

**Ocena dorobku naukowego w postępowaniu habilitacyjnym
dr n. biol. Doroty Rogackiej adiunkta w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i
Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN w Gdańsku.**

Dane ogólne

Dr Dorota Rogacka uzyskała dyplom magister biotechnologii w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w 1999 roku. W latach 1999 – 2004 odbyła studia doktoranckie w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej. W 2005 roku uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych na Wydziale Biologii, Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego na podstawie rozprawy zatytułowanej „Przywracanie aktywności pirarubicyny w stosunku do komórek nowotworowych o oporności wielolekowej” W latach 2007-2010 pracowała na stanowisku adiunkta w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego a od 2011 jest adiunktem w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN w Gdańsku.

Ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy Kandydatki obejmuje 24 prace oryginalne (łącznie z osiągnięciem naukowym) opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku wpływu $IF = 77,777$ oraz punktacji KBN/MNiSW = 656. Pierwszym autorem dr Dorota Rogacka jest w 5 publikacjach i autorem korespondencyjnym w 1 publikacji. Liczba cytowań bez autocytowań wynosi 205, IH wynosi 9. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych dr Rogacka opublikowała 21 prac oryginalnych o łącznym współczynniku wpływu $IF = 70,647$ oraz punktacji KBN/MNiSW = 614. Po odliczeniu cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego sumaryczny IF po doktoracie wynosi 54,068 (KBN/MNiSW = 465). Cennym uzupełnieniem dorobku naukowego dr Doroty Rogackiej jest 36 doniesień zjazdowych (12 na zjazdach krajowych, 24 na konferencjach międzynarodowych).

Poza cyklem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego badania naukowe dr n. biol. Doroty Rogackiej realizowane w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN w Gdańsku dotyczyły podstaw funkcji komórek kłębuszka nerkowego – podocytów - w stanach fizjologicznych i patologicznych oraz czynników endo-/para-/autokrynych regulujących funkcję kłębuszka nerkowego. Główny nurt badań Kandydatki to patogeneza nefropatii cukrzycowej. Poza badaniami insulinooporności

podocytów w cukrzycy dr Dorota Rogacka zajmuje się rolą kinazy białkowej G typu Ia w regulacji kłębuszkowej bariery filtracyjnej i aparatu kurczliwego podocytów w warunkach normo- i hiperglikemii oraz regulacji procesu autofagii w podocytach. Prowadzone badania wykazały po raz pierwszy, że w hodowli pierwotnej komórek podocytarnych obecna jest zależna od cGMP kinaza białkowa G typu Ia (PKG1 α), która w podocytach występuje w lokalizacji z nefryną, w błonach szczelinowych. Wykazano, że PKG1 α jest cząsteczką wrażliwą na stan oksydoredukcyjny komórki a czynnikiem regulującym aktywność tego enzymu jest nadtlenek wodoru. Nadtlenek wodoru prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego komórki i do pięciokrotnego wzrostu przepuszczalności warstwy utworzonej przez podocyty dla albuminy. Badania dr Doroty Rogackiej wykazały, że aktywatory PKG1 α zwiększają wychwyty glukozy w podocytach, podczas gdy zastosowanie inhibitora PKG1 α znosi stymulujący efekt insuliny na dokomórkowy transport glukozy. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na istnienie zależności pomiędzy generowanym w cukrzycy stresem oksydacyjnym, aktywacją PKG1 α , reorganizacją cytoszkieletu aktynowego oraz zmianami w przepuszczalności bariery filtracyjnej. Dalsze badania przepuszczalności warstwy filtracyjnej podocytów dla albumin wykazały udział białek regulujących wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia. Dr Dorota Rogacka wykazała wzajemne oddziaływanie PKG1 α i BKCa oraz TRPC6 w regulacji filtracji kłębuszkowej w odpowiedzi na insulinę. Badania procesów autofagii wykazały, że pod wpływem insuliny w podocytach dochodzi do wzrostu ekspresji genów kodujących markery autofagii: *Atg5* i *LC3*, co sugeruje, że hormon ten wpływa na aktywność procesu autofagii na etapie dojrzewania pęcherzyków autofagosomalnych i że stymulacja autofagii pod wpływem insuliny zależy od poziomu produkcji reaktywnych form tlenu.

O dużej aktywności naukowej dr n.biol. Doroty Rogackiej świadczy kierowanie pięcioma grantami przyznanymi przez NCN oraz realizacja 6 kolejnych projektów jako główny wykonawca. Za swoje osiągnięcia naukowe dr Dorota Rogacka otrzymała pięciokrotnie Nagrodę Naukową Dyrektora IMDiK PAN oraz nagrodę Naukową Zespołową Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego

Osiągnięcie naukowe przedstawione przez Kandydatkę stanowi cykl spójnych tematycznie 5 publikacji zatytułowanych „**Potencjalne mechanizmy indukcji insulinooporności komórek podocytarnych kłębuszka nerkowego**”. Wszystkie prace to publikacje oryginalne, w

heksozamin i polioloowego, aktywacja kinazy białkowej C (PKC), transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β), układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS), zwiększona produkcja zaawansowanych produktów glikacji, nadprodukcja reaktywnych form tlenu. Wyjaśnienie patogenezы nefropatii cukrzycowej i mechanizmów insulinooporności podocytów jest bardzo aktualnym tematem podjętym przez dr Rogacką, gdyż cukrzyca typu 2 stała się wiodącą przyczyną schyłkowej niewydolności nerek w krajach rozwiniętych. Leczenie nerkozastępcze tej populacji jest wyzwaniem dla współczesnych systemów ochrony zdrowia. Poznanie mechanizmów i interwencja na wczesnym etapie rozwoju nefropatii pozwoliłoby ograniczyć progresję choroby.

Wszystkie prace doświadczalne zostały wykonane przez dr n.biol. Dorotę Rogacką na hodowanych podocytach szczura w oparciu o nowoczesny warsztat badawczy Zespołu Kliniczno-Badawczego Molekularnej i Komórkowej Nefrologii.

W przeprowadzonych badaniach Kandydatka wykazała, że długotrwała ekspozycja podocytów kłębuszka nerkowego na wysokie stężenie glukozy prowadzi do indukcji insulinooporności w postaci zniesieniem stymulującego efektu insuliny na dokomórkowy transport glukozy oraz powoduje wzrost przepuszczalności błony filtracyjnej dla albuminy.

Dalsze badania koncentrowały się na próbie wyjaśnienia mechanizmów indukcji insulinooporności w podocytach hodowanych w środowisku wysokich stężeń glukozy, które mogą polegać na zaburzeniach aktywności szlaków regulowanych dokomórkowym napływem substancji odżywczych i zaangażowanych w regulację homeostazy glukozy. Autorka wykazała, że zmniejszeniu wrażliwości podocytów na insulinę towarzyszy spadek stopnia fosforylacji serynowo-treoninowej kinazy białkowej AMPK, będącej miarą aktywności tego enzymu oraz redukcja ilości białka i aktywności enzymatycznej deacetylazy SIRT1. Stwierdziła także związek insulinooporności podocytów ze wzrostem przepływu substratów przez szlak biosyntezy heksozamin. Z badań wynika, że zastosowanie aktywatora AMPK (AICAR) redukuje zaburzenia metaboliczne u szczurów, stąd farmakologiczna aktywacja AMPK może więc stwarzać potencjalne możliwości terapii cukrzycy, znanym, dostępnym aktywatorem AMPK jest metformina (MTF), stosowana w leczeniu cukrzycy typu 2.

Hiperglikemia powoduje powstawanie nadmiaru reaktywnych form tlenu (ROS) i stresu oksydacyjnego, który prowadzi do zaburzeń czynności komórek, zwiększonej przepuszczalności błony filtracyjnej, w konsekwencji twardnienia kłębuszka. Główne źródła

ROS to aktywacja oksydazy NADP(H), która katalizuje powstawanie rodnika nadtlenowego (O_2). Wartościowym osiągnięciem dr Doroty Rogackiej jest wykazanie, że w podocytach głównym źródłem ROS jest oksydaza NAD(P)H, po krótkotrwałej ekspozycji podocytów na wysokie stężenia glukozy aktywność oksydazy NAD(P)H wzrasta o 117%, a produkcja ROS o 27%. Tylko długotrwała ekspozycja podocytów na wysokie stężenia glukozy zmniejszała aktywność AMPK o 25% z towarzyszącą insulinoopornością. Dr Dorota Rogacka badając związek aktywności AMPK z aktywnością oksydazy NAD(P)H wykazała, że metformina działa antyoksydacyjnie zmniejszając produkcję ROS wskutek obniżenia aktywności oksydazy NAD(P)H. Otrzymane wyniki wykazały, że aktywności AMPK i oksydazy NAD(P)H w podocytach są ze sobą powiązane, a antyoksydacyjny efekt metforminy wynika z jej zdolności do aktywacji AMPK. W dalszym etapie pracy Habilitantka badała wpływ reaktywnych form tlenu na aktywność AMPK w podocytach inkubując komórki w obecności H_2O_2 i wykazała, że H_2O_2 bierze udział w regulacji ścieżki sygnałowania insulinowego w podocytach w sposób zależny od AMPK. Zastosowanie aktywatorów AMPK takich jak metformina czy resweratrol powoduje AMPK-zależny wzrost transportu glukozy do podocytów.

W dalszym etapie prac Habilitantka badała, w którym miejscu szlaku sygnałowania insuliny dochodzi do zaburzeń wskutek ekspozycji podocytów na wysokie stężenia glukozy. Ciekawe spostrzeżenie dotyczy oddziaływania insuliny na dokomórkowy transport glukozy, który zależy od ścieżki AMPK-PTEN. Habilitantka wykazała, że ścieżka AMPK-PTEN zaangażowana jest w regulację szlaku sygnałowania insulinowego i wrażliwości podocytów na działanie insuliny, a zaburzenia tego oddziaływania mogą przyczyniać się do indukcji insulinooporności tych komórek.

Kolejne wartościowe badania dotyczyły zmian w ilości/aktywności deacetylazy SIRT1, jako mechanizmu indukcji insulinooporności podocytów. Dr Dorota Rogacka wykazała, że długotrwała ekspozycja podocytów na wysokie stężenia glukozy powoduje zmniejszenie ilości białka SIRT1 o 27% i aktywności deacetylazy o 22% oraz zmienia stan oksydoredukcyjny komórki zmniejszając stosunek NAD/NADH. Dowiodła, że zmniejszenie stopnia fosforylacji AMPK w podocytach eksponowanych na wysokie stężenia glukozy prowadzi do indukcji insulinooporności w sposób zależny od SIRT1.

Kolejnym analizowanym mechanizmem insulinooporności była zwiększona aktywność szlaku biosyntezy heksozamin (HBP), który odpowiada za powstawanie i przemianę glukozaminy (GlcN) w komórce. Oryginalnym spostrzeżeniem Habilitantki, po raz pierwszy opublikowanym w literaturze jest wykazanie, że podocyty charakteryzują się wysokim w

porównaniu z GFAT poziomem białka OGT a w procesie *O*-glikozylacji białek wykorzystywana jest GlcN pochodząca w większości najprawdopodobniej ze środowiska pozakomórkowego, a w mniejszym stopniu wygenerowana na szlaku biosyntezy heksozamin w podocytach. Wzrost przepływu glukozy przez HBP w podocytach prowadził do indukcji insulinooporności tych komórek wskutek podwyższenia poziomu *O*-glikozylowanych białek komórkowych.

Otrzymane wyniki badań wskazują, że AMPK i SIRT1, które odgrywają tak ważną rolę w utrzymaniu równowagi energetycznej komórki mogą stanowić istotny cel molekularny w leczeniu insulinooporności i poprawy wrażliwości podocytów na insulinę a co za tym idzie zapobiegania progresji nefropatii cukrzycowej.

Ocena końcowa

Podsumowując pozytywnie oceniam całokształt działalności naukowej i dokonań

dr n.biol. Doroty Rogackiej. Jest ona dojrzałym, w pełni ukształtowanym, samodzielnym badaczem a jej dokonania mają charakter oryginalny i zasięg międzynarodowy oraz wartościowe implikacje terapeutyczne. Osiągnięcia dr n.biol. Doroty Rogackiej spełniają kryteria określone w artykule 16. ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595 ze zmianami Dz.U. z 2005 r. Nr 164 poz. 1365, Dz.U. z 2010 r. Nr 96 poz. 620 i nr 182 poz. 1228, Dz.U. z 2011 r. Nr 84 poz.455). Mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej IMDiK im. Mirosława J. Mossakowskiego PAN wniosek o dopuszczenie dr n. biol. Doroty Rogackiej do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Warszawa 02.01.2018



Prof. Magdalena Durlik