



Dr hab. Izabela Jędrzejowska
Zakład Biologii Rozwoju Zwierząt
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski
ul. Sienkiewicza 21
50-335 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Ostróżki z tytułowanej: „Analiza zmian w strukturze i ultrastrukturze komórek nabłonka jelita środkowego słodkowodnej krewetki, *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) wywołanych obecnością niklu w środowisku życia” wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Magdaleny Rost-Roszkowskiej w Zespole Histologii i Embriologii Zwierząt na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Ocena merytoryczna

1. Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Głównym celem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej był szczegółowy opis zmian w komórkach nabłonka jelita oraz wątrobotrzustki powstałych w wyniku ekspozycji zwierząt na nikiel, a także spodziewanych w tych narządach zmian regeneracyjnych po ponownym hodowaniu zwierząt w czystej wodzie. Wybrana do analiz krewetka, *Neocaridina davidi*, jako obiekt badawczy charakteryzuje się kilkoma zaletami, wśród których warto wymienić łatwość hodowli, dobrze poznaną strukturę jelita środkowego oraz przynależność do skorupiaków, które często pełnią rolę bioindykatorów zarówno wód słodkich jak i słonych. Nikiel i jego związki przyczyniają się do zanieczyszczenia środowiska jako skutek uboczny i niepożądany działalności przemysłowej człowieka co stanowi poważny problem natury ekologicznej. Wpływ tego związku na kondycję zwierząt nie jest dobrze poznany. Biorąc pod uwagę powyższe, wybór tematyki recenzowanej rozprawy, jak i wybór materiału do badań uważam za zasadne. W tym miejscu warto podkreślić, że temat rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Ostróżki wpisuje się w tematykę badawczą projektów realizowanych pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Rost-Roszkowskiej, od lat specjalizującej się w badaniach struktury i funkcji jelita środkowego u przedstawicieli wybranych grup bezkręgowców. Wiele z tych projektów ma charakter eksperymentalny i dotyczy wpływu różnych substancji na strukturę jelita środkowego wybranych przedstawicieli bezkręgowców, tak więc temat realizowany był pod opieką naukową promotora z bardzo dużym w tej tematyce doświadczeniem.

2. Ocena poprawności struktury rozprawy (kolejność rozdziałów, proporcje między poszczególnymi rozdziałami), język i formalna strona rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma formę manuskryptu, który liczy łącznie 183 strony. Praca została podzielona na dwie części. Część pierwsza, licząca 139 numerowanych stron, zawiera typowe dla pracy naukowej rozdziały: Wstęp, Cel pracy i hipotezy badawcze, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Bibliografię. Część druga obejmuje bogato ilustrowaną dokumentację badań, w której znajduje się 20 tablic z fotografiami oraz 16 wykresów. W tej

części pracy dwie tablice omyłkowo oznaczone są numerem 19, podczas gdy w Wynikach pracy zachowana jest numeracja prawidłowa. Proporcje między poszczególnymi rozdziałami są właściwe. Praca napisana jest w sposób klarowny świadczący o opanowaniu techniki pisania prac naukowych. Błędy edytorskie lub interpunkcyjne są nieliczne. W tekście pojawiają się skróty myślowe, które są dość łatwe do rozszyfrowania przez czytelnika np. „Skorupiaki to najważniejsza grupa bezkręgowców;” (str. 7), czy też niewłaściwe zestawienia systematyczno/taksonomiczne np. skorupiaki z rodziny *Balanus improvisus* (str.7), *Pardosa cupreus* (Opisthothelae), gdzie Opisthothelae to podrząd w rzędzie pajaków (str. 69); nieprecyzyjne sformułowania np. nekroza lub apoptoza mitochondriów (str. 60 i 69). Na sporą objętość tekstu rozprawy wpływa dość duża liczba powtórzeń, szczególnie w Dyskusji rozprawy.

3. *Szczegółowa charakterystyka i ocena poszczególnych części rozprawy*

WSTEP dysertacji dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy. Znajdują się w nim informacje dotyczące skorupiaków jako bioindykatorów środowiska wodnego, budowy jelita środkowego skorupiaków oraz znaczenia biologicznego i toksykologii niklu. Charakterystyka komórek nabłonkowych jelita skorupiaków przedstawiona jest w formie dwóch tabel co ułatwia ich porównanie. Lekki niedosyt budzi cytowanie niezbyt aktualnej już literatury odnoszącej się do zanieczyszczenia ekosystemów niklem.

Rozdział CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE. Cele pracy są jasno sprecyzowane i adekwatne do tytułu pracy. Obok celu głównego przedstawiono sześć celów szczegółowych uwzględniających między innymi analizę aktywacji i przebiegu śmierci komórkowej wywołanych ekspozycją na nikiel, analizę aktywacji gromadzenia reaktywnych form tlenu, zmian mitochondrialnych oraz poziomu ATP. Wśród celów szczegółowych cel 4 i 6, dotyczące zmian regeneracyjnych częściowo się pokrywają i moim zdaniem mogłyby być zawarte w jednym punkcie. Doktoranta postawiła 6 hipotez badawczych o charakterze przeciwnym. Ta wersja przedstawiania hipotez jest rzadziej spotykana w pracach naukowych, chociaż również akceptowalna. Szanuję ten wybór, Pani Anna Ostróżka jako Autorka pracy ma to tego prawo. W przyszłej pracy naukowej proponuję rozważyć postawienie na jedną z dwóch przeciwnych hipotez, co w mojej ocenie jest lepszym rozwiązaniem, gdyż niejako wymusza od autora pracy podjęcia decyzji, której słuszność ostatecznie zostanie zweryfikowana.

W rozdziale MATERIAŁY I METODY Autorka zamieściła szczegółową charakterystykę badanego gatunku, opis prowadzonej hodowli, założenia eksperymentu z podziałem na grupy eksperymentalne, a także odpowiedni opis wykorzystanych technik badawczych obejmujących mikroskopię świetlną, wybrane techniki histochemiczne, transmisyjną mikroskopię elektronową, rentgenowską spektrometrię fluorescencyjną z całkowitym odbiciem promieniowania, mikroskopię konfokalną do detekcji silnie kwaśnych struktur komórkowych oraz reaktywnych form tlenu, cytometrię przepływową z zastosowaniem różnorodnych odczynników i analizę statyczną. Co istotne, przedstawiono również informacje o liczbie osobników wykorzystanych w każdej z technik. Z opisu wynika, że eksperyment został zaplanowany właściwie biorąc pod uwagę dobór stężenia chlorku niklu oraz czas jakim poddane były zwierzęta wpływowi ksenobiotyku w obu grupach eksperymentalnych, a także zaplanowanie dodatkowych analiz w celu stwierdzenia ewentualnych zmian regeneracyjnych po przywróceniu zwierząt do hodowli w czystej wodzie akwariowej po upływie jednego oraz dwóch tygodni. Wybór metod badawczych należy uznać za trafny i umożliwiający osiągnięcie

zaplanowanych celów. Charakterystykę biologii badanej krewetki można by z powodzeniem przenieść do Wstępu pracy, co jest często spotykaną praktyką.

Do tej części pracy wkraść się błąd w nazwie podrozdziału 3.3.5.6. wskazujący, że Muse Cell Cycle Kit został wykorzystany do analizy aktywnych i nieaktywnych mitochondriów, podczas gdy Kit ten służy do ilościowej analizy komórek znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego.

W podrozdziale 3.3.4.2. Barwienie odczynnikiem DHE – detekcja reaktywnych form tlenu (ROS) nie podano stężenia odczynnika DAPI. Zakładam, że użyto odczynnika w takim samym stężeniu jak przy innych wyżej opisanych metodach.

W WYNIKACH Doktorantka opisała rezultaty badań realizując tym samym wyznaczone cele. Kolejność prezentowanych wyników jest ściśle związana z technikami badawczymi wykorzystanymi w pracy. Rozpoczyna się od danych dotyczących stężenia niklu w ciele badanych zwierząt, po czym kolejno opisane są zmiany na poziomie ultrastrukturalnym w komórkach nabłonka jelita i wątrobotrzustki wywołane obecnością niklu, wyniki analiz histochemicznych, autofagia, śmierć komórkowa, poziom reaktywnych form tlenu, aktywność mitochondrialna, zmiany poziomu ATP i ADP, analiza cyklu komórkowego oraz proliferacja komórek jelita środkowego. Sposób prezentacji wyników jest dość zwięzły i zasadniczo przejrzysty.

DYSKUSJA jest wielowątkowa i obejmuje zagadnienia związane z tematem recenzowanej rozprawy. Sposób prowadzenia dyskusji jest różnorodny. W niektórych fragmentach wprowadzenie do dyskusji i interpretacja wyników są bardzo klarowne, a w innych związek prezentowanych informacji z uzyskanymi wynikami jest mniej jasny. W nielicznych przypadkach Autorka nie akcentuje własnych interpretacji wyników, lecz bezpośrednio interpretuje je konkluzjami z cytowanych publikacji np. str. 74 „Barwienie odczynnikiem LysoTracker także wykazało spadek intensywności sygnałów emitowanych przez struktury silnie kwaśne (w tym autofagosomy), adekwatnie do czasu oczyszczania. Świadczy to tym, że autofagia nie jest już procesem wymaganym do dalszej ochrony komórek przed działaniem toksycznego metalu (Rost-Roszkowska i inni 2020b, 2022)”.

PODSUMOWANIE uzyskanych przez Doktorantkę wyników jest dość obszerne i wyczerpujące. Kończy je lista sześciu zweryfikowanych hipotez badawczych.

WNIOSKI pracy zawarte są w 7 punktach pozostających w spójności z uzyskanymi wynikami. Pierwszy z nich może budzić pewne wątpliwości, ponieważ zakłada, że „Krewetki nie dysponują wystarczająco wydajnym mechanizmem oczyszczania w sytuacji obecności w środowisku wysokiego stężenia metalu.” Tu radziłabym zachowanie pewnej ostrożności wskazując, że dotyczy to okresu regeneracji ograniczonego czasem eksperymentu.

SPIS LITERATURY jest bogaty i obejmuje 322 pozycje. Dobór cytowanych prac jest adekwatny do omawianych zagadnień, przemawiający za dobrą znajomością tematu. Spis ten przygotowany jest dość starannie, chociaż nazwy czasopism pisane są w sposób niejednorodny - Autorka zamiennie używa skrótów oraz pełnych nazw czasopism. W pozycji 249 brakuje nazwiska jednego ze współautorów publikacji (Rost-Roszkowska M.). W przyszłości, aby uniknąć takich sytuacji i zaoszczędzić sobie pracy proponuję użyć gotowych narzędzi do przygotowania bibliografii.

Rozprawę doktorską Pani mgr Anny Ostróżki oceniam wysoko. Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła eksperymenty przy użyciu różnorodnych i dobrze dobranych technik badawczych. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na uzyskanie nowych danych,

dotyczących wpływu ksenobiotyku jakim jest nikiel na strukturę jelita środkowego *Neocaridina davidi* oraz określenie potencjału regeneracyjnego badanych komórek.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej zaliczam:

1. wykazanie, że ekspozycja na nikiel przyczynia się do zwiększenia stężenia niklu w ciele krewetek i wywołuje zmiany w strukturze komórek jelita środkowego;
2. opis zmian w komórkach nabłonka jelita i wątrobotrzustki powstałych pod wpływem niklu oraz wykazanie, że zmiany te zależne są od czasu ekspozycji na nikiel;
3. wykazanie różnic w zmianach struktury komórek jelita i wątrobotrzustki powstałych pod wpływem działania niklu;
4. wykazanie, że przywrócenie krewetek do czystej wody sprzyja częściowej regeneracji i odwrócenia zmian wywołanych obecnością ksenobiotyku;
5. wykazanie, że wymienione w powyższym punkcie zmiany są intensywniejsze po dłuższym okresie powrotu do czystej wody, tj. po dwóch tygodniach i zachodzą szybciej w wątrobotrzustce niż w komórkach jelita;
6. określenie szeregu parametrów analizowanych komórek takich jak aktywacja autofagii, poziom stresu oksydacyjnego, wskaźniki śmierci komórkowej, aktywność mitochondriów, analiza proliferacji komórek i faz cyklu komórkowego, które pozwoliły na kompleksową ocenę zmian zachodzących w komórkach w wyniku negatywnego działania ksenobiotyku oraz w okresie regeneracji.

Uwagi krytyczne

1. Opis wyników dotyczących analiz rentgenowskiej spektrometrii fluorescencyjnej z całkowitym odbiciem promieniowania wykonanych w celu ustalenia stężenia niklu w ciele krewetek jest bardzo zwięzły, brakuje w nim między innymi komentarza do wyników dla grupy eksperymentalnej Ni 2:1. Prosiłabym o to uzupełnienie podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.
2. Dokumentacja fotograficzna odnosząca się przede wszystkim do analiz ultrastrukturalnych przygotowana jest niezbyt starannie. Większość elektronogramów jest dobrej lub bardzo dobrej jakości, ale niektóre przedstawiają zbyt małe powiększenia, na których omawiane struktury są słabo widoczne. Ponadto w dość licznych przypadkach omawiane w tekście wyniki struktury komórkowe albo nie są wskazane, albo wskazane są niezbyt precyzyjnie. Na przykład: str. 34 – mitochondria, cysterny RER czy elektronowo gęste ziarnistości nie są wskazane na zdjęciu 2C; str. 35 liczne autofagosomy (Fig. 4A-D) wskazane są tylko na zdjęciu 4A; str. 35 „Mitochondria były zniszczone, rozdęte i pozbawione grzebieni (Fig. 4A)” - we wskazanym na zdjęciu mitochondrium grzebienie są widoczne; str. 36 nieliczne autofagosomy (Fig. 5A-C) oraz zniekształcone mitochondria (Fig. 5A) nie zostały wskazane na zdjęciach; str. 36 „mitochondria i cysterny ER mają strukturę prawidłową (Fig. 5C)” - małe powiększenie zdjęcia i brak oznaczeń opisywanych organelli; str. 37 – przy opisie ultrastruktury komórek E podane są cechy dotyczące części podstawnej i apikalnej komórek niewidoczne na zdjęciu 9A, podobne braki pojawiają się przy opisie pozostałych komórek tj. F, B i R (str. 37 i 38); - str. 36 zdegenerowane mitochondria nie są widoczne na zdjęciu 6A.
Fotografia 6A, umieszczona w tablicy 6, która przedstawia ultrastrukturę nabłonka jelita *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej Ni 1:2 wydaje się identyczna z fragmentem fotografii 2A ukazującej ultrastrukturę nabłonka jelita *Neocaridina davidi* grupy kontrolnej – jest powiększeniem tego fragmentu. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii.

3. Pewne trudności budzi interpretacja wyników analiz histochemicznych tj. barwienia metodą PAS, błękitem bromofenolowym oraz Sudanem Czarnym B, szczególnie dotyczących wątrobotrzustki. Opis wyników tej części badań jest bardzo lakoniczny, a dokumentacja fotograficzna pod względem jakości jest bardzo zróżnicowana - część zdjęć przedstawia uszkodzone fragmenty wątrobotrzustki, na zdjęciach brak opisów wskazujących jednoznacznie wynik reakcji. Część z zabarwionych struktur koresponduje z pozycją i morfologią jądra komórkowego. Prosiłabym o uzupełnienie tych informacji podczas publicznej obrony.

4. W Dyskusji podrozdział 5.2. zawiera bardzo szczegółowy opis komórek jelita środkowego skorupiaków. Ten fragment mógłby być albo całkowicie usunięty z pracy lub znacząco zredukowany. Nie ma w tej części odniesienia do uzyskanych wyników, a opis tych komórek znajduje się zarówno we Wstępie oraz w Wynikach rozprawy.

5. W całej pracy Autorka skupia się na apoptozie, autofagii i nekrozie, a nie wspomina o innych dobrze już opisanych rodzajach śmierci komórkowej. Podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej chciałabym uzyskać od Doktorantki odpowiedzi na 2 pytania:

1) Czy wśród opisywanych zmian dostrzegalne są symptomy lub podobieństwo do innych typów śmierci komórkowej?

2) W jaki sposób Doktorantka zaplanowałaby dodatkowe badania, aby potwierdzić lub wykluczyć możliwość eliminacji komórek również w inny sposób niż zostało to udokumentowane?

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim jest wykazanie zmian w strukturze komórek nabłonka jelita środkowego *Neocaridina davidi* wywołanych pod wpływem chlorku niklu, a także opisanie zmian regeneracyjnych powstałych w komórkach po przywróceniu zwierząt poddanych wpływowi niklu do czystej wody akwariowej. Rozprawa prezentuje również ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauk biologicznych na co wskazuje znajomość zagadnień z wielu obszarów takich jak ekologia, systematyka, anatomia oraz szeroko pojęta cytofizjologia. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska potwierdza umiejętność Doktorantki w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, w tym opanowanie odpowiedniego warsztatu metodologicznego. Wskazuje na to umiejętność zaplanowania eksperymentu, jego realizacji oraz interpretacji uzyskanych wyników, a także napisania pracy naukowej. Wymienione w recenzji uwagi krytyczne nie umniejszają wartości pracy.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Anny Ostróżki pt. „Analiza zmian w strukturze i ultrastrukturze komórek nabłonka jelita środkowego słodkowodnej krewetki, *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) wywołanych obecnością niklu w środowisku życia” w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 18 lipca 2018 r. (Dz. U. 2023 poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Anny Ostróżki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 5. 09. 2023 r.


Izabela Jędrzejowska