



Prof. dr hab. Maria Kapiszewska

Kraków, 30 kwietnia 2013

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Stachurskiej Rola Nrf2 i oksygenazy hemowej-1 w uszkodzeniu nerek wywołanych ochratoksyną A

Uwagi wstępne

Czytając pracę naukową zwykle zadajemy sobie pytanie o cel badań, konfrontujemy go ze stanem aktualnej wiedzy, następnie ciekawi nas jakie podejście metodyczne będzie zastosowane do rozwiązania tego problemu i czy założenia badawcze uda się przy pomocy proponowanej metody potwierdzić. Jeśli autor ma wystarczającą wiedzę ale i szczęście (wiemy jak kapryśny jest materiał biologiczny) to wyniki potwierdzają założony cel badawczy. A jeśli nie? To sposób w jaki autor pracy wytłumaczy nam te rozbieżności pokazuje szerokość jego horyzontów, odwagę i erudycję interpretacyjną.

Zacznę od omówienia poszczególnych elementów tytułu prezentowanej pracy. Kto jest jego głównym bohaterem. Mimo, że tytuł pracy wskazuje, że jest nią czynnik transkrypcyjny Nrf2 i enzym oksygenaza hemowa HO-1 to dla mnie jest nim ochratoksyna A. To ona bowiem będzie rozdającym karty w tej grze. To jej obecność w pożywce, w organizmie będzie uruchamiała metaboliczne zmiany na różnych poziomach. Wybranie jej przez mgr Annę Stachurską i poświęcenie kilka lat życia intensywnej pracy wskazuje, że musi ona odgrywać ważną rolę w świecie organizmów żywych. Tak jest istotnie. Niewłaściwe przechowywanie żywności skutkuje zwykle pojawieniem się mykotoksyn. Jak wynika z książki Tony Weisa „Światowa Gospodarka Żywnościowa” produkujemy nadmiar żywności a mimo to liczba głodujących wynosiła 925 mln w roku 2010 i ciągle rośnie. Nie ma miejsca tutaj na analizowanie tego zjawiska ale z samego tego faktu można wnosić, że przechowywanie tego nadmiaru, a następnie jego dystrybucja pozostawia wiele do życzenia. Niestety najczęściej są to warunki sprzyjające rozwojowi pleśni. Powstające w produktach rolnych i w paszach grzyby należące przede wszystkim do rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* niosą ze sobą toksyczne metabolity, potencjalnie zagrażające zdrowiu. Jedną z takich grup metabolitów stanowi ochratoksyna A (OTA). Jak groźnie mogą być takie metabolity wystarczy przywołać wyginięcie Etrusków oraz pomór w Atenach w V w p.n.e. których przyczynę upatruje się w zatruciach toksyną T-2 indukowaną przez *Fusarium* czy też niewytłumaczoną do końca śmierć archeologów pracujących w grobowcach władców egipskich czy nekropolii na Wawelu w grobowcu Kazimierza Jagiellończyka przypisywaną wdychaniu głównego bohatera tej rozprawy czyli OTA odpowiedzialną za niewydolność nerek. Mykotoksyny ze względu na niezwykłą stabilność (nie ulegają nawet rozkładowi przy zastosowaniu obróbki procesach technologicznych) stanowią niezwykle zagrożenie dla zdrowia. Wystarczy powiedzieć, że obecność ich wykrywa się w winie, piwie a nawet prażonej kawie. Mechanizm działania tych związków na organizm nie jest do końca

nas w rolę jaką Nrf2 pełni w nerkach oraz omawia konsekwencje jakie występują po zatruciach OTA u myszy pozbawionych Nrf2^{-/-}. Większa podatność takich myszy na uszkodzenia nerek narażonych na działanie różnych związków wskazuje jednoznacznie na zaangażowanie tego czynnika transkrypcyjnego w proces detoksykacyjny. Potwierdzają to także obserwacje wzrostu ochronnej roli Nrf2 po jego aktywacji. Ta ochronna rola Nrf jest także związana z udziałem w produkcji ECM a także działaniem przeciwzapalnym i przeciwapoptotycznym.

Kolejny podrozdział jest opisem oksygeznazy hemowej HO-1, jej roli w reakcji rozkładu hemu i roli jaką powstający w tym procesie CO odgrywa w regulacji ścieżek sygnałowych. Poziom tego enzymu może być regulowany przez hem, którego zwiększona produkcja odbywa się w kanalikach proksymalnych kory nerki. Poznajemy także udział wielu różnych czynników w regulacji ekspresji *HO-1*. Dowiadujemy się także, że niedotlenienie powoduje wzrost ekspresji *HO-1* w komórkach mysich w związku z obecnością elementów odpowiedzi na niedotlenienie w promotorze *HO-1*, podczas gdy w komórkach ludzkich niedotlenienie powoduje zahamowanie ekspresji *HO-1* co jest związane z redukcją Nrf2. Ten czynnik transkrypcyjny jest jednym z tych (pozostałe zostają także omówione), które indukują ekspresję *HO-1* na poziomie aktywności promotora. Aktywacja transkrypcji następuje przez przyłączenie dimerów Nrf2-Maf. Myszy pozbawione *HO-1*^{-/-} mają zaburzone funkcjonowanie nerek oraz zwiększony poziom uszkodzeń kanalików, zwiększony poziom EMT, ekspresji TGFβ1 oraz zwłóknienie nerek po podaniu cis platyny czy glicerolu. Indukcja ekspresji *HO-1* chroni nerki przed uszkodzeniami. Jest to na przykład widoczne podczas indukcji ekspresji VEGF-A. Ekspresja VEGF regulowana jest nie tylko przez *HO-1* ale przede wszystkim przez niedotlenienie oraz czynniki transkrypcyjne HIF.

W kolejnym podrozdziale omawiana jest rola i własności ochratoksyny A. Ta mykotoksyna produkowana jest przez *Aspergillus ochraceus*, i *Penicillium verrucosum*. Jest ona najczęściej występująca mykotoksyną w pokarmach, powstającą głównie w związku z niewłaściwym magazynowaniem produktów. Jej toksyczne działanie ujawnia się już w niewielkich stężeniach, czyli na poziomie około jednego miligrama w kilogramie ziarna zbóż, przetworów zbożowych, pasz i innych produktów. Ma potencjalnie własności rakotwórcze a także mutagenne spowodowane przez indukowanie uszkodzeń oksydacyjnych w DNA, co stwierdzono u zwierząt laboratoryjnych takich jak szczury i myszy. OTA powoduje wzrost ekspresji białek zaangażowanych w odpowiedź na uszkodzenia DNA takich jak GADD45, proapoptotyczne białko GADD153 oraz aneksyna V. Wywołuje zmiany w nerkach w zakresie dawek od 200 do 4000 µg OTA na kilogram pożywienia. Jej stężenie określa się w surowicy krwi i u osób zdrowych wynosi 0,1-10 ng/ml. OTA po spożyciu odkłada się w nerkach w kanalikach proksymalnych i dystalnych ale także i w wątrobie. OTA wiąże się z białkami surowicy, zwłaszcza albuminy. Okres półtrwania może nawet wynosić ponad 30 dni a u zwierząt jest krótszy i wynosi np. u myszy od 24 do 39 godzin. Kluczową rolę w usuwaniu OTA pełnią nerki i wątroba. Wrażliwość na działanie OTA zależy od gatunku i płci. Dotychczas poznany mechanizm działania wskazuje, że osłabieniu ulega odpowiedź komórki na stres oksydacyjny poprzez zahamowanie aktywności Nrf2, hamowanie GST oraz zmniejszenie poziomu GSH. Efektem tego jest wzrost poziomu RFT, utlenienie lipidów błonowych a tym samym wzrost przepuszczalności błon i wzrost poziomu Ca²⁺. Zaburzenie gospodarki wapniowej obniża żywotność oraz proliferację komórek. OTA moduluje także różne ścieżki sygnałowe zaangażowane w różnicowanie komórek, w apoptozę czy proliferację komórek. OTA aktywuje także atypową kinazę białkową C co aktywuje ERK. Kluczowe w toksyczności tego związku wydaje się zatem zaburzenie równowagi między ERK oraz JNK i p38. Zmiany w aktywności kinaz mogą prowadzić do obserwowanego zahamowania czynnika transkrypcyjnego Nrf2 zaburzając odpowiedź na stres. OTA

wyjaśniony. Nefrotoksyczne działanie OTA i zaangażowanie czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz enzymu oksygenazy hemowej (HO-1) stało się przedmiotem zainteresowań doktorantki. Warto podkreślić, że HO-1, którego ekspresja regulowana jest przez Nrf2, jest od wielu lat przedmiotem badań promotora tej pracy prof. Józefa Dulaka, kierownika Zakładu Biotechnologii Medycznej. Zakład ten może poszczycić się wieloma znaczącymi publikacjami w tej dziedzinie. Niewątpliwie prezentowane w rozprawie nowe fakty określające rolę obydwu tych czynników w zapobieganiu zmianom wywołanym przez OTA, co jak często podkreśla doktorantka nie jest do tej pory określona wzbogaci dorobek naukowy Zakładu.

Wart podkreślenia jest fakt, że część zebranych w rozprawie wyników została już opublikowana w uznanych czasopismach zagranicznych i doktorantka jest ich pierwszym autorem. Współudział doktorantki w 5 innych pracach świadczy o jej dobrej znajomości warsztatu laboratoryjnego a dwie publikacje przeglądowe o dogłębnej wiedzy teoretycznej.

Uwagi do układu pracy i jej merytoryczna ocena

Praca doktorska pani Anny Stachurskiej ma typowy układ charakteryzujący prace doktorskie. Składa się ze Wstępu, Celu Pracy, Materiałów i Metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków i Bibliografii. Napisana jest na 154 stronach w tym 21 stron zajmuje 401 pozycji bibliografii. Liczba ta jest imponująca. Oczekiwałabym jednak większej selektywności w ich doborze.

Uwaga: Dostępność baz danych i programów pozwalających na łatwe przywołanie dowolnych opublikowanych prac w danym zakresie tematycznym powoduje, że autorzy zwykle są mało selektywni w ich cytowaniu. Dużą umiejętnością jest ograniczenie cytowanych pozycji. Wiele renomowanych czasopism ustawia limit w liczbie cytowanych prac. W recenzowanej pracy 68% pozycji literatury cytowane jest we Wstępie pracy. Myślę, że zwłaszcza w tym rozdziale można byłoby w dużej mierze korzystać z prac przeglądowych. W czasach kiedy dostęp do prac naukowych był bardzo ograniczony liczba cytowanych prac stanowiła dodatkową wartość. I jeszcze jedna uwaga, która ułatwiłaby życie czytelnikowi. Zastosowane w tej pracy numeryczne cytowanie literatury stanowi duże utrudnienie. Zdaniem recenzenta zastosowanie układu alfabetycznego pozwoliłoby na przykład czytelnikowi łatwo stwierdzić czy w pracy nie pominięto pozycji literatury, która z jakiegoś punktu widzenia wnosi istotny wkład w badany temat.

Wstęp stanowi około 16 % całej pracy, składa się z 3 głównych rozdziałów i zawiera wyczerpujące informacje o czynniku transkrypcyjnym Nrf2, o oksygenazie hemowej (HO-1) oraz o ochratoksynie A.

W podrozdziale „Czynnik transkrypcyjny Nrf2” znajdujemy informacje ogólne o jego budowie, o regulacji aktywności ze szczegółowym opisem reakcji ubikwitynacji Nrf2 i roli białka Keap1 w tym procesie a także wpływu jaki na ten proces ma stres oksydacyjny. Tak stres oksydacyjny, jak i fosforylacja Nrf2 prowadzą do dysocjacji kompleksów Keap1-Nrf2 i translokacji Nrf2 do jądra, gdzie po związaniu z białkami Maf wiąże się on do elementu odpowiedzi przeciwutleniającej (ARE). Następuje aktywacja transkrypcji genów zależnych od ARE czyli ochrona przed stresem. Następnie przedstawiane są hipotezy oparte na obserwacjach eksperymentalnych a dotyczące mechanizmu zahamowania ekspresji i regulacji aktywności Nrf2. W kolejnym podrozdziale następuje opis indukcji genów kodujących enzymy detoksyfikacyjne, indukcji ekspresji enzymów zaangażowanych w metabolizm reaktywnych związków karbonylowych a także enzymów należących do rodziny UDP-glukuronozylowych, czy enzymów szlaku pentoz a także innych. Te szczegółowe rozważania pokazują, że Nrf2 odgrywa kluczową rolę w ochronie komórek przed szkodliwymi skutkami stresu wywołanego różnymi czynnikami. Rozważania te wprowadzają

powoduje także zahamowanie cyklu komórkowego oraz indukuje apoptozę. Jest to związane z modulacją aktywności p53.

Uwaga: *Zgłaszam postulat dla tej i innych prac doktorskich. Proszę o robienie indeksu. Ogromnie ułatwiłoby to odszukiwanie informacji zawartych w różnych miejscach w pracy. Pozwalam sobie to postulować bo w dobie automatycznie robionej bibliografii, robienie, także automatycznie, takiego indeksu wydaje się jeszcze prostsze.*

Cel pracy – Wiedza zawarta we Wstępie wprowadza nas w jasno sformułowany cel pracy, w której doktorantka zamierza określić jaka jest rola Nrf2 i HO-1 w zmianach jakie OTA wywołuje w świńskich komórkach nabłonka kanalików proksymalnych nerki LLC-PK1 oraz w nerkach myszy z różnym poziomem Nrf^{+/+}, Nrf^{+/-} i Nrf^{-/-} a także z różnym poziomem HO-1 biorąc do badań myszy HO-1^{+/+}, HO-1^{+/-} oraz HO-1^{-/-}. Zmiany te określa także u myszy z normalnym poziomem Nrf oraz z normalnym poziomem HO-1 ale za to dodatkowo indukując je farmakologicznie przy pomocy odpowiednio SFN i CoPPIX.

Materiały i metody - Bardzo przejrzysto i czytelnie zebrany został w tabeli zestaw używanych w badaniach odczynników, ich pochodzenie oraz przypisano im metody w których je zastosowano. Stąd także można dowiedzieć się, że w pracy wykorzystano aż 20 metod aby osiągnąć założony cel. Należą do nich doświadczenia na zwierzętach, hodowle komórkowe, analiza surowicy, izolacja RNA, odwrotna transkrypcja, PCR w czasie rzeczywistym, analiza ekspresji miRNA, produkcja i mianowanie wektorów adenowirusowych, proliferacja komórek, żywotność komórek, cytotoksyczność, produkcja RFT, transfekcja komórek, ELISA, lumineks, izolacja białka, pomiar stężenia białka, hybrydyzacja typu western blot, immunofluorescencja, immunohistochemia.

Uwaga: *Interesujące byłoby w tym zestawieniu znaleźć oszacowaną ilość zastosowaną w badaniach i ich koszt. Dałoby to pojęcie jak planować badania przy ograniczonym budżecie.*

Pytania do modelu in vitro: 1. *Jakie środki ostrożności zastosowano aby uniknąć degradacji ochratoksyny w związku z tym, że „ochratoksyna A wykazuje niestabilność w stosunku do światła dziennego oraz powietrza i nawet krótkotrwała ekspozycja na światło dzienne, powoduje jej rozpad i degradację, zwłaszcza w warunkach wysokiej wilgotności”.* 2. *Czy wiadomo jaki procent OTA pozostaje niezwiązany z białkami surowicy w pożywce, zwłaszcza w przypadku długotrwałej inkubacji?* 3. *Czy wybrane stężenie OTA do stymulacji (dlaczego użyto tego określenia, str. 45) komórek linii LLC-PK1 jest najniższym nietoksycznym stężeniem? Dlaczego czas inkubacji z NAC (1 godz) i DFO (30 min) jest różny?*

Pytania do modelu zwierzęcego: 1. *Nie jest jasne kiedy podawano roztwór SFN. Jeśli „...począwszy od dnia pierwszego” czy należy rozumieć pierwszego dnia od rozpoczęcia eksperymentu? OTA podawano co 2 dni ale SFN też co drugi dzień. Czy należy to rozumieć, że OTA podawano w następnym dniu po kolejnych stymulacjach SFN (str 49), czy może obydwa związki były podawane w tym samym dniu? Czy w doświadczeniu były myszy którym podawano tylko SFN oraz CoPPIX? Ile dawek CoPPIX: „...CoPPIX począwszy od dnia pierwszego raz na tydzień – przez ile tygodni (czy przez 20 dni czyli prawie przez trzy tygodnie – czy to są 3 dawki? Tych wątpliwości nie rozwiewa rysunek 7.23 w rozdz. Wyniki.*

Wyniki: Uzyskane w badaniach wyniki opisano na 65 stronach. Ilustracje obejmują 40 wykresów i zdjęć. W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej LLC-PK1 oraz w modelu zwierzęcym (myszy C57B1/6) poszukiwano mechanizmu odpowiedzialnego za ochronny efekt czynnika transkrypcyjnego Nrf2 i związanej z nim oksygenazy hemowej HO-

1 przed toksycznym działaniem OTA. Doświadczenia koncentrowały się głównie na zastosowaniu takich związków czy warunków, które pośrednio lub bezpośrednio związane są z aktywnością czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz HO-1 i mogą potencjalnie zapobiegać indukowanemu działaniem OTA spadkowi aktywności Nrf2 i HO-1.

W badaniach na poziomie *in vitro* skoncentrowano się na sprawdzaniu żywotności komórek, proliferacji, poziomu RFT, produkcji białka ale także zmian w poziomie białek także na poziomie mRNA z rodziny TGF β , a także VEGF i HIF.

Do eksperymentów z LLC-PK1 wybrano stężenie 25 μ M OTA i inkubowano komórki przez 24 godz. Powołanie się na wyniki opublikowanych przez autorkę rezultatów wskazuje, że stężenie i czas został dobrany tak aby uzyskać spadek poziomu aktywności Nrf2 oraz spadek poziomu mRNA nie tylko Nrf2 ale także dla HO-1. OTA w tym stężeniu nie powoduje zmian w żywotności ale wywołuje spadek proliferacji i wzrost produkcja RFT.

Pytania: 1. czy do spadku aktywności Nrf2 może dochodzić wcześniej, czyli w trakcie inkubacji z OTA. Okres półtrwania Nrf2 wynosi zaledwie 20 min byłoby zatem interesujące zobaczyć w jakim momencie działania OTA (24 godz.) występuje maksymalny spadek tego czynnika transkrypcyjnego równocześnie analizując zmiany w poziomie RFT. Analiza kinetyki spadku aktywności Nrf2 i wzrostu RFT mogłaby rzucić więcej światła na współzależność tych procesów. Co prawda zastosowana procedura utrzymywanie przy pomocy wektorów adenowirusowych nadekspresji Nrf2 i HO-1 miała na celu uniezależnienie się od wpływu zmian związanych z kinetyką badanego zjawiska to dla spokoju sumienia zastosowałabym tą prostą metodę. Zwłaszcza, że sama procedura transdukcji z wektorami Nrf2 i HO-1 nie pozostaje bez wpływu na żywotność, poziom RFT i proliferację jeśli porównać ją z wynikami uzyskanymi w komórkach z wektorami kontrolnymi. Czy stosunek zmian w badanych parametrach (str. 69) jest inny dla transdukcji kontrolnej i z wektorami Nrf2 i HO-1?

Przeciwutleniacze takie jak DFO i NAC zastosowane przed działaniem OTA obniżają produkcję RFT oraz zmniejszają poziom mRNA TGF β indukowany przez OTA.

Pytanie: czy sprawdzano czy zastosowanie antyutleniaczy (bez OTA) wpływa na zmianę w Nrf2 i HO-1? Wydaje się bowiem, że bez sprawdzenia tego faktu wniosek z tego doświadczenia, że „wpływ Nrf2 i HO-1 na ekspresję TGF β może być skutkiem obniżenia przez te czynniki poziomu RFT” może być za daleko idący.

Dalsze badania mechanizmu zmian wywołanych działaniem OTA w tej linii komórkowej pokazały spadek ekspresji VEGF niezależny od ekspresji Nrf2 i HO-1, natomiast zależny od czynnika transkrypcyjnego HIF regulującego ekspresję VEGF. OTA obniża jego aktywność i poziom białka. Wnioski potwierdzono dodatkowo stosując aktywację HIF poprzez niedotlenienie oraz nadekspresję przy pomocy transdukcji HIF. W obydwu przypadkach ograniczało to spadek produkcji VEGF wywołany OTA.

Pytanie: Czy 24. godzinna hipoksja nie spowodowała zmian w żywotności, proliferacji oraz w poziomie RFT? Czy nie wpłynęło to także na zmiany w Nrf2 i HO-1?

Ekspresję VEGF reguluje także p53. W kolejnych doświadczeniach pokazano, że OTA powoduje wzrost poziomu p53 a jej zahamowanie inhibitorem pifitryną- α powoduje wzrost poziomu HIF-2 α , VEGF, Nrf oraz HO-1 obniżonych pod wpływem OTA.

W badaniach na modelu mysim badania stopień uszkodzenia nerek i rolę ochronną Nrf2 i HO-1 po podaniu dootrzewnowo myszom OTA (2,5 mg/kg mc 10 dawek co drugi dzień przez 20 dni). Badania prowadzono zatem na myszach z różnym poziomem Nrf2^{+/+} i Nrf2^{+/-} i pozbawionych Nrf2^{-/-} oraz HO-1^{+/+} i HO-1^{+/-} i pozbawionych HO-1^{-/-}. Pokazały one, że uszkodzenia spowodowane działaniem OTA a sprawdzane markerami biochemicznymi uszkodzenia nerek, są podniesione u myszy bez Nrf^{-/-} a także u myszy bez HO-1^{-/-} potwierdzając istotny udział obydwu tych czynników w uszkodzającym działaniu OTA. OTA wpływa także na ekspresję genów kodujących czynniki regulujące produkcję ECM, cytokiny zapalne, enzymy przeciwutleniające, białka regulowane przez p53 oraz miRNA. Część tych zmian była nasiloną u myszy Nrf2^{-/-} lub HO-1^{-/-}. Wyniki te, jak podkreśla doktorantka są pierwszym doniesieniem o skutkach działania OTA z użyciem myszy pozbawionych Nrf2^{-/-} i HO-1^{-/-}. Brak HO-1^{-/-} nasila toksyczność.

Pytania: 1. Czy OTA była letalna tylko dla myszy z brakiem HO-1 ('37% śmiertelności (3 z 8 zwierząt)'). 2. Po jakiej dawce całkowitej OTA następowała śmierć? 3. Czy śmiertelność się zmieniła kiedy równocześnie z OTA podawano CoPPiX? 4. Czy informacja pod tabelą 7.2 podaje liczbę zwierząt na dany genotyp? 5. W którym momencie myszy uśmiercano (pytanie dotyczy wszystkich doświadczeń). Wydaje się, że po ostatniej dawce OTA. Temu jednak przeczy informacja w Dyskusji, że próbki do analizy pobierano 48 godz. po ostatniej dawce SFN?

Nie udało mi się znaleźć wyniku pokazującego, że OTA podawane co 2 dni przez 20 dni powoduje wzrost poziomu mRNA dla Nrf2 w nerkach (informacja str. 110).

Interesującym wątkiem są badania dotyczące własności immunomodulujących Nrf2 i HO-1 zwłaszcza, że dane literaturowe dotyczące wpływu OTA na odpowiedź zapalną są niespójne a także dlatego, że bazalny poziom badanych czynników zapalnych jest różny w obecności Nrf2 oraz HO-1 i przy ich braku. To może tłumaczyć różną wrażliwość tych myszy na OTA.

Uwagi: Ponieważ indukcja RTF przez OTA wydaje się być odpowiedzialna za wiele badanych w myszach zamian czy nie należało jednak sprawdzić czy ilość RTF w nerkach ulega zmianie, zwłaszcza, że zmierzono aktywność enzymów antyutleniających. Taka sugestia pojawia się w Dyskusji (str 129). Ponadto, indukcja HO-1 wykazuje różne działanie w zależności od stopnia użytego stężenia substancji indukującej. To także potwierdza zasadność sugestii o prowadzeniu badań kinetycznych.

Kończąc uwagi dotyczące Wyników należy podkreślić niezwykłą staranność w prezentacji i opisie przedstawionych wykresów i tabel oraz dbałość w zaznaczaniu istotności statystycznej. Zakres prezentowanych wyników jest tak ogromny, że starczyłoby na jeszcze jedną pracę doktorską. Myślę jednak, że dopiero rozbudowanie kolejnych wskazanych w badaniach tropów badawczych przyniesie lepsze udokumentowanie postawionych hipotez. Nie mam wątpliwości, że będzie to kolejny etap w rozwoju naukowym i awansie doktorantki.

Dyskusja przeprowadzona jest na 25 stronach. Doktorantka omawiając poszczególne aspekty pracy zestawia obok siebie wyniki uzyskane *in vitro* i *in vivo* podkreślając ich zbieżność bądź tłumacząc różnice. Nie zawsze jednak taki układ jest konsekwentny a szkoda. Stara się także tam, gdzie to jest możliwe przytaczać wyniki literaturowe. Przejrzyste diagramy ułatwiają czytelnikowi pobieranie różnych badanych wątków w jedną spójną całość. W Dyskusji zabrakło mi zestawienia różnic w wynikach uzyskanych metodami *in vitro* i *in vivo* i próby ich wyjaśnienia.

Doktorantka wskazuje także jaki mógłby być dalszy ciąg prowadzonych przez nią badań. Szkoda, że niektóre z nich jak np. zbadanie zmian w poziomie RTF w nerkach nie zostały wykonane w ramach tej pracy zamiast innych doświadczeń, które co prawda otwierają nowe wątki ale nie wyjaśniają zbyt wiele jak np. ekspresja miRNA w nerkach myszy w zależności od poziomu HO-1 ale już nie Nrf2. Sama doktorantka podkreśla, że „jeden rodzaj miRNA może regulować ekspresję mRNA kilkuset czynników”. Wydaje się, że jest to wątek przypadkowy i raczej chcący podkreślić uczestniczenie w nowych trendach badawczych. Nie potrzebnie. Praca i tak jest bardzo dobra bez tego.

Uwagi na marginesie

Rozmiar pracy, wszechstronność podejścia do zagadnienia, zastosowana metodologia już na wstępie zapowiadała, że dla czytelnika będzie to ciekawa intelektualnie przygoda. I tak istotnie było. Rozmach w podejściu do tematu był imponujący a liczba zastosowanych metod wskazuje na doskonały warsztat badawczy doktorantki. Także fakt prowadzenia równolegle badań w układzie *in vitro* jak i *in vivo* poszerzają wiarygodność wyników z równoczesnym zwróceniem uwagi na różnice wynikające ze skomplikowanego układu jakim jest żywy organizm. Tak prowadzonych równolegle badań nie jest tak wiele i to zarówno ze względu na ich kosztowność, czasochłonność jak i konieczność posiadania wielu umiejętności. Doktorantka podjęła się tego wysiłku co niewątpliwie znacznie podnosi wartość i wiarygodność dokonanych obserwacji. Szkoda, że użyta w badaniach linia komórkowa nie jest linią myśią, tak jak model zwierzęcy. Zwłaszcza w związku z informacją, że efekty wywołane przez OTA „różnią się w zależności od gatunku i płci” (str 38) a komórki kanalików proksymalnych nerek są bardziej wrażliwe niż komórki np. szczurze. Zestawienie wyników z takich badań na pewno byłoby bardzo cenne. Zwłaszcza, jak podkreśla doktorantka w Dyskusji (str 109) jest to pierwsze doniesienie o zmianach wywołanych przez OTA u myszy Nrf2^{-/-} oraz HO-1^{-/-}.

Jak bardzo jest to innowacyjna tematyka świadczy liczba prac umieszczonych w WEB of Knowledge a dotycząca zarówno ochratoksyny A, jak i Nrf2. Jest ich 8 w tym jedna doktorantki. Zaledwie dwie dotyczące ochratoksyny A i skutków na HO-1, w tym także jedna doktorantki.

Podsumowanie. W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Anny Stachurskiej zatytułowana „Rola Nrf2 i oksygenazy hemowej-1 w uszkodzeniu nerek wywołanych ochratoksyną A” spełnia w pełni wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Anny Stachurskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie uważam, że a rozmach i innowacyjność prezentowanej rozprawy w pełni zasługują na jej wyróżnienie.

M. Kapienka