

**MECHANIZMY HEPATOTOKSYCZNOŚCI
 α -AMANITYNY ORAZ PORÓWNANIE SKUTECZNOŚCI
ODTRUTEK STOSOWANYCH W TERAPII ZATRUĆ
MUCHOMOREM SROMOTNIKOWYM –
PRZEGLĄD BADAŃ NA HODOWLACH KOMÓRKOWYCH**

MECHANISMS OF α -AMANITIN HEPATOTOXICITY
AND COMPARATIVE ANTIDOTAL EFFICACY OF SUBSTANCES
USED IN *AMANITA PHALLOIDES* INTOXICATION –
A REVIEW OF EXPERIMENTS ON PRIMARY HEPATOCYTE CULTURES

Jan MAGDALAN

Katedra i Zakład Farmakologii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

Streszczenie: W badaniach na hodowlach ludzkich i psich komórek wątrobowych wykazano, że uszkodzenie hepatocytów indukowane α -amanityną (α -AMA) przebiega w dwóch fazach; pierwsza ma głównie charakter czynnościowy i cechuje się upośledzeniem zdolności hepatocytów do syntezy białka oraz mocznika, zaś w drugiej dochodzi do obumierania tych komórek w drodze nekrozy i/lub apoptozy. Apoptoza hepatocytów indukowana α -AMA jest zależna od kaspazy-3 i białka p53. Ponadto α -AMA pobudza aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w hepatocytach i jednocześnie hamuje aktywność katalazy, co sprzyja peroksydacji lipidów i potęguje uszkodzenie komórek wątroby. Stwierdzono także, że silibinina, acetylocysteina, ceftazydym i rifamycyna są skutecznymi odtrutkami przeciwko α -AMA, jednakże ich efektywność nie przewyższa skuteczności benzylopenicyliny, która wciąż pozostaje najpowszechniej stosowaną odtrutką w terapii zatrucia muchomorem sromotnikowym.

Słowa kluczowe: α -amanityna, apoptoza, hepatocyty, peroksydacja lipidów, odtrutki.

Summary: The course of α -amanitin (α -AMA) toxicity in cultured canine and human hepatocytes is divided into 2 phases. The first phase comprises mainly functional cell impairments expressed by inhibition of protein and urea synthesis. The second stage is lethal and is characterized by ongoing necrosis and/or apoptosis. α -AMA-induced apoptosis in human hepatocyte cultures is p53- and caspase-3-dependent. Moreover, α -AMA causes increase in SOD activity, reduction of CAT activity and a significant increase in lipid peroxidation in cells, which may contribute to its severe hepatotoxicity. The findings of the experiments on human hepatocyte cultures demonstrate also, that antidotal efficacy of silibinin, acetylcysteine, ceftazidime or rifamycin was comparable to benzylpenicillin – the most often currently used antidote in *Amanita phalloides* intoxications.

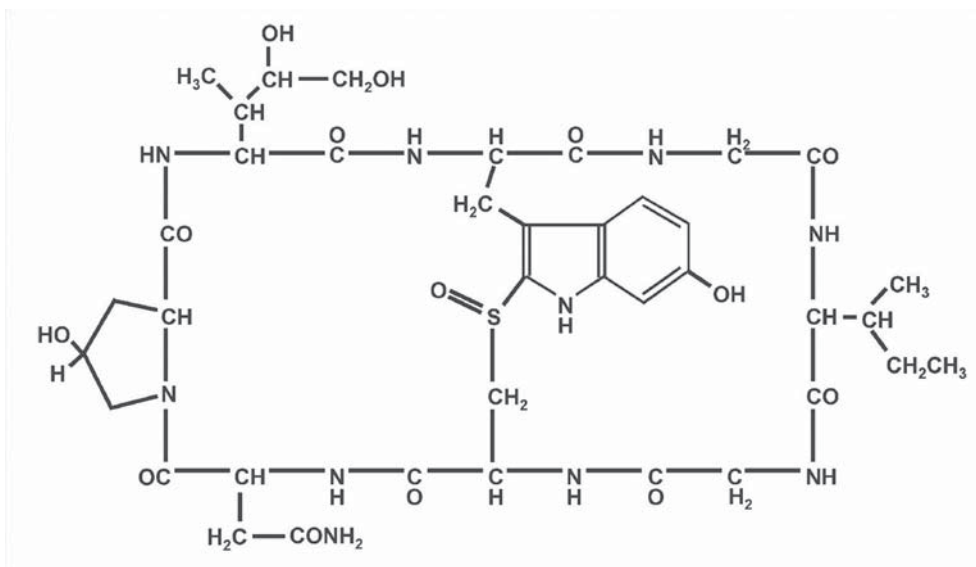
Key words: α -amanitin, apoptosis, hepatocytes, lipid peroxidation, antidotes.

Praca nie była dofinansowywana ani sponsorowana.

WSTĘP

Ocenia się, że aż 95% wszystkich śmiertelnych przypadków zatruc grzybami na świecie jest skutkiem spożycia muchomora sromotnikowego (*Amanita phalloides*) lub jego podgatunków; muchomora jadowitego (*Amanita virosa*) i muchomora wiosennego (*Amanita verna*) [29, 31]. Muchomor sromotnikowy zawiera dwie główne grupy toksyn o budowie wielopierścieniowych peptydów określanych jako fallotoksyny oraz amatoksyny [4, 7, 31]. Fallotoksyny uszkadzają błony komórkowe, jednakże nie wchłaniają się z przewodu pokarmowego człowieka i dlatego odpowiadają jedynie za objawy nieżytu żołądkowo-jelitowego w przebiegu zatrucia [4, 31]. Natomiast za uszkodzenie narządów wewnętrznych, a zwłaszcza wątroby, odpowiedzialne są amatoksyny (α -, β -, δ -, ϵ -, γ -amanityna, amanina, amaninamid, amanulina, kwas amanulinowy i proamanulina). Jeden średniej wielkości owocnik muchomora sromotnikowego zawiera 5–8 mg amatoksyn, podczas gdy już dawka 0,1 mg/kg masy ciała wystarcza do uśmiercenia dorosłej osoby [4].

Spośród wszystkich amatoksyn kluczową rolę w patogenezie uszkodzeń narządów wewnętrznych przypisuje się α -amanitynie (α -AMA) [10, 26, 31]. α -AMA (ryc. 1) zawarta w grzybach nie ulega inaktywacji przez żadną z form obróbki kulinarnej. Nie niszczy jej zamrażanie, suszenie, solenie, gotowanie ani smażenie, ponieważ jej temperatura rozkładu wynosi 254–255°C. Nie znane są także żadne enzymy degradujące tę toksynę [3, 26, 31]. U ludzi α -AMA szybko wchłania się z przewodu pokarmowego, a w surowicy można ją wykryć już po 30 min od zjedzenia grzybów. Z kolei wydalanie z moczem trwa do 72 godzin [11]. Wątroba wychwytyuje aż 57% krążących we krwi amanityn i jest głównym narządem



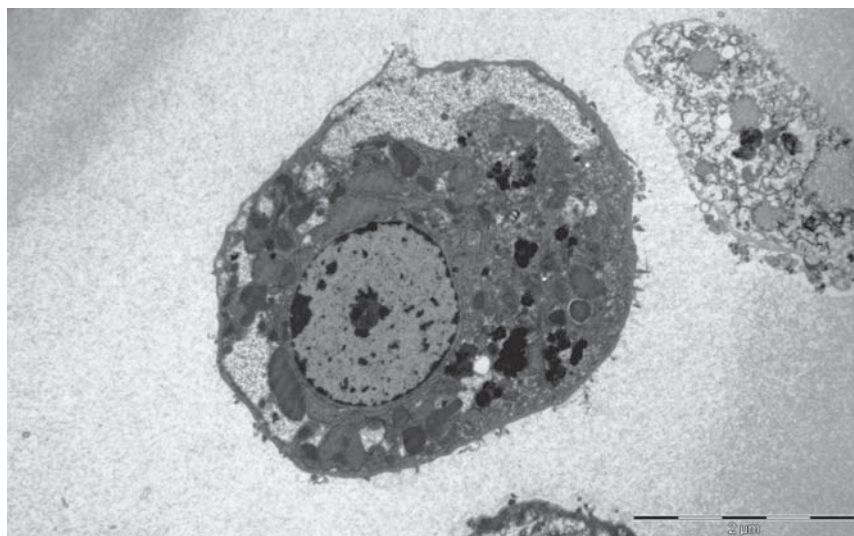
RYCINA 1. Wzór strukturalny α -amanityny (na podstawie [15], zmodyfikowane)
 FIGURE 1. Structural formula of α -amanitin (based on [15], modified)

krytycznym w przypadku zatrucia muchomore mromotnikowym [4, 14, 26, 28, 31]. α -AMA przenika do komórek wątroby przy udziale polipeptydu transportującego aniony organiczne 1B3 (OATP1B3), który jest zlokalizowany w błonie komórkowej hepatocytów [15]. Następnie nieodwracalnie łączy się z największą podjednostką polimerazy II RNA (RPB1) hamując transkrypcję, a w konsekwencji syntezę białek, w tym syntezę enzymów. To z kolei prowadzi do śmierci komórek [4, 26, 31].

Od dawna wiadomo, że skutkiem zatrucia amanitynami jest rozległa martwica wątroby. Niestety prawie wszystkie dane na temat zmian morfologicznych wątroby w przebiegu zatrucia muchomore mromotnikowym pochodzą z badań pośmiertnych, a więc przeprowadzonych dopiero po kilku dniach trwania choroby. U zatrutych muchomore mromotnikowym nie wykonuje się biopsji wątroby, co uniemożliwia przyżyciowe pobranie materiału do badań. I dlatego wciąż tak niewiele wiadomo o zaburzeniach funkcji i struktury komórek wątrobowych pojawiających się w początkowym okresie zatrucia. Cenną możliwość uzupełnienia naszej wiedzy stwarzają eksperymenty z wykorzystaniem hodowli hepatocytów. Doświadczenia takie umożliwiają symulację rzeczywistych warunków, nie budząc przy tym sprzeciwów etycznych. Ponadto umożliwiają obiektywną ocenę skuteczności działania odtrutek. W praktyce klinicznej obiektywna ocena efektywności zastosowanych odtrutek stwarza ogromne problemy, ponieważ wykonanie jakichkolwiek badań z użyciem odtrutek i placebo jest niemożliwe z przyczyn etycznych. Z kolei wiarygodność metaanaliz obserwacji klinicznych jest niewielka z uwagi na dużą niejednorodność analizowanego materiału, a przede wszystkim z powodu częstego stosowania u jednego pacjenta kilku odtrutek jednocześnie.

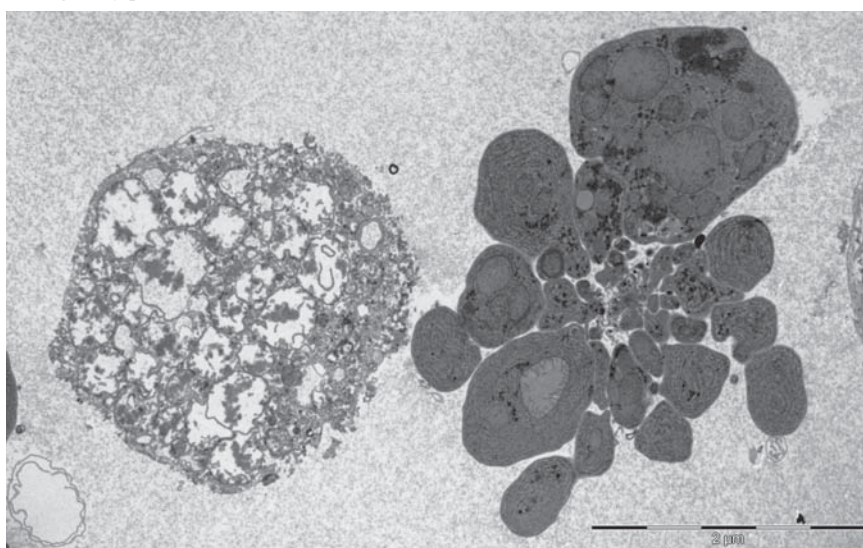
WCZESNE ZMIANY MORFOLOGICZNO-CZYNNOŚCIOWE HEPATOCYTÓW EKSPONOWANYCH NA α -AMANITYNĘ

Za pomocą doświadczeń z wykorzystaniem hodowli psich komórek wątrobowych wykazano, że zaburzenia hepatocytów ekspozowanych na toksyczne stężenia α -AMA przebiegają w dwóch fazach. Pierwsza faza ma głównie charakter czynnościowy, zaś faza druga cechuje się obumieraniem hepatocytów w wyniku martwicy i/lub apoptozy. Czas trwania poszczególnych faz zależy od stężenia α -AMA oddziałującej na hepatocyty [21]. Faza zaburzeń czynnościowych trwa ok. 6 godzin, gdy stężenie α -AMA w medium komórkowym pozostaje w granicach 1–5 μ M, co odpowiada stężeniu tej toksyny we krwi osób zatrutych muchomore mromotnikowym. W okresie tym większość hepatocytów nie wykazuje nieprawidłowości morfologicznych. W pojedynczych komórkach za pomocą mikroskopu elektronowego można dostrzec dyskretne zmiany ultrastruktury pod postacią kondensacji i marginalizacji chromatyny jądrowej, a w cytoplazmie jasne, piankowate przejaśnienia tworzące tzw. objaw pustej cytoplazmy (ryc. 2) [21]. Według Letschert i wsp. [15] do wczesnych zmian ultrastrukturalnych hepatocytów ekspozowanych na α -AMA należy też fragmentacja jąder, która jest najprawdopodobniej ultrastrukturalnym



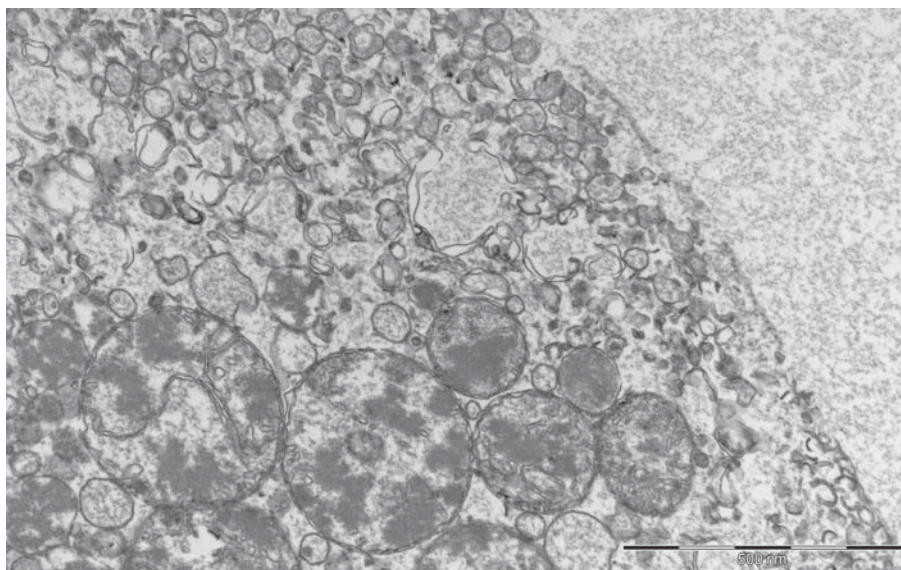
RYCINA 2. Zmiany morfologiczne hepatocytów ekspozowanych na α -amanitynę w stężeniu $5 \mu\text{M}$. Kondensacja i marginalizacja chromatyny jądrowej. Jasne, piankowane przestrzenie w cytoplazmie, tzw. objaw pustej cytoplazmy (oryginalnie opublikowane w [21])

FIGURE 2. Morphological alterations of hepatocytes after incubation with α -amanitin at concentration $5 \mu\text{M}$. Nuclear chromatin condensation and marginalization; pale, foamlike cytoplasm „empty cytoplasm” (originally published in [21])



RYCINA 3. Martwe hepatocyty po ekspozycji na α -amanitynę w stężeniu $10 \mu\text{M}$. Komórka po stronie prawej wykazuje cechy zaawansowanej apoptozy; widoczny jest rozpad komórki na liczne części zawierające pofragmentowane jądro oraz dobrze zachowane organella komórkowe (tzw. ciała apoptotyczne). Komórka po stronie lewej wykazuje cechy martwicy; widoczne są obrzęknięte i uszkodzone organella komórkowe oraz wpuklenia błony komórkowej (oryginalnie opublikowane w [21])

FIGURE 3. Dead hepatocytes after incubation with α -amanitin at concentration $10 \mu\text{M}$. The cell on the right is highly apoptotic, condensed, with parts of cytoplasm separated and fragmented in numerous bodies containing fragmented nucleus and organelles with well preserved ultrastructure (apoptotic bodies). The cell on the left is necrotic as demonstrated by swollen and ruptured intracellular organelles, and cytoplasm blebs (originally published in [21])



RYCINA 4. Martwiczy hepatocyt po ekspozycji na α -amanitynę w stężeniu 20 μ M. Umiarkowanie oraz znacznie obrzęknięte mitochondria, zanik grzebieni mitochondrialnych, bezpostaciowy materiał w macierzy mitochondrium, wakuolizacja komórki, rozszerzenie i pofragmentowanie siateczki śródplazmatycznej, uszkodzenia błony komórkowej (oryginalnie opublikowane w [21])

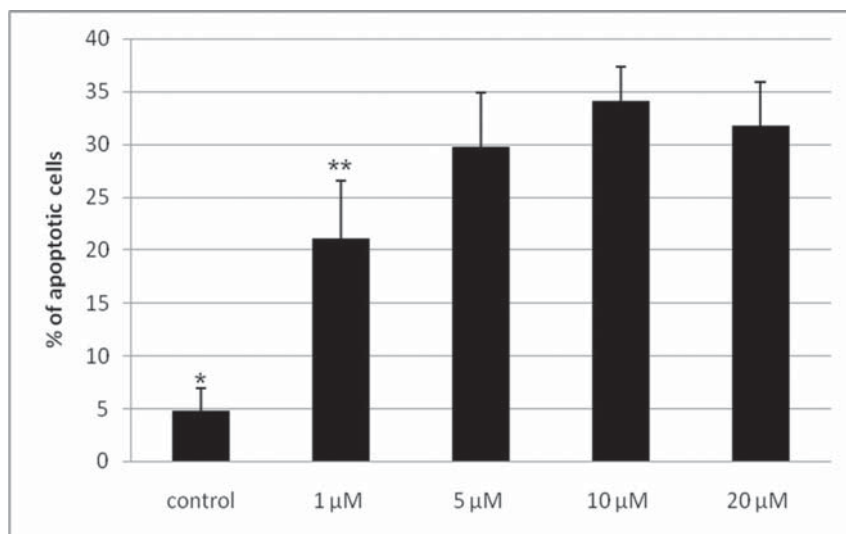
FIGURE 4. Necrotic hepatocyte after incubation with α -amanitin at concentration 20 μ M. Mild to severe swelling of mitochondria, disappearance of cristae, amorphous material in matrix, vacuolization, dilatation and defragmentation of endoplasmic reticulum, damages of cell membrane (originally published in [21])

wykładnikiem głównego mechanizmu działania α -AMA, czyli blokowania polimerazy II RNA. W pierwszej fazie zaburzeń hepatocytów nie dochodzi do obniżenia żywotności komórek ani do wzrostu aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w medium hodowlanym, co świadczy o zachowanej integralności błon komórkowych. Upośledzeniu ulega natomiast zdolność komórek wątrobowych do syntezy białek i mocznika [21].

Drugi okres oddziaływania α -AMA na hepatocyty charakteryzuje się masowym obumieraniem tych komórek w drodze nekrozy i/lub apoptozy. Co ciekawe, morfologiczne wykładniki obu typów śmierci komórkowej występują jednocześnie (ryc. 3). Obumieraniu hepatocytów towarzyszy gwałtowny wzrost aktywności LDH w medium komórkowym, co związane jest z utratą ciągłości błon cytoplazmatycznych hepatocytów ulegających martwicy (ryc. 4). LDH jest enzymem wewnątrzkomórkowym i w przypadku uszkodzenia błon cytoplazmatycznych wydostaje się do medium hodowlanego [21].

APOPTOZA HEPATOCYTÓW INDUKOWANA α -AMANITYNĄ

Właściwości α -AMA jako silnego induktora apoptozy znane są od lat [1, 2, 8]. Jednakże rola programowanej śmierci hepatocytów w patogenezie uszkodzenia wątroby w przebiegu zatrucia muchomorem sromotnikowym pozostaje niewyjaśniona.

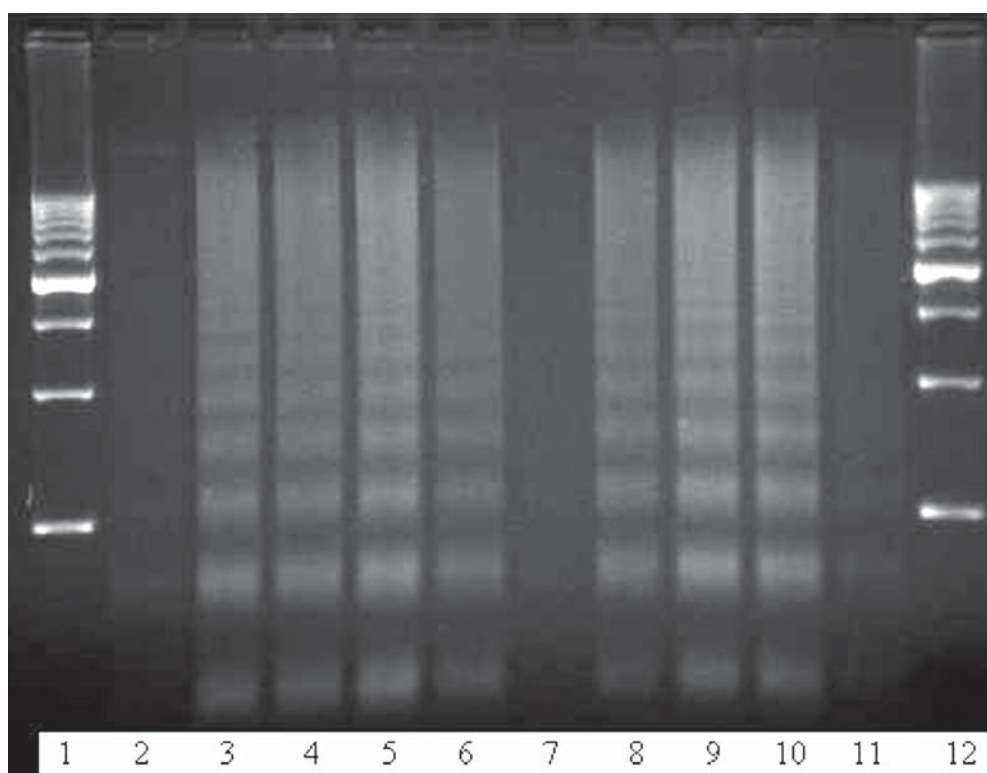


RYCINA 5. Odsetek komórek apoptotycznych w grupie kontrolnej i w grupach eksperymentalnych po 12 godzinach ekspozycji na α -amanitynę w stężeniach 1, 5, 10 i 20 μ M. Każda wartość odpowiada średniej $\pm$ SD, n = 16; *p < 0,05 kontrola w porównaniu do wszystkich grup; **p < 0,05 w porównaniu do wszystkich grup (oryginalnie opublikowane w [19])

FIGURE 5. Percentage of apoptotic cells in control and experimental groups after 12 h exposure to α -AMA at concentration 1, 5, 10 and 20 μ M. Each value represents the mean $\pm$ SD, n = 16; *p < 0.05 comparison to all groups; **p < 0.05 comparison to all groups (originally published in [19])

W badaniach pośmiertnych osób zmarłych na skutek zatrucia muchomorem sromotnikowym stwierdza się rozległą martwicę części środkowej zrazików wątrobowych [26, 31]. Należy jednak pamiętać, że badania pośmiertne są zazwyczaj wykonywane dopiero w 4–5 dobie zatrucia, a obserwowana wówczas martwica hepatocytów jest końcowym etapem różnych zaburzeń zachodzących w komórkach pod wpływem amanityn. Wyniki badań z wykorzystaniem hodowli psich i ludzkich hepatocytów sugerują, że apoptoza może odgrywać bardzo ważną rolę w patogenezie uszkodzenia wątroby, zwłaszcza w początkowej fazie zatrucia muchomorem sromotnikowym. Istotne zwiększenie odsetka komórek apoptotycznych obserwowano bowiem już po 6–12 godzinach ekspozycji hodowli hepatocytów na α -AMA (ryc. 5), czemu towarzyszyła typowa dla apoptozy regularna fragmentacja łańcuchów DNA (ryc. 6) [19].

α -AMA jest toksyną hamującą całkowitą transkrypcję w komórce, w tym także transkrypcję genów proapoptotycznych, jednak pomimo tego jest silnym induktorem apoptozy [1, 2, 8]. W badaniach na hodowlach komórkowych wykazano, że apoptoza ludzkich hepatocytów zachodząca pod wpływem α -AMA jest zależna od białka p53 i kaspazy-3 – głównego enzymu wykonawczej fazy apoptozy [23]. Według Arima i wsp. [2] zablokowanie przez α -AMA transkrypcji powoduje aktywację tzw. kinaz stresowych, które fosforylują reszty serynowe (Ser15 i Ser46) w cząsteczce białka p53, co chroni je przed proteolizą. Nagromadzone, ufosforylowane białko p53 przemieszczane jest do mitochondriów. To z kolei powoduje zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej, a w konsekwencji uwolnienie cytochromu c i indukcję programowanej śmierci komórki, pomimo hamującego



RYCINA 6. Analiza pofragmentowanego DNA hepatocytów za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym po 6 godzinach (ścieżki 1–6) i po 12 godzinach (ścieżki 7–12) ekspozycji na α -amanitynę. Marker 500 kbp (ścieżki 1 oraz 12); kontrola (ścieżki 2 oraz 7); α -AMA w stężeniu 1 μ M (ścieżki 3 oraz 8); α -AMA w stężeniu 5 μ M (ścieżki 4 oraz 9); α -AMA w stężeniu 10 μ M (ścieżki 5 oraz 10); α -AMA w stężeniu 20 μ M (ścieżki 6 oraz 11) (oryginalnie opublikowane w [19])

FIGURE 6. Analysis of fragmented DNA of hepatocytes by electrophoresis on 1,5% agarose gel after 6 h exposure to α -AMA (lanes 1–6) and after 12 h exposure to α -AMA (lanes 7–12). Marker 500 kbp (lanes 1 and 12); control (lanes 2 and 7); 1 μ M of α -AMA (lanes 3 and 8); 5 μ M of α -AMA (lanes 4 and 9); 10 μ M of α -AMA (lanes 5 and 10); 20 μ M of α -AMA (lanes 6 and 11) (originally published in [19])

apoptozę działania białka Bcl-2 [2]. Ponadto w badaniach na hodowlach ludzkich hepatocytów stwierdzono, że ekspozycja na α -AMA obniża w komórkach stężenie białka Bcl-2 uważanego za ważny czynnik antyapoptotyczny [23].

ZABURZENIA OBRONY ANTYOKSYDACYJNEJ HEPATOCYTÓW INDUKOWANE α -AMANITYNĄ

Przyjmuje się, że głównym mechanizmem toksycznego działania α -AMA jest blokowanie transkrypcji i syntezy białek, co z kolei prowadzi do martwicy komórek, a także indukuje apoptozę [1, 2, 8, 19, 21]. W ostatnich latach pojawiły się jednak doniesienia sugerujące, że toksyczność α -AMA może być dodatkowo potęgowana przez jej bezpośrednie i pośrednie właściwości prooksydacyjne [33, 34]. Zhel-

eva i wsp. [35] na podstawie badań na myszach wysunęli hipotezę, że α -AMA może zaburzać aktywność enzymów antyoksydacyjnych komórek wątrobowych. Przypuszczenia te znalazły potwierdzenie w doświadczeniach wykonanych na hodowlach ludzkich hepatocytów. Wykazano bowiem, że 48-godzinna ekspozycja hepatocytów na α -AMA w stężeniu 2 μ M powoduje istotne nasilenie peroksydacji lipidów [24]. Ponadto stwierdzono, że wzmożona peroksydacja lipidów pod wpływem tej toksyny jest przede wszystkim skutkiem zaburzeń aktywności katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) – enzymów odgrywających kluczową rolę w obronie komórek przed oddziaływaniem reaktywnych form tlenu [24]. Jak wiadomo, SOD jest metaloenzymem katalizującym przekształcenie anionu nadtlennego ($\cdot\text{O}_2^-$) do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru [25]. Natomiast CAT jest niezbędna do dalszego unieczynnienia szkodliwego nadtlenu wodoru, przekształcając dwie cząsteczki tego związku do tlenu cząsteczkowego i dwóch cząsteczek wody [5].

W hepatocytach człowieka eksponowanych na α -AMA dochodzi do podwyższenia aktywności SOD i jednocześnie znacznego obniżenia aktywności CAT [24]. Najprawdopodobniej wzmożona aktywność SOD zależy od nadmiaru $\cdot\text{O}_2^-$ powstałego przy udziale α -AMA przekształconej do fenoksylowych i sulfinylowych rodników [35]. Natomiast zmniejszenie aktywności CAT spowodowane jest bezpośrednim oddziaływaniem toksyny na enzym. α -AMA łączy się wiązaniami wodorowymi z cząsteczką CAT blokując dostęp substratu do centrum katalitycznego enzymu [33, 35]. Niekorzystna konfiguracja enzymatyczna wywołana w hepatocytach pod wpływem α -AMA może prowadzić do zwiększonej produkcji nadtlenu wodoru, co sprzyja peroksydacji lipidów i potęguje uszkodzenie komórek [33, 35].

DOŚWIADCZALNE PORÓWNANIE SKUTECZNOŚCI ODTRUTEK PRZECIWKO α -AMANITYNIE

Śmiertelność w zatruciach muchomorem sromotnikowym nadal jest wysoka i wynosi według różnych źródeł 20–60% [6, 12, 14, 29]. U wielu zatrutych, pomimo intensywnego leczenia farmakologicznego, dochodzi do ostrej niewydolności wątroby. Wówczas jedynym ratunkiem dla takich pacjentów jest pilna transplantacja tego narządu [6, 12, 14, 28, 29]. W praktyce klinicznej najdłużej i najpowszechniej stosowaną odtrutką pozostaje benzylopenicylina (BPCN), jednakże w ostatnim czasie jej skuteczność bywa kwestionowana [9, 29]. Nieliczne doniesienia kliniczne sugerują, że inne substancje, w tym antybiotyki i antyoksydanty, mogą okazać się skuteczniejszymi odtrutkami niż BPCN [29]. Niestety brakuje wystarczającej liczby badań doświadczalnych i porównawczych badań klinicznych, aby jednoznacznie ocenić przydatność nowych farmakologicznych metod leczenia.

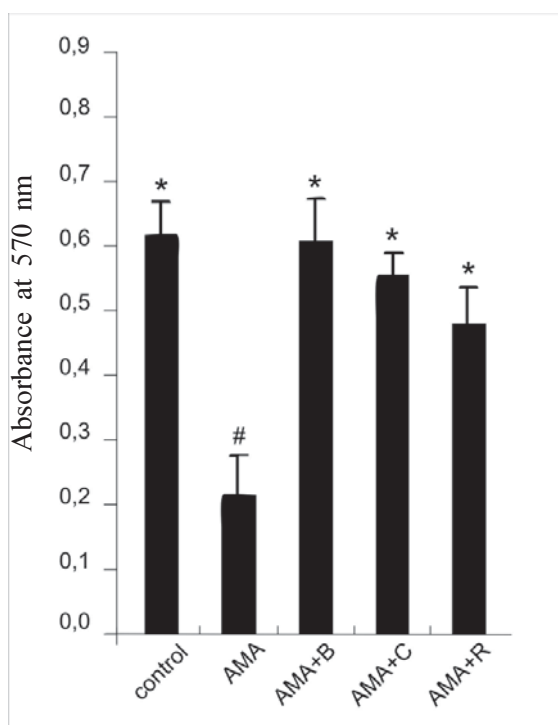
Coraz częściej w leczeniu zatruc muchomorem sromotnikowym zaleca się stosowanie silibiny (SIL) i/lub N-acetylo-L-cysteiny (ACC) podkreślając ich wielokierunkowe działanie antyoksydacyjne [29]. SIL jest najaktywniejszym składnikiem sylimaryny – kompleksu flawonoliganów uzyskiwanych z ostropestu plamistego

(*Silibum marianum*). Wykazuje działanie hepatoprotekcyjne i przeciwzapalne, a także pobudza regenerację wątroby stymulując polimerazę I RNA hepatocytów [30]. Poza tym, podobnie jak BPCN, blokuje OATP1B3 zmniejszając wątrobowy wychwyt α -AMA [15]. Niestety SIL jest lekiem drogim i niedostępnym w wielu krajach [30]. Natomiast ACC jest tania i szeroko dostępna. Wykazuje bezpośrednie działanie antyoksydacyjne, a ponadto, jest donorem glutationu, co może mieć istotne znaczenie w przypadku zatrucia amanitynami. Stwierdzono bowiem, iż wyciąg z muchomora jadowitego powoduje niedobory glutationu w izolowanych hepatocytach szczura [13]. Poza tym wyniki badań z wykorzystaniem pozaustrojowej perfuzji wątroby szczura wskazują, że ACC również zmniejsza wątrobowy wychwyt α -AMA skutecznie chroniąc CAT hepatocytów przed zablokowaniem [16, 22].

W badaniach z użyciem hodowli ludzkich hepatocytów wykazano, że BPCN, ACC oraz SIL efektywnie zabezpieczały komórki wątrobowe przed obumieraniem indukowanym α -AMA [17]. Na uwagę zasługuje także fakt, że w hodowlach hepatocytów chronionych BPCN i ACC obserwowano znacznie mniejsze wartości laboratoryjnych wykładników apoptozy (kaspazy-3 i aneksyny V) niż w hodowlach poddanych działaniu samej α -AMA [23]. Wykazano ponadto, że skuteczność ACC lub SIL jako odtrutki nie przewyższała skuteczności BPCN, pomimo że ACC i SIL efektywniej niż BPCN chroniły hepatocyty przed peroksydacją lipidów [17, 24]. Co ciekawe, w badaniach na hodowlach hepatocytów psa BPCN, ACC i SIL okazały się całkowicie nieskuteczne jako odtrutki na α -AMA. Jest to najprawdopodobniej związane z różnicami międzygatunkowymi u ludzi i psów w zakresie wątrobowych peptydów transportujących aniony organiczne [20].

Neftel i wsp. [27] zalecają w zatruciu muchomorem sromotnikowym podawanie ceftazydymu (CEFT). Jest to cefalosporyna III generacji, której korzystne działanie jako odtrutki przeciwko α -AMA może być związane z pobudzającym wpływem na replikację DNA [27]. Dotychczas CEFT stosowany był jedynie w nielicznych przypadkach zatrucia muchomorem sromotnikowym i na tej podstawie nie można jednoznacznie ocenić jego skuteczności klinicznej [29]. Teoretycznie skuteczna w leczeniu zatrucia muchomorem sromotnikowym mogłaby być także rifamycyna (RIF). Jest to niebetalaktamowy antybiotyk, który ma zdolność blokowania wątrobowych peptydów transportujących aniony organiczne, a więc może hamować wychwyt α -AMA przez hepatocyty [22, 32]. RIF nie była dotychczas stosowana w leczeniu zatrucia muchomorem sromotnikowym, tak więc jej rzeczywista przydatność kliniczna jako odtrutki pozostaje całkowicie nieznana.

W badaniach z użyciem hodowli ludzkich komórek wątrobowych CEFT i RIF okazały się skutecznymi odtrutkami przeciwko α -AMA chroniąc hepatocyty przed uszkodzeniem i utratą żywotności (ryc. 7). Nie wykazano jednak, aby substancje te były skuteczniejsze niż BPCN [18]. Ma to istotne znaczenie praktyczne, ponieważ zarówno CEFT, jak i RIF są antybiotykami znacznie droższymi niż BPCN. CEFT nawet w dużych dawkach jest dobrze tolerowany, natomiast RIF charakteryzuje się licznymi działaniami niepożądanymi. Wydaje się więc, że obecnie nie ma podstaw do zalecania RIF w przypadku zatrucia muchomorem sromotnikowym.



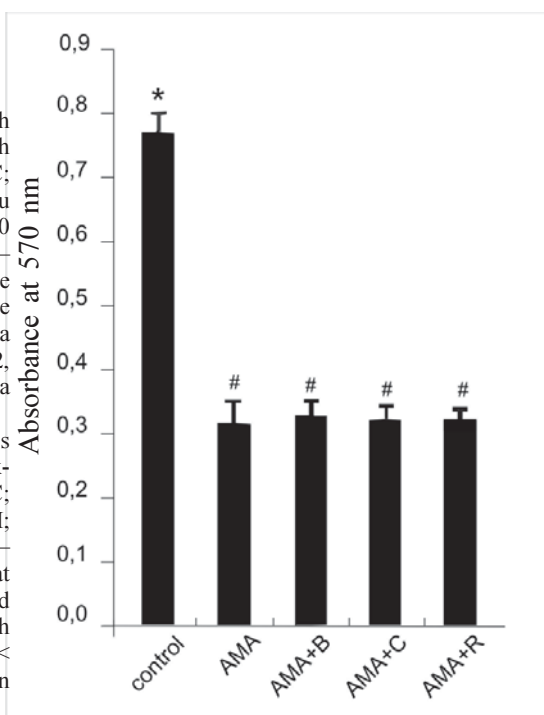
RYCINA 7. Żywotność hepatocytów ludzkich oceniana testem MTT w kontroli i grupach doświadczalnych: AMA; AMA+B; AMA+C; AMA+R (AMA – α -amanityna w stężeniu $2 \mu\text{M}$; B – benzylopenicylina w stężeniu $1,0 \mu\text{M}$; C – ceftazydim w stężeniu $1,0 \mu\text{M}$; R – rifamycyna w stężeniu $45 \mu\text{M}$). Wszystkie odtrutki były podawane jednocześnie z α -amanityną. Wartości na wykresie odpowiadają średniej $\pm$ SD, $n = 12$, # $p < 0,05$ vs kontrola, * $p < 0,05$ vs AMA (na podstawie [18], zmodyfikowane)

FIGURE 7. Viability of human hepatocytes determined as MTT activity in control and experimental groups: AMA; AMA+B; AMA+C; AMA+R (AMA – α -amanityna at conc. $2 \mu\text{M}$; B – benzylpenicillin at conc. $1,0 \mu\text{M}$; C – ceftazidime at conc. $1,0 \mu\text{M}$; R – rifamycin at conc. $45 \mu\text{M}$). All antidotes were administered simultaneously with α -amanitin. Each value represents the mean $\pm$ SD, $n = 12$, # $p < 0.05$ vs control, * $p < 0.05$ vs AMA (based on [18], modified)

Na uwagę zasługuje fakt, że w doświadczeniu na hodowlach ludzkich hepatocytów BPCN, CEFT lub RIF były skuteczne jako odtrutki tylko wówczas, gdy stosowano je jednocześnie z α -AMA. Natomiast żadna z tych odtrutek nie była skuteczna w przypadku zastosowania w 12 godzinie po ekspozycji na toksynę (ryc. 8) [18]. Obserwacja ta ma ogromne znaczenie, ponieważ większość chorych zgłasza się do lekarza zazwyczaj dopiero po wystąpieniu objawów klinicznych, a więc 10–12 godzin po spożyciu grzybów [4, 12, 31]. Uwzględniając bardzo szybkie wchłanianie α -AMA z przewodu pokarmowego, można przyjąć, że u większości chorych trafiających pod opiekę lekarską doszło już do wychwycenia przez wątrobę toksycznej dawki α -AMA. Jednak z drugiej strony trzeba pamiętać, że amanityny utrzymują się w krążeniu wrotno-jelitowym aż do 72 godziny, a podanie substancji hamujących wątrobowy wychwyt amanityn może przerwać ich obieg w krążeniu wrotno-jelitowym i uchronić tę część hepatocytów, która nie wychwyciła jeszcze krytycznej dawki toksyn. To z kolei może zmniejszyć uszkodzenie wątroby i złagodzić przebieg zatrucia. Tak więc wyniki opisanych doświadczeń wskazują na konieczność jak najszybszego podania odtrutki (BPCN, ACC, SIL lub CEFT) pacjentom podejrzanym o zatrucie muchomorem sromotnikowym, nawet przed ostatecznym potwierdzeniem zatrucia za pomocą badań sporologicznych i/lub laboratoryjnych. W terapii zatrucia muchomorem sromotnikowym nie należy rezygnować ze stosowania BPCN, ponieważ pod względem skuteczności nie ustępuje ona ACC, SIL, CEFT ani RIF, a poza tym jest lekiem szeroko dostępnym, bezpiecznym i tanim.

RYCINA 8. Żywotność hepatocytów ludzkich oceniana testem MTT w kontroli i grupach doświadczalnych: AMA; AMA+B; AMA+C; AMA+R (AMA – α -amanityna w stężeniu $2 \mu\text{M}$; B – benzylopenicylina w stężeniu $1,0 \mu\text{M}$; C – ceftazydym w stężeniu $1,0 \mu\text{M}$; R – rifamycyna w stężeniu $45 \mu\text{M}$). Wszystkie odtrutki były podawane w 12 godzinie ekspozycji na α -amanitynę. Wartości na wykresie odpowiadają średniej $\pm$ SD, $n = 12$, # $p < 0,05$ vs kontrola, * $p < 0,05$ vs AMA (na podstawie [18], zmodyfikowane)

FIGURE 8. Viability of human hepatocytes determined as MTT activity in control and experimental groups: AMA; AMA+B; AMA+C; AMA+R (AMA – α -amanityna at conc. $2 \mu\text{M}$; B – benzylpenicillin at conc. $1.0 \mu\text{M}$; C – ceftazidime at conc. $1.0 \mu\text{M}$; R – rifamycin at conc. $45 \mu\text{M}$). All antidotes were administered 12 hours after exposition to α -amanitin. Each value represents the mean $\pm$ SD, $n = 12$, # $p < 0.05$ vs control, * $p < 0.05$ vs AMA (based on [18], modified)



PODSUMOWANIE

Uszkodzenie hepatocytów pod wpływem α -AMA przebiega w dwóch fazach. Pierwsza faza ma głównie charakter czynnościowy i cechuje się upośledzeniem zdolności hepatocytów do syntezy białka oraz mocznika. W okresie tym mogą pojawiać się zmiany ultrastruktury hepatocytów pod postacią marginalizacji i kondensacji chromatyny oraz fragmentacji jąder. W drugiej fazie dochodzi do obumierania komórek w drodze nekrozy i/lub apoptozy. Apoptoza hepatocytów indukowana α -AMA jest zależna od kaspazy-3 i białka p53. Ponadto ekspozycja hepatocytów na α -AMA zmniejsza stężenie białka Bcl-2 uważanego za ważny czynnik antyapoptotyczny. Wykazano również, że w komórkach wątrobowych α -AMA pobudza aktywność SOD i jednocześnie hamuje aktywność CAT. Taka niekorzystna konfiguracja enzymatyczna może prowadzić do zwiększonej produkcji nadtlenu wodoru, co sprzyja peroksydacji lipidów i potęguje uszkodzenie komórek.

W ostatnich latach pojawiło się wiele kontrowersji dotyczących rzeczywistej skuteczności odtrutek stosowanych w leczeniu zatrucia muchomorem sromotnikowym. Wyniki badań na hodowlach ludzkich hepatocytów wskazują, że SIL, ACC, CEFT i RIF są skutecznymi odtrutkami przeciwko α -AMA, jednakże ich efektywność nie przewyższa skuteczności BPCN – odtrutki najpowszechniej i najdłużej stosowanej w praktyce klinicznej, która poza tym jest lekiem tanim i dobrze tolerowanym przez pacjentów. Ponadto wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że w przy-

padku zatrucia muchomorem sromotnikowym istnieje konieczność jak najszybszego podania odtrutek, zwłaszcza wtedy, gdy nie ma możliwości szybkiego potwierdzenia zatrucia za pomocą metod laboratoryjnych.

LITERATURA

- [1] ANDERA L, WASYLUK B. Transcription abnormalities potentiate apoptosis of normal human fibroblasts. *Mol Med* 1997; **12**: 852–863.
- [2] ARIMA Y, NITTA M, KUNINAKA S, ZHANG D, FUJIWARA T, TAVA Y, NAKAO M, SAYA H. Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J Biol Chem* 2005; **280**: 19166–19176.
- [3] BERGER KJ, GUSS DA. Mycotoxins revisited: Part I. *J Emerg Med* 2005; **28**: 56–62.
- [4] BURDA P, CISZOWSKI K. Grzyby trujące. W: Pach J [red.] Zarys toksykologii klinicznej. Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego 2009: 545–573.
- [5] CHELIKANIA P, FITAB I, LOEWENA PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 192–208.
- [6] ESCUDIÉ L, FRANCOZ C, VINEL JP, MOUCARI R, COURNOT M, PARADIS V, SAUVANET A, BELGHITI J, VALLA D, BERNUAU J, DURAND F. *Amanita phalloides* poisoning: reassessment of prognostic factors and indications for emergency liver transplantation. *J Hepatol* 2007; **46**: 466–473.
- [7] FERENC T, ŁUKASIEWICZ B, CIEĆWIERZ J, KOWALCZYK E. Zatrucia muchomorem sromotnikowym (*Amanita phalloides*). *Med Pracy* 2009; **60**: 415–426.
- [8] GARTEL AL. Transcriptional inhibitors, p53 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1786**: 83–86.
- [9] GIANNINI L, VANNACCI A, MISSANELLI A, MASTOIANNI R, MANNAIONI PF, MORONI F, MASINI E. Amatoxin poisoning: a 15-year retrospective analysis and follow-up evaluation of 105 patients. *Clin Toxicol* 2007; **45**: 539–542.
- [10] HALLEN HE, LUO H, SCOTT-CRAIG JS, WALTON JD. Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms. *PNAS* 2007; **104**: 19097–19101.
- [11] JAEGER A, JEHL F, FLESH F, SAUDER P, KOPFERSCHMITT J. Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications. *J Toxicol Clin Toxicol* 1993; **31**: 63–80.
- [12] KAUFMANN P. Pilzvergiftungen: Toxidrome, diagnose und therapie. *Wien Med Wochenschr* 2007; **158**: 493–502.
- [13] KAWAJI A, SONE T, NATSUKI R, ISOBE M, TAKABATAKE E, YAMAURA Y. *In vitro* toxicity test of poisonous mushroom extracts with isolated rat hepatocytes. *J Toxicol Sci* 1990; **12**: 141–142.
- [14] KŘENOVÁ M, PELCLOVÁ D, NAVRÁTIL T. Survey of *Amanita phalloides* poisoning: clinical findings and follow-up evaluation. *Hum Exp Toxicol* 2007; **26**: 955–961.
- [15] LETSCHERT K, FAULSTICH H, KELLER D, KEPPLER D. Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol Sci* 2006; **91**: 140–149.
- [16] MAGDALAN J, CHLEBDA E, KWIATKOWSKA J. Rat liver catalase protection from α -amanitin in extracorporeal liver perfusion. *Adv Clin Exp Med* 2008; **17**: 269–273.
- [17] MAGDALAN J, OSTROWSKAA, PIOTROWSKAA, GOMUŁKIEWICZA, PODHORSKA-OKOŁÓW M, PATRZALEK D, SZELĄGA, DZIEGIEL P. Benzylpenicillin, acetylcysteine and silibinin as antidotes in human hepatocytes intoxicated with α -amanitin. *Exp Toxicol Pathol* 2009, in press, DOI: 10.1016/j.etp.2009.05.03.
- [18] MAGDALAN J, OSTROWSKA A, PIOTROWSKA A, GOMUŁKIEWICZA, SZELĄGA, DZIEGIEL P. Comparative antidotal efficacy of benzylpenicillin, ceftazidime and rifamycin in cultured human hepatocytes intoxicated with α -amanitin. *Arch Toxicol* 2009; **83**: 1091–1096.
- [19] MAGDALAN J, OSTROWSKA A, PIOTROWSKA A, IŻYKOWSKA I, NOWAK M, PODHORSKA-OKOŁÓW M, SZELĄGA, DZIEGIEL P. α -Amanitin induced apoptosis in primary cultured dog hepatocytes. *FHC* 2010; **48**: in press, DOI: 10.2478/v10042-010-0010-6.
- [20] MAGDALAN J, OSTROWSKAA, PIOTROWSKAA, IŻYKOWSKA I, NOWAK M, SZELĄGA, DZIEGIEL P. Failure of benzylpenicillin, N-acetylcysteine and silibinin to reduce α -amanitin hepatotoxicity. *In Vivo* 2009; **23**: 393–400.

- [21] MAGDALAN J, OSTROWSKAA A, PODHORSKA-OKOŁÓW M, PIOTROWSKAA A, IŻYKOWSKA I, NOWAK M, DOLIŃSKA-KRAJEWSKA B, ZABEL M, SZELAĞ A, DZIEĞIEL P. Early morphological and functional alterations in canine hepatocytes due to α -amanitin, a major toxin of *Amanita phalloides*. *Arch Toxicol* 2009; **83**: 55–60.
- [22] MAGDALAN J, PIEŚNIEWSKA M, GLINIĄK H. The inhibition of α -amanitin uptake in perfused rat liver. *Adv Clin Exp Med* 2007; **16**: 355–362.
- [23] MAGDALAN J, PIOTROWSKAA A, GOMUŁKIEWICZ A, SOZAŃSKI T, PODHORSKA-OKOŁÓW M, SZELAĞ A, DZIEĞIEL P. Benzylpenicyllin and acetylcysteine protection from α -amanitin-induced apoptosis in human hepatocyte cultures. *Exp Toxicol Pathol* 2010; in press, DOI: 10.1016/j.etp.2010.02.004.
- [24] MAGDALAN J, PIOTROWSKA A, GOMUŁKIEWICZ A, SOZAŃSKI T, SZELAĞ A, DZIEĞIEL P. Influence of commonly used clinical antidotes on antioxidant systems in human hepatocyte culture intoxicated with α -amanitin. *Hum Exp Toxicol* 2010, in press. DOI: 10.1177/0960327109354939.
- [25] MARKLUND S. Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand* 1980; **492**: 19–23.
- [26] MAS A. Mushrooms, amatoxins and the liver. *J Hepatol* 2005; **42**: 166–169.
- [27] NEFTEL K, KEUSCH G, COTTAGNOUD P, WIDMER U, HANY M, GAUTSCHI K, JOOS B, WALT H. Sind Cefalosporine bei der Intoxicationen mit Knollenblätterpilz besser wirksam als Penicillin G? *Schweiz Med Wochenschr* 1988; **118**: 49–51.
- [28] ÖZÇAY F, BASKIN E, ÖZDEMİR N, KARAKAYALI H, EMIROĞLU R, HABERAL M. Fulminant liver failure secondary to mushroom poisoning in children: Importance of early referral to a liver transplantation unit. *Pediatr Transplant* 2006; **10**: 259–265.
- [29] POUCHERET P, FONS F, DORÉ JC, MICHELOT D, RAPIOR S. Amatoxin poisoning treatment decision-making: Pharmacotherapy clinical strategy assessment using multidimensional multivariate statistic analysis. *Toxicon* 2010, in press, Epub ahead of print, DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.02.005.
- [30] PRADHAN SC, GIRISH C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res* 2006; **124**: 491–504.
- [31] SCHNEIDER SM. Mushrooms. W: Ford MD, Delaney KA, Ling LJ, Erickson WB [red.] *Clinical Toxicology*. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto: Saunders Company 2001: 899–909.
- [32] VAVRICKA SR, VAN MONTFOORT J, HA HR, MEIER PJ, FATTINGER K. Interactions of rifampicin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology* 2002; **36**: 164–172.
- [33] ZHELEVA A, GADJEVA V, ZHELEV M. Free radical formation might contribute to the severe amatoxin hepatotoxicity. *Trakia J Sci* 2003; **1**: 42–45.
- [34] ZHELEVA A, MICHELOT D, ZHELEV ZD. Sensitivity of alpha-amanitin to oxidation by a lactoperoxidase-hydrogen peroxide system. *Toxicon* 2000; **38**: 1055–1063.
- [35] ZHELEVA A, TOLEKOVA A, ZHELEV M, UZUNOVA V, PLATIKANNOVA M, GADZHEVA V. Free radical reactions might contribute to severe alpha amanitin hepatotoxicity – A hypothesis. *Med Hypotheses* 2007; **69**: 361–367.

Redaktor prowadzący – J. Kubrakiewicz

Otrzymano: 10.11. 2009 r.

Przyjęto: 19.03. 2010 r.

Jan Magdalan

Katedra i Zakład Farmakologii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich,

ul. Mikulicza-Radeckiego 2, 50-345 Wrocław

e-mail: naladgam@op.pl