Mgr Beata Marciniak

Tytuł rozprawy: „Ocena genotoksyczności alfa-amanityny w komórkach szpiku kostnego myszy"

Promotor:

Dr hab. n. med. prof. nadzw. Tomasz Ferenc

Wstęp: Alfa-amanityna to najbardziej aktywna toksyna wyizolowana m. in. z muchomora sromotnikowego (*Amanita phalloides*). LD_{50} dla człowieka wynosi 0,1 mg/kg m.c. Substancja ta, będąca bicyklicznym oktapeptydem, ma działanie wielonarządowe, jednak w szczególności uszkadza komórki wątroby i nerek. Główne działanie α-amanityny w jądrze komórkowym polega na blokowaniu polimerazy RNA II, a tym samym na zahamowaniu transkrypcji i następowej syntezy białek, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki. Ponadto postuluje się, że α-amanityna może prowadzić do uszkodzeń komórek poprzez wpływ na zwiększenie puli reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach.

Cel pracy: Celem pracy była ocena genotoksyczności α-amanityny w komórkach szpiku kostnego myszy za pomocą testów cytogenetycznych: testu kometowego, testu strukturalnych aberracji chromosomowych i testu mikrojądrowego. Ponadto, ocena potencjalnego działania pro-oksydacyjnego α-amanityny w oparciu o oznaczanie aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych w lizatach erytrocytów myszy.

Materiały i metody: Badania przeprowadzono na samcach myszy szczepu BALB/c (Zgoda nr 55/Ł439/2008). Każdorazowo grupę doświadczalną stanowiło 10 myszy. Substancję badaną stanowiła α-amanityna (Sigma-Aldrich) podawana dootrzewnowo w czterech doświadczalnie ustalonych dawkach tj.: 0,05 mg/kg m.c.; 0,1 mg/kg m.c.; 0,15 mg/kg m.c.; 0,25 mg/kg m.c. (LD_{50}). Kontrolę negatywną stanowił 0,9 % NaCl, natomiast kontrolę pozytywną cyklofosfamid (Sigma-Aldrich) w dawce 50 mg/kg m.c. Badania przeprowadzono niezależnie za pomocą trzech testów cytogenetycznymi tj. testem kometowym, testem strukturalnych aberracji chromosomowych oraz testem mikrojądrowym. Ponadto wykonano badania analityczne tj. oznaczanie aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) oraz badanie stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Do przeprowadzenia analizy statystycznej otrzymanych wyników zastosowano następujące testy: Shapiro-Wilka, t Studenta i U Manna-Whitneya. Poziom ufności istotności statystycznej przyjęto na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki: Wyniki uzyskane za pomocą testów cytogenetycznych przedstawiają się następująco: w teście kometowym dla każdego z badanych stężeń α-amanityny zanotowano istotny statystycznie wzrost procentowej zawartości DNA w ogonie komety (% DNA w ogonie) w porównaniu do kontroli negatywnej ($p < 0,0001$); w teście strukturalnych aberracji chromosomowych zaobserwowano istotny statystycznie wzrost częstości występowania aberracji dla trzech stężeń α-amanityny tj: 0,05; 0,15; 0,25 mg/kg m.c. ($p < 0,05$); w teście mikrojądrowym zanotowano istotny statystycznie wzrost częstości erytrocytów polichromatycznych z mikrojądrami (MNPCE [%]) dla stężeń 0,1 i 0,25 mg/kg m.c. ($p < 0,05$).

Aktywność badanych enzymów przedstawiała się następująco: dla wszystkich badanych stężeń α-amanityny zaobserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności SOD w porównaniu do kontroli negatywnej ($p < 0,05$); dla stężeń 0,05 i 0,25 mg/kg m.c. zaobserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności CAT w porównaniu do kontroli negatywnej ($p < 0,05$), natomiast dla pozostałych stężeń tj. 0,1 i 0,15 mg/kg m.c. aktywność CAT nie różniła się istotnie statystycznie ($p > 0,05$); stężenia TBARS we wszystkich testowanych dawkach α-amanityny nie różniły się istotnie statystycznie w porównaniu do kontroli negatywnej ($p > 0,05$).

Wnioski:

1. Większość testowanych dawek α-amanityny powodowała istotny statystycznie wzrost częstości strukturalnych aberracji chromosomowych i częstości mikrojąder, co może wskazywać na klastogenne działanie tej toksyny (potencjalny efekt klastogenny).
2. Badane testem komety dawki α-amanityny powodowały istotny statystycznie wzrost częstości uszkodzeń DNA, co wskazuje na genotoksyczne działanie tej toksyny (efekt genotoksyczny).
3. Zanotowane zmiany aktywności badanych enzymów antyoksydacyjnych tj. dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w lizatach erytrocytów myszy mogą wskazywać na pro-oksydacyjne działanie α-amanityny.
4. Wyniki uzyskane w testach cytogenetycznych oraz badaniach analitycznych wskazują, że utlenianie DNA może być główną przyczyną obserwowanych uszkodzeń materiału genetycznego.

Promotor

Doktorantka