

Streszczenie

Mykotoksyna T-2 należy do trichotecenów typu A i swojej budowie zawiera podwójne wiązanie między C-9 i C-10 oraz grupę epoksydową między C-12 i C-13. Struktura chemiczna toksyny charakteryzuje się grupą hydroksylową (OH) w pozycji C-3, grupami acetyloksyłowymi (-OCOCH₃) w pozycjach C-4 i C-15, atomem wodoru w pozycji C-7 oraz grupą izowalerylową z wiązaniem estrowym [OCOCH₂CH(CH₃)₂] w pozycji C-8. Toksyna T-2 produkowana jest przez różne gatunki grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium* takie jak *F. sporotrichioides*, *F. poae* i *F. acuminatum*. Toksyna ta wykazuje odporność na degradację pod wpływem wysokiej temperatury i światła UV. Toksyna T-2 wywołuje skażenia wielu upraw a jej obecność wykrywano w ziarnach zbóż takich jak jęczmień, pszenica, owies, ryż i kukurydza, a także w produktach zbożowych m.in. mące pszennej, płatkach śniadaniowych czy wyrobach piekarniczych.

Wśród trichotecenów toksyna T-2 uważana jest za najbardziej toksycznego przedstawiciela. Dane literaturowe potwierdzają, że toksyna ta wykazuje toksyczność względem różnych układów organizmu ludzi i zwierząt tj. pokarmowego, immunologicznego, nerwowego, moczowego czy płciowego. Co więcej, toksyna T-2 oddziałuje silnie drażniąco na skórę i może być wchłaniana przez nienaruszoną powłokę skórne, powodując ogólnoustrojową toksyczność. Uważa się, że uszkodzenia skóry wywołane działaniem tej toksyny mogą być nawet 400-krotnie silniejsze niż przy zastosowaniu iperytu siarkowego, który należy do broni chemicznej. Ponadto aktywność toksyny T-2 po wnikięciu do organizmu przez drogi oddechowe jest porównywalna z aktywnością iperytu siarkowego, iperytów azotowych i luizytu. Dlatego też właściwości toksyny T-2 są bardziej zbliżone do środków chemicznych niż toksyn biologicznych. Dermatotoksyczne skutki działania toksyny charakteryzują się zaczerwienieniem, obrzękiem a w ciężkich przypadkach owrzodzeniem i martwicą skóry. Pomimo wielu lat badań nad toksycznym działaniem toksyny T-2 względem skóry brak jest informacji wskazujących na molekularne mechanizmy działania tej toksyny względem jej komórek.

Głównym celem pracy było wyjaśnienie mechanizmów cytotoksycznego i genotoksycznego działania toksyny T-2 w warunkach *in vitro*. Materiał do badań stanowiła linia komórkowa prawidłowych ludzkich fibroblastów – Hs68. Komórki traktowano mykotoksyną T-2 w zakresie stężeń 0,001-100 µM oraz inkubowano przez 24 i 48 godzin.

Oceny bezpośredniego toksycznego działania toksyny T-2 względem ludzkich prawidłowych fibroblastów linii Hs68 dokonano za pomocą analizy przeżywalności komórek

z wykorzystaniem testu z błękitem trypanu oraz testu MTT. Oznaczono także komórkowy poziom ATP metodą bioluminometrii oraz aktywność kaspazy-3 oraz kaspazy-7 techniką cytometrii przepływowej. Analizę zmian apoptotycznych i nekrotycznych przeprowadzono z wykorzystaniem wiązania aneksyny V i jodku propidyny metodą cytometrii przepływowej, natomiast stężenie cytokeratyny 18 oceniono przy użyciu testu ELISA. Analizę wpływu toksyny T-2 na uszkodzenia mitochondriów komórek linii Hs68 przeprowadzono oznaczając zmiany potencjału błony mitochondrialnej przy użyciu sondy fluorescencyjnej JC-1, generowanie reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species – ROS) przy użyciu sondy fluorescencyjnej H2DCFDA, uszkodzenia mitochondrialnego DNA metodą Semi-Long Run qRT-PCR oraz ilość kopii mitochondrialnego DNA metodą Real-Time-qPCR. Analizę wpływu toksyny T-2 na uszkodzenia genomu jądrowego oparto na ocenie uszkodzeń jądrowego DNA metodą kometową, z wykorzystaniem reakcji Semi-Long Run qRT-PCR oraz ocenie zmian ekspresji genów na poziomie mRNA dla genów związanych z procesem stanu zapalnego i naprawy DNA. Dodatkowo przeprowadzono analizę *in silico* dotyczącą wiązania toksyny do DNA.

Przeprowadzone badania wykazują, że toksyna T-2 posiada toksyczne właściwości i negatywnie wpływa na funkcjonowanie komórek prawidłowych ludzkich fibroblastów linii Hs68. Analizy *in vitro* obejmujące traktowanie linii komórkowej toksyną w zakresie stężeń 0,001-100 μM przy 24- i 48-godzinnej inkubacji ukazują zarówno cytotoksyczny jak i genotoksyczny charakter toksyny T-2.

Summary

T-2 mycotoxin toxin belongs to type A trichothecenes and contains a double bond between C-9 and C-10 and an epoxy group between C-12 and C-13. The T-2 chemical structure is characterized by a hydroxyl (OH) group at the C-3 position, acetyloxy (-OCOCH₃) groups at the C-4 and C-15 positions, an atom of hydrogen at the C-7 position and an ester-linked isovaleryl [OCOCH₂CH(CH₃)₂] group at the C-8 position. T-2 toxin is produced by various species of filamentous fungi of the genus *Fusarium* such as *F. sporotrichioides*, *F. poae* and *F. acuminatum*. This toxin exhibits resistance to degradation under the influence of high temperature and UV light. T-2 toxin causes contamination of many crops, and its presence has been detected in grains of cereals such as barley, wheat, oats, rice and corn, as well as in cereal products such as wheat flour, breakfast cereals and bakery products.

Among the trichothecenes, the T-2 toxin is considered the most toxic representative. Literature data confirm that this toxin exhibits toxicity to various human and animal body systems, i.e., digestive, immunological, nervous, urinary and sexual. Moreover, T-2 toxin is a strong skin irritant and can be absorbed through intact skin, causing systemic toxicity. It is considered that skin damage caused by this toxin can be up to 400 times stronger than when using sulfur mustard, which belongs to chemical weapons. In addition, the activity of the T-2 toxin after entering the body through the respiratory tract is comparable to that of sulfur mustard, nitrogen mustard and lewisite. Therefore, the properties of the T-2 toxin are more similar to chemical agents than to biological toxins. Dermatotoxic effects of the toxin are characterized by redness, swelling and in severe cases ulceration and necrosis of the skin. Despite many years of studies on skin toxicity of T-2 toxin, there is no information indicating the molecular mechanisms of this toxin's action on this organ.

The main aim of the study was to elucidate the mechanisms of cytotoxic and genotoxic action of T-2 toxin under in vitro conditions. The study material was a cell line of normal human fibroblasts - Hs68. Cells were treated with mycotoxin T-2 at concentrations ranging from 0.001 to 100 μM and incubated for 24 and 48 hours.

The direct toxicity of T-2 toxin against human normal Hs68 fibroblasts was assessed by cell viability analysis using the trypan blue and the MTT assays. The cellular ATP level was also determined by bioluminometry and activity of caspase-3 and caspase-7 by flow cytometry. Analysis of apoptotic and necrotic lesions was performed using the binding of annexin V and propidine iodide by flow cytometry, while the concentration of cytokeratin 18 was assessed using the ELISA test. The analysis of the impact of T-2 toxin on mitochondrial damage of Hs68

cells was performed by determining changes of the mitochondrial membrane potential using the JC-1 fluorescent probe, generating reactive oxygen species (ROS) using the H2DCFDA fluorescent probe, determining mitochondrial DNA damage using the Semi-Long method Run qRT-PCR and the number of mitochondrial DNA copies by Real-Time-qPCR.

The analysis of the impact of T-2 toxin on nuclear genome damage was based on the assessment of nDNA damage using the comet method, Semi-Long Run qRT-PCR reaction and the evaluation of changes in gene expression at the mRNA level for genes related to inflammation and DNA repair. In addition, an *in silico* analysis of toxin binding to DNA was performed.

The studies show that T-2 toxin has toxic properties and negatively affects the functioning of normal human fibroblast cells of the Hs68 line. In vitro analyzes involving treatment of the cell line with toxin concentrations in the concentration range of 0.001-100 μM with 24- and 48-hour incubation show both the cytotoxic and genotoxic nature of the T-2 toxin.