



KATEDRA BIOCHEMII FARMACEUTYCZNEJ

ul. Święcickiego 4
60-781 Poznań

tel.: + 48 61 854 66 20
fax: + 48 61 854 66 20
e-mail: baerw@ump.edu.pl

Poznań, 15 kwietnia 2013

OCENA

Rozprawy doktorskiej
magister **Anny Stachurskiej**

p.t. „Rola Nrf2 i oksygenazy hemowej-1 w uszkodzeniu nerek wywołanym ochratoksyną A”

Ochratoksyna A (OTA), mikotoksyna produkowana przez wiele gatunków pleśni rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*, jest powszechnie występującym zanieczyszczeniem żywności. OTA wywołuje różne efekty toksyczne, z których najpoważniejszą, jako stwierdzono wykorzystując przede wszystkim gryzonie jako model doświadczalny, to nefro-toksyczność i nefro-kancerogenność. Pomimo długoletnich badań, mechanizm toksycznego działania OTA, a szczególnie kancerogenności nie jest do końca poznany, a jego znajomość jest konieczna do właściwej oceny ryzyka ekspozycji na ten związek w odniesieniu do ludzi. Dotyczy to m.in. aktywności genotoksycznej OTA. Recenzowana praca opisująca możliwy udział modulacji Nrf2 i oksygenazy hemu-1 w efekcie nefro-toksycznym OTA dobrze wpisuje się w ten nurt. Choć hamowanie aktywności Nrf2 jako jeden z efektów działania OTA był już częściowo opisany, nigdy nie badano tego zjawiska tak systematycznie jak w recenzowanej rozprawie.

W tej niezwykle obszernej pracy imponuje ilość przeprowadzonych doświadczeń, zarówno *in vitro* jak *in vivo* oraz różne podejścia eksperymentalne mające na celu wszechstronne zbadanie efektu związanego z wyznaczonym celem molekularnym - ścieżkami przekazywania sygnału związanymi z Nrf2. Tak obszerna praca mogła powstać tylko w dobrze zorganizowanym zespole, a więc uznanie należy się nie tylko autorce, ale i promotorom.

Praca ma układ tradycyjny typowy dla tego typu opracowań. Opis eksperymentów i uzyskanych wyników poprzedza obszerny wstęp oparty na 273 pozycjach literaturowych. Autorka podsumowuje w nim aktualny stan wiedzy na temat Nrf2 i kontrolowanych przez ten czynnik genów oraz charakterystykę i działanie OTA. Są to zasadniczo informacje zaczerpnięte wyłącznie z piśmiennictwa anglojęzycznego (wyjątek stanowią artykuły w *Postęпах Biochemii*, które autorka także cytuje w wersji angielskiej). W tym języku autorka publikuje również swoje własne prace, co jest zrozumiałe, ale wiąże się z pewnymi trudnościami w opisie omawianych zjawisk w języku polskim. Dotyczy to nie tylko niezręcznych sformułowań, takich jak, np. poziom bazalny powtarzający się w

całej pracy, czy efekt podniesiony, bądź waga ciała zamiast masa, ale prowadzi też niekiedy to błędnej interpretacji lub skrótów myślowych, które do niej prowadzą.

I tak np. na str 21 autorka pisze, że glutation jest substratem peroksydazy glutationowej z czym trudno się zgodzić, bo GSH jest kofaktorem cyklu katalitycznego peroksydazy, a substratem nadtlenu wodoru. Podobnie na str 22 dosyć dowolnie interpretowane są wyniki przedstawione w odnośnikach 42, 55, 56.

Synteza hemu (str 27) nie jest jak pisze autorka, prowadzona przez wszystkie komórki jądrzaste (istotne w tym procesie jest mitochondrium, a nie jądro), lecz przez komórki erytroidalne szpiku kostnego (85%) i hepatocyty. W wątrobie syntetyzowana jest głównie grupa prostetyczna cytochromu P450. Nawiązanie do tego ostatniego na str 28 to też skrót, bo reakcje katalizowane przez P450, nie zawsze prowadzą bezpośrednio do eliminacji ksenobiotyków, a mogą natomiast przyczyniać się do ich aktywacji do bardziej reaktywnych metabolitów. Sugeruje się, że taki mechanizm może wiązać się z genotoksycznością OTA. W kilku miejscach (np. na str 38) autorka utożsamia „lipid peroxidation” z utlenianiem lipidów, a to dwa różne procesy.

Autorka zdaje sobie sprawę z możliwych nieprawidłowości w tłumaczeniu nazewnictwa i podaje w nawiasach nazwy angielskie, co z kolei w większości przypadków jest niepotrzebne, bo jak np. w odniesieniu do glutationu są to wyrażenia podręcznikowe.

Rycina 4.5 podsumowująca aktualny stan wiedzy na temat działania OTA nie uwzględnia Nrf2, choć jak wspomniano wyżej było ono już opisane u szczurów (Marin-Kuan et al. 2006)

Choć wstęp jest bardzo obszerny nie wylania się z niego wyraźna hipoteza badawcza, a cel pracy jest sformułowany zadaniowo. Jednym z nich, jak to określa autorka jest „określenie wpływu farmakologicznej indukcji Nrf2 sulforafanem, a HO-1 CoPPIX”. Nie są to określenia uprawnione, ponieważ zarówno sulforafan, jak i pozostałe zastosowane w pracy induktory lub inhibitory nie są lekami.

Badania *in vitro* w linii komórkowej LLC-PK1 autorka poprzedza oceną wpływu OTA na żywotność i proliferację komórkową. Na podstawie tej oceny dobiera dawkę nie wywołującą obniżenia żywotności, którą wykorzystuje do dalszych niezwykle systematycznych badań prowadzących do wykazania najpierw modulacji przez OTA aktywacji i ekspresji Nrf2, a potem szerokiej gamy elementów, które z tym efektem mogą być powiązane.

Wykazuje więc m.in. że obniżony poziom Nrf2 wiąże się z obniżoną proliferacją komórkową, zwiększoną produkcją RFT i ekspresją TGFβ2, co może być przyczyną zwłóknienia nerek. Przy tej okazji nasuwa się uwaga: poziom RFT w przeciwieństwie do pozostałych parametrów wyrażano jako % kontroli/ stęż białka (Rys 7.1 i 7.4). Czy poziom RFT w kontroli nie był przeliczany na mg białka ?

Szczególnie ciekawą obserwacją jest obniżenie ekspresji VEGF oraz jego powiązanie z niedotlenieniem, a szczególnie odwrócenie tego zjawiska przez zahamowanie p53. Ciekawa byłaby analiza tego zjawiska w kontekście metabolicznego profilu/fenotypu komórki nowotworowej. Zastosowanie komórek z nadekspresją Nrf2 i HO-1, w których stwierdzono odwrócenie zjawisk wywołanych OTA w modelu podstawowym pozwoliło autorce potwierdzić istotną rolę zahamowania aktywacji Nrf2 i w cytoksycznym działaniu OTA.

Efekty zaobserwowane *in vitro* autorka stara się zweryfikować *in vivo* wykorzystując myszy C57BL/6 dzikie oraz pozbawione Nrf2 lub HO-1. O ile w badaniach *in vitro* dawka OTA została dobrana na podstawie testu MTT, uzasadnienie dawki i schematu podawania tego związku zwierzętom nie jest podane. Autorka deklaruje zainteresowanie efektem nefro-toksycznym, ale przy takim okresie podawania (20 dni, 2.5 mg /kg masy ciała, co dwa dni) nie można wykluczyć działania prowadzącego do inicjacji kancerogenezy. Warto by też było określić odniesienie tych stężeń do ekspozycji ludzi na ten związek.

Wyniki badań *in vivo* zasadniczo potwierdziły obserwacje *in vitro*. U myszy Nrf2^{-/-} i HO-1^{-/-} stwierdzono nasilenie ekspresji czynników, które mogą sprzyjać zwiłknieniu nerek, w tym ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne. Opisując te ostatnie (str. 80 i wcześniej) autorka określa GR i GSTA1, jako enzymy metabolizmu, glutationu, co jest kolejnym skrótem myślowym. W metabolizmie GSH, czyli syntezie i degradacji tego peptydu uczestniczą inne enzymy, o których zresztą autorka wcześniej pisała (str. 21).

Badania *in vivo* wykazały dodatkowo także wzrost markerów stanów zapalnych (cytokiny) szczególnie u myszy Nrf2^{-/-} i HO-1^{-/-} co może mieć związek zarówno z toksycznym jak i kancerogennym działaniem OTA. Potwierdza tym samym opisany dobrze związek Nrf2 z ze stanami zapalnymi stanowiącymi podłoże wielu nowotworów..

Uzyskane wyniki autorka omawia w rozdziale Dyskusja. Rozdział ten ma trochę nie typowy układ i podzielony jest na części odnoszące się do poszczególnych etapów badań, co ułatwia komentarz do dużej liczby danych, których praca dostarcza. Poszczególne podrozdziały są raczej omówieniem wyników własnych i w stosunkowo w niewielkim stopniu stanowią konfrontację z wynikami innych autorów. Oczywiście w dużej mierze wynika to z unikalnego podejścia badawczego. Osobiście odczuwam pewien niedosyt z powodu braku dyskusji uzyskanych wyników w kontekście genotoksyczności. Choć sugeruje się, że zwiększony pod wpływem OTA stres oksydacyjny w powiązaniu z silną cytotoksycznością może być istotnym czynnikiem decydującym o selektywnej indukcji nowotworów nerki, (np. Kamp et al. 2005), to pojawiają się również opinie, (Hibi et al. 2013), że to nie stres oksydacyjny, a inne czynniki przede wszystkim związane z naprawą DNA, są odpowiedzialne za genotoksyczność OTA i indukcję tumorogenezy w nerkach.

Na podstawie uzyskanych wyników autorka przedstawia w formie schematów możliwe skutki oddziaływania OTA związane z obniżoną aktywacją/ekspresją Nrf2 (Rys 8.3) i wysokiego poziomu

HO-1 (Rys 8.4). Ten ostatni jest szczególnie interesujący, ponieważ pokazuje, że choć prawidłowe poziomy tego enzymu chronią przed niektórymi skutkami działania OTA, to zwiększona indukcja może przyczynić do nasilenia efektów toksycznych.

Podsumowując swoje badania autorka formułuje 9 wniosków w rozdziale tak zatytułowanym. Byłoby lepiej jednak zatytułować ten rozdział Podsumowanie i Wnioski, bo w dużej mierze są one powtórzeniem wyników.

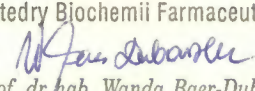
Bibliografia wykorzystana w pracy jest niezwykle obszerna. Łącznie liczy 403 pozycje. Wszystkie odnośniki są poprawnie cytowane. Wydaje się jednak, że bibliografia mogłaby być nieco skrócona, gdyby autorka zrezygnowała z cytowania niektórych prac oryginalnych szczególnie tych starszych, jak np. 303 i 304, a zamiast nich powołała się w większym stopniu na prace przeglądowe.

Wymienione powyżej uwagi odnoszą się tylko do strony redakcyjnej pracy lub są dyskusyjne. Wartość merytoryczną pracy oceniam bardzo wysoko. Uzyskanie wyników z tak szeroko zaplanowanych badań wymagało nie tylko dużej wiedzy, znakomitego przygotowania laboratoryjnego, ale i ogromu pracy, co dodatkowo podnosi jej wartość.

Podsumowując stwierdzam więc, że badania przedstawione w pracy zostały rzetelnie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są bardzo wartościowe. Praca zawiera elementy nowości i stanowi o indywidualnym wkładzie doktorantki do piśmiennictwa dotyczącego zagadnienia będącego przedmiotem dysertacji.

Przedstawiona do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim co pozwala mi wnosić o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie magister Anny Stachurskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Na tej podstawie pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Anny Stachurskiej i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto biorąc pod uwagę fakt, że część wyników przedstawionych w pracy została już opublikowana, wnioskuję o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK
Katedry Biochemii Farmaceutycznej

Prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska