

Warszawa, 21 sierpnia 2018 r.

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
w Warszawie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
Pana mgr. Michała Adamskiego
pt.: Warunki dekompozycji cytotoksyny cylindrospermopsyny.
Charakterystyka produktów jej rozkładu.

przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Białczyka

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Michała Adamskiego stanowi zwarte opracowanie, liczące 142 strony i zawierające 49 złożonych rysunków oraz 9 tabel. Rozprawa została przygotowana w języku polskim, a jej struktura jest standardowa i charakterystyczna dla badawczych prac doktorskich. Opracowanie obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wstęp (30 stron), opis celów pracy, omówienie materiałów i metod (17 stron), przedstawienie uzyskanych wyników (45 stron), dyskusję (16 stron), podsumowanie (2 strony) oraz spis literatury. To zestawienie mówi wiele o ogromnym jak na doktorat materiale doświadczalnym i bardzo szerokim spektrum metod badawczych. Wstęp dysertacji we właściwy sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące problematyki związanej z zakwitami sinic, produkowanymi przez nie rodzajami toksyn oraz skutkami biologicznymi, które wywołują u zwierząt i ludzi. Integralną część wstępu stanowi podrozdział, w którym Doktorant w bardzo profesjonalny sposób dokonał przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat cylindrospermopsyny, ze szczególnym uwzględnieniem występowania tej cytotoksyny w zbiornikach wodnych na świecie, jej właściwości fizykochemicznych, biosyntezy, biologicznej aktywności w organizmach zwierzęcych i roślinnych oraz metod stosowanych do jej jakościowej i ilościowej analizy. Podrozdział ten w zgrabny sposób uzasadnia wybrany przez Doktoranta przedmiot badań własnych. Cele pracy zostały sprecyzowane jasno i konkretnie. Treść założeń jest jednoznaczna, a zakres przeprowadzonych badań i opis stosowanych metod przygotowane są niezwykle starannie. Wyniki eksperymentów zostały przedstawione czytelnie i jasno. Zarówno prezentacja wyników, jak też ich opis nie budzą żadnych zastrzeżeń. Dyskusja własnych wyników badań prowadzona jest w sposób dowodzący doskonałej znajomości nie tylko piśmiennictwa, a także wiedzy ogólnej z zakresu pracy i dowodzi odwagi Autora w formułowaniu własnych wniosków, a także zdolności logicznego i syntetycznego myślenia. Literatura przedmiotu jest bardzo dobrze dobrana. Autor wybrał 154 pozycje, nie ograniczając się do prac najnowszych. Rozprawa od strony edytorskiej jest bardzo starannie opracowana, a układ graficzny i rozplanowanie tekstu zasługują na bardzo wysoką ocenę.

Przedmiotem pracy jest poszerzenie wiedzy o procesie dekompozycji cylindrospermopsyny pod wpływem wybranych czynników abiotycznych oraz charakterystyka produktów powstałych podczas jej rozpadu. Biorąc pod uwagę stały wzrost częstości i intensywności masowych zakwitów sinicowych, toksyczność produkowanych przez nie metabolitów oraz ograniczoną wiedzę na temat ich oddziaływania w środowisku naturalnym, jak również znikomą wiedzę na temat skutecznych metod ich usuwania ze zbiorników wodnych, problem podjęty przez Doktoranta jest niezwykle ważny oraz ciekawy, zarówno poznawczo, jak i z punktu widzenia praktycznego wykorzystania uzyskanej wiedzy do opracowania procedur technologicznych dla uzdatniania wody.

Autor postawił sobie trzy zasadnicze cele:

- określenie stopnia dekompozycji cylindrospermopsyny indukowanej temperaturą, pH o szerokim zakresie oraz ekspozycją na promieniowanie UV-B i promieniowanie fotosyntetycznie aktywne,
- określenie stopnia toksyczności produktów dekompozycji cylindrospermopsyny w porównaniu do oddziaływania czystej toksyny,
- zweryfikowanie hipotez określających wpływ cylindrospermopsyny na zdolności antyoksydacyjne glutationu oraz obniżenie jej toksyczności po chelatacji z jonami żelaza(III).

Materiał do badań stanowiła cylindrospermopsyna, której źródłem były sinice *Cylindrospermopsis raciborski* szczep CS 505/7 z kolekcji Australian Algae Culture Collection (Australia). Doktorant posłużył się odpowiednimi metodami hodowli ww. szczepu sinic i izolacji cylindrospermopsyny oraz zaawansowanymi, analitycznymi metodami badawczymi do ilościowej i jakościowej analizy uzyskanej toksyny oraz produktów jej dekompozycji, takimi jak: wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz ultrasprawa chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS). Zastosował również szereg metod biologicznych i biochemicznych do oceny toksyczności cylindrospermopsyny oraz produktów jej dekompozycji, takich jak: test oceny żywotności larw skorupiaków *Thamnocephalus platyurus*, test analizy bioluminescencji bakterii *Vibrio fischeri*, test aktywności kolagenazy, test aktywności elastazy, metodę biochemiczną do oceny zdolności antyoksydacyjnych glutationu oraz 3 testy z wykorzystaniem ludzkich komórek naskórka *in vitro* (test proliferacji WST-1, test cytotoksyczności LDH oraz test zarastania rany do oceny aktywności migracyjnej komórek). Wszystkie zastosowane metody zostały dobrane w sposób adekwatny do postawionych celów badań.

Punktem wyjścia do badań były nieliczne doniesienia, dotyczące wpływu czynników fizykochemicznych na stabilność cząsteczki cylindrospermopsyny oraz niejednoznaczne informacje, wyjaśniające mechanizmy oddziaływania toksyny oraz produktów jej rozpadu na organizmy. W związku z tym Autor pracy podjął próbę przeprowadzenia wnikliwych studiów nad oddziaływaniem szerokiego zakresu temperatur, pH, promieniowania UV-B oraz promieniowania fotosyntetycznie aktywnego i fikocyjaniny C wzbudzonej światłem czerwonym na przebieg procesu dekompozycji toksyny, ze szczególnym uwzględnieniem charakterystyki i toksyczności produktów tworzących się podczas jej rozpadu.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały idealną zgodność między wartościami i kształtami widm absorpcyjnych cylindrospermopsyny ekstrahowanej z komórek sinic i komercyjnego wzorca, wskazując na wysoki stopień czystości otrzymanej toksyny. Dalsze badania potwierdziły sugerowaną wcześniej wysoką stabilność badanej cząsteczki. Doktorant wykazał, że oddziaływanie roztworów o pH kwaśnym i obojętnym (3, 5 oraz 7 jednostek) nie indukowało rozpadu toksyny. Jej dekompozycję zaobserwowano wyłącznie w warunkach alkalicznych w pH równym 10 i 12 jednostek. Zastosowanie nowoczesnych technik analitycznych przez Doktoranta pozwoliło na oznaczenie 7 produktów dekompozycji, które nazwano od C1 do C6 oraz 7-epi-cylindrospermopsynę. Z uwagi na fakt, że 6 z 7 otrzymanych produktów dekompozycji nie zostało do tej pory opisane w literaturze, na szczególną uwagę zasługują zaproponowane przez Doktoranta możliwe ścieżki fragmentacji masowej produktów dekompozycji toksyny w warunkach zasadowego środowiska oraz zaproponowane struktury uzyskanych produktów. Analiza wpływu temperatury na stabilność cząsteczki toksyny wykazała, że cząsteczka ta nie ulegała rozkładowi zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w temperaturze 40 °C i 100 °C w szerokim zakresie pH. Jej dekompozycję zaobserwowano jedynie w warunkach równoczesnego oddziaływania temperatury 100 °C i środowiska silnie alkalicznego o pH 10 i 12. Doktorant wykazał również dużą stabilność toksyny pod wpływem promieniowania fotosyntetycznie aktywnego oraz fikocyjaniny C wzbudzonej światłem czerwonym z równoczesnym oddziaływaniem szerokiego zakresu pH i temperatury pokojowej. Jedynie równoczesne działanie promieniowania UV-B i środowiska silnie alkalicznego o pH 10 i 12 wywołało znaczne obniżenie stężenia toksyny w roztworze wodnym. Szczegółowa analiza produktów rozpadu toksyny wykazała 6 produktów i pozwoliła na zaproponowanie ścieżki fragmentacji masowej poszczególnych produktów i ich struktur. Co ciekawe, część spośród oznaczonych produktów różniła się od produktów powstałych wyłącznie pod wpływem środowiska silnie alkalicznego, co wskazywałoby na to, że promieniowanie UV-B może być czynnikiem przyspieszającym dekompozycję toksyny. Należy podkreślić i docenić, że wyniki uzyskane przez Doktoranta, w części, są pierwszymi, a w części jednymi z pierwszych tego rodzaju wyników uzyskanych na świecie. Podsumowując, uzyskane wyniki, wskazujące na przyspieszoną degradację toksyny pod wpływem wysokiej temperatury, promieniowania UV-B i alkalicznego pH mogą okazać się bardzo przydatną informacją podczas opracowania procedur technologicznych dla oczyszczania wody.

Kolejnym, bardzo ciekawym aspektem pracy było zbadanie toksyczności cylindrospermopsyny oraz produktów jej dekompozycji. Doktorant zastosował do tego celu bardzo szerokie spektrum metod badawczych, pozwalających na kompleksową ocenę skutków biologicznych toksyn z zastosowaniem mikroorganizmów oraz skorupiaków, jak również na poziomie biochemicznym i komórkowym (ludzkie keratynocyty). Eksperymenty z zastosowaniem larw skorupiaków wykazały silną toksyczność czystej cylindrospermopsyny w bardzo niskich dawkach, ale nie wykazały takiej toksyczności w przypadku produktów jej rozpadu, które powstały po zastosowaniu wysokiej temperatury i alkalicznego środowiska oraz po zastosowaniu promieniowania

UV-B i alkalicznego środowiska. Podobne wyniki uzyskano po przeprowadzeniu testu z zastosowaniem bioluminiscencyjnych bakterii *Vibrio fischeri*. Natomiast, wyniki badań biochemicznych, dotyczących pomiaru aktywności kolagenazy i elastazy wykazały, że zarówno czysta toksyna, jak również produkty jej dekompozycji, istotnie obniżały ww. aktywności. Doktorant wykazał jednocześnie, że hamowanie aktywności reakcji enzymatycznych zależało w istotnym stopniu od stężenia toksyny oraz produktów jej rozpadu i czasu reakcji. Niezwykle ciekawe dla mnie są wyniki badań dotyczące wpływu cylindrospermopsyny oraz produktów jej dekompozycji na cytotoksyczność komórkową, aktywność proliferacyjną oraz aktywność migracyjną ludzkich keratynocytów *in vitro*. Prawdopodobieństwo narażenia ludzi i zwierząt na toksynę i/lub produkty jej rozpadu poprzez skórę jest oczywiste podczas rekreacyjnego i gospodarczego korzystania ze zbiorników wodnych, a możliwość ich transportu do innych organów oraz zdolność ich akumulacji w tkankach może istotnie wpływać na zdrowie ludzi. Wyniki uzyskane przez Doktoranta jasno wykazały, że zarówno czysta toksyna, jak również produkty jej rozpadu wywołały zależny od dawki spadek proliferacji komórek. Analiza cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu LDH potwierdziła wyniki testu proliferacji, wskazując na to, że nawet niewielkie dawki czystej cylindrospermopsyny prowadzą do rozległych i nieodwracalnych uszkodzeń błon komórkowych keratynocytów. W przypadku produktów jej rozpadu, ich cytotoksyczność była ściśle zależna od dawki. Wyniki eksperymentów dokumentujących aktywność migracyjną keratynocytów pozostają w ścisłej korelacji z wynikami poprzednich 2 testów, wskazując na zahamowanie regeneracji warstwy komórkowej.

Ostatnim celem pracy było zweryfikowanie hipotez określających wpływ cylindrospermopsyny na zdolności antyoksydacyjne glutationu oraz próba obniżenia jej toksyczności po chelatacji z jonami żelaza(III). Uzyskane w pracy wyniki wykazały, że ani cylindrospermopsyna, ani produkty jej rozpadu nie hamowały reakcji usuwania wolnego rodnika przez glutation, co skłoniło Doktoranta do przedstawienia kilku możliwych hipotez obserwowanego zjawiska. Jedna z nich zakładała możliwy udział cytochromu P450 w obniżeniu toksyczności badanych związków. Przeprowadzone eksperymenty nie potwierdziły jednak tych przypuszczeń. W przypadku weryfikacji pozostałych hipotez odczuwam pewien niedosyt, ponieważ Doktorant dokonał ich na podstawie doniesień literaturowych, a nie badań własnych. Ta uwaga nie umniejsza jednak wartości rozprawy i myślę, że eksperymentalna weryfikacja pozostałych hipotez mogłaby w przyszłości stanowić ciekawy aspekt przyszłej pracy naukowej Doktoranta. Natomiast, bardzo ciekawym uzupełnieniem rozprawy są badania dotyczące wpływu chelatacji cylindrospermopsyny i produktów jej dekompozycji z jonami żelaza(III) na ich biologiczną aktywność. Chociaż uzyskane wyniki nie wykazały istotnych zmian toksyczności badanych związków po ich związaniu z jonami żelaza(III), w porównaniu do czystej toksyny i produktów jej rozpadu, to kontynuacja podobnych badań jest niezwykle istotna, zarówno z poznawczego punktu widzenia, jak również z punktu widzenia ekotoksykologii tych związków.

W konkluzji stwierdzam, że Doktorant omówił i przedyskutował uzyskane wyniki badań w sposób syntetyczny i spójny, wykazując logiczne powiązanie głównych celów rozprawy doktorskiej. Wyniki badań są ponadto oryginalne, wzbudzają wysoki stopień zaufania czytelnika i poszerzają w istotny sposób wiedzę na temat cylindrospermopsyny i produktów jej dekompozycji oraz ich toksyczności. W opinii recenzenta stanowią one niezwykle istotny wkład do osiągnięć naukowych w Polsce i na świecie. Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, iż jest ona świadectwem ogromnej pracowitości Doktoranta i bardzo dobrej znajomości podjętego tematu. Badania prowadzono z zastosowaniem licznych i zaawansowanych metod. Praca napisana została poprawnym językiem z zachowaniem zasad przygotowywania prac naukowych. Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób analizy wyników świadczą o dojrzałości naukowej oraz doskonałym warsztacie badawczym i w pełni uzasadniają ubieganie się o stopień doktora.

W związku z tym stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr. Michała Adamskiego spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. Zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr. Michała Adamskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na bardzo szeroki zakres prac doświadczalnych, ich interdyscyplinarność, wysoki poziom naukowy, nowatorski charakter i kluczowy wpływ na rozwój nauki oraz wartość praktyczną, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr. Michała Adamskiego.

