

6. STRESZCZENIE

Akrylamid (AA) to niebezpieczny związek chemiczny występujący w żywności. Biotransformacja AA zachodzi głównie w wątrobie. AA i jego pochodne tworzą połączenia z hemoglobina (Hb) dlatego związek może wpływać na funkcje i obraz krwi. Ponadto z biotransformacją AA wiąże się jego wpływ na funkcjonowanie nerek oraz śledziony, narządów, które pełnią ważną funkcję w jego metabolizmie oraz wydalaniu z organizmu, a ponadto wykazują istotny wpływ na obraz krwi. Metabolizmowi AA towarzyszy wytwarzanie reaktywnych form tlenu, aktywacja systemu przeciwutleniaczy, co wpływa na równowagę redoks oraz strukturę i funkcję narządów ważnych dla metabolizmu ksenobiotyków w organizmie. AA i jego metabolity mogą powodować uszkodzenia składników komórek, utlenianie cząstek biologicznych oraz uszkodzenia materiału genetycznego narządów zaangażowanych w jego metabolizm.

W niniejszej pracy przyjęto założenie, że podanie kationów metali odgrywających istotną rolę w funkcjach antyoksydacyjnych może wpływać na zmniejszenie objawów toksycznego działania AA. Suplementacja jonów magnezu (Mg^{2+}) i cynku (Zn^{2+}) - kationów będących kofaktorami kilkuset substancji enzymatycznych biorących udział w różnych przemianach, w tym biotransformacji ksenobiotyków i neutralizacji wolnych rodników może zmienić oddziaływanie AA na obraz krwi oraz strukturę i funkcję wątroby, nerek i śledziony.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu AA, Mg^{2+} i Zn^{2+} na parametry morfologiczne krwi, tj. stężenia leukocytów (WBC), limfocytów (Lymph), erytrocytów (RBC), Hb i wartość hematoktytu (HTC) oraz przeżywalność komórek szpiku kostnego. Ponadto celem pracy była ocena statusu antyoksydacyjnego, poprzez zbadanie stężenia glutationu zredukowanego (GSH) i aktywności enzymów antyoksydacyjnych tj. dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GSH-Px) i katalazy (CAT) w wątrobie, nerkach i śledzionie myszy po podaniu AA, kationów Mg^{2+} i Zn^{2+} , oznaczenie wskaźnika peroksydacji lipidów tj. dialdehydu malonowego (MDA) w wątrobie i nerkach a także ocena ekspresji kaspaz-3 i zmian strukturalnych w wątrobie, nerkach i śledzionie myszy po podaniu AA, Mg^{2+} i Zn^{2+} . Ponadto w pracy dokonano oceny aktywności wybranych enzymów wątrobowych, tj. fosfatazy zasadowej (ALP), aminotransferazy alaninowej (ALT) i gamma-glutamylotransferazy (GGT) w wątrobie myszy po podaniu AA oraz kationów Mg^{2+} i Zn^{2+} .

W badaniach przeprowadzono dwa eksperymenty *in vivo*, w których do doświadczeń wykorzystano myszy białe szczepu swiss. W pierwszym z nich myszom podawano AA w dawkach 20 mg/kg mc i 40 mg/kg mc oraz jony Mg^{2+} w dawce 5 mg/kg mc. W drugim

eksperymentcie zwierzętom podano AA (takie same dawki jak w pierwszym eksperymencie) oraz kationy Zn^{2+} w dawce 3,5 mg/kg mc. AA, Mg^{2+} i Zn^{2+} były podawane w postaci wodnych roztworów *per os*, przez 10 dni. Mysiom z grupy kontrolnej podawano wodę pitną. Krew do badań morfologicznych pobrano z żyły ogonowej, po 24 godzinach od pierwszego podania oraz po 24 godzinach od ostatniego podania kationów oraz AA. Po eutanazji pobrano wątrobę, nerki oraz śledzionę do badań biochemicznych i histologicznych. Hodowlę i analizę żywotności komórek szpiku kostnego wykonano w eksperymencie *in vitro* na komórkach szpiku kostnego pobranego z kości udowej królika. Wpływ AA (o stężeniu 1 mM, 2,5 mM, 5 mM i 10 mM) oraz jonów Mg^{2+} (40,8 mg) i Zn^{2+} (0,65 mg) na szpik kostny oceniono wykonując test żywotności komórek szpiku kostnego (MTT).

Analizy hematologiczne wykonano w krwi pełnej przy użyciu analizatora hematologicznego. Pomiar wskaźników równowagi oksydacyjno-redukcyjnej, tj. stężenie MDA, GSH, aktywność GSH-Px, SOD, CAT oraz enzymatycznych wskaźników funkcji wątroby, tj. aktywność ALP, ALT oraz GGT oznaczono wykorzystując opisane w literaturze metody badawcze oparte na spektrofotometrycznych technikach pomiaru absorbancji. Oznaczenia kaspaz-3, barwienia podstawowe i DAPI preparatów histologicznych w wątrobie, nerkach oraz śledzionie myszy wykonano za pomocą barwień rutynowych i immunohistochemicznych (IHC).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że AA wpłynął na parametry krwi, tj. stężenie WBC, Lymph, RBC, Hb oraz wartość HTC. Suplementacja kationami Mg^{2+} i Zn^{2+} spowodowała, że analizowane parametry morfologiczne krwi u zwierząt poddanych działaniu AA częściowo powracały do wartości kontrolnych. Zaobserwowano, że podanie AA w kulturach *in vitro* komórek szpiku kostnego obniżało ich żywotność natomiast podanie jonów Mg^{2+} częściowo znosiło ten efekt. AA spowodował istotny wzrost stężenia MDA, zmiany w aktywności ALP, ALT i GGT, wzrost aktywności kaspaz-3 oraz zmiany histopatologiczne w wątrobie, nerkach i śledzionie. Zmianom tym towarzyszyły zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej. Spadek stężenia GSH oraz zmiany w aktywności GSH-Px, SOD i CAT w wątrobie, nerkach oraz śledzionie mogą świadczyć o tym, że mechanizm uszkodzeń narządowych wywołanych przez AA związany jest ze stresem oksydacyjnym. Suplementacja Mg^{2+} i Zn^{2+} powodowała częściowy powrót stężenia GSH i aktywności badanych enzymów wątrobowych do wartości kontrolnych, co wskazuje na ochronne działanie zastosowanych jonów podczas toksycznego działania AA.

Przeprowadzone badania wskazują, że AA miał umiarkowany wpływ na parametry krwi. Zmiany w morfologii krwi, które wystąpiły po podaniu AA, Mg^{2+} i Zn^{2+} mogą być

między innymi związane z wpływem na żywotność komórek szpiku kostnego. Suplementacja magnezem i cynkiem wydaje się być korzystna dla ogólnego stanu organizmu ponieważ zaobserwowano, że po jej zastosowaniu analizowane parametry morfologiczne krwi u zwierząt poddanych działaniu AA częściowo wracały do wartości kontrolnych. Zaobserwowanym zmianom towarzyszyły zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej co może świadczyć o tym, że mechanizm uszkodzeń narządowych wywołanych przez AA związany jest ze stresem oksydacyjnym. Suplementacja magnezem i cynkiem, kationów biorących udział w utrzymaniu równowagi redoks, powodowała zmniejszenie toksycznych efektów AA we wszystkich badanych narządach, co również potwierdza oksydacyjny charakter uszkodzeń zaobserwowanych w narządach myszy poddanych działaniu AA.