

## STRESZCZENIE

W ostatnich latach wzrasta liczba publikacji naukowych poświęconych jednej z najsilniej działających toksyn sinicowych – cylindrospermopsynie (CYN). CYN jest cytotoksycznym alkaloidem produkowanym przez kilkanaście gatunków sinic. Jej działanie w organizmach kręgowców obejmuje zaburzenie szeregu procesów metabolicznych między innymi: zahamowanie biosyntezy białek, uszkodzenia materiału genetycznego, stres oksydacyjny lub obniżenie wartości indeksu mitotycznego. Wiedza dotycząca warunków dekompozycji CYN oraz charakterystyki produktów jej rozkładu była do tej pory niezadowolająca. Prezentowane w tej pracy wyniki dostarczają nowych informacji na temat stabilności cząsteczki CYN poddawanej oddziaływaniu wybranych czynników abiotycznych takich jak: szeroki zakres pH, wysoka temperatura, napromieniowanie zakresem UV-B oraz promieniowanie fotosyntetycznie aktywne (PAR). Obejmują one również szczegółową charakterystykę produktów jej rozkładu. Cząsteczka CYN jest związkiem zachowującym stabilność w roztworach o pH kwasowym i obojętnym (3-7 jednostek), a jej dekompozycję obserwowano w warunkach zasadowych (pH 10 i 12 jednostek). Poddawanie CYN działaniu temp. 100 °C nie stymulowało jej rozkładu w pH kwasowym i obojętnym (pH 3-7 jednostek), a jej dekompozycję uzyskano w roztworach o odczynie alkalicznym (pH 10-12 jednostek). Dekompozycja CYN w warunkach zasadowych bez/lub w trakcie oddziaływania 100 °C powodowała pojawienie się siedmiu produktów. Określono ich masy cząsteczkowe i strukturę chemiczną, a także zaproponowano potencjalne ścieżki fragmentacji masowej wyjściowej formy związku. Napromieniowanie roztworów CYN zakresem UV-B ( $36 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) aktywowało jej dekompozycję w pH zasadowym (10-12 jednostek), natomiast w pH kwasowym i obojętnym (3-7 jednostek) nie powodowało podobnej reakcji. Rozpad CYN w roztworach zasadowych napromieniowanych zakresem UV-B indukował powstanie sześciu produktów, dla których określono ich masy cząsteczkowe oraz zaproponowano strukturę chemiczną i potencjalne szlaki fragmentacyjne. Działanie PAR bez/lub w obecności wzbudzonej światłem czerwonym fikocyjaniny C nie naruszało stabilności cząsteczki CYN.

Wyniki uzyskane z wykorzystaniem testów toksyczności Thamnotoxkit FTM oraz Deltatox II® wykazały, że produkty całkowitej dekompozycji CYN powstałe w roztworach zasadowych (pH 10) podczas oddziaływania 100 °C lub promieniowania UV-B ( $36 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) nie wykazują toksycznych właściwości względem larw skorupiaków *Thamnocephalus platyurus* i bakterii *Vibrio fischeri*. Dawki LC50 i IC50 oszacowane dla CYN na podstawie

wyników wykonanych podobnych testów potwierdziły jej wysoki stopień toksyczności i wynosiły odpowiednio  $0,39 \mu\text{g ml}^{-1}$  i  $< 0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Zarówno CYN jak również produkty jej dekompozycji hamowały aktywność enzymów kolagenazy i elastazy z wysoką wydajnością odpowiednio  $\sim 85\%$  oraz  $\sim 35\%$  po 30 min. Opracowane dla CYN lub produktów jej dekompozycji dawki IC50 względem kolagenazy wynosiły  $< 0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Podobny parametr obliczony dla elastazy przyjmował wyższe wartości  $\sim 3 \mu\text{g ml}^{-1}$  i  $\sim 4 \mu\text{g ml}^{-1}$  odpowiednio dla CYN i produktów jej rozkładu.

CYN lub produkty jej dekompozycji wykazywały również wysoką bioaktywność względem komórek ludzkiego naskórka. Keratynocyty inkubowane w pożywce zawierającej CYN lub jej produkty traciły zdolność proliferacji, a przy oddziaływaniu wyższych stężeń ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  lub  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) obumierały. Wyniki testu dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wykazały, że zarówno CYN jak również produkty jej dekompozycji charakteryzują się wysokim stopniem dermatotoksyczności. Oddziaływanie toksyny lub produktów jej rozkładu obniżało ponadto zdolność keratynocytów do regeneracji uszkodzeń warstwy komórkowej. Zastosowany w doświadczeniach i powszechnie używany do oceny właściwości antyoksydacyjnych rodnik 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl (DPPH) nie wykazywał wpływu CYN lub produktów jej dekompozycji na aktywność przeciwutleniającą glutationu. Podobnie pochodne reakcji CYN lub produktów jej rozkładu po reakcji z cytochromem P450 nie zaburzały procesu usuwania DPPH przez glutation. Chelatacja CYN lub produktów jej dekompozycji z jonami żelaza(III) nie modyfikowała biologicznej aktywności tych związków. Stopień toksyczności CYN lub produktów jej rozkładu inkubowanych uprzednio z jonami żelaza(III) oszacowany poprzez zastosowanie testu Thamnotoxkit FTM nie wykazywał różnic w porównaniu do wartości uzyskanych dla CYN. Prezentowane w tej pracy wyniki dostarczają nowych informacji na temat warunków dekompozycji CYN oraz produktów jej rozkładu. Znacząco poszerzają dostępną dotychczas wiedzę o budowie i charakterystyce produktów dekompozycji CYN powstających pod wpływem testowanych czynników oraz stopniu ich toksyczności. Rezultaty badań określających toksyczność CYN oraz produktów jej dekompozycji pozwalają na pełniejszą ocenę niebezpieczeństw jakie związki te mogą stwarzać potencjalnie w naturalnych zbiornikach wodnych