $\alpha$  i  $\beta$  powstające wskutek alternatywnego składowania mRNA i różniące się N-końcowymi fragmentami o długości ok. 100 reszt aminokwasowych. Różnice w N-terminalnym końcu izoform  $\alpha$  i  $\beta$  wpływają przede wszystkim na powinowactwo do cGMP, specyficzność względem substratu białkowego, a także lokalizację. Nadtlenek wodoru jest kolejnym ważnym czynnikiem aktywującym PKGI $\alpha$  na skutek jej dimeryzacji. Zwiększa się w ten sposób ilość

PKGI $\alpha$  w formie aktywnego homodimeru, który charakteryzuje się 7-krotnym zwiększeniem powinowactwa do jej substratów

### **Wyniki oryginalnych badań opisanych w habilitacji.**

1. W badaniach wykazano oryginalnie **obecność kinazy białkowej G typu I $\alpha$  w hodowli pierwotnej komórek podocytnych** (*Publikacja 2.*). Stwierdzono, że aktywność PKGI $\alpha$  podocytów wykazują na zależność pomiędzy **hiperglikemią** a aktywnością **oksydazy NAD(P)H**. Już po krótkim czasie inkubacji podocytów w obecności **wysokich stężeń glukozy, wzrasta aktywność tego enzymu**, przy czym jest ona dużo wyższa w homogenacie otrzymanym z podocytów w porównaniu z całymi kłębuszkami nerkowymi **Podocyty mogą być więc komórkami zdolnymi generować znaczne ilości ROS** i jednocześnie bardzo czuły na zmiany jego stężenia.

2. Logicznym następstwem było wykazanie **roli reaktywnych form tlenu w regulacji aktywności kinazy białkowej G typu I alfa** i jej szlak przekazywania sygnału **w komórkach podocytnych**

Właściwości te zostały uwidocznione w odniesieniu do nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), który w ostatnich latach uważany jest za ważną cząsteczkę sygnałową w komórkach. W cukrzycy dochodzi innymi do wzrostu aktywności enzymów zaangażowanych w generowanie ROS oraz do hiperfiltracji i hipertrofii komórek kłębuszka nerkowego. Towarzyszy temu wzrost produkcji ilości reaktywnych form tlenu, których głównym źródłem jest oksydaza NAD(P)H. Komórki podocytnarne posiadają kilka izoform oksydazy NAD(P)H (NOX1, gp91phox, NOX4). **W badaniach wykazano zależność generacji ROS od stężenia i czasu inkubacji podocytów z glukozą**. Metodą RT-PCR i immunodetekcji, **wykazano obecność czterech podjednostek błonowych NOX1, NOX2, NOX4, p22phox oraz podjednostek cytoplazmatycznych p47phox i p67phox oksydazy NAD(P)H**. Stwierdzono również, że długotrwała inkubacja podocytów w środowisku z wysokim stężeniem glukozy powoduje statystycznie znamiennej wzrost jedynie podjednostki NOX4. (*Publikacja 1.*). W oryginalnych, nowoczesnych badaniach **roli podjednostki NOX4 w indukowaną przez wysokie stężenia glukozy produkcję ROS zastosowano wyciszający RNA (siRNA NOX4)**. Stwierdziliśmy znaczące obniżenie ilości białka NOX4 w podocytach po transfekcji siRNA aktywności oksydazy NAD(P)H w obecności wysokich stężeń glukozy. Wydaje się zatem, że **wzrost generacji ROS w obecności wysokich stężeń glukozy jest związana z nadekspresją podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H** (*Publikacja 1.*). Wykazano również, że podjednostka NOX4 oksydazy **NAD(P)H odgrywa też kluczową rolę w regulacji aktywności SOD, GPx i CAT w komórkach podocytnych ekspozowanych na wysokie stężenia glukozy.** (*Publikacja 1.*)

3. Dalsze badania wykazały że **insulina zwiększa aktywność tego enzymu aktywność i NAD(P)H-zależną generacji rodników nadtlennowych w podocytach i izolowanych kłębuszkach nerkowych.** (*Publikacja 3.*). Tak więc oryginalne wyniki badań habilitantki potwierdzone ostatnio też przez wyniki badań innych autorów w różnych typach komórek wskazują na nowy mechanizm regulatorowy działania insuliny. (*Publikacja 2.*)

4. Oryginalnym odkryciem było również odkrycie zjawiska dimeryzacji PKGI $\alpha$  pod wpływem nadtlenu wodoru jak i przy inkubacji w wysokim stężeniu glukozy czy obecności insuliny. (*Publikacja 2., 3., 4.*). Badania te świadczą „ że w komórkach podocytnych insulina i glukoza są odpowiedzialne za oksydacyjną aktywację PKGI $\alpha$  poprzez aktywację podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H.

5. W dalszych badaniach potwierdzono, że **insulina zwiększa dokomórkowy transport glukozy na skutek aktywacji izoformy PKG $\alpha$  w komórkach podocytarnych. (Publikacja 5.).**

6. Dodatkowo, badania Habilitantki wykazały **nowy mechanizm PKG $\alpha$  w regulacji aparatu kurczliwego komórek podocytarnych**. Wiadomym było, że PKGI wpływa na rozkurcz mięśni gładkich poprzez oddziaływanie z białkami aparatu kurczliwego komórek. Proces skurczu jest regulowany przez kinazę MLCK i odbywa się przez fosforylację seryny w pozycji 19 regulatorowego łańcucha lekkiego miozyny (MLC). Działanie antagonistyczne posiada fosfataza lekkich łańcuchów miozyny, MLCP. MLCP stanowi bezpośredni substrat dla PKG $\alpha$ .

. Stosując swoiste przeciwciała **wykazano, że H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> powoduje wzrost stopnia fosforylacji MYPT1, a jednocześnie zmniejsza stopień fosforylacji MLC** Aktywator PKGI (8-Br-cGMP) powoduje podobny efekt co nadtlenek wodoru i że w obecności nadtlenu wodoru zwiększa się ilość PKG $\alpha$  w obszarze przybłonowym, oraz zmienia się rozmieszczenie fosfatazy MYPT1 Zaobserwowano również znaczny wzrost ilości białka MLC w podocytach inkubowanych w obecności wysokiego stężenia glukozy, przy równoczesnym istotnym spadku stopnia fosforylacji MLC w tym środowisku. Powyższe wyniki sugerują, że warunki **wysokie stężenie glukozy może promować rozkurcz aparatu kurczliwego podocytów. (Publikacja 2.).** Potwierdzono również, że inkubacja komórek podocytarnych z insuliną zwiększa ilość ufosforylowanej fosfatazy MYPT1 i zmniejsza ilość ufosforylowanej miozyny. Przedstawione e tej pracy eksperymenty wskazują, że **insulina poprzez wzrost produkcji reaktywnych form tlenu poprzez aktywację PKG $\alpha$ , bierze również udział, w regulacji aparatu kurczliwego komórek podocytarnych. (Publikacja 3.).**

7. **Znaczenie funkcjonalne** obserwowanych zmian biochemicznych potwierdzono w badaniu **regulacji przepuszczalności bariery filtracyjnej drogą aktywacji kinazy białkowej G** w podocytach przy użyciu albuminy znakowanej fluorescencyjnie (FITC-albumina). Potwierdzono że w obecności nadtlenu wodoru zwiększa się przepuszczalność bariery filtracyjnej. Wysokie stężenia glukozy, jak i insuliny zwiększały przepuszczalność dla albuminy W obecności inhibitora oksydazy NAD(P)H (apocynina) lub kinazy G (Rp-8-Br-cGMP) jak i zastosowanie wyciszenia ekspresji genów dla NOX4 i PKG $\alpha$  obserwowano zahamowanie zjawiska. **(Publikacja 4.). (Publikacja 2.). (Publikacja 3.).**

Podobne zjawiska zmiany przepuszczalności obserwowano w izolowanych **kłębuszkach nerkowych**, jak i w kłębuszkach izolowanych od szczurów z genetycznie uwarunkowaną hiperinsulinemią oraz opornością na insulinę (szczury rasy Zucker). **(Publikacja 3)**

Otrzymane wyniki potwierdzają zatem rolę reaktywnych formy tlenu w regulacji przepuszczalności bariery filtracyjnej.

**Ocena znaczenia celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:**

Powyższe wyniki sugerują, że generowane w stresie komórkowym nerek (hiperglikemia, hiperinsulinemia) wolne rodniki (nadtlenek wodoru) i generowane poprzez oksydacyjną aktywację kinazy białkowej G powoduje aktywację fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny. Ta z kolei poprzez defosforylację lekkich łańcuchów miozyny jest odpowiedzialna za rozkurcz komórki podocytarnej, czego efektem

końcowym jest zwiększona przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Istotną rolę w tym procesie odgrywa aktywacja podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H. Mechanizm ten może mieć kluczowe znaczenie w zwiększonej przepuszczalności filtra kłębuszkowego w stanach patologicznych przebiegających ze zwiększoną akumulacją wolnych rodników jaką jest nefropatia cukrzycowa .

Reasumując opisane powyżej badania wprowadzicie wykonane na modelu zwierzęcym stanowią oryginalny, spójny bardzo istotny wkład w zrozumienie metabolizmu upośledzenia funkcji nefronu, a zwłaszcza uszkodzenia w przebiegu nefropatii cukrzycowej.

Wyniki prezentowane przez przedstawione prace dają istotną podstawę do drogi poszukiwania nowych terapii, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu powikłań cukrzycy.

## **5. Ocena współpracy naukowej i popularyzacji nauki oraz działalności dydaktycznej**

### **Udział w projektach badawczych**

W latach 2002-2005 ( do doktoratu) Habilitantka była wykonawcą trzech projektów badawczych ( w tym jednego promotorskiego) KBN ściśle związanych z tematyką doktoratu.

Płace badawcze niezbędne do realizowanej habilitacji były możliwe dzięki zdobytym projektom głównie NCN . W latach 2008 do chwili obecnej ( zakończenie dwu z nich przewidywane jest w roku 2015/2-16) była kierownikiem czterech grantów, a głównym wykonawcą w dalszych czterech. Zdobyła i prowadziła projekt POMOST (MDiK PAN) dla kobiet w ciąży..

### **Nagrody**

#### *Stypendia:*

1. Habilitantka otrzymała dwa stypendia Firmy L'Oreal oraz Polskiego Komitetu UNESCO - *Kobiety Nauki 2003* w zakresie Biologii Medycznej
2. Otrzymała również stypendium habilitacyjne IMDiK PAN

#### *Wyróżnienia:*

Za swoje osiągnięcia naukowe Habilitantka otrzymała nagrodę naukową Zespołowa II-go Stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad rolą układu purynergicznego w patogenezie podocytopatii cukrzycowej. (2011), oraz dwie nagrody naukowe Dyrektora IMDiK PAN za publikację "Extracellular ATP through P2-receptors activates AMP-activated protein kinase and suppresses superoxide generation in cultured mouse podocytes." (2011), oraz za publikację: "Hydrogen peroxide induces dimerization of protein kinase G type I $\alpha$  subunits and increases albumin permeability in cultured rat podocytes." (2012) ogłoszone w znaczących publikacjach międzynarodowych.

### **Zgłoszenie patentowe**

Habilitantka jest współ autorem międzynarodowego zgłoszenia patentowego

1) Tetracyclic anthraquinone analogues for the restoration of cytotoxic activity of antitumor agents toward multidrug resistant tumor cells.

E. Borowski, B. Stefańska, M. Dzieduszycka, J. Tarasiuk, M.M. Bontemps-Gracz, A. Piwkowska, M. Arciemium, K. Gobi, D. Rogacka, A. Garnier-Suillerot  
Zgłoszenie patentowe w USA nr US60/582,657 z dnia 25.05.2004

#### **Działalność dydaktyczna:**

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN nie prowadzi zajęć dydaktycznych. Wkład Habilitantki w działalność dydaktyczną jest związany z nauczaniem młodszej kadry Zespołu badawczego złożonej metodyki badań doświadczalnych.

Była opiekunem pracy magisterskiej pani Ireny Audzeyenki pod tytułem: „Rola kinazy białkowej G w regulacji aparatu kurczliwego podocytów w warunkach normo- i hiperglikemii.”

#### **5. Wnioski końcowe**

Całokształt dorobku naukowego, rozprawę habilitacyjną jak i przebieg pracy Habilitantki oceniam bardzo wtsoko. Przedstawiony dorobek naukowy wzbogaca wiedzę o mechanizmach działania nie do końca przebadanego mechanizmu angiopatii cukrzycowej

Praca oparta jest o rzetelnie wykonaną od strony podstawowych badań biochemicznych pracę biologa molekularnego potrafiącego wykorzystać zdobytą wiedzę i doswiadczenie Zespołu Badawczego do nowatorskiego kontynuowania tematu badawczego dzięki zdobytym projekom i darze współpracy w zespole. .

W oparciu o całokształt tego oryginalnego dorobku naukowego, przedłożone publikacje stanowiące jednolitą tematycznie znaczącą naukowo całość rozprawy habilitacyjnej, osiągnięcia dydaktyczne, mam zaszczyt przedstawić Centralnej Komisji ds Stopni i Tytułów **wnioszek o dopuszczenie Pani dr n. med. Agnieszki Piwkowskiej adiunkta Zespołu Kliniczno-Badawczego Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.**

Równocześnie **wnioskuje wyróżnienie tej wzorcowej rozprawy Habilitantki jak i spójnego i nowatorskiego dorobku naukowego** ze względu na wskazanie możliwości opracowania nowego typu terapii prewencyjnej powikłań cukrzycy i nefropatii cukrzycowej

Kraków 16 stycznia 2015 roku

Prof dr hab med. Aldona Dembińska-Kieć