



**Politechnika
Śląska**

Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Katedra Biotechnologii Środowiskowej

ROZPRAWA DOKTORSKA

Badania ekotoksyczności wybranych leków cytostatycznych i możliwości wykorzystania grzybów do ich usuwania

mgr inż. Marcelina Jureczko

Promotor:

dr hab. inż. Wioletta Przysaś, prof. Pol. Śl.

Gliwice, 2021

Streszczenie

Wzrost wykorzystania leków przeciwnowotworowych, prowadzi do zwiększonego poziomu cytostatyków uwalnianych do środowiska, stąd też ich obecność w wodach powierzchniowych, gruntowych, jak również pitnych. Ponieważ wpływają na stabilność materiału genetycznego, mogą być zagrożeniem dla środowiska. Związki te są odporne na rozkład biologiczny w naturalnych wodach i nie są skutecznie usuwane przez oczyszczalnie ścieków. Badania nad skutecznym eliminowaniem leków przeciwnowotworowych z wód są zatem koniecznością. Technologie oparte na grzybach białej zgnilizny drewna są szczególnie warte zainteresowania. Organizmy te znalazły bowiem zastosowanie w usuwaniu wielu związków o budowie aromatycznej, dzięki synergistycznemu działaniu wielu zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych niespecyficznych enzymów oraz strategii nieenzymatycznych. Dlatego oczyszczanie ścieków z wykorzystaniem grzybów wydaje się być obiecującą alternatywą dla rozwiązania problemu obecności leków antynowotworowych w wodach.

Studium literaturowe pozwoliło na sformułowanie dwóch tez badawczych, zgodnie z którymi: 1) cytostatyki mogą być toksyczne dla organizmów nie będących docelowym przedmiotem ich działania, zatem istnieje konieczność ich eliminacji ze ścieków; 2) grzyby, rozkładające wiele ksenobiotyków o strukturze pierścieniowej ze względu na produkcję szeregu enzymów o niskiej specyficzności, mogą skutecznie usuwać także leki przeciwnowotworowe o takiej właśnie budowie. Z postawionych tez wyniknęły główne cele projektu: uzyskanie złożonych danych porównawczych na temat ekotoksyczności wybranych leków cytostatycznych i ich mieszaniny w środowisku wodnym oraz ocena przydatności grzybów do usuwania tych substancji ze środowiska.

Realizacji celów badawczych dokonano dzięki wykonaniu szeregu eksperymentów oraz studium literatury. Najpierw zebrano doniesienia dotyczące leków przeciwnowotworowych jako substancji zanieczyszczających wodę i ich szkodliwego wpływu na środowisko naturalne. Następnie dokonano oceny ekotoksyczności wybranych leków cytostatycznych: bleomycyny i winkrystyny, oraz ich mieszaniny wobec przedstawicieli wszystkich trzech poziomów troficznych organizmów wodnych (rośliny *Lemna minor*, skorupiaka *Daphnia magna* i bakterii *Pseudomonas putida*). W kolejnym kroku pochyłono się nad problemem eliminacji tych dwóch związków ze środowiska. Wyselekcjonowano i wyizolowano grzyby białej zgnilizny drewna (*Fomes fomentarius* (szczep CB13), *Hypholoma fasciculare* (szczep CB15), *Phyllotopsis nidulans* (szczep CB14), *Pleurotus ostreatus* (szczep BWPH) i *Trametes versicolor* (szczep CB8)) oraz określono ich

przydatność do usuwania badanych cytostatyków. Najpierw przetestowano możliwości wzrostu grzybów w obecności badanych leków, w zależności od zawartości substancji odżywczych w pożywce. Następnie oceniono wydajność i mechanizm usuwania testowanych substancji przez poszczególne szczepy, wraz z analizą wpływu warunków fizykochemicznych na proces eliminacji leków przez grzybnię. Dokonano tego w testach usuwania leków na drodze fizycznej sorpcji oraz biologicznej degradacji. Eksperymentom biodegradacji towarzyszyła weryfikacja potencjału enzymatycznego wybranych szczepów grzybów, oraz ocena ekotoksyczności próbek po procesie usuwania leków antynowotworowych uzupełniona o testy cytotoksyczności na mysich fibroblastach L929.

Przegląd literatury oraz badania własne pozwoliły stwierdzić, że cytostatyki mogą stanowić istotne zagrożenie dla środowiska są bowiem toksyczne dla organizmów nie będących docelowym przedmiotem ich działania. Wykonane analizy pozwoliły zakwalifikować bleomycynę i winkrystynę, odpowiednio jako bardzo toksyczny i toksyczny związek zanieczyszczający wodę. W testach ekotoksyczności oba farmaceutyki obecne w mieszaninie wykazały działanie antagonistyczne, co oznacza, że bazowanie na efektach uzyskanych dla pojedynczych substancji może prowadzić do błędnej oceny ryzyka środowiskowego. Wyniki usuwania bleomycyny i winkrystyny w procesie sorpcji jak i biodegradacji wykazały, że grzyby białej zgnilizny drewna mogą stanowić przydatne narzędzie do eliminacji badanych leków przeciwnowotworowych. Mimo, że efektywność jest uzależniona od rodzaju procesu, cytostatyku, zastosowanego szczepu grzyba, charakteru biomasy oraz parametrów fizykochemicznych to przeprowadzone badania pozwoliły na uzyskanie najwyższej i/lub najszybszej eliminacji leków w porównaniu z innymi biologicznymi i niebiologicznymi metodami usuwania tych substancji prezentowanymi na świecie. Dla winkrystyny osiągnięto 97 % eliminacji leku w procesie degradacji (po 4 dniach eksperymentu z grzybnią szczepu CB15) i 26 % w badaniach sorpcji (po 3 godzinach kontaktu z żywą biomasą szczepu CB14). Usunięcie bleomycyny wynosiło odpowiednio 36 % (w 9 dniu badań degradacji) i 59 % (po 3 godzinach w procesie sorpcji) przy wykorzystaniu grzybni szczepu CB8. W czasie testów biodegradacji badanych cytostatyków wykazano także spadek toksyczności próbek po procesie oraz znaczącą aktywność enzymu lakaza. Tak obiecujące wyniki eksperymentów otwierają przestrzeń do dalszych badań nad zastosowaniem grzybów i ich enzymów w eliminacji ze środowiska farmaceutyków do tej pory uważanych za odporne na degradację.