

Prof. dr hab. Gerard Drewa
Em. profesor Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Ocena
rozprawy doktorskiej

mgr biol. Beata Marciniak na temat „Ocena genotoksyczności α -amanityny w komórkach szpiku kostnego u myszy”.

Uwagi ogólne

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Beata Marciniak składa się z dziewięciu rozdziałów, z których pięć podzielono na podrozdziały, co czyni dysertację bardziej przejrzystą. Wydruk komputerowy obejmuje 86 stron i oparty jest na 144 pozycjach dobrze dobranego piśmiennictwa.

Jestem pod dużym i pozytywnym wrażeniem wiedzy doktorantki na temat mechanizmów działania α -amanityny. Toksyna ta powoduje destrukcję hepatocytów tak na drodze nekrozy, jak i apoptozy. Autorka powołuje się tutaj m.in. na doniesienia naukowe Piotrowskiej i wsp. opublikowane w 2011 roku w *Exp. Toxicol. Pathol.* i w *Human Exp. Toxicology*.

W wyniku uszkodzenia hepatocytów i komórek innych narządów (trzustka, nerki) wzrasta w organizmie aktywność wolnych rodników tlenowych, a także poziom produktów peroksydacji lipidów. Doktorantka zna dobrze patomechanizmy bezpośredniego działania α -amanityny na hepatocyty i skutki prowadzące m. in. do uszkodzenia kwasów nukleinowych, struktur komórkowych i stłuszczenia komórek, jak i reakcje wtórne przebiegające pod wpływem wytworzonych wolnych rodników tlenowych.

Autorka rozważa ciąg kolejnych zdarzeń wynikających z działania wolnych rodników tlenowych o różnym stopniu reaktywności, które degradują błony biologiczne, białka i kwasy nukleinowe. Pod ich wpływem następuje uszkodzenie materiału genetycznego na poziomie DNA (mutacje genowe) i na poziomie chromosomów (mutacje strukturalne i/lub liczbowe). Wytworzone w nadmiarze wolne rodniki tlenowe na poziomie DNA modyfikują zasady azotowe na drodze oksydacji, alkilacji, deaminacji i modyfikują reszty cukrowej. Wolne rodniki tlenowe prowadzą m.in. do wytworzenia wiązań krzyżowych i powstania analogów zasad azotowych. Na poziomie chromosomów wolne rodniki tlenowe odpowiadają za powstanie aberracji liczbowych i strukturalnych oraz mikrojąder.

W drodze ewolucji człowiek wytworzył mechanizmy obronne w postaci enzymów antyoksydacyjnych, które neutralizują nadmiar tlenu i wolnych rodników tlenowych. Należą do nich dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa. Ich rola i reakcje katalizowane przez wymienione enzymy zostały szczegółowo opisane. Podczas gdy procesy prowadzące do pęcznienia mitochondriów, stłuszczenia komórek i objawy zatrucia muchomorek sromotnikowym są naukowo wyjaśnione, działanie genotoksyczne α -amanityny nie jest do końca poznane.

Na podstawie znajomości piśmiennictwa i posiadanej szerokiej wiedzy, Doktorantka określiła cele badań określające ocenę genotoksyczności α -amanityny w komórkach szpiku kostnego myszy za pomocą trzech testów cytogenetycznych: testu kometowego, aberracji strukturalnych oraz testu mikrojądrowego.

Podjęła również próbę oceny działania prooksydacyjnego α -amanityny poprzez oznaczanie aktywności niektórych enzymów antyoksydacyjnych w lizatach erytrocytów myszy.

W rozdziale „Materiały i metody” prawidłowo wyznaczyła LD_{50} wynoszące 0,25mg/kg m.c. Poza dawką LD_{50} przyjęła trzy stężenia 0,05, 0,1 i 0,15 mg/kg m.c. myszy.

W celu porównania wyników eksperymentu z kontrolą wykonała dwa testy kontrolne; jeden pozytywny dla testu kometowego oraz negatywny z solą fizjologiczną i nadtlenkiem wodoru. Wszystkie stosowane odczynniki były najwyższej czystości chemicznej. Eksperyment wykonano za zgodą Lokalnej Komisji ds. Doświadczeń na Zwierzętach (zgoda nr 55/Ł 439/2008).

Przebieg eksperymentu opisano precyzyjnie tak, że można go powtórzyć w każdym laboratorium tej klasy, jakim dysponuje Katedra Farmakologii Ogólnej i Klinicznej UM w Łodzi. Test kometowy pozwala wykryć uszkodzenia DNA i ich efektywną naprawę w komórkach eukariotycznych, test struktury aberracji chromosomowych *in vivo* pozwala wykryć złamania i przerwy w chromatydach i wymiany między nimi, test mikrojądrowy *in vivo*, jest najczęściej stosowany w badaniach genotoksyczności różnych związków chemicznych, gdyż wykrywa tak uszkodzenia klastrogenne chromatyd, jak i uszkodzenia wrzeciona kariokinetycznego.

Badania biochemiczne natomiast dotyczyły oznaczenia aktywności dwóch enzymów antyoksydacyjnych tj. dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy oraz stężenie produktów peroksydacji lipidów.

Analizę statystyczną wyników wykonano programem Statistica firmy Stat Soft wersja 9.

Wyniki badań przedstawiono w ośmiu tabelach, na tyluż rycinach i fotografiach. Dowodzą one, że wszystkie stosowane stężenia α -amanityny działają genotoksycznie i powodują istotny statystycznie wzrost procentowy zawartości DNA w ogonie komety. W teście aberracji strukturalnych chromosomów, liczba tych mutacji wzrosła około 0,006/komórkę. Najczęstszymi aberracjami strukturalnymi były przerwy chromatynowe i złamania chromatydowe.

W teście mikrojądrowym Autorka stwierdziła, iż tylko stężenia 0,1 i 0,25 mg α -amanityny powodują wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, przy czym

aktywność katalazy jest istotna statystycznie wyższa tylko po najniższym i najwyższym stężeniu tej toksyny.

α -amanityna nie wpływa na wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów, co wykazują reakcje tych produktów z kwasem tiobarbiturowym.

W Dyskusji Autorka porównuje swoje wyniki testów cytogenetycznych z wynikami innych autorów opisujących np. działanie nikotyny na materiał genetyczny. Porównania te prowadzi wielowątkowo, analizuje je tak na poziomie zmian w DNA, jak i zmian w aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

W dyskusji cytuje wielu autorów zajmujących się problemem cytotoksyczności różnych związków chemicznych egzogennych.

Dyskusję kończą cztery wnioski, które podkreślają odkrycia Doktorantki nad cytotoksycznością α -amanityny w komórkach szpiku kostnego myszy.

Uwagi szczegółowe

Dysertacja Pani mgr biol. Beaty Marciniak jest samodzielną nowatorską pracą naukową.

Wstęp jest dobrze napisaną monografią na temat genotoksyczności α -amanityny w oparciu o najnowsze i dobrze dobrane piśmiennictwo.

Badania prowadzone przez Doktorantkę są absolutnie nowatorskie. Na uwagę zasługuje fakt podjęcia wyjaśnienia mechanizmów uszkodzenia materiału genetycznego, przez testowaną mykotoksynę.

Wykonany eksperyment i napisana rozprawa świadczy o dużej wiedzy i zdolnościach Autorki do samodzielnego rozwiązywania naukowych problemów i prowadzenia eksperymentów.

Doktorantka osiągnęła zamierzony cel badań, przedstawiła wyniki czytelnie, dobrze opracowane statystycznie i graficznie. Całość kończą cztery wnioski poprawnie sformułowane, wieńczące dysertację.


Pragnę tutaj podkreślić pewną wyjątkowość; otóż część wyników badań mgr Beata Marciniak opublikowała w renomowanym piśmie naukowym jakim jest *Toxicon* (63, 2013, 147-153) o współczynniku oddziaływania $IF=2,924$ jeszcze przed obroną.

Najczęściej doktoranci publikują fragmenty swoich prac doktorskich dopiero po obronie.

Uwagi końcowe

Na podstawie przedstawionych faktów tak w uwagach ogólnych jak i szczegółowych zwracam się z całym przekonaniem do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr biol. Beaty Marciniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Po przeprowadzeniu obrony proszę również o rozważenie możliwości wyróżnienia tej pracy nagrodą J.M. Rektora.

Prof. dr hab. n. med. Gerard Drewno
85-066 BYDGOSZCZ
ul. Konarskiego 11/2



Bydgoszcz, 30 maja 2014 r.