



WYDZIAŁ  
BIOLOGII  
I OCHRONY  
ŚRODOWISKA



Uniwersytet  
ŁÓDZKI

Uniwersytet Łódzki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin

Dr hab. Alina Błaszczyk, prof. nadzw. UŁ  
Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej  
i Biotechnologii Roślin  
Uniwersytet Łódzki

### Recenzja

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Marciniak pt. „Ocena genotoksyczności  $\alpha$ -amanityny w komórkach szpiku kostnego myszy” wykonanej w Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem prof. nadzw. dr hab. n. med. Tomasza Ferenc**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Beaty Marciniak dotyczy oddziaływania  $\alpha$ -amanityny na materiał genetyczny myszy.  $\alpha$ -Amanityna jest toksyną, polipeptydem o stosunkowo prostej budowie, obecną w muchomorze sromotnikowym. Toksyna ta jest przyczyną wielu zatruc po spożyciu grzyba, który przez niedoświadczonych grzybiarzy często mylony jest z jadalną czubajką kanią. Skutki spożycia tego grzyba dla człowieka są tragiczne a szansa na przeżycie i wyzdrowienie zależy od ilości spożytych grzybów, wieku, stanu zdrowia i cech osobniczych.

Na poziomie komórkowym  $\alpha$ -amanityna hamuje aktywność polimerazy II RNA, czego efektem jest nieodwracalne uszkodzenie i zablokowanie transkrypcji DNA i w konsekwencji zatrzymanie syntezy białek strukturalnych i enzymatycznych, co prowadzi do śmierci komórki. W ostatnich latach podejmowane są badania mające na celu wykorzystanie tej aktywności  $\alpha$ -amanityny w leczeniu chorób nowotworowych. Przyłączenie toksyny do nośników, które uwalniałyby ją w lekko zakwaszonym środowisku charakterystycznym dla środowiska komórek nowotworowych, umożliwiłoby wywołanie śmierci komórek nowotworowych. Stwierdzono, że połączenie  $\alpha$ -amanityny z substancjami lipofilowymi może

ułatwić jej przenikanie przez błonę komórkową, a także zwiększa wielokrotnie siłę jej działania, dzięki czemu mogłaby być ona stosowana w niewielkich, mikromolarnych stężeniach.

Pani mgr Beata Marciniak podjęła się zadania oceny genotoksyczności  $\alpha$ -amanityny. Analizy prowadziła zarówno na poziomie DNA jak i na poziomie chromosomów. Zagadnienie to nie było wcześniej tematem badań naukowych, a w świetle wyżej wspomnianych eksperymentów analizujących możliwość jej zastosowania w leczeniu nowotworów zbadanie sposobu oddziaływania  $\alpha$ -amanityny na wszystkie elementy strukturalne komórki jest celowe, w związku z czym przebadanie właściwości genotoksycznych tego związku jest uzasadnione.

Rozprawa doktorska Pani Marciniak ma układ typowej eksperymentalnej pracy naukowej i obejmuje 86 stron maszynopisu. Pomijając streszczenia i spis literatury rozprawa zawiera sześć podstawowych rozdziałów: *Wstęp* (1), *Cele pracy* (2), *Materiały i Metody* (3), *Wyniki* (4), *Dyskusję* (5) i *Wnioski* (6).

Pierwszy rozdział, *Wstęp*, stanowi ogólne wprowadzenie do tematyki badawczej rozprawy. Podzielony został na cztery główne podrozdziały, które dotyczą: biologii muchomora sromotnikowego (1), toksykologii (2), zatruc muchomorem sromotnikowym (3) oraz uszkodzeń materiału genetycznego (4). W drugim z tych podrozdziałów Autorka przedstawiła ogólną charakterystykę substancji toksycznych muchomora sromotnikowego należących do dwóch grup: fallotoksyn oraz amatotoksyn. Bardziej szczegółowo omówione zostały właściwości  $\alpha$ -amanityny i jej działanie na poziomie komórkowym i tkankowym. W podrozdziale o zatruciach muchomorem sromotnikowym przedstawiono jakie są objawy zatrucia, jakie metody stosuje się w diagnostyce zatruc oraz jakie stosuje się leczenie. Najbardziej obszernym podrozdziałem *Wstępu* jest podrozdział dotyczący uszkodzeń materiału genetycznego. Autorka przedstawiła ogólną charakterystykę czynników genotoksycznych, szczególną uwagę zwróciła na udział reaktywnych form tlenu w indukowaniu uszkodzeń DNA oraz działanie systemów antyoksydacyjnych komórki. Opisane zostały również rodzaje uszkodzeń materiału genetycznego, zarówno te obserwowane na poziomie DNA (miejsca apurynowe i apirymidynowe, jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA, modyfikacje zasad azotowych i reszt cukrowych, kompleksy koordynacyjne i in.), jak i te obserwowane na poziomie chromosomu (aberracje chromosomowe i mikrojądra). W rozdziale tym znalazłam pewne uchybienia i błędy, które czasem zdarzają się podczas redagowania rozpraw doktorskich:

- na str. 23 Autorka pisze „Utleniona guanina ma powinowactwo do cytozyny...” . Powinno być: .... Utleniona guanina na powinowactwo do adeniny....

- na str. 25 Autorka pisze „.....dochodzi do powstania replikacji typu tranzycji...”. Chodziło chyba o mutację typu tranzycji.

- na str. 27 Autorka pisze: „Interkalacja jest rodzajem uszkodzenia DNA...”. Interkalacja to wnikanie płaskich cząsteczek pomiędzy zasady azotowe (jak dalej wyjaśnia Autorka), w wyniku którego następuje zaburzenie struktury DNA. Wg mnie nie powinno się nazywać procesu wnikania cząsteczek pomiędzy zasady azotowe uszkodzeniem DNA - uszkodzenie DNA jest skutkiem interkalacji.

*Wstęp* jest napisany w sposób staranny i przejrzysty, niestety ilustrowany jest tylko dwiema rycinami, z których pierwsza przedstawia wzór strukturalny  $\alpha$ -amanityny, druga – schemat pokazujący mechanizmy działania czynników genotoksycznych. Brakuje mi we *Wstępie* np. rycin, które schematycznie przedstawiłyby typy strukturalnych aberracji chromosomowych czy powstawanie mikrojąder. Ryciny takie na pewno w sposób istotny wzbogaciłyby tę część rozprawy doktorskiej.

*Cele pracy* zostały sformułowane prawidłowo i są adekwatne do przeprowadzonych badań.

W rozdziale *Materiały i metody* mgr Marciniak opisała sposób przeprowadzenia doświadczeń. Opis stosowanych metod jest dokładny i staranny (z jednym błędem dotyczącym stosunku kwasu octowego i metanolu, który jest odwrócony: jest 3:1, powinno być 1:3; str. 37), pozwala na powtórzenie doświadczeń bez sięgania do wyjściowej literatury. Autorka wykonywała eksperymenty *in vivo* na komórkach szpiku kostnego z wykorzystaniem myszy szczepu BALB/c, na co uzyskała zgodę Lokalnej Komisji ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Do oceny genotoksyczności badanego związku została zastosowana metoda elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym (test komety) oraz klasyczne metody cytogenetyczne: test aberracji chromosomowych i test mikrojądrowy. Mogłoby się wydawać, że wykorzystanych testów jest niewiele, jednakże należy podkreślić, że w zastosowanych klasycznych metodach cytogenetycznych analiza preparatów jest bardzo czasochłonna, zwłaszcza w teście aberracji chromosomowych. Ponadto, aby analiza została przeprowadzona w sposób prawidłowy wymagane są duże umiejętności rozpoznawania poszczególnych chromosomów i ich aberracji, w związku z czym w początkowym etapie realizacji postawionych przed Doktorantką zadań badawczych musiała ona zapewne sporo czasu poświęcić na naukę analizy preparatów, korzystając z pomocy bardziej doświadczonych współpracowników i Promotora. Zaplanowane doświadczenia wykonywane były na myszach, którym  $\alpha$ -amanityna podawana była dootrzewnowo na 48 h. **Chciałabym zapytać Doktorantkę dlaczego zastosowała taki czas traktowania zwierząt badanym związkiem a nie krótszy, np. 24-godzinny?** W teście aberracji chromosomowych bowiem

analizę efektów działania związków powinno analizować się w pierwszej mitozie po zadziałaniu badanego czynnika. Jest to spowodowane tym, iż w trakcie kolejnych podziałów mitotycznych efekty działania testowanego związku mogą nie być widoczne, bowiem uszkodzenia DNA są naprawiane, uszkodzone chromosomy mogą być gubione podczas kolejnych mitoz, a w komórkach z poważnymi aberracjami może zostać zaindukowana śmierć apoptotyczna. W teście komety z kolei, po tak długim czasie od momentu podania zwierzętom badanego związku w komórkach również mogą zostać uruchomione komórkowe systemy naprawy DNA i po 48-godzinnym traktowaniu zwierząt badanym związkiem można nie zaobserwować wszystkich zaindukowanych wcześniej uszkodzeń DNA.

*Wyniki.* Uzyskane wyniki Autorka przedstawiła w sposób bardzo przejrzysty i czytelny na 8 wykresach i w 8 tabelach, zamieściła również dokumentację fotograficzną. Statystyczne analizy jakie zostały wykonane w recenzowanej rozprawie doktorskiej są prawidłowe i upoważniły Autorkę do wyciągnięcia wniosków. Porównując wyniki zawarte w Tabeli 2 oraz w Tabeli 3 można zauważyć, iż w Tabeli 2 wkradły się błędy liczbowe polegające na tym, iż w wartościach pokazujących średnią liczbę aberracji na 1 komórkę jest o jedno zero po przecinku za dużo. Zwracam na to uwagę, aby Doktorantka nie powieliła tego błędu w przyszłości przy przygotowywaniu wyników testu aberracji chromosomowych do publikacji.

W *Dyskusji* Doktorantka miała trudne zadanie przeanalizowania własnych wyników na tle wyników innych autorów, bowiem badań właściwości genotoksycznych  $\alpha$ -amanityny na podobnym materiale badawczym jest po prostu brak. W związku z powyższym Autorka postanowiła omówić wyniki badań *in vivo* innych toksyn występujących w różnych organizmach. Jak stwierdziła Autorka rozprawy jedynymi dostępnymi pracami doświadczalnymi na zwierzętach obejmującymi po części tematykę poruszaną w Jej pracy są prace oceniające aktywność enzymów antyoksydacyjnych i w tym zakresie Autorka była w stanie omówić uzyskane przez siebie wyniki w porównaniu z wynikami innych autorów. Z drugiej strony szkoda, iż mgr Marciniak ograniczyła się w *Dyskusji* tylko do omówienia wyników uzyskanych w badaniach właściwości  $\alpha$ -amanityny w warunkach *in vivo*. Autorka w *Dyskusji* nie omówiła zagadnienia wykorzystania  $\alpha$ -amanityny jako leku i nie odniosła się do wyników nielicznych, ale opublikowanych badań *in vitro* dotyczących indukcji apoptozy przez tę toksynę, jej efektu antyproliferacyjnego i związanego z tymi właściwościami jej antynowotworowego potencjału. **Chciałabym poprosić Doktorantkę o komentarz - jakie jest Jej zdanie na temat możliwości zastosowania  $\alpha$ -amanityny jako leku przeciwnowotworowego?**


W rozdziale 6 Autorka sformułowała cztery wnioski. Na podstawie wyników testu aberracji chromosomowych i testu mikrojądrowego Doktorantka stwierdziła, iż badany związek jest potencjalnie klastogenny. Z kolei wyniki testu komety (statystycznie istotny wzrost poziomu uszkodzeń DNA w porównaniu z kontrolą negatywną oraz zależność dawka-efekt) upoważniły Autorkę do stwierdzenia, że  $\alpha$ -amanityna ma działanie genotoksyczne. Procent uszkodzonego DNA obserwowanego w ogonach komet był jednak niezbyt wysoki, dlatego uważam, iż należałoby zaznaczyć, iż jest to działanie raczej słabo genotoksyczne. Autorka stwierdziła również, że obserwowane uszkodzenia materiału genetycznego spowodowane są prawdopodobnie pro-oksydacyjnym działaniem  $\alpha$ -amanityny.

*Spis literatury* obejmuje 144 pozycje, które uporządkowane są alfabetycznie i dodatkowo ponumerowane. Autorka stosuje jednak nietypowy, niespotykany w opracowaniach naukowych sposób cytowania publikacji w tekście pracy: podaje numery publikacji, przy czym pierwszą cytowaną publikacją (na str. 8) jest pozycja nr 15, a kolejnymi 13, 45, 57..., co według mnie nie jest właściwe (przy systemie liczbowym pierwsza cytowana praca powinna być oznaczona nr 1, następnie kolejnymi liczbami i w takiej kolejności powinny być umieszczone w spisie cytowanych publikacji). Należy jednak podkreślić, że mimo takiego nietypowego systemu cytowania można bez problemu odnaleźć cytowane publikacje w spisie literatury zamieszczonym na końcu opracowania.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest oryginalnym dziełem Autora, porusza zagadnienia, które nie były do tej pory badane, można więc stwierdzić, że są w niej elementy nowości i należy ona do pionierskich prac odnośnie tej tematyki badań. Sformułowane na podstawie uzyskanych wyników wnioski końcowe odpowiadają zamierzonemu celowi pracy. Przedstawione powyżej drobne błędy występujące w rozprawie nie wpływają na walory poznawcze i końcową pozytywną jej ocenę. Należy również podkreślić, że duża część uzyskanych przez Doktorantkę wyników została opublikowana w czasopiśmie *Toxicon* (IF<sup>2013</sup> = 2,924).

**Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Beaty Marciniak spełnia w mojej opinii wymogi stawiane dysertacjom doktorskim. Wnoszę więc do Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Łódź, dnia 02.06.2014 r.

  
dr hab. Alina Błaszczyk, prof. nadzw. UŁ