

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Edyty Janik-Karpińskiej
na temat: Ocena mechanizmów cytotoksycznego i genotoksycznego działania toksyny
T-2 produkowanej przez grzyby z rodzaju *Fusarium*

We współczesnym świecie obserwuje się intensywny rozwój produkcji żywności tej nieprzetworzonej (przeznaczonej do bezpośredniego spożycia), przetworzonej (najczęściej konserwowanej) i handlu nią. W tym kontekście nie dotyczy to pasz dla zwierząt, choć jest to łańcuch pośredni przy produkcji żywności dla ludzi. To niezwykle istotny problem, gdyż może dotyczyć bezpieczeństwa. Zgodnie z definicją ONZ ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO), bezpieczeństwo żywności to zapewnienie, że produkty żywnościowe nie spowodują szkód zdrowotnych u konsumentów. Konsument ma prawo wiedzieć, w jaki sposób żywność przeznaczona do spożycia jest produkowana, przetwarzana, pakowana i sprzedawana. Temu celowi służą uregulowania prawne. Przykładowo w Rozporządzeniu (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. zostały ustanowione ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności, powołano Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) oraz podkreślono konieczność zapewnienia wysokiego poziomu ochrony życia i zdrowia ludzkiego, w kontekście swobodnego przepływu bezpiecznej, zdrowej żywności i pasz. Zagrożeniem bezpieczeństwa żywności są min. obecne w niej zanieczyszczenia.

W naszym kraju ma to bardzo istotne znaczenie, gdyż sprawdzono z Ukrainy nieokreśloną ilość zbóż i kukurydzy i nie do końca wiadomo odnośnie ich klasyfikacji. Miały to być produkty spożywcze, albo paszowe albo techniczne. W masmediach pojawiły się informacje o możliwości ich skażenia mykotoksynami, pestycydami i metalami ciężkimi.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy oceny mechanizmów cytotoksycznego i genotoksycznego działania toksyny T-2 produkowanej przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, która jest toksycznym wtórnym metabolitem powszechnie występującym, jako zanieczyszczenia ziaren zbóż, a ze względu na ich toksyczność dla ludzi i zwierząt hodowlanych stanowią istotny problem zdrowotny i bezpieczeństwa żywności.

Przedstawiona dysertacja doktorska liczy 102 stron tekstu, z czego 33 to tekst zasadniczy z wnioskami, ze streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz bibliografią. Pracę kończy 3 wnioski oraz wykaz 25 pozycji anglojęzycznego piśmiennictwa opublikowanego w znacznej części w latach 2003-2023. Część zasadniczą pracy poprzedza

wykaz czterech publikacji będących podstawą merytoryczną rozprawy doktorskiej oraz wykaz 11 publikacji stanowiący „pozostały dorobek naukowy”. Układ pracy jest zgodny z wymogami stawianymi pracom naukowym wykonywanym na stopień doktora nauk biologicznych. Obejmuje on przegląd dokonań publikacyjnych, w którym Doktorantka przedstawia aktualny stan wiedzy z zakresu kompleksowej charakterystyki mykotoksyn z grupy trichotecenów ze szczególnym uwzględnieniem toksyny T-2 w odniesieniu do jej budowy oraz mechanizmów toksycznego oddziaływania. W mojej ocenie jest to poprawna analiza piśmiennictwa będącego inspiracją do podjęcia badań będących tematem zrealizowanej pracy doktorskiej, świadcząca o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki.

Wstęp pracy został przedstawiony na 6 stronach i zawiera szczegółową charakterystykę mykotoksyn z grupy trichotecenów ze szczególnym uwzględnieniem toksyny T-2 w zakresie ich właściwości fizyko-chemicznych jak również oddziaływania na komórki eukariotyczne z uwzględnieniem toksyczności ostrej i przewlekłej. Jest zwięzłe przedstawienie treści zawartych w publikacjach stanowiących podstawę merytoryczną rozprawy.

W rozdziale „Cel pracy” Autorka prezentuje trzy główne cele badań, w których zawiera zadania obejmujące wyjaśnienie mechanizmów cytotoksycznego i genotoksycznego działania toksyny T-2 w warunkach *in vitro*, względem linii komórkowej prawidłowych ludzkich fibroblastów – Hs68, a mianowicie:

1. Ocenę bezpośredniego toksycznego działania toksyny T-2 względem ludzkich prawidłowych fibroblastów linii Hs68.
2. Analizę wpływu toksyny T-2 na uszkodzenia mitochondriów komórek linii Hs68.
3. Ocenę wpływu toksyny T-2 na uszkodzenia genomu jądrowego komórek linii Hs68.

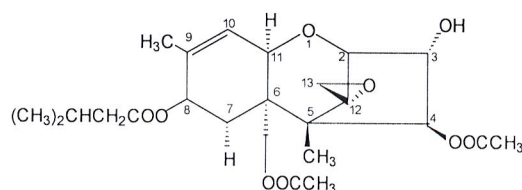
W niniejszym podrozdziale Doktorantka sprecyzowała hipotezę badawczą: „Toksyna T-2 produkowana przez grzyby z rodzaju *Fusarium* w warunkach *in vitro* wykazuje właściwości cytotoksyczne oraz genotoksyczne względem komórek prawidłowych ludzkich fibroblastów linii Hs68”.

Należy zaznaczyć, że zaprezentowane w części edycyjnej rozprawy są zbieżne z celami badań zaprezentowanych w publikacjach stanowiących podstawę merytoryczną rozprawy.

Bez szkody dla rozprawy byłoby wyraźne stwierdzenie o udowodnieniu (lub nie) przyjętej hipotezy. W podsumowaniu można znaleźć stwierdzenia sugerujące, że wyniki przeprowadzanych badań wypełniły cele badań i udowodniono postawioną hipotezę.

Rozdział „Materiał i metody” przedstawiony na 2 stronach wydruku, a szczegółowe procedury badawcze z wyszczególnieniem materiałów, aparatury i metodyk analitycznych i analizy statystycznej, w publikacjach 2-4. W publikacji 1 zamieszczono dodatkowo metodyki odnośnie bezpieczeństwa pracy. Z doniesień literaturowych wynika, że bardzo dobrą skuteczność dezynfekcji (odkażania) uzyskano stosując gazową formę nadtlenu wodoru (stężenie ok. 2000 ppm, czas procesu ok. 30 minut) w stosunku np. do szczepów *Candida* i *Aspergillus Niger*, spor *Bacillus atrophaeus* i *Bacillus stearothermophilus*, ale bez wyników badań mykotoksyn.

Należy podkreślić, że zakres prowadzonych badań, jak też opis zastosowanych metod został przedstawiony bardzo precyzyjnie i profesjonalnie, co świadczy, że Doktorantka bardzo dobrze opanowała zastosowany w pracy warsztat badawczy. Należy również zaznaczyć, że opis zastosowanych metodyk umożliwia ich powtórzenie oraz konfrontację z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Nie rozumiem tylko numeracji atomów na ryc. 1. Nie jest to numeracja atomów węgla, gdyż cały opis grup funkcyjnych w toksynie T-2 zamieszczony w rozprawie byłby nieprawidłowy. Na poniższej rycinie przedstawiono wzór strukturalny toksyny T-2 z prawidłową numeracją atomów węgla:



W przeprowadzonych badaniach *in vitro* określono bezpośrednią toksyczność toksyny T-2 na ludzkiej linii komórkowej fibroblastów skóry Hs68. W rezultacie określono poziom toksyczności toksyny T-2 i jej cytotoksyczny mechanizm działania. W testach cytotoxyczności zaobserwowano zależny od dawki i czasu cytotoksyczny wpływ T-2 na linię komórkową. Wyniki badań bioluminescencji wykazały, że względne poziomy ATP w komórkach poddanych działaniu mykotoksyny były obniżone. Dalsza analiza wpływu toksyny T-2 na indukcję procesów apoptozy i nekrozy wykazała znaczną przewagę komórek wybarwionych PI, brak aktywności kaspazy 3/7 i zwiększone stężenie uwolnionej ludzkiej cytokeratyny 18 w traktowanych toksyną komórkach, co wskazuje na proces nekrozy. Podsumowując, wyniki modelu fibroblastów ludzkiej skóry *in vitro* po raz pierwszy ujawniły, że toksyna T-2 indukuje martwicę, jako efekt toksyczny. Wyniki te zapewniają nowy wgląd w mechanizm toksycznego działania toksyny T-2 na skórę.

W badaniach *in vitro* określono toksyczności T-2 na mitochondriach linii komórkowej ludzkich fibroblastów skóry Hs68. W pierwszym etapie badania określono wpływ toksyny

T-2 na mitochondrialny potencjał błonowy komórek (MMP), co spowodowało spadek MMP zależny od dawki i czasu. Uzyskane wyniki wykazały, że toksyna T-2 nie miała wpływu na zmiany wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach Hs68. Dalsza analiza genomu mitochondrialnego wykazała, że toksyna T-2 w sposób zależny od dawki i czasu zmniejszała liczbę kopii mitochondrialnego DNA (mtDNA) w komórkach. Ponadto oceniono genotoksyczność toksyny T-2 powodującą uszkodzenie mtDNA. Stwierdzono, że inkubacja komórek Hs68 w obecności toksyny T-2, w sposób zależny od dawki i czasu, zwiększała poziom uszkodzeń mtDNA w obu badanych regionach mtDNA: Podjednostki 1 dehydrogenazy NADH (ND1) i Podjednostki 5 dehydrogenazy NADH (ND5). Podsumowując, wyniki badania *in vitro* wykazały, że toksyna T-2 wykazuje niekorzystny wpływ na mitochondria komórek Hs68. Toksyna T-2 indukuje dysfunkcję mitochondriów i uszkodzenie mtDNA, co może powodować zaburzenie syntezy adenosynotryfosforanu (ATP), a w konsekwencji śmierć komórki.

W analizie badań, pod rycinami podano wyniki w układzie ($\bar{x} \pm SD$) oraz wartość prawdopodobieństwa ($p < 0,001$) z testu równości wariancji. Statystycy sugerują podawanie wartości siły testu, w tym przypadku „F”.

W literaturze stwierdzono, że toksyna T-2 ma toksyczny wpływ na różne tkanki i narządy, a ludzie i zwierzęta cierpią na różne stany patologiczne po spożyciu żywności skażonej mikotoksynami np. stanami zapalnymi skóry. W kolejnym badaniu *in vitro* określono molekularny mechanizm genotoksyczności toksyny T-2 w linii komórkowej Hs68 - fibroblastach ludzkiej skóry. W tym celu komórki traktowano toksyną T-2 w stężeniach 0,1; 1 i 10 μM i inkubowano przez 24 h i 48 h. Wyniki testu kometowego w wersji alkalicznej wykazały, że toksyna T-2 indukuje uszkodzenia jądrowego DNA. Pęknięcia nici DNA w komórkach i poziom uszkodzeń DNA są skorelowane ze wzrostem stężenia i czasu ekspozycji na toksynę T-2. Ocena uszkodzeń jądrowego DNA wykazała, że ekspozycja na toksynę powodowała wzrost częstości uszkodzeń genów HPRT1 i TP53 w komórkach Hs68. Dalsza analiza koncentrowała się na zmianach ekspresji mRNA w dwóch grupach genów: zaangażowanych w proces zapalny i naprawczy. Poziom mRNA wzrósł dla wszystkich badanych genów zapalnych (TNF, INFG, IL1A i IL1B). W drugiej grupie genów związanych z procesem naprawczym zaobserwowano zmiany ekspresji indukowanej toksyną w genach - LIG3 i APEX. Poziom mRNA dla LIG3 obniżył się, natomiast dla APEX wzrósł. W przypadku LIG1, FEN i XRCC1 nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA pomiędzy komórkami kontrolnymi i komórkami inkubowanymi z toksyną T-2. Dodatkowo, analiza dokowania molekularnego *in silico* wykazała, że toksyna T-2 ma silne powinowactwo do

interakcji z głównym rowkiem podwójnej helisy DNA. Podsumowując, wyniki tego badania wskazują, że toksyna T-2 wykazuje działanie genotoksyczne na komórki Hs68, a mechanizm molekularny tego toksycznego działania jest związany z uszkodzeniem nDNA.

W rozdziale „Omówienie wyników” Doktorantka przedstawiła poprawną analizę uzyskanych wyników. Autorka zaprezentowała uzyskane rezultaty badań własnych z analizą piśmiennictwa.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska została opracowana samodzielnie przez Doktorantkę. Jest ona dziełem o charakterze aplikacyjnym, skonstruowanym dobrze w aspekcie metodycznym, merytorycznym i edytorskim. Odpowiada warunkom, określonym w art. 187 ust. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478)*. Wniosuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Edyty Janik-Karpińskiej do publicznej obrony.

Wniosuję o wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani mgr Edyty Janik-Karpińskiej. Stwierdzam, że rozprawa zawiera szczególne walory poznawcze oraz aplikacyjne.

W walorach poznawczych na szczególną uwagę zasługują wyniki badań na modelu in vitro fibroblastów ludzkiej skóry gdzie wykazano, że toksyna T-2 indukuje martwicę, jako efekt toksyczności, czyli nowe podejście do oceny mechanizmu toksycznego działania toksyny T-2 na skórę. W badaniach wykazano również, że toksyna T-2 wykazuje niekorzystny wpływ na mitochondria komórek Hs68. Wykazano, że indukuje dysfunkcję mitochondriów i uszkodzenie mtDNA, co może powodować zaburzenie syntezy adenozyntrifosforanu (ATP), a w konsekwencji śmierć komórki, a ponadto udowodniono, że toksyna T-2 wykazuje genotoksyczne działanie na komórki Hs68, a mechanizm molekularny tego oddziaływania jest związany z uszkodzeniem nDNA.

Walory aplikacyjne, to cztery publikacje związane ściśle z tematem rozprawy, gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem (520 pkt MEiN według punktacji MEiN z dnia 01.12.2021 r. oraz IF = 21.137; IF 5-letni = 22.153) oraz 11 uzupełniających (1180 pkt MEiN według punktacji MEiN z dnia 01.12.2021 r. oraz IF = 54.84; IF 5-letni = 57.468). Ma to bardzo istotne znaczenie wobec niekontrolowanego napływu z Ukrainy do naszego kraju zbóż, kukurydzy oraz pasz, braku ich badań, nie do końca określonych warunków magazynowania, a to może stwarzać realne zagrożenie dla ludzi oraz zwierząt hodowlanych mykotoksynami ze wszystkimi konsekwencjami opisanymi w rozprawie i w publikacjach.

Władysław Horwata