

## Ocena

**dorobku naukowego oraz osiągnięcia naukowego będącego podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego**  
**dr nauk medycznych Agnieszki Piwkowskiej, adiunkta w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego PAN.**

Dr Agnieszka Piwkowska ukończyła studia na kierunku biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej w r. 2000. W ciągu kolejnych 4 lat odbywała studia doktoranckie w Katedrze Technologii i Leków tej uczelni a w 2005 r., już na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego obroniła pracę doktorską p.t. *Modulatory białek ABC i antymetabolity w badaniach nad opanowaniem problemu oporności wielolekowej komórek nowotworowych.*

Od roku 2006 zatrudniona jest w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego PAN, uczestnicząc w pracy zespołu badawczego dla którego należałoby użyć określenia „szkoły prof. Angielskiego”, zespołu kierowanego obecnie przez prof. Macieja Jankowskiego.

Aktywność badawcza dr Piwkowskiej zaowocowała łącznie liczbą 21 publikacji (w tym jednej pracy przeglądowej), warto zwrócić uwagę, że w 10 z nich była pierwszym autorem. Natomiast spośród 10 najnowszych publikacji, była pierwszym autorem aż w 9 przypadkach. Wszystkie (21) artykuły ukazały się w periodykach naukowych znajdujących się na tzw. liście filadelfijskiej a ich sumaryczny współczynnik wpływu (IF) wynosi 53.58. Prace te uzyskały łącznie 200 cytowań (bez autocytowań), co złożyło się na tzw. współczynnik Hirscha równy 8 (osiem). Do powyższego dorobku należy dodać autorstwo i współautorstwo 30 komunikatów przedstawionych na zjazdach, kongresach i konferencjach polskich i międzynarodowych, z czego aż w 18 przypadkach streszczenia opublikowano w czasopismach naukowych.

**Dorobek badawczy poprzedzający prace „cyklu habilitacyjnego”**

Był to dorobek merytorycznie znaczący, co potwierdzają także wskaźniki naukometryczne: sumaryczny IF artykułów (po wyłączeniu 5 prac składających się na „cykl habilitacyjny”) wynosi ok. 40. Należy tu wyróżnić dwa główne kierunki badań.

(1) Związane tematycznie z rozprawą doktorską prace (7 publikacji, wszystkie w czasopismach z listy filadelfijskiej) dotyczące mechanizmów oporności nowotworów na leki cytostatyczne. Zbadano i opisano przede wszystkim kompetencyjne właściwości w stosunku do tych leków wykazywane przez modyfikatory aktywności ich białek transportowych. W oparciu o wyniki tych badań zgłoszono także międzynarodowy wniosek patentowy.

(2). Prowadzone już w zespole prof. Jankowskiego badania dotyczące roli układu purynergicznego w regulacji filtracji kłębuszkowej (nagroda Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 2011 r) a także mechanizmu insulinoodporności podocytów - opisano także rolę przemian heksozamin oraz kinazy białkowej aktywowanej przez AMP i zbadano zmiany aktywności ROS. Opublikowane badania (12 publikacji, wszystkie w periodykach z listy filadelfijskiej) mieszczą się już w głównym nurcie badawczym dr Piwkowskiej i całego Zespołu dotyczącym podstaw molekularnych uszkodzenia kłębuszków nerkowych w przebiegu nefropatii cukrzycowej i stanach wiążących się ze zmianami generacji ROS. Z tego właśnie bardzo oryginalnego i bogatego nurtu można było wyodrębnić tematycznie 5 prac składających się na „cykl habilitacyjny” (patrz niżej).

### **Inne aspekty dorobku naukowego i pracy zawodowej**

*Nagrody i wyróżnienia, stypendia.* Dr Piwkowska uzyskała nagrodę zespołową Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad rolą układu purynergicznego w patogenezie nefropatii cukrzycowej (2011 r), oraz dwukrotnie nagrodę Dyrektora IMDiK za najlepsze w Instytucie publikacje (IF>3.5) (2011, 2012).

Uzyskała też stypendium naukowe Polskiego Komitetu UNESCO (Kobiety Nauki 2003 r.) oraz stypendium habilitacyjne IMDiK PAN.

Dr Piwkowska jest też współautorką *zgłoszenia patentowego* w USA, dotyczącego związków przywracających aktywność przeciwnowotworową cytostatyków w przypadkach oporności wielolekowej niektórych guzów nowotworowych.

*Uzyskane granty na badania.* Dr. Piwkowska wykazuje niebywałą skuteczność w uzyskiwaniu grantów. W latach 2011-2013 uzyskała, jako kierownik projektu, cztery granty

NCN i MNiSzW; należy podkreślić, że uzyskanie grantu oznacza wygraną konkursu z szansą sukcesu ok. 20-30%. W szeregu innych grantów była głównym wykonawcą lub wykonawcą. *Działalność dydaktyczna.* Dr. Piwkowska zatrudniona jest w instytucie w którym nie prowadzi się zajęć dydaktycznych dla studentów natomiast kształci się absolwentów przygotowujących prace magisterskie a także doktorantów. W około 10 projektach badawczych wprowadzała młodszych od siebie pracowników (późniejszych współautorów komunikatów zjazdowych i publikacji) w zadania składające się na ich realizację i szkoliła w zakresie stosowanej metodyki. Dr Piwkowska była też oficjalnym opiekunem jednej pracy magisterskiej.

### **Osiągnięcie naukowe w rozumieniu art. 16 ustawy o stopniach i tytułach nauk (14 marca 2003 r) czyli tzw. „cykl habilitacyjny”**

Przedstawione osiągnięcie naukowe (nazywane też tradycyjnie „cyklem habilitacyjnym”), zatytułowane „*Rola kinazy białkowej G i reaktywnych form tlenu w regulacji funkcji podocytów w warunkach fizjologicznych i w wybranych stanach patofizjologicznych*”, przedstawione jest w sposób syntetyczny na 15 stronach maszynopisu, w tym prawie 3 strony to wykaz kluczowych pozycji literatury. Jest to podsumowanie istotnych treści i wniosków wynikających z badań opublikowanych przez dr Piwkowską i jej macierzysty zespół badawczy w pięciu pracach oryginalnych z lat 2011-2014 (we wszystkich artykułach dr Piwkowska była autorem wiodącym).

Należy podkreślić, że z prace zostały opublikowane w czasopiśmie z IF w granicach 2,40 – 4,91 (sumaryczny IF = 18), jest wśród nich tak prestiżowy periodyk jak *Biochimica Biophysica Acta*. Oznacza to, że prace zostały rygorystycznie zrecenzowane przez specjalistów z właściwej dziedziny. Dlatego nie ma potrzeby uzupełniania a tym bardziej weryfikowania tych ocen, warto natomiast wypunktować pewne wątki badawcze, które wydają się mieć najistotniejsze znaczenie dla zrozumienia mechanizmów leżących u podłoża zaburzeń działania błony filtracyjnej nerek w niektórych sytuacjach patologicznych, szczególnie w stanach stresu oksydacyjnego i cukrzycy. Przedstawione przez dr Piwkowską omówienie ma cechy wstępnej wersji pracy przeglądowej (*brief review*), dlatego dodam na marginesie pewne uwagi, być może oczywiste, które mogły by posłużyć do przyszłego ulepszenia i przetworzenia tekstu w tym kierunku.

*Tytuł* cyklu jest adekwatny do przedstawianego zakresu badań. Zaletą tekstu jest, że kolejność omawiania zagadnień wynika z klucza merytorycznego a nie po prostu z chronologii ukazywania się poszczególnych publikacji.

*Wprowadzenie* przedstawia zwięźle strukturę i poznane elementy funkcji błony filtracyjnej nerek (tutaj pomocny byłby rysunek poglądowy, np. zaczerpnięty („wypożyczony”), oczywiście z podaniem źródła). Słusznie rozwinięto wątek dotyczący budowy i sposobu funkcjonowania błon szczelinowych (*slit diaphragm*) i scharakteryzowano reakcję biomolekularną tej błony i podocytów na hormonalne, parakrynne czy fizyczne bodźce zewnętrzne. Jednak stwierdzenie w ostatnim zdaniu *Wprowadzenia*, że kurczliwość podocytów „...może i **powinna** być regulowana przez czynniki naczynioruchowe...” to albo próba posłużenia się niedopuszczalną w naukach przyrodniczych teleologią (jest tak bo to celowe no a cel jest słuszny?) – albo tylko niezręczne sformułowanie.

Omówienie kluczowych własnych badań nad rolą kinazy białkowej G (przede wszystkim PKG I) poprzedzone jest bardzo przejrzystym wstępem. Kluczowym osiągnięciem dr. Piwkowskiej i zespołu było oczywiście wykrycie PKGIa w podocytach (publikacja 2).

Dużo uwagi poświęca się roli w komórkach podocytarnych reaktywnych form tlenu (ROS) a szczególnie ich źródła: oksydazy NAD(P)H. Obecne badania są rozwinięciem ustaleń dr Piwkowskiej i wsp. przedstawionych wstępnie już w r. 2009 i prowadzą ostatecznie do wniosków, że ekspozycja podocytów na wysokie stężenie glukozy („model” cukrzycy) znacznie zwiększa produkcję ROS przez NAD(P)H – w szerszym kontekście interesujące jest, że komórki te mogą zarówno być źródłem znacznych ilości ROS jak i zmieniać swój metabolizm, strukturę i funkcję w odpowiedzi na ich nagromadzenie. Zmiany takie mogą leżeć u podłoża uszkodzenia filtru kłębuszkowego, szczególnie w stanach stresu oksydacyjnego i w cukrzycy, a kluczem do poznania mechanizmów molekularnych tego uszkodzenia było prześledzenie zachowania się kinazy białkowej G I a szczególnie jej podjednostki NOX4. Okazało się, że jej zwiększona aktywność może zaburzać lokalną równowagę antyoksydacyjną w podocytach, czego następstwem są zaburzenia ich funkcji a nawet struktury (głównie publikacja 1).

Ostatnie dziesięciolecie przyniosło bogatą dokumentację roli insuliny w organizacji wewnętrznej struktury podocytów, szczególnie ich szkieletu aktywnego; zmiany te mediowane są także z udziałem rodnika nadtlenkowego. Kluczowym osiągnięciem dr Piwkowskiej i zespołu jest wykazanie wyraźnego wzrostu w obecności insuliny generacji ROS, co zależne było od wzrostu aktywności w podocytach oksydazy NAD(P)H; proces ten można było zahamować za pomocą inhibitorów tej oksydazy (publikacja 3). (N.B.

wypadnięcie jednego słowa w zdaniu:”...zbadaliśmy wpływ insuliny (?? samej, *alone*) oraz w obecności ...” podważa logikę całego stwierdzenia – na szczęście można się domyśleć o co chodzi). W ocenie autorki, uwzględniając podobne działanie insuliny w komórkach innych niż podocyty, mamy tu do czynienia z nową regulatorową ścieżką działania insuliny w ustroju.

Kluczowym przedmiotem zainteresowania było oczywiście znaczenie kolejnego ogniw ścieżki sygnałowej aktywowanej przez stężoną glukozę („model” hiperglikemii) oraz insulinę czyli kinazy białkowej G (publikacje 2, 3, 4, 5). Okazało się, że insulina zwiększa transport glukozy do komórki podocytarnej właśnie poprzez aktywację PG I $\alpha$ . Podsumowując wyniki ciągu badań, zarówno insulina jak i glukoza odpowiadają za aktywację przez ROS sygnałowych molekuł PG I $\alpha$ ., głównie dzięki wzrostowi aktywności podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H.

Nie ulega wątpliwości, że mechanizmy regulujące aparat kurczliwy podocytów leżą u podłoża zmian ich funkcji, także w przebiegu cukrzycy. Są one dosyć złożone (czytający ich opis odczuwa dotkliwie brak odpowiedniego graficznego schematu poglądowego), najogólniej chodzi tu o procesy fosforylacji i defosforylacji lekkiego łańcucha miozyny (MLC). Badania opisane głównie w publikacji 2 wykazały, że kinaza białkowa GI $\alpha$  jest ważnym czynnikiem w regulacji aparatu kurczliwego w podocytach, okazało się także, że wysokie lokalne stężenia glukozy („quasi hiperglikemia”) mogą sprzyjać relaksacji tego aparatu. Dalsze badania wykazały, że aktywacja PG I przez insulinę istotnie wpływa na stopień fosforylacji miozyny a więc jest to także szlak regulacyjny aparatu kurczliwego podocytów (publikacja 3). Takie właśnie zmiany biomolekularne mogą leżeć u podłoża opisywanego w cukrzycy zaniku wypustek stopowatych i powiększenia szczelin filtracyjnych podocytów.

Ostatni podrozdział omówienia, najbardziej interesujący dla fizjopatologa, dotyczy badań ostatecznego wpływu zmian biostruktury podocytów na przepuszczalność filtru kłębuszkowego (głównie publikacje 2, 4), badań które dokumentują wniosek, że aktywacja kinazy białkowej G przez ROS, proces prowadzący do defosforylacji lekkich łańcuchów miozyny, to jeden z kluczowych czynników determinujących przepuszczalność bariery filtracyjnej dla albuminy. (W tym świetnym skądinąd podsumowaniu rażą występujące niekiedy nieprecyzyjne sformułowania, szczególnie „przepuszczalność albuminy” zamiast „przechodzenia czy dyfuzji albuminy”; lepiej określenie „przepuszczalność” stosować dla bariery filtracyjnej, która jest w mniejszym lub większym stopniu „przepuszczalna” albo wykazuje pewną „przepuszczalność”, np. dla albuminy).

Omówienie uzupełnia wybór literatury przedmiotu, słusznie ograniczony do niespełna 40 pozycji; fakt, że tylko osiem z nich pochodzi sprzed r. 2000 dodatkowo uwypukla nowoczesność poruszanej problematyki.

Umiejętność stworzenia omówionego wyżej przeglądu (*brief review*) stanowi potwierdzenie umiejętności badaczki w zakresie dokonywania integracji wniosków z wielu badań, co jest jeszcze jednym dowodem na to, że osiągnęła szczybel rozwoju zawodowego wymagany od samodzielnego pracownika nauki.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawione przez dr Piwkowską „osiągnięcie naukowe” to chwalebny przykład serii badań, które wcale nie zostały zaplanowane w celu uzyskania tytułu doktora habilitowanego ale są tematycznie wyodrębnionym koherentnym fragmentem bardzo istotnego i stale powiększającego się dorobku badawczego.

Zarówno „cykl habilitacyjny” jak i dorobek badawczy jako całość charakteryzują się nowoczesnością i perfekcyjnością wykonania. Nie ma wątpliwości, że w sposób istotny wzbogacają współczesną wiedzę dotyczącą funkcjonowania bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych i patogenyzy zaburzeń tej czynności w stanach stresu oksydacyjnego a szczególnie w cukrzycy. Osiągnięcia te wskazują, autorka ich w pełni spełnia wymagania stawiane samodzielnym pracownikom naukowym.

Dlatego z pełnym przekonaniem składam do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN wniosek o nadanie dr nauk medycznych Agnieszce Piwkowskiej tytułu naukowego doktora habilitowanego w dyscyplinie biologia medyczna.



Prof. dr hab. n. med. Janusz Sadowski

Warszawa, 2015-01-10