

UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH
WYDZIAŁ NAUK PRZYRODNICZYCH
ZESPÓŁ HISTOLOGII I EMBRIOLOGII ZWIERZĄT

ANNA OSTRÓŻKA

ANALIZA ZMIAN W STRUKTURZE I ULTRASTRUKTURZE KOMÓREK
NABŁONKA JELITA ŚRODKOWEGO SŁODKOWODNEJ KREWETKI,
NEOCARIDINA DAVIDI (CRUSTACEA, MALACOSTRACA) WYWOŁANYCH
OBECNOŚCIĄ NIKLU W ŚRODOWISKU ŻYCIA

ROZPRAWA DOKTORSKA

CZEŚĆ I

PROMOTOR
PROF. DR HAB. MAGDALENA
ROST-ROSZKOWSKA

KATOWICE 2023

Słowa kluczowe: jelito środkowe, *Neocaridina davidi*, nikiel, degeneracja

Oświadczenie autora pracy

Ja, niżej podpisana:

imię (imiona) i nazwisko Anna Ostróżka

autor pracy dyplomowej pt. Analiza zmian w strukturze i ultrastrukturze komórek nabłonka jelita środkowego słodkowodnej krewetki, *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) wywołanych obecnością niklu w środowisku życia

Numer albumu: 8699

Studentka Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

(Nazwa wydziału/jednostki dydaktycznej)

kierunku studiów

Advanced methods in biotechnology and biodiversity

specjalności*

.....

*(wypełnić, jeśli dotyczy)

Oświadczam, że ww. praca dyplomowa:

- została przygotowana przeze mnie samodzielnie¹,
- nie narusza praw autorskich w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tekst jednolity Dz. U. z 2006 r. Nr 90, poz. 631, z późn. zm.) oraz dóbr osobistych chronionych prawem cywilnym,
- nie zawiera danych i informacji, które uzyskałem/–am w sposób niedozwolony,
- nie była podstawą nadania dyplomu uczelni wyższej lub tytułu zawodowego ani mnie, ani innej osobie.

Oświadczam również, że treść pracy dyplomowej zamieszczonej przeze mnie w Archiwum Prac Dyplomowych jest identyczna z treścią zawartą w wydrukowanej wersji pracy.

Jestem świadoma odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia.

.....

.....

Data

Podpis autora pracy

¹uwzględniając merytoryczny wkład promotora (w ramach prowadzonego seminarium dyplomowego)

*W tym miejscu chciałabym podziękować wszystkim osobom,
które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy:*

➤ Pani prof. dr hab. Magdalenie Rost-Roszkowskiej za pomoc, zaangażowanie, udzielenie cennych wskazówek, cierpliwość i poświęcony czas

➤ Pani prof. dr hab. Grażynie Wilczek za pomoc w czasie badań oraz w analizach statystycznych

➤ Panu dr hab. inż. prof. PŚ Sebastianowi Studentowi za pomoc podczas badań z użyciem mikroskopii konfokalnej

➤ Wszystkim pracownikom i doktorantom Zespołu Histologii i Embriologii Zwierząt, za okazaną życzliwość i pomoc.

SPIS TREŚCI:

1. WSTĘP	6
1.1. Skorupiaki jako bioindykatory środowiska wodnego.....	6
1.2. Jelito środkowe skorupiaków.....	7
1.2.1. Jelito środkowe <i>Neocaridina davidi</i>	11
1.3. Nikiel w środowisku – znaczenie biologiczne i toksykologia.....	15
2. CELE PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE	19
3. MATERIAŁY I METODY	21
3.1. Materiał.....	21
3.1.1. Charakterystyka biologii <i>Neocaridina davidi</i>	21
3.1.2. Warunki hodowli <i>Neocaridina davidi</i>	22
3.2. Eksperyment.....	22
3.3. Metody.....	25
3.3.1. Mikroskopia świetlna i histochemia.....	25
3.3.1.1. Barwienie metodą PAS – detekcja obojętnych polisacharydów oraz glikogenu.....	25
3.3.1.2. Barwienie błękitem rtęciowobromofenolowym - detekcja ciał białkowych... 26	
3.3.1.3. Barwienie Sudanem Czarnym B – detekcja lipidów.....	26
3.3.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa.....	26
3.3.3. Rentgenowska spektrometria fluorescencyjna z całkowitym odbiciem promieniowania (TXRF) - analiza stężenia niklu gromadzonego w krewetkach.....	27
3.3.4. Mikroskopia konfokalna - analiza jakościowa.....	27
3.3.4.1. Barwienie odczynnikami LysoTracker Red – detekcja silnie kwaśnych struktur komórkowych w żywych komórkach.....	27
3.3.4.2. Barwienie odczynnikami DHE – detekcja reaktywnych form tlenu (ROS).....	28
3.3.5. Cytometria przepływowa - analiza ilościowa.....	28
3.3.5.1. Aneksyna V – detekcja procesów śmierci komórkowej.....	29
3.3.5.2. Muse Multicaspase Kit – analiza aktywacji kaspaz.....	29
3.3.5.3. Oxidative Stress – analiza poziomu reaktywnych form tlenu.....	30
3.3.5.4. Muse MitoPotential Kit – analiza aktywnych i nieaktywnych mitochondriów.....	30
3.3.5.5. Metoda luminometryczna (stężenie ATP i stosunek ADP/ATP).....	31
3.3.5.6. Muse Cell Cycle Kit – analiza aktywnych i nieaktywnych mitochondriów.....	31
3.3.5.7. Muse Ki67 Proliferation Kit – analiza proliferacji komórek.....	31
3.4. Analiza statystyczna.....	32
4. WYNIKI	33
4.1. TXRF - stężenie niklu w krewetkach.....	33
4.2. Zmiany w ultrastrukturze nabłonka jelita i wątrobotrzustki <i>Neocaridina davidi</i>	34
4.2.1. Zmiany w ultrastrukturze komórek jelita <i>N. davidi</i> wywołane obecnością niklu w środowisku.....	34

4.2.1.1. Jelito osobników kontrolnych.....	34
4.2.1.2. Jelito - zmiany wywołane obecnością niklu w środowisku.....	35
4.2.1.3. Jelito - zmiany wywołane przywróceniem zwierząt do środowiska nieskażonego po wcześniejszej ekspozycji na nikiel.....	36
4.2.2. Zmiany w ultrastrukturze komórek wątrobotrzustki <i>N. davidi</i> wywołane obecnością niklu w środowisku.....	37
4.2.2.1. Wątrobotrzustka osobników kontrolnych.....	37
4.2.2.2. Wątrobotrzustka - zmiany wywołane obecnością niklu w środowisku.....	38
4.2.2.3. Wątrobotrzustka - zmiany wywołane przywróceniem zwierząt do środowiska nieskażonego po wcześniejszej ekspozycji na nikiel.....	39
4.3. Histochemia – analiza zmian w materiałach zapasowych jelita i wątrobotrzustki <i>N. davidi</i> w trakcie eksperymentu.....	40
4.4. Autofagia w nabłonku jelita i wątrobotrzustki <i>N. davidi</i> – analiza jakościowa.....	40
4.5. Śmierć komórkowa w jelicie i wątrobotrzustce <i>N. davidi</i> - analiza ilościowa.....	41
4.6. Poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w jelicie i wątrobotrzustce <i>N. davidi</i>	44
4.7. Aktywność mitochondrialna w komórkach jelita i wątrobotrzustki <i>N. davidi</i>	45
4.8. Zmiany poziomu ATP i ADP w komórkach jelita i wątrobotrzustki <i>N. davidi</i>	46
4.9. Analiza cyklu komórkowego w komórkach jelita i wątrobotrzustki <i>N. davidi</i>	48
4.10. Proliferacja komórek jelita i wątrobotrzustki <i>N. davidi</i>	48
5. DYSKUSJA.....	50
5.1. Stężenie niklu w środowisku wodnym.....	50
5.2. Budowa jelita środkowego u skorupiaków.....	52
5.3. Zmiany degeneracyjne w nabłonku jelita środkowego <i>Neocaridina davidi</i> pod wpływem niklu.....	56
5.4. Zmiany w jelicie i wątrobotrzustce po przywróceniu <i>N. davidi</i> do czystej wody po uprzedniej ekspozycji na nikiel.....	71
5.5. Analiza cyklu komórkowego i proliferacji komórek w jelicie i wątrobotrzustce <i>Neocaridina davidi</i> eksponowanej na nikiel i przywróconej do wody czystej.....	92
6. PODSUMOWANIE.....	99
7. WNIOSKI.....	104
8. STRESZCZENIE.....	105
9. ABSTRACT.....	107
10. BIBLIOGRAFIA.....	108

1. WSTĘP

Układ pokarmowy, obok powłok ciała uważany jest za narząd, poprzez który zwierzęta mają kontakt ze środowiskiem zewnętrznym. Drogą pokarmową do organizmu oprócz składników odżywczych zawartych w pokarmie mogą przedostawać się także inne substancje, w tym ksenobiotyki takie jak np. metale ciężkie, które mogą wpływać na homeostazę organizmu.

Układ pokarmowy, zwłaszcza jego środkowy odcinek u licznych bezkręgowców jest odpowiedzialny m.in. za trawienie, syntezę i wydzielanie enzymów trawiennych, wchłanianie i gromadzenie materiałów zapasowych oraz detoksykację. Z racji tego, że jelito środkowe pełni funkcję bariery pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a ciałem zwierzęcia, jest ono uważane za kluczowy narząd w utrzymaniu homeostazy, dlatego też cieszy się sporym zainteresowaniem wśród badaczy (Hyra i inni 2016, Lipovšek i inni 2018, Rost-Roszkowska i inni 2019, 2020ab, 2021a).

1.1. Skorupiaki jako bioindykatory środowiska wodnego

Do oceny stanu zbiorników słodkowodnych wykorzystywane są liczne obserwacje zarówno krótko-, jak i długoterminowe zwierząt słodkowodnych (Dzioczek i inni 2006). Bioindykacja pozwala nie tylko na ocenę zmian w środowisku wodnym wywołanym obecnością w nim licznych ksenobiotyków, ale także na ocenę zmian, jakie może dany ksenobiotyk wywoływać w organizmach żyjących w danym środowisku (Tomczak i Dominiak 2016). Organizmami najczęściej wykorzystywanymi w monitorowaniu środowiska wodnego są glony (Schneider i Lindstrøm 2009, Rajfur i inni 2010), skorupiaki, małże, czy ryby (Sasikumar i Krishnakumar 2011, Tomczak i Dominiak 2016). Bioindykatorami wrażliwymi należącymi do bezkręgowców są między innymi *Polycelis nigra* (wielociczka czarna), *Dendrocoelum lacteum* (wyplawek biały), *Ancylys fluviatilis* (przytulik strumieniowy), *Gammarus pulex* (kiełz zdrojowy), *Daphnia magna* (rozwielitka), *Lymnaea stagnalis* (błotniarka stawowa), *Astacus astacus* (rak szlachetny), a także liczne larwy owadów należących do chrzączek, jętek i widelnic (Rinderhagen i inni 2000). Najwięcej badań nad wykorzystaniem

skorupiaków w monitorowaniu wód związanych jest z wodami morskimi i oceanicznymi (Suciū i inni 2018). Zwierzęta te są dobrymi wskaźnikami wpływu człowieka na środowisko morskie, ponieważ wykazują fizjologiczną tolerancję na stres, plastyczność behawioralną i różnorodne strategie życiowe, które pozwalają im reagować na szeroki zakres zmian środowiskowych (Ottaviano i Scapini 2010, Schlacher i Thompson 2012, Schlacher i inni 2016). Dla przykładu, do biomonitoringu wyznaczonych stanowisk Zatoki Gdańskiej pod kątem śladowych ilości metali Cu, Zn, Cd, Fe, Pb, Mn i Ni wykorzystano skorupiaki z rodziny *Balanus improvisus* (Rainbow i inni 2004). Natomiast wśród skorupiaków wykorzystywanych do bioindykacji wód słodkich wykorzystuje się do badań przede wszystkim rozwielitki *Daphnia magna* oraz *Ceriodaphnia sp* (Traczewska 2011). Bioindykacja umożliwia wykrycie toksyczności szkodliwych substancji (Tomczak i Dominiak 2016).

Spośród organizmów wodnych w głównej mierze u bezkręgowców mierzy się potencjalne zagrożenia ze strony chemikaliów w ekosystemach, ze względu na fakt, iż są one przedstawicielami różnych sieci pokarmowych w systemach wodnych. Skorupiaki to najważniejsza grupa bezkręgowców; są najczęściej wykorzystywane jako organizmy modelowe do oceny badań ekotoksykologicznych materiałów niebezpiecznych w ekosystemach wodnych. Zwierzęta te mogą izolować toksyczne metale w postaci granul swoich tkankach (Ruppert i inni 2004). Ponadto, skorupiaki to grupa organizmów bezkręgowych zawierająca wiele ważnych handlowo gatunków hodowlanych i dzikich. Gatunki morskie krewetki białe (*Penaeus vannamei*) i krewetki tygrysie (*Penaeus monodon*) to najczęściej hodowane gatunki, a pozostałe skorupiaki akwakultury są hodowane głównie w wodach słodkich (Urdes i inni 2023).

1.2. Jelito środkowe skorupiaków

Jelito środkowe skorupiaków może mieć postać prostej rury pozbawionej jakichkolwiek uchyłków (Sousa i Petriella 2006, Rost-Roszkowska i inni 2012) lub też może posiadać uchyłki najczęściej zlokalizowane w przedniej części jelita (Coleman 1990). W drugim przypadku jest zróżnicowany na dwa połączone ze sobą narządy: jelito oraz gruczoł wątrobotrzustkowy tworzony przez liczne uchyłki oraz ślepo zakończone cewki. U niektórych gatunków brak jest jelita, a funkcje trawienne pełni

gruczoł trawienny, nazywany wątrobotrzustką (Sousa i Petriella 2001, Symonova 2007). W budowie nabłonka wyścielającego jelito środkowe skorupiaków wyróżnia się obecność kilku rodzajów komórek, różniących się pod względem lokalizacji i funkcji (Tabela 1).

Tabela 1. Rola i lokalizacja komórek nabłonkowych w endodermalnym fragmencie jelita skorupiaków (za Sonakowska i inni 2015)

Typy komórek	Funkcja	Źródło	Lokalizacja	Źródło
Komórki R	detoksykacja i recykling poprzez gromadzenie lipidów, polisacharydów, metali oraz dostarczanie energii w okresach głodu, linienia i reprodukcji	Arnaud i inni 1978; Al-Mohanna i Nott 1987; Nassiri i inni 2000	proksymalny obszar wątrobotrzustki	Sousa i Petriella 2000; 2001; 2007
			proksymalny i medialny obszar wątrobotrzustki	Franceschini-Vicentini i inni 2009
			medialny obszar wątrobotrzustki	Moritz i inni 1973; Correia i inni 2002; Sousa i inni 2005
			na całej długości cewek wątrobotrzustki	Caceci i inni 1988; Al-Mohanna i Nott 1989
Komórki B	trawienie wewnątrz-komórkowe, gromadzenie wchłoniętych materiałów i wydzielanie	Al-Mohanna i Nott 1986; Sousa i Petriella 2007; Sonakowska i inni 2015	medialna i dystalna część wątrobotrzustki	Franceschini-Vicentini i inni 2009
			medialna część wątrobotrzustki	Sousa i inni 2005
			proksymalny obszar wątrobotrzustki	Al-Mohanna i Nott 1989; Sousa i inni 2005; Sousa i Petriella 2007; Sonakowska i inni 2015
Komórki F	synteza i wydzielanie enzymów trawiennych	Arnaud i inni 1978; Al-Mohanna i Nott 1989; Vogt i inni 1989; Sousa i Petriella 2006, 2007; Sonakowska i inni 2015	medialna i proksymalna część wątrobotrzustki	Al-Mohanna i Nott 1989; Vogt i inni 1989; Sousa i inni 2005
			na całej długości organu	Franceschini-Vicentini i inni 2009
			proksymalny obszar wątrobotrzustki	Sonakowska i inni 2015

cd. Tabela 1. Rola i lokalizacja komórek nabłonkowych w endodermalnym fragmencie jelita skorupiaków (za Sonakowska i inni 2015)

Typy komórek	Funkcja	Źródło	Lokalizacja	Źródło
Komórki M	akumulacja lipidów i polisacharydów	Icely i Nott 1984	na całej długości organu	Vogt i inni 1989
			nieobecne	Vogt i inni 1989
Komórki E	regeneracja jelita środkowego	Arnaud i inni 1978; Muskó 1988; Ceccaldi 1989; Sousa i Petriella 2001; Sousa i inni 2005; Sonakowska i inni 2015	przednia część jelita	Arnaud i inni 1978; Sonakowska 2015
			dystalna i medialna część wątrobotrzustki	Mycles 1979; Sonakowska i inni 2015
			nieobecne	Prosi i inni 1983; Tam i Avenant-Oldewage 2009ab; Rost-Roszkowska i inni 2012;
Komórki D	synteza i wydzielanie enzymów trawiennych	Sonakowska i inni 2015	jelito	Sonakowska i inni 2015

1.2.1. Jelito środkowe *Neocaridina davidi*

Układ pokarmowy *Neocaridina davidi* znajduje się po grzbietowej stronie ciała zwierzęcia. Zaczyna go znajdujący się z przodu ciała otwór gębowy, który następnie przechodzi kolejno w jelito przednie, jelito środkowe, jelito tylne, a kończy otwór odbytniczy.

Jelito środkowe *N. davidi* składa się z dwóch narządów o pochodzeniu endodermalnym: jelita oraz wątrobotrzustki.

Jelito mające postać długiej prostej rury jest wyścielone jednowarstwowym nabłonkiem walcowatym spoczywającym na bezkomórkowej blaszce podstawnej, do której od strony jamy ciała przylegają mięśnie trzewne. Nabłonek jelita budują dwa typy komórek: trawienne (D) oraz regeneracyjne (E). Komórki E zlokalizowane są jedynie w przedniej części jelita (Sonakowska i inni 2015).

Komórki trawienne (D) wykazują regionalizację w rozmieszczeniu organelli komórkowych, na podstawie której wyróżnić można rejon apikalny, okołojądrowy, bazalny. W części apikalnej, błona komórkowa tworzy mikrokosmki, których korzenie filamentów zakotwiczą się w cytoplazmie apikalnej tworząc warstwę korytkalną. Pod nią znajdują się liczne cysterny gładkiego i szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, mitochondria, ciała wielopęcherzykowe, pęcherzyki gęste i jasne elektronowo. Dla obszaru okołojądrowego charakterystyczna jest obecność dużego, owalnego jądra komórkowego, z chromatyną o średniej gęstości elektronowej. Wokół jądra występują licznie cysterny szorstkiego i gładkiego retikulum endoplazmatycznego oraz aparaty Golgiego, natomiast mitochondria są nieliczne. W obszarze bazalnym, bazalna błona komórkowa tworzy niewielkie pofałdowania, w sąsiedztwie których obserwuje się liczne mitochondria, aparaty Golgiego oraz cysterny gładkiego i szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. Komórki trawienne nie gromadzą materiałów zapasowych, są PAS, Sudan Czarny B i BPB negatywne (Sonakowska i inni 2015).

Komórki regeneracyjne (E) owalnego kształtu, znajdują się pomiędzy sąsiadującymi komórkami trawiennymi, natomiast są dużo niższe i nie mają kontaktu z światłem jelita. Błona bazalna nie jest pofałdowana, cytoplazma jest uboga w organelle komórkowe. Pojedyncze mitochondria i cysterny szorstkiego i gładkiego retikulum endoplazmatycznego obserwuje się wokół dużego owalnego jądra komórkowego.

Ultrastrukturalnie komórki te są bardzo podobne do komórek regeneracyjnych spotykanych w dystalnym rejonie cewek w wątrobotrzustce (Sonakowska i inni 2015).

Wątrobotrzustka jest narządem endodermalnym odchodzącym od przedniej części jelita, tak więc światło tego narządu kontaktuje się ze światłem jelita. Składa się z dwóch uchyłków, które rozdzielają się na liczne ślepo zakończone kanaliki (cewki). W kanalikach tych wyróżnia się obecność trzech obszarów: proksymalnego, medialnego (środkowego) oraz dystalnego (Sonakowska i inni 2015).

W obszarze proksymalnym występują komórki F - fibrylarne, komórki B - magazynujące oraz komórki R - resorpcyjne. W obszarze medialnym występują pojedyncze komórki regeneracyjne (E) oraz komórki w fazie różnicowania, natomiast w obszarze dystalnym występują tylko komórki regeneracyjne (E) (Sonakowska i inni 2015, Sonakowska-Czajka i inni 2021).

Komórki F - fibrylarne (typ I) stanowią główną część wszystkich komórek nabłonkowych wątrobotrzustki. W obrębie cytoplazmy komórek tych nie obserwuje się regionalizacji w rozmieszczeniu organelli komórkowych. Błona apikalna tworzy mikrokosmki, których filamenty wchodzi do apikalnej cytoplazmy tworząc cienką warstwę korytkalną. W obrębie tej warstwy obserwuje się pojedyncze, małe pęcherzyki z elektronowo przejrzystą zawartością, cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, wolne rybosomy. Jądro komórkowe jest owalnego kształtu i zawiera nukleoplazmę o średniej gęstości elektronowej. Natomiast cytoplazma całej komórki obfituje w cysterny szorstkiego i gładkiego retikulum endoplazmatycznego, aparaty Golgiego, a mitochondria występują pojedynczo i sporadycznie. Dobrze wykształcone cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego tworzą owalne pęcherzyki o różnej wielkości. Błona bazalna tworzy niewielkie pofałdowania. Co ciekawe, zaobserwowano korelację pomiędzy ultrastrukturą komórek a odległością od strefy różnicowania w cewkach wątrobotrzustki. Im bardziej ta odległość się zwiększa, tym bardziej elektronowo - gęsta i bogatsza w organelle staje się cytoplazma komórek. Komórki te nie gromadzą materiałów zapasowych, co przejawia się negatywnym wynikiem barwień: PAS, Sudan Czarny B, błękit rtęciowobromofenolowy (Sonakowska i inni 2015).

Komórki B - magazynujące (typ II), ich cytoplazma także nie wykazuje regionalizacji w rozmieszczeniu organelli komórkowych. Podobnie jak w przypadku

komórek fibrylarnych, błona apikalna tworzy mikrokosmki, natomiast nie obserwuje się wyraźnie wykształconej warstwy korykalnej. Cała cytoplazma jest uboga w organelle komórkowe takie jak cysterny szorstkiego i gładkiego retikulum endoplazmatycznego, natomiast jest bogata w mitochondria i wolne rybosomy. Ponadto, w obrębie cytoplazmy obserwuje się obecność materiałów zapasowych: polisacharydów i glikogenu (pozytywny wynik reakcji PAS) oraz tłuszczów (pozytywny wynik barwienia Sudanem Czarnym B). W przypadku tych komórek obserwuje się podobną zależność pomiędzy ultrastrukturą komórek a odległością od strefy różnicowania w cewkach wątrobotrzustki. Wraz ze wzrostem odległości zwiększa się ilość materiałów zapasowych oraz cystern szorstkiego i gładkiego retikulum endoplazmatycznego (Sonakowska i inni 2015).

Komórki regeneracyjne (E) - nie posiadają mikrokosmków, pofałdowanej błony bazalnej, ani materiałów zapasowych. Ich cytoplazma nie wykazuje regionalizacji w rozmieszczeniu organelli komórkowych. Wokół owalnego jądra komórkowego obserwuje się mitochondria oraz pojedyncze cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego (Sonakowska i inni 2015).

Komórki resorpcyjne (R) - obserwowane są w stadium rozwojowym zoea III, cytoplazma komórek tych zawiera liczne cysterny szorstkiego i gładkiego retikulum endoplazmatycznego, aparaty Golgiego oraz pęcherzyki o średniej gęstości elektronowej, zlokalizowane głównie w apikalnej części komórki. Autofagosomy występują poniżej warstwy korykalnej (Sonakowska-Czajka i inni 2021).

Porównanie ultrastruktury komórek tworzących jelito środkowe *Neocaridina davidi* przedstawia Tabela 2.

Tabela 2. Porównanie ultrastruktury komórek budujących jelito środkowe *Neocaridina davidi* (na podstawie Sonakowska i inni 2015, Sonakowska-Czajka i inni 2021)

Cecha	Komórki D	Komórki E	Komórki F	Komórki B	Komórki R
Lokalizacja oraz liczebność	najliczniejsze komórki jelitowe	w jelicie - głównie przednia część; w wątrobotrzustce w obszarze dystalnym	proksymalny obszar cewek wątrobotrzustki, ok 70 % komórek	proksymalny obszar cewek wątrobotrzustki, ok 30 % komórek	proksymalny obszar cewek wątrobotrzustki, w stadium zoea III
Regionalizacja organelli	występuje	brak	brak	brak	brak
Błona apikalna tworząca mikrokosmki	obecna, wyraźna warstwa korykalna	brak	obecna, cienka warstwa korykalna	obecne, brak wyraźnej warstwy korykalnej	obecne
Pofałdowana błona bazalna	tak, niewielkie fałdy	nie	słabo pofałdowana	słabo pofałdowana	słabo pofałdowana
Owalne jądro komórkowe	tak, z euchromatyną o średniej gęstości elektronowej	tak, z bardzo gęstą elektronowo heterochromatyną	tak	tak	tak
RER, SER, aparaty Golgiego	liczne w części apikalnej i bazalnej	nieliczne wokół jądra komórkowego	liczne	nieliczne, liczne rybosomy	liczne
Mitochondria	liczne w części apikalnej, nieliczne w części bazalnej	nieliczne wokół jądra komórkowego	pojedyncze	liczne	liczne
Materiały zapasowe	brak	brak	brak	obecne: polisacharydy, glikogen, lipidy	obecne: polisacharydy, glikogen, lipidy

Objaśnienia: (RER) - cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, (SER) - cysterny gładkiego retikulum endoplazmatycznego

Jelito środkowe *N. davidi* bierze udział w licznych procesach, spośród których wyróżnić można: syntezę i sekrecję enzymów trawiennych, trawienie, absorpcję, gromadzenie materiałów zapasowych, detoksykację, wchłanianie związków odżywczych. Badania eksperymentalne związane z analizą wpływu różnych stresorów (np. brak pokarmu, pestycydy, bisfenol) na strukturę jelita środkowego *N. davidi* wykazały, że narząd ten (zarówno jelito, jak i watrobotrzustka) bierze udział w utrzymywaniu homeostazy organizmu. Zachodzące w nim procesy degeneracyjne (apoptoza, nekroza, autofagia, zmiany mitochondrialne) wywołane stresorem będą stanowiły ochronę przed jego wpływem na pozostałe narządy organizmu (Włodarczyk i inni 2017, 2019ab, Ostróżka i inni 2022). Ze względu na prostotę hodowli, łatwość pozyskania materiału do badań (liczne hodowle *N. davidi*), prostą budowę ciała, a także coraz większe zainteresowanie badanym gatunkiem krewetki, wydaje się być ona dobrym gatunkiem do prowadzenia badań eksperymentalnych związanych z ekotoksykologią środowiska słodkowodnego.

1.3. Nikiel w środowisku – znaczenie biologiczne i toksykologia

Nikiel (Ni) jest 24-tym najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem w skorupie ziemskiej, stanowiąc 3% jej składu. Natomiast pod względem wielkości zajmuje piąte miejsce wśród najpowszechniejszych pierwiastków, zaraz za: żelazem, tlenem, magnezem, krzemem (Coogan i inni 1989, Clayton i Clayton 1994, Young 1995). W skorupie ziemskiej nikiel głównie wiąże się z tlenem oraz siarką tworząc tlenki oraz siarczki (Das i inni 2019), te z kolei występują naturalnie w wielu mineralnych formach (Coogan i inni 1989, Clayton i Clayton 1994, Young 1995), głównie w minerałach takich jak pentlandyt, garnieryt, milleryt, nikolit i ulmannit (Harasim i Filipek 2015).

Nikiel jest jednym z wielu pierwiastków śladowych szeroko rozprzestrzenionym w środowisku i może występować zarówno w powietrzu, wodzie, jak i w materii biologicznej (Grandjean 1984, Clarkson 1988, Clayton i Clayton 1994, von Burg 1997) oraz w każdym rodzaju gleby, a także w meteorytach (Das i inni 2019).

Nikiel występuje w różnych stężeniach we wszystkich ekosystemach (Das i inni 2019), np. w wodzie morskiej w stężeniach od 0,1 do 0,5 $\mu\text{g/l}$ (Szefer 2002a), wody Bałtyku zawierają 0,09 - 1,08 $\mu\text{g Ni/l}$ (Szefer 2002b), natomiast średnia zawartość niklu w rzekach wynosi 0,7 $\mu\text{g/l}$ (Gaillardet i inni. 2003).

Pierwiastek ten do środowiska może się uwalniać zarówno ze źródeł naturalnych, jak i na skutek działalności antropogenicznej. Naturalnym źródłem niklu jest pył przenoszony przez wiatr, który powstaje na skutek procesów wietrzenia skał i gleb, erupcji wulkanicznych, pożarów lasów (Grandjean 1984, Clarkson 1988, Clayton i Clayton 1994, von Burg 1997).

Metal ten może pojawić się także w środowisku na skutek działalności człowieka m.in. poprzez: spalanie węgla, oleju napędowego i opałowego, spalanie odpadów, w ściekach (Grandjean 1984, Clarkson 1988, Clayton i Clayton 1994, von Burg 1997). Nikiel przedostaje się do atmosfery między innymi z powodu jego wydobycia, czy też na skutek działania np. elektrowni, przemysłu gumowego i tworzyw sztucznych, przemysłu baterii nikielowo-kadmowych, przemysłu galwanicznego (Das i inni 2019).

Nikiel oraz związki niklu znajdują wiele zastosowań przemysłowych i handlowych (Scott-Fordsmand 1997, Haber i inni 2000, Diagonanolin i inni 2004). W przemyśle głównie jest wykorzystywany do produkcji stali nierdzewnej i innych stopów niklu o wysokiej odporności na korozję i temperaturę. Nikiel metaliczny i jego stopy są wykorzystywane w metalurgii, chemii i przemyśle przetwórstwa spożywczego, zwłaszcza jako katalizatory i pigmenty (Grandjean 1984, Clarkson 1988, Barceloux i Barceloux 1999). Przykładami produktów zawierających nikiel są np.: implanty dentystyczne i ortopedyczne, kuchenne utensylia ze stali nierdzewnej oraz biżuteria (Cempel i Nikiel 2006).

Szerokie zastosowanie niklu w różnych gałęziach przemysłu oraz jego wykorzystanie w procesach produkcyjnych, ale także jego recykling i utylizacja (Das i inni 2019), a także rosnący poziom uprzemysłowienia przyczynił się do zwiększonej emisji tego pierwiastka i zanieczyszczenia ekosystemów (Scott-Fordsmand 1997, Haber i inni 2000, Diagonanolin i inni 2004). Przy czym autorzy podają, że główną przyczyną zanieczyszczenia wód są ścieki komunalne (Nriagu i Pacyna 1988, Barańkiewicz i Siewak 1999).

Nikiel łatwo akumuluje się w fitoplanktonie oraz roślinach wodnych, które są wrażliwymi bioindykatorami zanieczyszczenia wody. Może być osadzony w osadzie poprzez takie procesy jak wytrącanie, kompleksowanie i adsorpcja na cząsteczkach gliny i poprzez wchłanianie przez faunę i florę (Nriagu i Pacyna 1988, Barańkiewicz i Siepak 1999).

Metal ten także ma znaczenie w ujęciu biologicznym. Jest niezbędnym metalem śladowym dla co najmniej kilku gatunków zwierząt, mikroorganizmów oraz roślin, dlatego też przy niewystarczającej, bądź nadmiernej podaży tego pierwiastka mogą wystąpić objawy niedoboru, czy toksyczności (Bencko 1983, Klaassen 1996, Barceloux i Barceloux 1999, Scott-Fordsmand 1997, Cempel i Nikiel 2006). U zwierząt tych jest zaangażowany w metabolizm lipidów, szczególnie w regulację zawartości lipidów w tkankach oraz w syntezę fosfolipidów (Stangl i Kirchgessner 1996). Jest składnikiem dziewięciu metaloenzymów, w tym ureazy, która uczestniczy w hydrolizie mocznika (Harasim i Filipek 2015). Metale odgrywają integralną rolę poprzez koniugację w miejscach aktywnych enzymów i przyczyniając się bezpośrednio w procesie katalitycznym, stabilizując w ten sposób makrocząsteczkę struktury białek i kwasów nukleinowych oraz wpływając na integrację strukturalną i funkcjonalną (Das i inni 2019). Natomiast u niektórych roślin obecność niklu stanowi przystosowanie obronne, chroniąc je przed patogenami i owadami roślinożernymi (Harasim i Filipek 2015).

Wchłanianie niklu zależy od jego właściwości fizykochemicznych (Barceloux i Barceloux 1999, Haber i inni 2000, von Burg 1997). Metaliczny nikiel, siarczki niklu i tlenki niklu są słabo rozpuszczalne w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczalnymi w wodzie solami niklu są chlorki, azotany, siarczany (Barceloux i Barceloux 1999). Dobrze rozpuszczalne w wodzie związki niklu łatwiej się także wchłaniają. U zwierząt 1-10% niklu z pożywienia jest wchłaniana przez przewód pokarmowy (Barceloux i Barceloux 1999, Haber i inni 2000, von Burg 1997). Rozpuszczalne w wodzie związki niklu są też bardziej toksyczne niż związki mniej rozpuszczalne. Stwierdzono, że mniej rozpuszczalne związki niklu, takie jak tlenek niklu i podsiarczek mają LD50 większe niż 3600 mgNi/kg masy ciała u szczurów, podczas gdy rozpuszczalne związki niklu, tj. siarczan niklu i octan, wykazywały LD50 w zakresie 39–141 mg Ni/kg mc u szczurów i myszy (Cempel i Nikiel 2006). Badania na zwierzętach wykazały rakotwórczy potencjał różnych związków niklu, takich jak podsiarczek niklu, chlorek niklu, tlenek niklu i

siarczany nikielu itp. (Diwan i inni 1992). Toksyczne funkcje nikielu wynikają prawdopodobnie przede wszystkim z jego zdolności do zastępowania innych jonów metali w enzymach i białkach lub wiązania się ze związkami komórkowymi zawierającymi atomy O, S i N, takimi jak enzymy i kwasy nukleinowe, które następnie są hamowane (Scott-Fordsmand 1997, Coogan i inni 1989). Jednym z możliwych sposobów, w jaki nikiel powoduje śmierć i/lub uszkodzenie komórek, mogą być reakcje oksydacyjne, takie jak indukowana nikiem peroksydacja lipidów (LPO) (Cempel i Nikiel 2006).

Co więcej, metale ciężkie, takie jak nikiel, mogą wytwarzać wolne rodniki z cząsteczki dwuatomowej przez proces dwuetapowy i wytworzyć anion nadtlenukowy. Aniony ponadtlenkowe łączą się z protonami i ułatwiają dysmutację z wytworzeniem nadtlenuku wodoru, który jest najważniejszą przyczyną indukowanego obecnością nikielu pojawiania się zmian patologicznych w żywych organizmach (Das i inni 2019).

2. CELE PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

Celem pracy było opisanie zmian w komórkach nabłonka jelita oraz wątrobotrzustki słodkowodnej krewetki *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) powstałych w wyniku ekspozycji zwierząt na nikiel, a także przeanalizowanie zmian regeneracyjnych, które mogą pojawić się na skutek ponownego hodowania zwierząt w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na metal. Tak więc **cele szczegółowe** badań to:

1. Dokonanie analizy i opisu zmian na poziomie ultrastrukturalnym, które pojawiają się w nabłonku jelita i wątrobotrzustki na skutek ekspozycji zwierząt na nikiel obecny w środowisku życia.
2. Analiza aktywacji i przebiegu procesów śmierci komórkowej (autofagia, apoptoza, nekroza) w nabłonku jelita i wątrobotrzustki badanej krewetki pod wpływem niklu.
3. Analiza zmian w mitochondriach komórek nabłonka jelita i wątrobotrzustki wywołanych obecnością niklu w środowisku życia badanych krewetek.
4. Dokonanie analizy i opisu na poziomie ultrastrukturalnym zmian regeneracyjnych, które mogą pojawić się w komórkach jelita i wątrobotrzustki *N. davidi* w wyniku umieszczenia zwierząt w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na nikiel.
5. Zanalizowanie zmian aktywacji gromadzenia reaktywnych form tlenu, zmian mitochondrialnych i poziomu ATP w komórkach jelita i wątrobotrzustki słodkowodnej krewetki wywołanych obecnością niklu w wodzie, a także po umieszczeniu zwierząt w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na nikiel.
6. Opisanie regeneracyjnych zdolności komórek jelita i wątrobotrzustki aktywowanych lub nie na skutek życia w środowisku zanieczyszczonym niklem, a także życia w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na metal.

Badania miały na celu zweryfikowanie (potwierdzenie lub wykluczenie) następujących hipotez badawczych:

- **H_{1,0}**: obecność niklu w wodzie wywołuje zmiany na poziomie ultrastrukturalnym w komórkach nabłonka jelita i wątrobotrzustki słodkowodnych krewetek;
- **H_{1,1}**: obecność niklu w wodzie nie wywołuje żadnych zmian na poziomie

ultrastrukturalnym w komórkach nabłonka jelita i wątrobotrzustki słodkowodnych krewetek;

- **H_{2,0}**: wraz z wydłużającym się czasem życia słodkowodnych krewetek w wodzie zawierającej nikiel pojawiają się liczne zmiany degeneracyjne w komórkach nabłonka jelita i wątrobotrzustki;
- **H_{2,1}**: brak zależności pomiędzy wydłużającym się czasem życia słodkowodnych krewetek w wodzie zawierającej nikiel a zmianami degeneracyjnymi w komórkach nabłonka jelita i wątrobotrzustki;
- **H_{3,0}**: obecność niklu w wodzie wpływa na aktywację autofagii i/lub apoptozy u badanego gatunku słodkowodnej krewetki, co może być związane ze strategią przetrwania w czasie działania niekorzystnych warunków bytowania lub uszkodzeniami wywołanymi obecnością metalu w środowisku życia;
- **H_{3,1}**: obecność niklu w wodzie nie wywołuje aktywacji autofagii i/lub apoptozy u badanej słodkowodnej krewetki, co może sugerować aktywację mechanizmów chroniących komórki/tkanki;
- **H_{4,0}**: obecność niklu w wodzie wpływa na aktywację gromadzenia reaktywnych form tlenu, zmiany mitochondrialne i/lub poziom ATP w komórkach jelita i wątrobotrzustki słodkowodnej krewetki;
- **H_{4,1}**: obecność niklu w wodzie nie ma wpływu na aktywację gromadzenia reaktywnych form tlenu, zmiany mitochondrialne i/lub poziom ATP w komórkach jelita i wątrobotrzustki słodkowodnej krewetki;
- **H_{5,0}**: hodowanie zwierząt w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na nikiel ma wpływ na procesy regeneracyjne w komórkach jelita i wątrobotrzustki;
- **H_{5,1}**: hodowanie zwierząt w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na nikiel nie ma wpływu na procesy regeneracyjne w komórkach jelita i wątrobotrzustki;
- **H_{6,0}**: w wybranych do badań narządach zachodzą odmienne procesy degeneracyjne/regeneracyjne wywołane obecnością niklu w środowisku lub wywołane umieszczeniem zwierząt ponownie w wodzie czystej;
- **H_{6,1}**: w wybranych do badań narządach zachodzą podobne procesy degeneracyjne/regeneracyjne wywołane obecnością niklu w środowisku lub po umieszczeniu zwierząt ponownie w wodzie czystej.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał

Materiał do badań stanowiły dorosłe osobniki (samice i samce) słodkowodnej krewetki *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). Zwierzęta zakupiono od lokalnych hodowców oraz hodowano w warunkach laboratoryjnych. Narzędziem do badań było jelito środkowe, które składa się z jelita oraz wątrobotrzustki.

3.1.1. Charakterystyka biologii *Neocaridina davidi*

Neocaridina davidi (Bouvier 1904) (Crustacea, Decapoda) jest słodkowodną, wszystkożerną, krewetką ozdobną pochodzącą z Tajwanu. Choć gatunek ten pochodzi z Azji, to aktualnie jest szeroko rozprzestrzeniony w słodkich wodach na świecie, a w 2018 r. stwierdzono jego inwazyjną obecność w Dolnej Odrze (Jabłońska 2018).

Krewetki te wskazują tolerancję na głódzenie zarówno na wczesnych etapach rozwoju (Pantaleão i inni 2015), jak i jako dorosłe osobniki (Włodarczyk i inni 2019b), a także wykazują tolerancję ze względu na temperaturę wody (Tropea i inni 2015).

Zwierzęta te ze względu na prostotę hodowli cieszą się dużym zainteresowaniem wśród akwarystów na całym świecie (Gehrmann 2021). Przedstawiciele tego gatunku można spotkać w wielu wariantach kolorystycznych, np. czerwonym, żółtym, niebieskim, co jest uwarunkowane obecnością chromatoforów w ich pancerzach (Tropea i inni 2015). Natomiast najpopularniejszą spotykaną odmianą jest czerwona, nazywana komercyjnie Red Cherry (Pantaleão i inni 2015).

Osobniki tego gatunku mogą żyć 1-2 lata. Przy pełnym wzroście mogą osiągnąć nawet 4 cm długości (Gehrmann 2021). Zwierzęta te wykazują wyraźny dymorfizm płciowy. Samce są przeważnie mniejsze, słabiej wybarwione i posiadają płaski odwłok, natomiast samice są większe, lepiej wybarwione i posiadają wypukły odwłok, po brzusznej stronie którego znajduje się miejsce lęgowe (przeznaczone do przechowywania jaj) (Suen i Gillett 2021).

Jak większość skorupiaków, krewetki te odgrywają kluczową rolę w ekosystemie wodnym, ponieważ stanowią źródło pożywienia dla innych organizmów, a

także biorą udział w recyklingu składników pokarmowych żerując na rozkładającej się roślinności (Weber i Traunspurger 2016).

3.1.2. Warunki hodowli *Neocaridina davidi*

Zakupione krewetki hodowano w warunkach laboratoryjnych. W akwarium utrzymywano stałe parametry: temperatury (21°C), pH (wartość 7) oraz twardości wody (10°GH). Zwierzęta karmiono dedykowanym dla krewetek pokarmem JBL Novo Prawn.

3.2. Eksperyment

Pierwszym etapem badań mających na celu określenie wpływu niklu na jelito środkowe *N. davidi* było wyznaczenie odpowiedniego stężenia metalu (Ni), dla którego analizowane będą opisane poniżej zmiany. Opierając się na danych literaturowych (Ali i inni 2005, Leonard i inni 2011), drogą eksperymentalną sprawdzono 3 stężenia wodnego roztworu niklu w postaci NiCl₂: 0,2 mg/l, 2 mg/l, 8 mg/l (które na stężenie samego niklu przedstawiały się następująco: 0,09 mg/l, 0,9 mg/l oraz 3,63 mg/l). Aby możliwa była stopniowa obserwacja potencjalnie pojawiających się zmian, do eksperymentu wybrano stężenie 3,63 mgNi/l, przy którym obserwowano ok. 50% śmiertelność populacji po 14 dniach.

Zwierzęta traktowano ksenobiotykiem, ale także po czasach ekspozycyjnych dodatkowo przywracano do czystej wody, w celu weryfikacji, czy potencjalnie pojawiające się zmiany są odwracalne. Schemat eksperymentu przedstawia Fig. 1. Zwierzęta podzielono więc na następujące grupy eksperymentalne (Tabela 3):

CT – kontrola - zwierzęta cały eksperyment przebywały w czystej wodzie akwariowej, w warunkach opisanych powyżej;

Ni 1:0 - krewetki hodowane w wodzie akwariowej z dodatkiem niklu przez 1 tydzień;

Ni 2:0 - krewetki hodowane w wodzie akwariowej z dodatkiem niklu przez 2 tygodnie;

Ni 1:1 - krewetki po tygodniowej hodowli w wodzie akwariowej z dodatkiem niklu, przywrócono do czystej wody i hodowano przez 1 tydzień;

Ni 1:2 - krewetki po tygodniowej hodowli w wodzie akwariowej z dodatkiem niklu przywrócono do czystej wody na 2 tygodnie;

Ni 2:1 - krewetki po 2 tygodniowej hodowli w wodzie akwariowej z dodatkiem niklu przywrócone do czystej wody na 1 tydzień;

Ni 2:2 - krewetki po 2 tygodniowej hodowli w wodzie akwariowej z dodatkiem niklu przywrócone do czystej wody na 2 tygodnie.

Pozostałe warunki hodowli w/w opisanych grup eksperymentalnych były takie same jak dla osobników kontrolnych.

Tabela 3. Podział na grupy eksperymentalne

Grupa eksperymentalna	Ekspozycja na nikiel	Czysta woda
CT	-	cały eksperyment
Ni 1:0	1 tydzień	-
Ni 2:0	2 tygodnie	-
Ni 1:1	1 tydzień	1 tydzień
Ni 1:2	1 tydzień	2 tygodnie
Ni 2:1	2 tygodnie	1 tydzień
Ni 2:2	2 tygodnie	2 tygodnie

Objaśnienia: (CT) - kontrola

Jak wcześniej wspomniano, materiał do badań stanowiło wyizolowane z dorosłych osobników wszystkich grup eksperymentalnych jelito środkowe, a więc jego dwa odcinki: jelito oraz wątrobotrzustka. Zwierzęta przed sekcją były usypiane chloroformem i dekapitowane.

Liczba osobników wykorzystanych do badań została przedstawiona w Tabeli 4.

Tabela 4. Liczba osobników *Neocaridina davidi* wykorzystywanych do badań

Grupy badawcze		Metody jakościowe			Metody ilościowe							
		TEM + MŚ	Mikroskopia konfokalna		TXRF	Cytometria przepływowa						
			Lyso Tracker Red	DHE		Aneksyna V	Multi Caspase	Oxidative Stress	Mito Potential	ATP + ADP/ATP	Cell Cycle	Ki67
CT	samice	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
	samce	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
Ni 1:0	samice	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
	samce	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
Ni 2:0	samice	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
	samce	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
Ni 1:1	samice	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
	samce	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
Ni 1:2	samice	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
	samce	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
Ni 2:1	samice	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
	samce	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
Ni 2:2	samice	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5
	samce	4	3	3	15	5	5	5	5	5	5	5

Objaśnienia: (TEM) – transmisyjna mikroskopia elektronowa, (MŚ) - mikroskopia świetlna, (DHE) – dihydroetydyna, (TXRF) – rentgenowska spektrometria fluorescencyjna z całkowitym odbiciem promieniowania

3.3. Metody

3.3.1. Mikroskopia świetlna i histochemia

Osobniki z uzyskanych wszystkich grup eksperymentalnych poddano dekapitacji oraz wyizolowano jelito środkowe, czyli jelito oraz wątrobotrzustkę. Następnie tkanki utrwalano w 2,5% glutaraldehydzie (2 h, temp. pokojowa), przepłukano kilkakrotnie w 0,1 M buforze fosforanowym, utrwalano w 1% czterotlenku osmu w 0,1 M buforze fosforanowym (2 h, temp. 4°C) oraz ponownie przepłukano kilkakrotnie w buforze fosforanowym. Tkanki następnie poddano stopniowemu odwadnianiu w rosnącym szeregu alkoholowym (50%, 70%, 80%, 90%, 96% po 15 minut, 4 x 100% po 15 minut), acetonie (15 minut), mieszaninie acetonu z żywicą epoksydową (Epoxy Embedding Medium Kit, Sigma) (1,5 h, buteleczki zamknięte), przepojono oraz zatopiono w żywicy epoksydowej (Wróbel i inni 2005), zgodnie z procedurą opisaną we wcześniejszych pracach dotyczących *N. davidi* (Sonakowska i inni 2015, 2016, Sonakowska-Czajka i inni 2021, Włodarczyk i inni 2017, 2019b).

Błoczki eponowe pokrojono na mikrotomie Leica Ultracut UCT25. Uzyskane skrawki półcienkie (o grubości 0,8 µm) wybarwiono 1% błękitem metylenowym w 0,5% boraksie (dla wizualizacji ogólnej topografii tkanki). Wykonano także następujące barwienia histochemiczne: metodą PAS, błękitem rtęciowobromofenolowym, Sudanem Czarnym B.

3.3.1.1. Barwienie metodą PAS – detekcja obojętnych polisacharydów oraz glikogenu

Szkiełka podstawowe zawierające skrawki eponowe (półcienkie) z analizowanymi tkankami przepłukano 70% etanolem, następnie inkubowano 10 min w 1% roztworze kwasu nadjodowego, po czym ponownie przepłukano 70% etanolem. Kolejnym krokiem było naniesienie na skrawki eponowe mieszaniny redukującej (1g jodku potasu, 1g tiosiarczanu sodu, 30 ml 95% etanolu, 20 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml 2N HCl) na 1 minutę i ponowne przepłukanie 70% etanolem. Tak przygotowane preparaty barwiono odczynnikami Schiff'a przez 24 godziny w 37 °C. Preparaty płukano w bieżącej wodzie i zamknięto szkiełka przy pomocy DPX (Litwin 1985). Tak

przygotowane preparaty analizowano i fotografowano w mikroskopie świetlnym Olympus BX60.

W pozytywnym wyniku tego barwienia, polisacharydy i glikogen zabarwiają się na kolor malinowy, czerwony.

3.3.1.2. Barwienie błękitem rtęciobromofenolowym - detekcja ciał białkowych

Pierwszym etapem barwienia było naniesienie na preparaty 2% kwasu nadjodowego i przepłukanie ich wodą po upływie 10 minut. Następnie materiał przez 24 godziny był barwiony błękitem rtęciobromofenolowym w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu preparaty przepłukano bieżącą wodą, aż do zmiany zabarwienia z żółtej na niebieską oraz przepłukano w wodzie destylowanej. Na koniec zamknięto szkiełka przy pomocy DPX (Litwin 1985). Tak przygotowane preparaty analizowano i fotografowano w mikroskopie świetlnym Olympus BX60.

W pozytywnym wyniku tego barwienia ciała białkowe zabarwiają się na kolor niebieski.

3.3.1.3. Barwienie Sudanem Czarnym B – detekcja lipidów

Procedura barwienia preparatów z wykorzystaniem tego odczynnika obejmuje dziesięciominutowe barwienie skrawków Sudanem Czarnym B w temperaturze pokojowej, szybkie przepłukanie 50% etanolem, przepłukanie w wodzie destylowanej (Litwin 1985). Szkiełka zamknięto w DPX tuż przed fotografowaniem. Tak przygotowane preparaty analizowano i fotografowano w mikroskopie świetlnym Olympus BX60.

W pozytywnym wyniku tego barwienia krople lipidowe zabarwiają się na różne odcienie czerni, szarości, brązu i granatu.

3.3.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Przygotowanie materiału na potrzeby analiz w transmisyjnym mikroskopie elektronowym było podobne do opisanej powyżej procedury dla mikroskopii świetlnej. Skrawki ultracienkie (o grubości 70 nm) zostały pokrojone na ultramikrotomie Leica Ultracut EM UC7 RT, a w dalszych etapach zostały przeniesione na miedziane siatki i

wykontrastowane za pomocą octanu uranylu i cytrynianu ołowiu (Sonakowska i inni 2015, 2016, Sonakowska-Czajka i inni 2021, Włodarczyk i inni 2017, 2019b).

Tak przygotowane preparaty analizowano w mikroskopie elektronowym Hitachi H500 przy napięciu 75kV. Uzyskane wyniki udokumentowano na kliszach negatywowych Kodak Electron Microscope Film 4489.

3.3.3. Rentgenowska spektrometria fluorescencyjna z całkowitym odbiciem promieniowania (TXRF) - analiza stężenia niklu gromadzonego w krewetkach

W celu oszacowania stężenia niklu gromadzonego w krewetkach na skutek przeprowadzonego eksperymentu, całe osobniki (po usunięciu pancerzy) suszono przez 7 dni w 110°C. Następnie próbki poddano mineralizacji w HNO₃ w mineralizatorze mikrofalowym. Tak przygotowane próbki analizowano techniką rentgenowskiej spektrometrii fluorescencyjnej z całkowitym odbiciem promieniowania TXRF (spektrometr S4 T-STAR, Bruker, Niemcy). Technikę tę wybrano ze względu na możliwość uzyskania granic wykrywalności na poziomie ng mL⁻¹ (ppb) (Fernandez-Ruiz 2022).

3.3.4. Mikroskopia konfokalna - analiza jakościowa

3.3.4.1. Barwienie odczynnikiem LysoTracker Red – detekcja silnie kwaśnych struktur komórkowych w żywych komórkach

Sondy LysoTracker składają się z hydrofobowego fluoroforu połączonego ze słabą zasadą, która jest tylko częściowo protonowana w obojętnym pH. W stanie neutralnie naładowanym sondy LysoTracker mogą swobodnie dyfundować przez nienaruszone błony plazmatyczne żywych komórek. Ze względu na z natury kwaśne właściwości lizosomu, po dyfuzji do jego wnętrza słabo zasadowe ugrupowanie jest protonowane. W tym stanie naładowanym sonda nie dyfunduje łatwo przez błonę organelli, zapewniając zlokalizowaną akumulację dla wyraźnego barwienia kwaśnych organelli, stąd jest to metoda często stosowana do analizy procesu autofagii (informacja ze strony producenta - <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7528>).

Wyizolowane narządy bez utrwalania umieszczono w TBS (Tris buffered saline), następnie TBS + triton, inkubowano w ciemności przez 5 min w 2,5 mmol/L

LysoTrackerRed DND-99 (Molecular Probes, L 7528) rozpuszczonym w TBS. Materiał kilkakrotnie przepłukano w TBS, podbarwiono jądra komórkowe, przy użyciu 1 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride), ponownie przepłukano w TBS. Tak przygotowane tkanki umieszczono w szkiełku podstawowym z łożką, zamknięto w vectashield oraz obserwowano w mikroskopie konfokalnym Olympus FluoView FV1000. Długość światła wzbudzającego (laser argon/krypton) 543 nm dla LysoTracker Red i 405 nm dla barwnika DAPI. (Sonakowska i inni 2016, Włodarczyk i inni 2019b).

Wynik barwienia: niebieska fluorescencja jąder komórkowych oraz czerwona fluorescencja silnie kwaśnych struktur w obrębie cytoplazmy komórki.

3.3.4.2. Barwienie odczynnikiem DHE – detekcja reaktywnych form tlenu (ROS)

Dihydroetydyna (DHE) jest barwnikiem swobodnie przenikającym przez błony komórkowe i umożliwiającym monitorowanie wytwarzania reaktywnych form tlenu w obrębie komórek. Sonda ta w kontakcie z ROS oksyduje i wytwarza czerwony fluorescencyjny produkt, który interkaluje do DNA (Koss-Mikołajczyk i inni 2017). Stąd barwnik ten jest powszechnie wykorzystywany w ocenie lokalizacji nagromadzenia reaktywnych form tlenu w komórkach i tkankach.

Wyizolowane jelita i wątrobotrzustki bez utrwalania płukano w TBS (badanie przyżyciowe), następnie w TBS + triton, barwiono w 30 µM DHE (Invitrogen) sporządzonym z 30 mM DHE w DMSO, ponownie przepłukano w TBS. Kolejnym krokiem było podbarwienie jąder komórkowych przy pomocy DAPI (30 min, RT), ponowne płukanie w TBS, zamykanie szkiełek vectashield (Włodarczyk i inni 2019a). Tak przygotowane preparaty obserwowano w mikroskopie konfokalnym Olympus FluoView FV1000 (559 nm dla DHE i 405 nm dla DAPI).

Wynik barwienia: niebieska fluorescencja jąder komórkowych oraz czerwona fluorescencja wskazująca na lokalizację ROS w obrębie komórki.

3.3.5. Cytometria przepływowa - analiza ilościowa

W celu przeprowadzenia analiz ilościowych wyizolowane z dorosłych osobników jelita oraz wątrobotrzustki były homogenizowane w zimnym buforze

PBS/TBS z wykorzystaniem mechanicznego homogenizatora BEAD BUG MICROTUBE HOMOGENIZER.

3.3.5.1. Aneksyna V – detekcja procesów śmierci komórkowej

Dla celów analizy ilościowej (liczba komórek żywych, komórek na wczesnych i późnych etapach apoptozy oraz liczby komórek nekrotycznych w obrębie jelita środkowego *N. davidi*) wykorzystano zestaw do detekcji apoptozy Annexin V-FITC apoptosis detection (Abcam®, № ab14085).

Homogenaty wyizolowanych narządów umieszczono w eppendofach w 300µl PBS przeprowadzono procedurę zgodnie z protokołem producenta (Annexin V-FITC apoptosis detection): dodano 500 ul 1x Binding Buffer, następnie po 5 µl Aneksyny V-FITC i jodku propidyny. Tak przygotowane próbki inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Uzyskaną zawiesinę komórek analizowano w cytometrze przepływowym Beckman Coulter Instrument FC 500 z laserem argonowym 488 nm. Wyniki poziomu fluorescencji badano za pomocą oprogramowania CXP Analysis (Poprawa i inni 2022).

3.3.5.2. Muse Multicaspase Kit – analiza aktywacji kaspaz

Muse Multicaspase Kit wykorzystywany jest w analizie ilościowej komórek żywych, żywych z aktywnymi kaspazami, martwych z aktywnymi kaspazami oraz martwych. Tak więc wykorzystywany jest w analizie procesów śmierci komórkowej: apoptozy oraz nekrozy, a także udziału kaspaz apoptotycznych w funkcjonowaniu komórek. Jelito oraz wątrobotrzustka wyizolowane z osobników *N. davidi* z wszystkich grup badanych zostało bez utrwalania (badanie przyżyciowe) po przygotowaniu homogenatu przygotowane do analizy według protokołu producenta (<https://www.luminexcorp.com/muse-multicaspase-kit/#overview>): inkubacja w Muse MultiCaspase Reagent (30 minut, temp. 37°C, w ciemności), inkubacja w Muse Caspase 7-AAD 95 minut, temperatura pokojowa, w ciemności). Materiał analizowano w cytometrze MUSE.

3.3.5.3. Oxidative Stress – analiza poziomu reaktywnych form tlenu

Analizy z wykorzystaniem zestawu MUSE OXIDATIVE STRESS KIT (Merck Millipore, No. MCH100111) umożliwiają ilościowy pomiar populacji komórek zawierających ROS.

Po wyizolowaniu z dorosłych osobników *N. davidi* z wszystkich grup badawczych jelita oraz watrobotrzustki przy użyciu homogenizatora wykonano zawiesinę komórkową, następnie bez utrwalania (analiza przyżyciowa) przeprowadzono procedurę zgodnie z zaleceniami producenta dla MUSE OXIDATIVE STRESS KIT (Merck Millipore, No. MCH100111): płukanie w 1X Assay Buffer, inkubacja w roztworze roboczym Muse Oxidative Stress (30 minut, 37°C, w ciemności). Tak przygotowane próbki analizowano w cytometrze MUSE (Włodarczyk i inni 2019a). Wyniki: Procentowy udział komórek ROS(+) oraz ROS(-)

3.3.5.4. Muse MitoPotential Kit – analiza aktywnych i nieaktywnych mitochondriów

Muse MitoPotential Kit wykorzystywany jest w analizie ilościowej komórek z mitochondriami spolaryzowanymi/zdepolaryzowanymi. Tak więc zliczany jest procentowy udział komórek żywych, żywych zawierających mitochondria zdepolaryzowane, martwych zawierających mitochondria zdepolaryzowane oraz komórek martwych.

Po wyizolowaniu z dorosłych osobników *N. davidi* z wszystkich grup badawczych jelita oraz watrobotrzustki przy użyciu homogenizatora wykonano zawiesinę komórkową, następnie przeprowadzono procedurę zgodnie z protokołem producenta dla MUSE MitoPotential Kit (analiza przyżyciowa) (<https://www.luminexcorp.com/muse-mitopotential-kit/#overview>): do 100 ul zawiesiny komórkowej dodano 95 µl MitoPotential working solution (sporządzony przez rozcieńczenie MitoPotential Dye w 1X Assay Buffer w stosunku 1:1000) i inkubowano przez 20 min w 37 °C, następnie dodano 5 µl Muse 7-AAD i inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej. Tak przygotowane próbki analizowano w cytometrze przepływowym MUSE.

3.3.5.5. Metoda luminometryczna (stężenie ATP i stosunek ADP/ATP)

W celu oceny stężenia ATP oraz wielkości stosunku ADP/ATP wykorzystano zestawy: ApoSENSOR ATP Cell Viability Bioluminescence Assay Kit (BioVision, № K254 oraz ApoSENSOR ADP/ATP Ratio Bioluminescence Assay Kit (BioVision, № K255). Analizę wymienionych parametrów w wyizolowanych narządach osobników z poszczególnych grup eksperymentalnych przeprowadzono zgodnie z protokołami producenta. Oznaczanie stężenia ATP opiera się na reakcji oksydacyjnej dekarboksylacji lucyferyny katalizowanej przez lucyferazę, w obecności wysokoenergetycznego ATP i jonów magnezu. Natężenie światła mierzono przy długości fali 562 nm. Poziom ADP mierzono przez jego konwersję do ATP, który jest wykrywany przy użyciu tej samej reakcji. Wyniki wyrażono jako nmol ATP · mg⁻¹ białka. Zawartość białka mierzono zgodnie z metodą Bradford, stosując albuminę bydlęcą (zawartość białka > 95%, Fluka) jako standard (Poprawa i inni 2022).

3.3.5.6. Muse Cell Cycle Kit – analiza aktywnych i nieaktywnych mitochondriów

Muse Cell Cycle Kit umożliwia analizę ilościową komórek będących w różnych fazach cyklu komórkowego: G₀/G₁, S, G₂/M. Wyizolowane z dorosłych osobników krewetek jelita oraz wątrobotrzustki zostały przygotowane do analizy z wykorzystaniem cytometru MUSE według protokołu zalecanego na stronie producenta (<https://www.luminexcorp.com/muse-cell-cycle-kit/#overview>): utrwalanie w 70% etanolu (24h, w lodzie), płukanie w buforze PBS, inkubacja w Muse Cell Cycle Reagent (30 minut, temperatura pokojowa, w ciemności) i analizowane w cytometrze MUSE.

3.3.5.7. Muse Ki67 Proliferation Kit – analiza proliferacji komórek

Muse Ki67 Proliferation Kit umożliwia ilościową analizę komórek ulegających proliferacji (Ki67+) oraz nieproliferujących (Ki67-) w oparciu o ekspresję białka Ki67. Wyizolowane narządy z osobników krewetki z wszystkich grup badawczych zostały bez utrwalania przygotowane według protokołu dedykowanego temu zestawowi (<https://www.luminexcorp.com/muse-ki67-proliferation-kit/#overview>). Homogenat narządów utrwalano w 1X Fixation Buffer (15 minut, temperatura pokojowa), płukano (2 x w 1X Assay Buffer), inkubowano w Permeabilization Buffer (15 minut, temperatura pokojowa), ponownie łukano w 1X Assay Buffer, inkubowano w

mieszaniu przeciwciał 10 μ L Muse Hu IgG1-PE oraz 10 μ L Muse Hu Ki67-PE) (30 minut, temperatura pokojowa, w ciemności), a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometru MUSE.

3.4. Analiza statystyczna

Wyniki analizy statystycznej zostały przedstawione jako wartości średniej \pm SD. Normalność sprawdzono za pomocą testu Shapiro – Wilk'a. Dane pod kątem jednorodności wariancji były przeanalizowane za pomocą testu Levene'a równości wariancji błędów. Aby określić istotności różnic w poziomach analizowanych parametrów w odniesieniu do różnych terminów traktowania niklem zastosowano metodę jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), stosując t-Studenta na poziomie $p < 0,05$. Korelację wartości parametrycznych wykonano na podstawie analizy regresji Pearsona z wykorzystaniem modelu regresji wielorakiej. Uzyskane dane uznawano za istotne przy poziomie $p < 0,05$. Analizy statystyczne wykonano z wykorzystaniem pakietu oprogramowania STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc. (2010) wersja 10.0. <http://www.statsoft.com>).

4. WYNIKI

4.1. TXRF - stężenie niklu w krewetkach

Zanieczyszczenie środowiska życia krewetek niklem powoduje gromadzenie metalu w ciele zwierząt. Najwyższe wartości obserwuje się po tygodniowej ekspozycji na nikiel (w grupie **Ni 1:0**). Po dwóch tygodniach ekspozycji (grupa **Ni 2:0**) poziom pierwiastka jest niższy niż po 1 tygodniu ekspozycji, co może świadczyć o “przyzwyczajeniu się” i przystosowaniu się krewetek do obecności ksenobiotyku oraz aktywacji procesów detoksykujących. Po przywróceniu krewetek do wody czystej poziom pierwiastka minimalnie spada, ale jest nadal obecny w ciele zwierząt (Tabela 5).

Tabela 5. Pomiary zawartości niklu w ciele dorosłych osobników *N. davidi* (TXRF)

PARAMETRY	Stężenie [mg kg ⁻¹]		
	Oznaczenie I	Oznaczenie II	Oznaczenie III
CT	<LOD	<LOD	<LOD
Ni 1:0	85 ± 6	72,73 ± 0,01	84,9 ± 0,3
Ni 1:1	52 ± 1	60 ± 1	60,3 ± 0,2
Ni 1:2	48 ± 1	36 ± 4	34 ± 1
Ni 2:0	36 ± 4	52 ± 1	53,7 ± 0,4
Ni 2:1	56 ± 4	90 ± 4	63 ± 2
Ni 2:2	42,1 ± 0,1	53,6 ± 0,2	68,6 ± 0,3

Objaśnienia: (TXRF) - rentgenowska spektrometria fluorescencyjna z całkowitym odbiciem promieniowania, (CT) - grupa kontrolna, (<LOD) - poniżej granicy wykrywalności

4.2. Zmiany w ultrastrukturze nabłonka jelita i wątrobotrzustki *Neocaridina davidi*

4.2.1. Zmiany w ultrastrukturze komórek jelita *N. davidi* wywołane obecnością niklu w środowisku

4.2.1.1. Jelito osobników kontrolnych

Nabłonek jednowarstwowy cylindryczny jelita *N. davidi* składa się w dominującym stopniu z komórek trawiennych (komórki D) oraz w mniejszym stopniu z komórek regeneracyjnych (komórki E), zlokalizowanych w przedniej części jelita. Nabłonek spoczywa na bezkomórkowej blaszce (błonie) podstawnej, pod którą zlokalizowane są mięśnie trzewne.

Komórki D (Fig. 2A-B) wykazują regionalizację w rozmieszczeniu organelli w cytoplazmie, na podstawie czego można wyróżnić 3 obszary: bazalny, okołojądrowy oraz apikalny. Dla cytoplazmy bazalnej charakterystyczna jest obecność pofałdowanej bazalnej błony komórkowej, cystern retikulum endoplazmatycznego (ER), aparatów Golgiego, mitochondriów. W części okołojądrowej oprócz jądra komórkowego zaobserwować można cysterny retikulum endoplazmatycznego szorstkiego (RER) i gładkiego (SER). Część apikalna natomiast obfituje w liczne mitochondria, cysterny retikulum endoplazmatycznego, ciała wielopęcherzykowe oraz pęcherzyki o różnej gęstości elektronowej. W części tej błona apikalna tworzy mikrokosmki (Fig. 2B). Autofagia, apoptoza oraz nekroza były obserwowane sporadycznie w komórkach D jelita osobników grupy kontrolnej. Komórki apoptotyczne charakteryzują się elektronowo gęstą cytoplazmą, w której transformacji ulegają organelle takie jak cysterny retikulum endoplazmatycznego, mitochondria, a jądro komórkowe ulega fragmentacji. Cytoplazma komórek nekrotycznych jest jasna elektronowo, organelle ulegają rozdzieleniu. Błony w takiej komórce ulegają rozerwaniu. Natomiast autofagia związana jest z gromadzeniem w komórkach nabłonka licznych struktur autofagicznych (autofagosomy, autolizosomy, ciała resztkowe). **Komórki E** z kolei nie mają kontaktu ze światłem jelita, a ich cytoplazma uboga jest w organelle, a zawiera nieliczne mitochondria, cysterny RER czy elektronowo gęste ziarnistości (Fig. 2C). Dokładny opis ultrastruktury komórek nabłonka jelitowego *N. davidi* znajduje się w publikacjach

dotyczących budowy jelita środkowego *N. davidi* (Sonakowska i inni 2015, Sonakowska-Czajka i inni 2021), a procesy degeneracyjne (nekroza, apoptoza, autofagia) opisane zostały przez Sonakowska i inni (2016). W trakcie przeprowadzonych analiz zaobserwowane zmiany dotyczyły w przypadku jelita tylko komórek D. Nie zaobserwowano żadnych zmian ultrastrukturalnych w komórkach E, stąd poniższy opis dotyczy jedynie komórek D.

4.2.1.2. Jelito - zmiany wywołane obecnością niklu w środowisku

Ekspozycja na nikiel wpłynęła na ultrastrukturę komórek trawiennych krewetki *N. davidi*. Zmiany degeneracyjne nasilały się wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji na ksenobiotyk. Natomiast w komórkach regeneracyjnych nie zaobserwowano zmian w żadnej z grup eksperymentalnych.

Po tygodniu ekspozycji na nikiel (**Ni 1:0**) większość komórek trawiennych nie wykazywała zmian na poziomie ultrastrukturalnym. W pojedynczych komórkach D zaobserwowano zwakuolizowane obszary cytoplazmy – obecność licznych wakuol o elektronowo jasnym wnętrzu (Fig. 3A-C), skrócone mikrokosmki (Fig. 3A-B), autofagosomy (Fig. 3A-C). Wiele komórek miało także zdegenerowane mitochondria (Fig. 3A).

Po 2 tygodniach ekspozycji na nikiel (**Ni 2:0**) w cytoplazmie komórek D obserwowane były liczne autofagosomy (Fig. 4A-D). Mitochondria były zniszczone, rozdęte i pozbawione grzebieni (Fig. 4A). Ponadto obserwowano rozdęte cysterny RER, SER oraz wakuole o jasnym elektronowo wnętrzu. Błony apikalne niektórych komórek tracą ciągłość, co skutkuje wydostaniem się zawartości komórek trawiennych do światła jelita (Fig. 4C). Natomiast błona podstawna nabłonka oraz zlokalizowane poniżej mięśnie wisceralne nie wykazują zmian ultrastrukturalnych (Fig. 4D).

W wyniku ekspozycji zwierząt na nikiel zaobserwowano intensyfikację procesu autofagii wraz z wydłużeniem ekspozycji krewetek na ksenobiotyk. Na terenie cytoplazmy komórek D można było zaobserwować wzrastającą liczbę struktur autofagicznych (autofagosomy, autolizosomy, ciała reszkowe) Pojedyncze zmiany nekrotyczne pojawiały się w grupie **Ni 1:0**, natomiast zjawisko silnie narasta w grupie

Ni 2:0. Pojawiające się komórki nekrotyczne charakteryzowały się ubogą w organelle komórkowe cytoplazmą, w której często błony organelli lub błony komórkowe ulegały rozerwaniu. Podczas badań ultrastrukturalnych nie zaobserwowano komórek apoptotycznych na terenie nabłonka jelita badanego gatunku krewetki.

4.2.1.3. Jelito - zmiany wywołane przywróceniem zwierząt do środowiska nieskażonego po wcześniejszej ekspozycji na nikiel

Przywrócenie krewetek do czystej wody skutkowało zmniejszeniem liczebności oraz intensywności zmian degeneracyjnych w komórkach trawiennych. Regeneracja nabłonka następowała skuteczniej przy 2 tygodniach przywrócenia do czystej wody, zarówno zwierząt hodowanych wcześniej w wodzie z niklem przez okres 1, jak i 2 tygodni.

Ultrastruktura komórek trawiennych jelita krewetek z grupy **Ni 1:1** przypomina **Ni 1:0**. W grupie tej w pojedynczych komórkach trawiennych obserwuje się obecność nielicznych autofagosomów (Fig. 5A-C) oraz zniekształconych mitochondriów (Fig. 5A). Ponadto mikrokosmki niektórych komórek trawiennych nadal są skrócone (Fig. 5A). Można jednak zaobserwować, że w wielu komórkach mitochondria i cysterny ER mają strukturę prawidłową (Fig. 5C). W grupie **Ni 1:2**, a więc gdy czas życia w wodzie czystej został wydłużony o kolejny tydzień, cytoplazma komórek D przypomina swoją ultrastrukturą cytoplazmę grupy kontrolnej (Fig. 6A-B). Wciąż jednak znaleźć można pojedyncze komórki ze zdegenerowanymi mitochondriami (Fig. 6A). Natomiast w obrębie nabłonka komórki nekrotyczne wciąż były obserwowane (Fig. 6C).

Nabłonek jelitowy osobników z grupy **Ni 2:1** w przeważającej mierze jest całkowicie zdegenerowany, ultrastrukturalnie przypomina grupę **Ni 2:0**. Komórki wykazują silne zmiany nekrotyczne (Fig. 7A-C), otoczki jądrowe jąder komórkowych są uszkodzone (Fig. 7B). Ponadto w dalszym ciągu obserwuje się obecność licznych autofagosomów, jednak intensywność autofagii wyraźnie spada (Fig. 7A-B). Wzrasta liczba zdegenerowanych mitochondriów, które są rozdęte i mają skrócone grzebienie i jasną elektronowo cytoplazmę (Fig. 7A). W nabłonku występują także komórki z prawidłową budową ultrastrukturalną (Fig. 7D).

W grupie **Ni 2:2** wiele komórek D jelita wykazuje nadal cechy nekrotyczne (Fig. 8A), mają jasną elektronowo cytoplazmę (Fig. 8A), w obrębie której występują pojedyncze autofagosomy (Fig. 8B), uszkodzone, rozdęte mitochondria (Fig. 8A-B), rozdęte cysterny ER. Ponadto, w błonie apikalnej obserwuje się silnie skrócone mikrokosmki (Fig. 8A). Znaleźć można było jednak komórki o prawidłowej ultrastrukturze, w której jedynie mitochondria były rozdęte i posiadały skrócone grzebienie (Fig. 8B). Pomimo wydłużającego się czasu hodowania zwierząt w wodzie czystej po 2 tygodniach ekspozycji na nikiel, zmiany degeneracyjne na poziomie ultrastrukturalnym wciąż były obserwowane, w tym intensywnie zachodziły procesy nekrotyczne.

4.2.2. Zmiany w ultrastrukturze komórek wątrobotrzustki *N. davidi* wywołane obecnością niklu w środowisku

4.2.2.1. Wątrobotrzustka osobników kontrolnych

Wątrobotrzustka badanego gatunku krewetki zbudowana jest z dwóch uchyłków rozgałęziających się na liczne ślepo zakończone cewki. W obrębie cewek wyróżnia się 3 obszary: dystalny, środkowy oraz proksymalny. Obszar dystalny, zajmujący końcową część cewek narządu charakteryzuje obecność komórek regeneracyjnych (komórki E); środkowy - komórek niezróżnicowanych; natomiast w odcinku proksymalnym występują trzy typy komórek.

Komórki E - w komórkach regeneracyjnych obecne są mitochondria oraz cysterny RER zlokalizowane wokół dużego, owalnego jądra komórkowego. Błona bazalna tych komórek nie jest pofałdowana, a w cytoplazmie obserwuje się niewielką ilość organelli komórkowych. Błona apikalna tych komórek nie tworzy mikrokosmków (Fig. 9A).

Komórki F - mają cytoplazmę nie wykazującą regionalizacji w rozmieszczeniu organelli komórkowych, błona bazalna jest słabo pofałdowana, natomiast błona apikalna tworzy mikrokosmki. Komórki te wyróżnia obecność licznych rozdętych cystern RER, SER oraz aparatów Golgiego. RER jest dobrze rozwinięte w postaci pęcherzyków o różnej średnicy (Fig. 9B-D).

Komórki B – mają cytoplazmę nie wykazującą regionalizacji w rozmieszczeniu organelli komórkowych, a błona apikalna tworzy mikrokosmki. Cała cytoplazma tych komórek jest uboga w cysterny RER, SER, natomiast bogata w mitochondria oraz wolne rybosomy. Charakterystyczna dla tych komórek jest także obecność licznych kul o różnej gęstości elektronowej z materiałami zapasowymi (Fig. 9B).

Komórki R – cała cytoplazma, w której jądro zajmuje często centralną część, jest bogata w cysterny RER oraz SER, a także aparaty Golgiego. Pęcherzyki o różnej gęstości elektronowej zlokalizowane są w pobliżu błony apikalnej, pod którą znajduje się warstwa korowa posiadająca korzenie filamentów mikrokosmków, a także liczne struktury autofagiczne (Fig. 9C-D).

Dokładny opis ultrastruktury komórek wątrobotrzustki znajduje się w publikacji dotyczącej budowy jelita środkowego *N. davidi* (Sonakowska i inni 2015, Sonakowska-Czajka i inni 2021). Analiza nie wykazała żadnych zmian w komórkach zajmujących dystalny oraz środkowy region cewek tego narządu, stąd też poniższy opis dotyczy jedynie komórek występujących w regionie proksymalnym.

4.2.2.2. Wątrobotrzustka - zmiany wywołane obecnością niklu w środowisku

Obecność niklu w środowisku życia *N. davidi* wpłynęła na ultrastrukturę komórek budujących region proksymalny cewek wątrobotrzustki, a więc na komórki F, B i R. Nie zaobserwowano żadnych zmian w komórkach E, stąd dalsze badania dotyczą jedynie komórek F, B oraz R.

Po tygodniowej ekspozycji na nikiel (**grupa Ni 1:0**) na terenie cytoplazmy komórek tworzących nabłonek proksymalnej części cewek zaobserwować można było pojedyncze zmiany degeneracyjne, zwakuolizowane obszary cytoplazmy, a także nieznaczny wzrost liczby autofagosomów na terenie komórek F, B oraz R (Fig. 10A-B). Brak zmian związanych z materiałami zapasowymi nagromadzonymi na terenie **komórek B** (Fig. 10B). Natomiast przy wydłużającej się ekspozycji na ksenobiotyk (2 tygodnie, **Ni 2:0**) nasilała się intensywność oraz częstotliwość obserwowanych zmian degeneracyjnych. Zaobserwowano wzrost intensywności procesu nekrozy (Fig. 11A), a także wzrost liczby autofagosomów na terenie wszystkich opisywanych typów komórek

(Fig. 11A-C). **Komórki F** posiadają silnie skrócone mikrokosmki. Cytoplazmę komórek tych cechuje obecność licznych autofagosomów, zdegenerowanych mitochondriów, rozdętych cystern ER oraz obecność obszarów zwakuolizowanych (Fig. 11A-B). **Komórki B**, a także **komórki R** wykazują wakuolizację w obrębie cytoplazmy oraz obecność rozdętych cystern ER (Fig. 11A, 11C). Analiza z wykorzystaniem TEM nie wykazała obecności komórek apoptotycznych w przypadku opisywanych typów komórek.

4.2.2.3. Wątrobotrzustka - zmiany wywołane przywróceniem zwierząt do środowiska nieskażonego po wcześniejszej ekspozycji na nikiel

Przywrócenie krewetek po tygodniowej ekspozycji na nikiel do wody czystej przyczyniło się do częściowej regeneracji komórek na poziomie ultrastrukturalnym, zwłaszcza przy 2 tygodniach w czystej wodzie, gdzie ultrastruktura wszystkich komórek tworzących proksymalny region cewek tego narządu u zwierząt grupy **Ni 1:2** przypomina grupę kontrolną (**CT**). W grupie **Ni 1:1** oraz **Ni 1:2** zaobserwować można było wciąż pojedyncze zmiany degeneracyjne (Fig. 12A-C, Fig. 13 A-B) wskazujące na proces nekrozy (cytoplazma jasna elektronowo, uboga w organelle, które często są rozdęte lub mają rozerwane błony). W grupach **Ni 1:1** oraz **Ni 1:2** obserwowano wzrost liczby struktur autofagicznych, a także spadek liczby kul z elektronowo gęstym materiałem zapasowym. Kule, które występują na terenie cytoplazmy stają się jasne elektronowo.

W przypadku zwierząt hodowanych w środowisku niklowym, po przeniesieniu ich do wody czystej na 1 tydzień (**Ni 2:1**), silne zmiany degeneracyjne (nekrotyczne) wciąż dotyczyły wszystkich typów komórek regionu proksymalnego cewek narządu (Fig. 14 A-C). Tak więc wiele organelli komórek **B**, **F** oraz **R** jest rozdętych, a cytoplazma elektronowo jasna zawiera niewielkie ich ilości.

W komórkach **F** obserwowano silnie zwakuolizowane obszary cytoplazmy, natomiast nie tak silne jak w przypadku grupy **Ni 2:0**. Cytoplazmę komórek tych cechuje też mniejsza liczba autofagosomów oraz w dalszym ciągu obecność rozdętych cystern ER (Fig. 14C). W cytoplazmie komórek **B** zaobserwowano liczne kule

materiału zapasowego, natomiast cytoplazma nadal wykazuje silną wakuolizację oraz obecność rozdętych cystern ER, a także autofagosomów (Fig. 14B).

2 tygodnie życia zwierząt w czystej wodzie po 2 tygodniach ekspozycji na ksenobiotyk (**Ni 2:2**) nie jest także wystarczające dla pełnej regeneracji tkanki (Fig. 15 A-C). W obrębie komórek F zwakuolizowane obszary cytoplazmy nie dotyczą już znacznych obszarów komórki, lecz miejscowych pojedynczych obszarów. Natomiast obserwuje się liczne autofagosomy oraz rozdęte cysterny ER (Fig. 15A-B). Komórki B wyróżnia obecność materiałów zapasowych w trakcie trawienia, co nie było zauważalne w grupie **Ni 2:1**. Ponadto widoczne są liczne autofagosomy (Fig. 15C).

4.3. Histochemia – analiza zmian w materiałach zapasowych jelita i wątrobotrzustki *N. davidi* w trakcie eksperymentu

Jelito - Traktowanie krewetek niklem nie wpłynęło na gromadzenie materiałów zapasowych w obrębie komórek trawiennych i regeneracyjnych. Komórki te we wszystkich grupach eksperymentalnych, podobnie jak w kontroli nie gromadzą materiałów zapasowych i są: PAS-negatywne, BPB-negatywne, Sudan Czarny B-negatywne (Fig. 16A-C, 17-19).

Wątrobotrzustka - Obecność niklu w środowisku życia krewetek wpływa na obecność gromadzonych w komórkach materiałów zapasowych. W grupie kontrolnej komórki typu B gromadzą materiały zapasowe w postaci polisacharydów oraz lipidów, tak w grupach **Ni 1:0** oraz **Ni 2:1** obok materiału zawierającego lipidy oraz polisacharydy, zaobserwowano gromadzenie białek (BPB-pozytywne), podczas gdy w pozostałych grupach materiały zapasowe uległy wyraźnej redukcji (Fig. 16D-F, 17-19).

4.4. Autofagia w nabłonku jelita i wątrobotrzustki *N. davidi* – analiza jakościowa

Analiza z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej potwierdziła obecność silnie kwaśnych struktur, do których należą struktury autofagiczne w cytoplazmie komórek D jelita. Obecność niklu w środowisku życia krewetek wpłynęła na intensyfikację procesu autofagii, tak więc najsilniejsze sygnały pochodziły z komórek D w obu narządach

zwierząt eksponowanych na nikiel przez okres 2 tygodni (**Ni 2:0**). U zwierząt przywróconych do wody nieskażonej zaobserwowano spadek intensywności sygnałów emitowanych przez silnie kwaśne struktury komórkowe. Sygnały emitowane przez struktury silnie kwaśne są słabsze, adekwatnie do czasu oczyszczania (czyli obserwowane jeszcze przy 1 tygodniu w czystej wodzie w grupie **Ni 1:1** i występujące rzadziej przy 2 tygodniach w czystej wodzie, grupa **Ni 2:2** (Fig. 20).

W wątrobotrzustce zaobserwowano wzrost intensywności sygnałów pochodzących od silnie kwaśnych struktur wraz z wydłużającym się czasem ekspozycji zwierząt na nikiel (najsilniejsze sygnały – grupa **Ni 2:0**). Przywrócenie zwierząt do życia w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na ksenobiotyki wpływa na obniżenie intensywności sygnałów pochodzących z silnie kwaśnych struktur, jednak w grupach **Ni 1:1** oraz **Ni 1:2** sygnały te nadal są silne (Fig. 20). Przywrócenie do wody czystej w przypadku wątrobotrzustki skutkuje obecnością rozproszonych w całej cytoplazmie czerwonych sygnałów w grupach **Ni 1:1**, mniejszych, licznych, skupionych czerwonych sygnałów w grupie **Ni 2:1** oraz dużych czerwonych skupionych sygnałów w grupie **Ni 2:2**. W grupie **Ni 1:2** czerwone sygnały wyraźnie słabną. Porównując oba narządy, w wątrobotrzustce sygnały są liczniejsze niż w nabłonku jelitowym (Fig. 20).

4.5. Śmierć komórkowa w jelicie i wątrobotrzustce *N. davidi* - analiza ilościowa

Ilościowa analiza wykazała więcej komórek wczesno-apoptotycznych i komórek późno-apoptotycznych w wątrobotrzustce niż w jelicie niezależnie od długości ekspozycji na metal (Fig. 21A-B, 22A-B). Po jednym oraz dwóch tygodniach ekspozycji na metal średni odsetek komórek apoptotycznych w wątrobotrzustce wynosił odpowiednio: 5,1% i 6,5% oraz 14,1% i 30,8% dla komórek późno-apoptotycznych (Fig. 21B, 22B). Natomiast w jelicie wartości procentowe były średnio prawie 5-krotnie niższe dla komórek wczesno-apoptotycznych oraz 7-krotnie i 15-krotnie niższe dla komórek późno-apoptotycznych odpowiednio dla jednego i dwóch tygodni ekspozycji na metal (Ni grupy -1 tydzień i Ni - 2 tygodnie) (Fig. 21A, 22A).

Z kolei średni odsetek komórek z przejawami nekrozy wynosił w wątrobotrzustce odpowiednio 12,3% i 10,7%, natomiast w jelicie 9,5% i 8,3% odpowiednio po 1

tygodniu i 2 tygodniach ekspozycji na Ni (Fig. 23). Jedynie w przypadku wątrobotrzustki różnice te były istotne w stosunku do grupy kontrolnej, niezależnie od czasu ekspozycji na metal (Ni: 1 tydzień: $P=0,001$; Ni: 2 tygodnie: $P=0,01$) (Fig. 23B). Przebywanie w czystej wodzie powodowało stopniowy i postępujący spadek liczby komórek apoptotycznych, późnoapoptotycznych i nekrotycznych w wątrobotrzustce do poziomu kontrolnego, podczas gdy w jelicie ich liczba wzrastała po jednym lub dwóch tygodniach przebywania w nieskażonej wodzie (Fig. 21-23).

Finalnie, po powrocie do czystej wody, odsetek żywych komórek wątrobotrzustki był podobny do kontroli (Fig. 24B), natomiast w jelicie był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej, u osobników po jednym lub dwóch tygodniach ekspozycji na metal i jednocześnie przebywaniu w czystej wodzie (odpowiednio: $P=0,007$, $P=0,0003$ jeden tydzień w czystej wodzie; $P=0,02$, $P=0,001$ dwa tygodnie w czystej wodzie) (Fig. 24A).

Analiza ilościowa z użyciem MUSE® MultiCaspase Kit wykazała, że obecność niklu w środowisku życia krewetek ma wpływ na aktywację kaspaz, które z kolei świadczą o aktywacji procesu apoptozy w komórce. Po tygodniu ekspozycji na nikiel poziom żywych komórek kaspazo-pozytywnych w wątrobotrzustce wzrósł trzykrotnie, natomiast w jelicie nie zwiększył się. Przywrócenie do wody czystej przyczyniło się do obniżenia poziomu aktywnych kaspaz, zwłaszcza w wątrobotrzustce (Fig. 25 i 26).

Najmniejszy odsetek komórek żywych (LL) zanotowano w jelitach osobników poddanych ekspozycji dwutygodniowej na Ni i oczyszczaniu trwającemu 1 tydzień ($P<0,00001$). Poziom tego parametru w komórkach jelita osobników narażonych na nikiel, był o 31% niższy niż w kontroli (Fig. 25A).

Najmniejszy odsetek żywych komórek kaspazo-pozytywnych (LR), średnio ośmiokrotnie niższy niż w kontroli, zanotowano w jelitach osobników poddanych ekspozycji jednotygodniowej na Ni i oczyszczaniu trwającemu 2 tygodnie (**Ni 1:2**) ($P=0,00001$) (Fig. 25B). W pozostałych grupach poddanych ekspozycji jednotygodniowej, poziom analizowanego parametru był także niższy, średnio o 40%, niż w kontroli ($P=0,023$). Z kolei odsetek żywych komórek kaspazo-pozytywnych w komórkach jelita osobników narażonych na nikiel przez dwa tygodnie i oczyszczanych przez tydzień (**Ni 2:1**), był prawie pięciokrotnie wyższy niż w pozostałych grupach, poddanych 2 tygodniowej ekspozycji na metal ($P<0,0000$). Wykazano istotne różnice

statystyczne w poziomie tego parametru między komplementarnymi grupami podlegającymi oczyszczeniu, przy obu czasach ekspozycji (Fig. 25B).

Najmniejszy odsetek martwych komórek kaspazo-pozytywnych, pięciokrotnie niższy niż w kontroli zanotowano w jelitach osobników poddanych ekspozycji jednotygodniowej na Ni i oczyszczaniu trwającemu 2 tygodnie (**Ni 1:2**) ($P < 0,0000$) (Fig. 25C). W pozostałych grupach poddanych ekspozycji jednotygodniowej, poziom analizowanego parametru był niższy niż w kontroli, lecz tylko w przypadku osobników z grupy narażonej na Ni, ale nie poddanej oczyszczeniu, były to różnice istotne statystycznie względem kontroli ($P = 0,00003$). Z kolei odsetek martwych komórek kaspazo-pozytywnych w komórkach jelita osobników narażonych na nikiel przez dwa tygodnie i oczyszczanych przez tydzień (**Ni 2:1**), był prawie 0,5% wyższy niż w kontroli (**CT**) ($P = 0,0007$). Najniższą wartość tego parametru (0,37%) zanotowano w jelitach osobników narażonych na nikiel przez dwa tygodnie i oczyszczanych przez 2 tygodnie (**Ni 2:2**). Wykazano istotne różnice statystyczne w poziomie tego parametru między komplementarnymi grupami podlegającymi oczyszczeniu, po 1 tygodniu oczyszczania ($P = 0,00004$) (Fig. 25C). W obu czasach ekspozycji na Ni (jednotygodniowa/dwutygodniowa) najniższy odsetek komórek martwych (UR) odnotowano w jelitach osobników poddanych oczyszczaniu trwającemu 2 tygodnie (**Ni 1:2**, **Ni 2:2**). Uzyskane wartości różniły się istotnie od wartości kontrolnych (odpowiednio: 0,38 %, $P = 0,00003$; 0,26 %, $P = 0,00001$) (Fig. 25D).

W przypadku wątrobotrzustki niezależnie od czasu ekspozycji na nikiel największy odsetek komórek żywych (LL) zanotowano w wątrobotrzustce osobników poddanych oczyszczaniu trwającemu 2 tygodnie (**Ni 1:2**, **Ni 2:2**). Poziom tego parametru w wątrobotrzustce osobników narażonych na nikiel był o 6% wyższy niż w kontroli (**CT**) w przypadku osobników poddanych ekspozycji jednotygodniowej na Ni (**Ni 1:0**) i 5 % w przypadku osobników poddanych ekspozycji dwutygodniowej (**Ni 2:0**). Z kolei najmniejszy odsetek żywych komórek wykazano w wątrobotrzustkach osobników poddanych ekspozycji jednotygodniowej na Ni (75,8%) (Fig. 26A).

Największy odsetek żywych komórek kaspazo-pozytywnych (LR), średnio trzykrotnie wyższy niż w kontroli, zanotowano w wątrobotrzustce osobników poddanych ekspozycji jednotygodniowej na Ni (**Ni 1:0**) ($P < 0,00000$) (Fig. 26B). Z kolei najmniejszy odsetek żywych komórek kaspazo-pozytywnych (LR), średnio

siedmiokrotnie niższy niż w kontroli, zanotowano w wątrobotrzustce osobników poddanych ekspozycji jednodobowej na Ni i oczyszczaniu trwającemu 2 tygodnie (**Ni 1:2**) ($P < 0,00000$). Oczyszczanie trwające jeden tydzień (**Ni 1:1**) wywołało obniżenie wartości tego parametru do poziomu kontrolnego (Fig. 26B). Z kolei odsetek żywych komórek kaspazo-pozytywnych w wątrobotrzustce osobników narażonych na nikiel przez dwa tygodnie i oczyszczanych przez tydzień (**Ni 2:1**), był prawie siedmiokrotnie wyższy niż w grupie kontrolnej (**CT**) ($P < 0,0000$). Wykazano istotne różnice statystyczne w poziomie tego parametru między komplementarnymi grupami podlegającymi oczyszczeniu, w obu czasach ekspozycji (Fig. 26B).

Najmniejszy odsetek martwych komórek kaspazo-pozytywnych, dziesięciokrotnie niższy niż w kontroli zanotowano w wątrobotrzustkach osobników poddanych ekspozycji jednodobowej na Ni (**Ni 1:0**) ($P = 0,016$) (Fig. 26C). Ekspozycja dwudobowa na ten metal nie spowodowała wyraźnych zmian w wielkości tego parametru w porównaniu z kontrolą. Największy odsetek martwych komórek kaspazo-pozytywnych, ponad dwukrotnie większy niż w kontroli, wykazano w wątrobotrzustce osobników poddanych ekspozycji jednodobowej na Ni i oczyszczanych przez 1 tydzień (**Ni 1:1**) ($P = 0,00005$). Wykazano istotne różnice statystyczne w poziomie tego parametru między komplementarnymi grupami podlegającymi oczyszczeniu, po 1 tygodniu oczyszczania ($P = 0,00001$) (Fig. 26C).

Odsetek komórek martwych (UR) w wątrobotrzustce osobników poddanych ekspozycji jednodobowej na Ni i oczyszczanych przez 1 tydzień (**Ni 1:1**) lub 2 tygodnie (**Ni 1:2**) był istotnie wyższy niż w kontroli, średnio trzykrotnie (Fig. 26D). Poziom tego parametru w wątrobotrzustce osobników narażonych na nikiel przez 2 tygodnie był najwyższy (2,09%) u osobników przebywających w wodzie czystej przez 1 tydzień. Wykazano istotne różnice statystyczne w poziomie tego parametru między komplementarnymi grupami podlegającymi dwudobowemu oczyszczeniu ($P = 0,025$) (Fig. 26D).

4.6. Poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w jelicie i wątrobotrzustce *N. davidi*

Analiza jakościowa z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (barwienie odczynnikiem DHE) wykazała, że ekspozycja krewetek na nikiel przyczynia się do

intensyfikacji stresu oksydacyjnego w komórkach budujących analizowane narządy. Czerwone sygnały świadczące o obecności ROS w obrębie cytoplazmy komórek, czy jąder komórkowych są szczególnie liczne w grupach ekspozycyjnych obu analizowanych narządów. Przywrócenie krewetek do czystej wody na tydzień nie przyczynia się do zmniejszenia intensywności sygnałów emitowanych przez komórki ROS-pozytywne zarówno w jelicie, jak i wątrobotrzustce. Porównując oba narządy, stres oksydacyjny wywołany ekspozycją krewetek na nikiel jest wyższy w wątrobotrzustce we wszystkich grupach eksperymentalnych, co może wiązać się z istotną funkcją tego narządu w procesach detoksykacji. W obu narządach w grupie **Ni 2:1** zaobserwowano silny wzrost sygnałów emitowanych przez komórki ROS-pozytywne (Fig. 27).

Uzyskane wyniki z analizy jakościowej stresu oksydacyjnego są zbieżne z wynikami z analizy ilościowej z cytometru (MUSE® Oxidative Stress Kit). Niezależnie od czasu ekspozycji na metal, odsetek komórek ROS-pozytywnych w obu narządach był istotnie wyższy w porównaniu z kontrolą (Fig. 28): wyższe średnio 2- i 3-krotnie w jelicie oraz 2-krotnie i 5-krotnie w przypadku wątrobotrzustki odpowiednio dla jednego i dwóch tygodni ekspozycji na metal (**Ni 1:0**, **Ni 2:0**) (Fig. 28). Po umieszczeniu zwierząt w wodzie czystej odsetek komórek ROS-pozytywnych w obu narządach był znacznie wyższy w porównaniu z osobnikami grupy kontrolnej (**CT**) i podobny do grup po tygodniowej lub dwutygodniowej ekspozycji na metal. Jedynie w wątrobotrzustce osobników po tygodniowej ekspozycji na Ni odsetek komórek ROS-pozytywnych był istotnie niższy niż u osobników ponownie przebywających w wodzie nieskażonej.

4.7. Aktywność mitochondrialna w komórkach jelita i wątrobotrzustki *N. davidi*

Analiza ilościowa wykazała, że największy odsetek komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, średnio dwukrotnie wyższy niż w kontroli, zanotowano w jelitach osobników poddanych ekspozycji jednotygodniowej na Ni i oczyszczaniu trwającemu 2 tygodnie (**Ni 1:2**) ($P=0,002$) (Fig. 29). Dwutygodniowa ekspozycja na nikiel (**Ni 2:0**) skutkowała blisko dwukrotnym, względem kontroli, wzrostem liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami ($P=0,049$). Nie

stwierdzono różnic w odniesieniu do kontroli w poziomie tego parametru w komórkach jelita osobników z grup **Ni 2:1** i **Ni 2:2**. Dwutygodniowe oczyszczanie w czystej wodzie osobników z grupy otrzymującej nikiel przez dwa tygodnie skutkowało istotnie niższym poziomem komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami niż w przypadku ekspozycji jednodniowej ($P=0,022$) (Fig. 29).

Analiza ilościowa wątrobotrzustki wykazała największy odsetek komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, średnio 130-krotnie wyższy niż w kontroli, w wątrobotrzustce osobników poddanych ekspozycji dwutygodniowej na metal (**Ni 2:0**, $P<0,0000$) (Fig. 30). Jednodniowa ekspozycja na nikiel (**Ni 1:0**) skutkowała ponad trzydziestokrotnym względem kontroli, wzrostem liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, ale nie były to różnice istotne statystycznie. Nie stwierdzono różnic w odniesieniu do kontroli, w poziomie tego parametru w wątrobotrzustce osobników narażonych na nikiel przez dwa tygodnie i przeniesionych do wody czystej na okres 1 i 2 tygodni (**Ni 2:1**, **Ni 2:2**). Jedno- i dwutygodniowe oczyszczanie w czystej wodzie osobników z grupy otrzymującej nikiel przez 1 tydzień (**Ni 1:1**, **Ni 1:2**) skutkowało istotnie wyższym poziomem komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w porównaniu z kontrolą (odpowiednio $P=0,017$; $P=0,00008$) (Fig. 30).

4.8. Zmiany poziomu ATP i ADP w komórkach jelita i wątrobotrzustki *N. davidi*

Tygodniowa ekspozycja na nikiel (grupa **Ni 1:0**) nie spowodowała zmian stężenia ATP w komórkach jelita, podczas gdy ekspozycja dwutygodniowa (**Ni 2:0**) wywołała ponad dwukrotne zmniejszenie stężenia ATP w porównaniu z kontrolą (**CT**) ($P=0,0004$) (Fig. 31A). Stężenie ATP w jelicie osobników poddanych jednodniowej ekspozycji na Ni i oczyszczaniu było zbliżone, lecz istotnie niższe niż w kontroli (**Ni 1:1**: $P=0,019$; **Ni 1:2**: $P=0,009$). W przypadku osobników ekspozycyjnych na metal przez 2 tygodnie, długość czasu oczyszczania nie wpłynęła na poziom stężenia ATP w komórkach jelita, bowiem był on istotnie niższy niż w kontroli, prawie dwukrotnie w odniesieniu do kontroli (**Ni 2:1**: $P=0,008$; **Ni 2:2**: $P=0,022$) i nie różnił się istotnie od poziomu ATP notowanego w jelitach osobników nie poddanych oczyszczeniu (Fig. 31A).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian wielkości wskaźnika ADP/ATP w komórkach jelita po jednodobnej ekspozycji na nikiel (grupa **Ni 1:0**), podczas gdy ekspozycja dwudobna (**Ni 2:0**) wywołała blisko czterokrotny wzrost tego wskaźnika w porównaniu z kontrolą (**CT**) ($P=0,024$) (Fig. 31B). Poziom ADP/ATP w jelicie osobników poddanych jednodobnej ekspozycji na Ni i jednodobnemu oczyszczeniu w czystej wodzie (**Ni 1:1**) był istotnie wyższy w odniesieniu zarówno do kontroli, jak i grupy poddanej działaniu metalu w wymienionym czasie ($P=0,018$). W przypadku osobników eksponowanych na metal przez 2 tygodnie, jednodobne oczyszczanie (**Ni 2:1**) spowodowało wzrost wielkości ADP/ATP w komórkach jelita w odniesieniu do kontroli ($P=0,0001$), podczas gdy w grupie **Ni 2:2** wielkość wskaźnika nie różniła się od kontroli (Fig. 31B).

Ekspozycja na nikiel (grupa **Ni 1:0** i **Ni 2:0**) spowodowała istotne względem kontroli obniżenie stężenia ATP w komórkach wątrobotrzustki: blisko dwukrotne po ekspozycji jednodobnej (**Ni 1:0**, $P=0,03$) i prawie pięciokrotne po ekspozycji dwudobnej (**Ni 2:0**, $P=0,0002$) (Fig. 32A). Długość okresu życia zwierząt w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na nikiel nie zmieniła poziomu ATP w komórkach tego narządu, bowiem był on porównywalny u osobników wszystkich grup (Fig. 32A).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian wielkości wskaźnika ADP/ATP w komórkach wątrobotrzustki po jednodobnej ekspozycji na nikiel (grupa **Ni 1:0**), podczas gdy ekspozycja dwudobna (**Ni 2:0**) wywołała blisko trzynastokrotny wzrost tego wskaźnika w porównaniu z kontrolą (**CT**) ($P=0,0006$) (Fig. 32B). Poziom ADP/ATP w wątrobotrzustce osobników poddanych jednodobnej ekspozycji na Ni i jednodobnemu oczyszczeniu (**Ni 1:1**) w czystej wodzie był blisko trzynastokrotnie wyższy w odniesieniu do kontroli ($P=0,036$). Oczyszczanie dwudobne (**Ni 1:2**) spowodowało obniżenie wielkości wskaźnika do poziomu, który nie różnił się od kontroli. W przypadku osobników eksponowanych na metal przez 2 tygodnie, zarówno jedno- jak i dwudobne oczyszczanie (**Ni 2:1**, **Ni 2:2**) spowodowało obniżenie wskaźnika ADP/ATP do poziomu kontrolnego (Fig. 32B).

4.9. Analiza cyklu komórkowego w komórkach jelita i wątrobotrzustki *N. davidi*

W obu czasach ekspozycji na nikiel, niezależnie od długości okresu oczyszczania, odsetek komórek w fazie G_0/G_1 w jelicie był istotnie niższy, niż w pozostałych grupach doświadczalnych ($P < 0.0000$). Ponadto, niezależnie od czasu narażenia zwierząt na nikiel, najwyższy odsetek tego parametru zanotowano u osobników poddanych działaniu tylko metalu (98,6%) (Fig. 33A).

Niezależnie od czasu ekspozycji na nikiel, wykazano istotne, w odniesieniu do kontroli, obniżenie w jelicie odsetka komórek w fazie S (Fig. 33B) i G_2/M (Fig. 33C) ($P < 0.0000$). W przypadku obu parametrów, odsetek komórek w jelicie po jedno- i dwutygodniowym oczyszczaniu, był istotnie wyższy w grupie poddanej 1 tygodniowemu narażeniu na nikiel, w porównaniu z okresem narażenia dwutygodniowego ($P < 0.0000$) (Fig. 33B-C).

W przypadku wątrobotrzustki w grupie osobników poddanych jednotygodniowej ekspozycji na metal odsetek komórek w fazie G_0/G_1 u osobników poddanych ekspozycji na metal (98,4%) był zbliżony do kontroli, jednak istotnie wyższy, w porównaniu do wartości notowanych u osobników po jednym ($P = 0,03$) i dwóch tygodniach oczyszczania ($P = 0,01$) (Fig. 34A).

Niezależnie od czasu ekspozycji na nikiel, wykazano w wątrobotrzustce obniżenie odsetka komórek w fazie S (Fig. 35B) i G_2/M (Fig. 34C), jednak nie były to zmiany istotne względem kontroli. W przypadku obu parametrów (%S i % G_2/M) po dwutygodniowym oczyszczaniu, odsetek komórek był istotnie wyższy w grupie poddanej 1 tygodniowemu narażeniu na nikiel, w porównaniu z okresem narażenia dwutygodniowego ($P < 0.0000$) (Fig. 34B-C).

4.10. Proliferacja komórek jelita i wątrobotrzustki *N. davidi*

Analiza ilościowa z wykorzystaniem MUSE® Ki67 Proliferation Kit wykazała, że najwyższy odsetek komórek Ki67-pozytywnych (ulegających proliferacji) zanotowano w jelitach osobników poddanych jednotygodniowej ekspozycji na nikiel (**Ni 1:0**). W tym czasie ekspozycji był on blisko o 6% wyższy niż w kontroli (CT, $P = 0,0007$), o 9% wyższy niż u osobników przebywających w wodzie czystej przez tydzień (**Ni 1:1**, $P = 0,0001$) oraz o 10% wyższy niż u osobników oczyszczanych przez 2

tygodnie (**Ni 1:2**, $P=0,0001$) (Fig. 35). Z kolei w grupie osobników poddanych dwutygodniowej ekspozycji (**Ni 2:0**) na metal odsetek komórek Ki67-pozytywnych był porównywalny do w kontroli (**CT**). Tylko w przypadku osobników poddanych dwutygodniowemu oczyszczaniu (**Ni 2:2**) zanotowano istotne, blisko trzykrotne, obniżenie odsetka tych komórek względem kontroli i pozostałych grup. Wykazano ponadto istotne różnice statystyczne w poziomie tego parametru między komplementarnymi grupami zwierząt przebywającymi w środowisku skażonym nikiem przez jeden (**Ni 1:0**) i dwa tygodnie (**Ni 2:0**) oraz podlegającymi oczyszczeniu przez okres 1 tygodnia (**Ni 1:1**, **Ni 2:1**) (Fig. 35).

W przypadku wątrobotrzustki, jednodotygodniowa ekspozycja na Ni (**Ni 1:0**) spowodowała wzrost odsetka komórek Ki67-pozytywnych średnio o 3%, względem kontroli ($P=0,04$). Dla tego czasu ekspozycji na metal zanotowano także istotny względem kontroli wzrost odsetka tych komórek po jednym tygodniu oczyszczania (**Ni 1:1**), blisko o 6% ($P=0,00008$). Dwutygodniowe oczyszczanie (**Ni 1:2**) wywołało jednak istotne względem kontroli obniżenie (o prawie 5%) odsetka tych komórek ($P=0,00009$) (Fig. 36). Z kolei w grupie osobników poddanych dwutygodniowej ekspozycji na metal odsetek komórek Ki67-pozytywnych w wątrobotrzustce, tylko w grupie poddanej jednodotygodniowemu oczyszczaniu (**Ni 2:1**) był istotnie wyższy niż w kontroli (**CT**) o blisko 7 % ($P=0,00002$). Wykazano ponadto istotne różnice statystyczne w poziomie tego parametru między komplementarnymi grupami hodowanymi w wodzie skażonej nikiem przez jeden i dwa tygodnie (**Ni 1:0**, **Ni 2:0**) oraz podlegającymi oczyszczeniu przez okres 2 tygodni (**Ni 1:2**, **Ni 2:2**) ($P<0,00000$) (Fig. 36).

5. DYSKUSJA

5.1. Stężenie niklu w środowisku wodnym

Nikiel jest uważany za jeden z metali obok ołowiu i kadmu, który może negatywnie wpływać na funkcjonowanie organizmów, może zaburzać homeostazę tkanek i komórek, a w konsekwencji wywoływać efekty letalne. Może także kumulować się w organizmach i ostatecznie przekazywany będzie do kolejnych ogniw łańcuchów troficznych. W przypadku wód słodkich podaje się, że stężenia niklu nie powinno przekraczać 0,03 mg/l, jednak jako najwyższe dopuszczalne stężenie tego metalu w wodach słodkich to 0,02 mg/l. W wodzie mineralnej pakowanej w butelkach stężenie niklu wynosi najczęściej 25 µg/l (Allen i inni 1989), 1,9 µg/l, 20 µg/l lub nawet 30,3 µg/l (Bertoldi i inni 2011). Natomiast dopuszczalne stężenie niklu w wodzie pitnej lub w wodzie mającej kontakt z powłokami niklowymi to 0,2 mg/l. Wiele badań prowadzonych było na kręgowcach, jak i bezkręgowcach słodkowodnych w celu ustalenia stężeń letalnych oraz dopuszczalnych, w których zwierzęta ta przeżywają, czy nie wykazują żadnych efektów letalnych, a także są zdolne do rozwoju i rozrodu. Jak się okazuje dla różnych gatunków ryb słodkowodnych dochodzi do obniżenia liczebności, czy rozrodczości zwierząt przy różnych stężeniach niklu (Pickering 1974, Blaylock i Frank, 1979). Prowadzi się badania między innymi z wykorzystaniem parametrów: LD50, LC50 czy LT50, gdzie LD50 - mówi o dawce substancji wywołującej śmierć u połowy badanej populacji; LC50 - odnosi się do stężenia substancji wywołującej śmierć u połowy badanej populacji; natomiast LT50 mówi o czasie, po którym obserwuje się śmierć w 50% populacji. Badania wykorzystujące parametr LT50 prowadzono między innymi na słodkowodnych małżach z rodziny racicznicowatych *Dreissena polymorpha*, *Dreissena rostriformis bugensis*. Badacze eksponowali zwierzęta na nikiel w stężeniu 2,3 mg/l i na podstawie LT50 wykazali różną tolerancję w badanych populacjach (Potet i inni 2018).

W przypadku skorupiaków słodkowodnych toksyczne stężenie, wywołujące śmiertelność połowy badanych populacji wynosi 8 mg/l. Wiele badań, które opierały się na analizie wpływu niklu na liczebność populacji, śmiertelność, rozrodczość

prowadzono także przy stężeniu 0,8 mg/l (Ali i inni 2005, Leonard i inni 2011). Subletalne stężenie niklu dla słodkowodnych krabów *Carcinus maenas* wynosiło 8,2, 500, a nawet 3000 µg/l w zależności od okresu przez jaki zwierzęta żyły w danym środowisku (Blewett i inni 2015). Natomiast u raka *Astacus leptodactylus* prowadzono badania z wykorzystaniem stężenia 70 mg/l NiCl₂ (Zarnescu i inni 2017). Natomiast za modelowy w badaniach toksykologicznych gatunek słodkowodnego skorupiaka uważa się rozwielitkę *Daphnia magna*, u której wykonywano badania toksyczności ostrej, przewlekłej oraz chronicznej (Wdowczyk 2018).

W niniejszych badaniach wybrano do analizy kilka stężeń niklu, tak aby ocenić przy jakim stężeniu dojdzie do zmniejszenia liczebności populacji o połowę. Drogą eksperymentalną sprawdzono 3 stężenia wodnego roztworu niklu w postaci NiCl₂: 0,2 mg/l, 2 mg/l, 8 mg/l (czyli stężenia metalu to: 0,09 mg/l, 0,9 mg/l oraz 3,63 mg/l). Dla testowanych stężeń uzyskano następujące wartości LT50: dla 0,09 mgNi/l - brak zgonów w ciągu 4 tygodni, dla 0,9 mgNi/l - około 27 dni oraz dla 3,63 mgNi/l około 14 dni. Aby możliwa była stopniowa obserwacja potencjalnie pojawiających się zmian, do eksperymentu wybrano stężenie 8 mg NiCl₂/l, a więc stężenie samego metalu to 3,6 mg/l wody akwariowej, przy którym obserwowano około 50% śmiertelność populacji po 14 dniach.

Niniejsze badania w ujęciu toksykologicznym można uznać za badania toksyczności chronicznej, w której zwierzęta są eksponowane na substancję toksyczną w niższych stężeniach. Badanie takie wówczas trwa dłużej niż w przypadku toksyczności ostrej (24, 48, 92 h), a rezultaty obserwuje się po dłuższym czasie.

Z uwagi na fakt, że stężenia wywołujące efekty w testach chronicznych są też z reguły mniejsze, niż w toksyczności ostrej, dlatego też testy te są znacznie czulszym i bliższym warunkom naturalnym wskaźnikiem negatywnych efektów środowiskowych (Traczewska 2011).

Jak się okazuje przy stężeniu niklu w wodzie słodkiej (akwariowej o stałych parametrach: temperatura 21 °C, pH 7, twardości wody - 10°GH) o wartości 3,6 mgNi/l (8 mg NiCl₂/l) połowa zwierząt umiera po okresie 2 tygodni. Okres 2 tygodni wybrany został jako ostateczny, w którym można by spodziewać się zmian degeneracyjnych, natomiast okres 1 tygodnia wybrany został jako połowa okresu ostatecznie wywołującego efekt letalny w 50% populacji. Tak więc takie stężenie niklu oraz czasy

hodowli zwierząt w tym stężeniu (1 oraz 2 tygodnie) zostało wybrane do badań eksperymentalnych, w celu zrealizowania założonych celów związanych z opisem wpływu wybranego metalu na procesy degeneracyjne w komórkach jelita środkowego, które pojawiają się wraz z umieralnością zwierząt. Kolejny etap badań związany był z kolei z ustaleniem, czy ponowne hodowanie zwierząt w czystej wodzie akwariowej (po okresach 1 oraz 2 tygodniu ekspozycji na nikiel) aktywuje procesy naprawcze, a jeśli tak, to czy procesy te będą wystarczające aby zwierzęta przeżyły. Okazuje się, że część ze zwierząt, które przeżyły okres 1 oraz 2 tygodniu w wodzie z 8 mg NiCl₂/l przeżyły kolejne okresy eksperymentu, a więc 1 lub 2 tygodnie w wodzie czystej. Sugeruje to, że doszło do aktywacji procesów regeneracyjnych. Podobnych obserwacji dokonała w swych badaniach na *N. davidi* Włodarczyk i inni (2017, 2019ab). W doświadczeniu tym dorosłe osobniki były poddane różnym okresom głodzenia, po których ponownie podawana im była standardowa karma przeznaczona dla krewetek. Podczas gdy okres głodzenia aktywował stopniową degenerację komórek i organelli w jelicie oraz wątrobotrzustce, to powrót do spożywania pokarmu wskazał na aktywację procesów regeneracyjnych (Włodarczyk i inni 2017, 2019ab).

5.2. Budowa jelita środkowego u skorupiaków

U skorupiaków zaobserwowano różnorodność w morfologii endodermalnej części układu pokarmowego, gdzie może stanowić ona jedynie długą prostą rurę pozbawioną uchyłków, rurę posiadającą uchyłki w przedniej części narządu, może być tworzona przez dwa narządy połączone ze sobą anatomicznie (jelito i wątrobotrzustka) lub być tworzona jedynie przez duży gruczoł wątrobotrzustkowy (Herrera-Alvarez i inni 2000, Sousa i Petriella 2001, 2006, Symonova 2007, Rost-Roszkowska i inni 2012, Sonakowska i inni 2015).

U dziesięcionogów (Decapoda) wyróżnia się obecność 4 stref w kanalikach wątrobotrzustkowych: strefę komórek E, strefę różnicowania, komórek B oraz obszar proksymalny. Komórki E macierzyste dają początek komórkom F, F, B. W proksymalnej części brak komórek B, ponieważ na końcu strefy B są one na drodze holokrynowej sekrecji wydalane na późnej fazie trawienia (Štrus i inni 2019).

U raków regeneracja całej wątrobotrzustki na podstawie autoradiografii trwa krócej niż 2 tygodnie (Davis i Burnett 1964).

Niezwykłym aspektem przewodu pokarmowego skorupiaków jest jego funkcja przechowywania rezerwy składników odżywczych. Rezerwy te są wykorzystywane podczas fazy *intermolt* każdego linienia cyklu do budowy nowych tkanek. Specjalne endokrynne mechanizmy regulują syntezę enzymów trawiennych, a niektóre, jak np. proteazy o niskiej wadze, zostały znalezione tylko u skorupiaków. Pomimo różnorodności grup skorupiaków, istnieją pewne wspólne struktury komórkowe zaangażowane we wchłanianie i odkładanie składników odżywczych, które należy uznać za charakterystyczne skorupiaków (Ceccaldi 1998).

Początkowo zgodnie z Hirsch i Jacobs 1928, 1930 klasyczne nazewnictwo i funkcja komórek przedstawia się następująco: komórki E (lub Embryonalzellen), które mają cechy embrionalne; komórki R (lub Restzellen), które mają funkcję przechowywania; Komórki F (lub Fibrenzellen), które mają włóknisty wygląd; komórki B (lub Blasenstellen), które pełnią funkcję wydzielniczą, i zawierają jedną lub więcej ważnych wakuoli wydzielniczych. Natomiast aktualny stan wiedzy na ten temat jest większy.

Nabłonek tworzący jelito środkowe skurupiaków zawiera liczne komórki, spośród których opisano komórki D – trawienne, E – embrionalne, regeneracyjne, R – resorpcyjne, B – magazynujące, F – fibryllarne, M – podstawne, główne (Arnaud i inni 1978, Hames i Hopkin 1991, Sousa i Petriella 2001, 2006, Žnidaršc i inni 2003, Rost-Roszkowska i inni 2012, Sonakowska i inni 2015). Lokalizacja i funkcja komórek jest przedstawiona we wstępie w Tabeli 1. Poniższy opis zawiera informacje na temat budowy komórek, która może się nieco różnić w zależności od gatunku.

Charakterystyka komórek jelita środkowego skorupiaków:

Komórki D – trawienne, cylindrycznego kształtu, występują w nabłonku jelitowym. Ultrastrukturalnie cechują się wyraźną regionalizacją cytoplazmy, na podstawie czego wyróżnić można rejon apikalny, okołojądrowy oraz bazalny. Dla pierwszego obszaru charakterystyczną cechą jest obecność mikrokosmków, będących wytworem błony apikalnej, filamenty zakotwiczą się w cytoplazmie tworząc warstwę korową, obecne są także mitochondria, cysterny gładkiego i szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, autofagosomy. Dla obszaru okołojądrowego, jak nazwa wskazuje,

charakterystyczna jest obecność dużego, owalnego jądra komórkowego wokół którego znajdują się aparaty Golgiego, cysterny gładkiego i szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. W obszarze bazalnym, błona bazalna tworzy pofałdowania, pomiędzy którymi w obrębie cytoplazmy mieszczą się liczne mitochondria, aparaty Golgiego, cysterny szorstkiego i gładkiego retikulum endoplazmatycznego (Sonakowska i inni 2015).

Komórki E – embrionalne, regeneracyjne, występują zarówno w jelicie jak i wątrobotrzustce. W jelicie znajdują się w bazalnej części nabłonka pomiędzy sąsiadującymi komórkami trawiennymi, nigdy nie osiągając światła jelita. Natomiast w wątrobotrzustce komórki te występują w obszarze dystalnym kanalików. Ultrastrukturalnie komórki te są owalnego kształtu, ich błona komórkowa nie tworzy pofałdowań w części apikalnej i bazalnej komórki. Cechą charakterystyczną tej komórki jest obecność dużego owalnego jądra komórkowego zajmującego większą część cytoplazmy. Sama cytoplazma jest raczej uboga w organelle komórkowe. W obrębie cytoplazmy spotyka się pojedyncze mitochondria oraz cysterny gładkiego i szorstkiego retikulum endoplazmatycznego (Sonakowska i inni 2015). Komórki E są niewyspecjalizowane i zawierają relatywnie duże jądro komórkowe w stosunku do rozmiaru komórki. Cytoplazma posiada zredukowaną ilość RER i SER u kraba *Scylla serrata*, komórka ma wysokość 25 μm i szerokość 5 μm (Barker i Gibson 1979, Ceccaldi 1998).

Komórki R – resorpcyjne, występują w proksymalnej części kanalika w wątrobotrzustce. Błona apikalna tych komórek wytwarza mikrokosmki, poniżej których znajduje się warstwa kortykalna. W cytoplazmie, głównie w części apikalnej komórki znajdują się autofagosomy, liczne cysterny gładkiego i szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, aparaty Golgiego a także pęcherzyki o średniej gęstości elektronowej (Sonakowska-Czajka i inni 2021). Przeważnie komórki R mają następujący rozmiar 60 x 10 μm , są obfite i zawierają liczne wakuole wypełnione osmofilnymi lipidami. Ich rąbek szczoteczkowy ma wysokość 1 do 2 μm . Występują również niewielkie struktury wapienne i ziarna glikogenu. Dojrzałe komórki R mają kropelki lipidów i cząsteczki glikogenu. Komórki charakteryzują także wakuole, które stopniowo tworzą nadjądrowe inkluzje zawierające metale (Ceccaldi 1998), u niektórych gatunków, takich jak rak *Procambarus clarkii*, opisany przez Ogurę (1959),

komórki te zawierają granulki miedzi. Komórki R są najliczniejszym typem komórek wątrobotrzustki. Mają polarną architekturę. Część apikalna składa się z mikrokosmkowej granicy, mitochondriów, krótkimi cysternami szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. Część bazalna zawiera zatokę hemolimfy (z cysternami gładkiego retikulum endoplazmatycznego), cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, mitochondria. Część środkowa komórki zawiera jądro komórkowe, lipidy, cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, mitochondria, aparaty Golgiego, peroksysony, autofagosomy, gęste elektronowo lizosomy. pęcherzyki aparatów Golgiego gęste elektronowo, glikogen u raków i krabów (Štrus i inni 2019).

Komórki B – magazynujące, mogą osiągnąć wysokość 50 μm i zawierać dużo owalnych wakuoli. W części apikalnej cytoplazmy znajduje się grupa małych wakuol, tuż poniżej rąbka szczoteczki. Komórki te produkują enzymy trawienne (Ceccaldi 1998). Komórki B są najbardziej tajemniczymi typami komórek wątrobotrzustki. Dojrzałe komórki B charakteryzują się dużą centralną wakuolą. Są uwalniane z nabłonka pod koniec strefy komórek B poprzez wydzielanie holokrynowe, w nieznanym związku z trawieniem. Komórki te nie syntetyzują proteolitycznych enzymów trawiennych, natomiast syntetyzują białka ale także wchłaniają materiały zapasowe ze światła kanalików (Štrus i inni 2019).

Komórki F – fibryllarne, posiadają następujące wymiary: 50-90 μm . Jądro komórkowe jest zlokalizowane w bazalnym rejonie komórki. Szorstkie retikulum endoplazmatyczne jest rozległe (Ceccaldi 1998). U raka *Astacus astacus*, aparaty Golgiego produkują wakuole enzymatyczne podczas określonych etapów cyklu karmienia (Icely i Nott 1992). Immunohistochemia z przeciwciałami skierowanymi przeciwko proteinazom astacynie, trypsynie i karboksypeptydazie wykazała intensywne barwienie ciałek/pęcherzyków Golgiego komórek F i światła komórek kanalików wątrobotrzustkowych (Vogt i inni 1989). Komórki R i komórki B były na ogół negatywne.

Komórki M – podstawne, główne (midget cell) zostały opisane w wątrobotrzustce krewetki *Penaeus semisulcatus*. Komórki te są bogate w białka i zawierają duże wakuole. Posiadają sferyczny kształt. Ich istnienie, wygląd i materiał zapasowy zmieniają się w ciągu okołodobowego cyklu trawiennego (Al-Mohanna i Nott 1985). Stanowią najmniejsze i najrzadsze w nabłonku wątrobotrzustki i były najpierw

opisane przez Al-Mohanna. Są pojedynczo zlokalizowane na błonie podstawnej z bliskim kontaktem do zatoki hemolimfy i nie mają kontaktu ze światłem kanalika wątrobotrzustki. Ultrastrukturalnie wykazują typową, syntetyzującą białka komórkę enkokrynną. Forma ich ziarnistych inkluzji jest bardzo zróżnicowana między gatunkami (Štrus i inni 2019). U *Penaeus monodon* występuje głównie jedna duża inkluzja, natomiast u *Astacus astacus* na ogół liczne drobne granulki (Vogt 1994).

U badanego gatunku krewetki słodkowodnej jelito środkowe tworzone jest przez dwa narządy: rurowate jelito oraz połączony z nim w przedniej części gruczoł nazywany wątrobotrzustką. Nabłonek jelita tworzony jest przez dwa typy komórek: D oraz E, natomiast długie i ślepo zakończone cewki wątrobotrzustki wykazały obecność komórek E (w regionie dystalnym), różnicujących się (w regionie środkowym), F, B oraz R w regionie proksymalnym cewek. Dokładna struktura obu narządów została opisana w pracach: Sonakowska i inni 2015 oraz Sonakowska-Czajka i inni 2021, z uwzględnieniem także badań histochemicznych wykazujących obecność lub brak materiałów zapasowych.

Jelito środkowe bezkręgowców, które jest odpowiedzialne za procesy syntezy, sekrecji, absorpcji, magazynowania substancji, stanowi jedną z pierwszych barier chroniących przed wpływem na cały organizm licznych ksenobiotyków znajdujących się w pożywieniu, czy środowisku życia. Dlatego też traktowane jest za dobry narząd modelowy do analiz procesów degeneracyjnych, czy regeneracyjnych uruchamianych w wyniku kontaktu komórek z ksenobiotykami (Wilczek i inni 2014, El-Saad i inni 2017, Bonelli i inni 2019).

5.3. Zmiany degeneracyjne w nabłonku jelita środkowego *Neocaridina davidi* pod wpływem niklu

Ze względu na fakt, że osobniki *N. davidi* traktowane były niklem, wykonano analizy zawartości tego metalu, aby sprawdzić, czy dochodzi do jego kumulacji w ciele zwierząt, a także czy przywrócenie ich do życia w wodzie czystej będzie miało wpływ na usuwanie niklu z organizmu (oczyszczanie). U osobników kontrolnych poziom niklu w organizmie był poniżej poziomu wykrywalności. W wyniku tygodniowej ekspozycji na nikiel (**grupa Ni 1:0**) zaobserwowano, że krewetki gromadzą ten metal. Co więcej,

w grupie tej notuje się wyższe stężenia gromadzonego ksenobiotyku w ciele krewetek w porównaniu z grupą **Ni 2:0**. Zjawisko to tłumaczyć można faktem rozpoczynającej się mobilizacji metabolizmu zwierząt do procesów detoksykacyjnych. Ultrastrukturalnie natomiast, po tygodniowym traktowaniu zwierząt niklem większość komórek budujących jelito środkowe *N. davidi* przypominało grupę kontrolną (CT).

Nikiel jest metalem ciężkim, który nie podlega degradacji przez mikroorganizmy, lecz akumuluje się w środowisku (wodzie, glebie, powietrzu) w konsekwencji zanieczyszczając łańcuchy troficzne, co z kolei zwiększa ryzyko zachwiania homeostazy organizmów żywych (Carocci i inni 2016). Wykazano, że metal ten, jak również inne metale takie jak między innymi Cd, Pb, Mn, Co mają zdolność do kumulowania się w ciałach zwierząt kręgowych i bezkręgowych. Ezemonye i inni 2019 podczas badań oszacowali stężenie niklu w rzece Benin w Nigerii, a także zmierzili poziom pierwiastka w krewetce *Macrobrachium macrobrachion* oraz rybie *Brycinus longipinnis*. Przy stężeniu niklu w rzece wynoszącym 0,42 mg/l w ciałach zwierząt odnotowano następujące wartości niklu: 33,03 mg/kg oraz 53,57 mg/kg, dla krewetki oraz ryby odpowiednio. Wśród skorupiaków gromadzenie niklu odnotowano także między innymi u raka *Astacus leptodactylus* (Zarnescu i inni 2017), krewetki *Penaes semisulcatus*, gdzie analizę stężenia metalu sprawdzano sezonowo i choć pierwiastek był w krewetce obecny cały rok, tak w ciągu października odnotowano najwyższe wartości w porównaniu do stycznia, kwietnia, lipca (Yılmaz i Yılmaz 2007).

Badania ultrastrukturalne związane z wpływem niklu na komórki nabłonka jelita środkowego wykazały zmiany jedynie na terenie komórek D jelita oraz komórek proksymalnego odcinka cewek wątrobotrzustki. Nie zaobserwowano zmian na terenie komórek E jelita i wątrobotrzustki, ani komórek różnicujących się wątrobotrzustki. Podobne obserwacje opisane zostały w przypadku badań eksperymentalnych związanych z głodzeniem dorosłych osobników *N. davidi* (Włodarczyk i inni 2017, 2019ab), czy traktowania ich pestycydem (Ostróżka i inni 2022). Tak więc wyniki badań z wykorzystaniem niklu, potwierdzają wcześniejszą konkluzję, że komórki regeneracyjne muszą być chronione przez dodatkowe mechanizmy, dzięki którym nie podlegają one procesom degeneracyjnym.

Zmiany degeneracyjne na poziomie ultrastrukturalnym w grupie **Ni 1:0** krewetek *N. davidi* obserwowano sporadycznie, w pojedynczych komórkach, gdzie przejawiały się poprzez obecność: skróconych mikrokosmków, zdegenerowanych mitochondriów, zwakuolizowanych obszarów cytoplazmy (zmian nekrotycznych), autofagosomów (autofagia). Barwienie odczynnikiem LysoTracker, użyte w celu detekcji silnie kwaśnych struktur (w tym autofagosomów), także wykazało obecność pojedynczych sygnałów, mniej licznych w porównaniu z grupą **Ni 2:0**. Nie obserwowano apoptozy. Tygodniowa ekspozycja na nikiel (**grupa Ni 1:0**) nie wpłynęła także na gromadzenie materiałów zapasowych w komórkach trawiennych (komórki D) jelita. Oddziaływanie to zaobserwowano w komórkach B wątrobotrzustki, gdzie gromadzone materiały zapasowe charakteru lipidowego oraz polisacharydowego uległy znacznej redukcji, ponadto w porównaniu do kontroli, komórki B zaczęły gromadzić także ciała białkowe (pozytywny wynik barwienia BPB).

Po dwóch tygodniach ekspozycji krewetek na nikiel (**grupa Ni 2:0**) zwierzęta w dalszym ciągu gromadzą metal, natomiast w niższym stężeniu w porównaniu z grupą **Ni 1:0**. Obserwowane niższe wartości tego parametru tłumaczyć można prawdopodobną adaptacją krewetek do zanieczyszczonego środowiska i aktywacją procesów detoksykacyjnych. Procesy takie mogą mieć na celu między innymi usunięcie uszkodzonych organelli i struktur komórkowych (np. autofagia), czy wręcz usuwanie z tkanek i narządów całych uszkodzonych komórek (np. apoptoza, nekroza). Procesy te będą wtedy mechanizmami chroniącymi narządy przed powstaniem stanu zapalnego (Broker i inni 2005, Tettamanti i inni 2011, Chandra i Tang 2009, Franzetti i inni 2012, Wilczek i inni 2014). Analiza ultrastrukturalna wykazała więc stopniowy wzrost intensywności oraz częstotliwości obserwowanych zmian degeneracyjnych w jelicie środkowym (komórki D jelita oraz komórki F, B, R wątrobotrzustki). W komórkach trawiennych (komórki D) jelita występują zniszczone mitochondria (rozdęte, pozbawione grzebieni), czy rozdęte cysterny szorstkiego i gładkiego retikulum endoplazmatycznego. Utracie ciągłości podlegają błony apikalne niektórych komórek, co skutkuje przedostawaniem się cytoplazmy do światła jelita. W obrębie komórek tych obserwuje się wzrost intensywności procesu autofagii oraz nekrozy w porównaniu do grupy **Ni 1:0**. W obrębie komórek F wątrobotrzustki dwutygodniowa ekspozycja na nikiel (**grupa Ni 2:0**) wywołała silne skrócenie mikrokosmków, degenerację

mitochondriów, rozcięcie cystern retikulum endoplazmatycznego, zwiększenie liczby autofagosomów oraz obszarów zwakuolizowanych. W obrębie cytoplazmy komórek B i R wątrobotrzustki obserwowano obszary zwakuolizowane oraz rozdęte cysterny retikulum endoplazmatycznego. W grupie Ni 2:0 jelita środkowego *N. davidi* nie zaobserwowano apoptozy na poziomie ultrastrukturalnym. Tak więc analiza ultrastrukturalna wyraźnie wykazała wzrost intensywności procesów degeneracyjnych wraz z wydłużającym się okresem narażenia zwierząt na działanie stresora.

Jak wspomniano, obecność stresorów w środowisku życia zwierząt może się wiązać z pojawieniem zmian na poziomie ultrastrukturalnym/komórkowym tkanek. Wpływ na to może mieć między innymi rodzaj stresora oraz długość trwania bodźca. Podobne obserwacje dotyczyły także innych zwierząt bezkręgowych poddawanych ekspozycji na działanie metali ciężkich (Cebollero i inni 2012, Bednarska i inni 2016, Rost-Roszkowska i inni 2021b, 2022, Poprawa i inni 2022) w tym skorupiaków słodkowodnych (Schuwerack i Lewis 2003, Chiodi Boudet i inni 2015, Wu i inni 2015, Naboka i inni 2018) oraz skorupiaków morskich (Vogt i Qunitio 1994, Manisseri i Menon 1995, Zhu i inni 2018, Vogt 2020, Barathkumar i inni 2022). Wiele badań wykazało zmiany histologiczne/histopatologiczne w jelicie środkowym owadów, które to wywołane były obecnością metali w środowisku życia zwierząt. Zhang i inni (2001) opisali silną wakuolizację komórek nabłonka jelita środkowego *Blattella germanica* (Blattodea) traktowanych metalami ciężkimi (Hg, Pb i Cr). Al-Dhafar i Sharaby (2012) wykazali silną degenerację, wakuolizację i obkurczanie komórek nabłonka jelita środkowego larw *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera) pod wpływem cynku. Podobne obserwacje zostały opisane dla *Blaps polychresta* (Coleoptera) traktowanych nikiem (El-Ashram 2021), czy *Aedes aegypti* (Diptera) traktowanych cynkiem (Banumathi i inni 2017). Badania nad wpływem kadmu na zmiany degeneracyjne zachodzące w nabłonku jelita środkowego prowadzone były także na glebowych stawonogach, np. *Lithobius forficatus* (Myriapoda) (Rost-Roszkowska i inni 2020b, 2021b, 2022, Poprawa i inni 2022).

Prowadzi się także badania nad zmianami degeneracyjnymi w układzie pokarmowym słodkowodnych skorupiaków indukowanymi obecnością metali w szczególności kadmu. Ekspozycja na kadm (Cd) słodkowodnej krewetki *Palaemon argentinus* spowodowała zanik i nekrozę nabłonka cewek wątrobotrzustki (Chiodi

Boudet i inni 2015). Podobny efekt działania kadmu zaobserwowano u słodkowodnego kraba *Sinopotamon henanense*, gdzie zaobserwowano, że ekspozycja na kadm przyczyniła się do powstania dużych obszarów nekrotycznych w komórkach jelita i wątrobotrzustki, ponadto komórki oddzieliły się od blaszki podstawnej nabłonka (Wu i inni 2015). Ekspozycja na kadm (Cd) słodkowodnego kraba *Potamonautes warreni* wiązała się z gromadzeniem krystalicznych osadów metalu przy blaszce podstawnej oraz u podstawy mikrokosmków, a sam kadm był obecny w cytoplazmie, pęcherzykach Golgiego i granulkach fosforanu wapnia komórek R. Ekspozycja na wyższe stężenia wiązała się z zwiększeniem osadzania kryształów wzdłuż błon komórkowych, spowodowała zmniejszenie zapasów lipidów, nabrzmienie jąder komórkowych z pęcherzykowatymi jąderkami, zwiększenie aktywności RER w komórkach R. Natomiast ostra ekspozycja spowodowała dysocjację komórek, w tym nekrozę mitochondriów, rozpuszczenie pól glikogenu i rozerwanie błon komórkowych (Schuwerack i Lewis 2003). Badania nad ekspozycją słodkowodnego raka *Procambarus virginalis* na nikiel (Ni), ołów (Pb) i mangan (Mn) wykazały, że spośród badanych metali ciężkich jony niklu najbardziej negatywnie wpływały na wskaźniki wagowe i śmiertelność skorupiaków. Metale ciężkie wpłynęły na wielkość płatów wątrobotrzustki oraz zmniejszyły średnicę światła gruczołu szczególnie przy ekspozycji na mangan i ołów (Naboka i inni 2018).

Wśród morskich skorupiaków badania prowadzono między innymi na kadmie (Cd), miedzi (Cu), ołowiu (Pb), rtęci (Hg), żelazie (Fe). Manisseri i Menon (1995) eksponowali morską krewetkę *Metapenaeus dobsoni* na miedź (Cu) i wykazali uszkodzenia ER, mitochondriów, blaszki podstawnej i jądra w wątrobotrzustce. Andersen i Baatrup (1988) z wykorzystaniem radioaktywnej rtęci ²³⁰Hg wysłedzili przenoszony przez wodę metal u krewetki brunatnej *Crangon crangon* i wykryli go głównie w gęstych elektronowo ziarnistościach komórek R oraz w znacznie mniejszym stopniu w ziarnistościach komórek F. W pobliżu jąder komórkowych rtęć była zamknięta w lizosomopodobnych organellach. Eksponowanie kraba błotnego *Scylla paramamosain* na kadm wywoływało zmiany w obrębie jąder i mitochondriów w komórkach wątrobotrzustki. Chromatyna stawała się coraz bardziej skondensowana i marginalizowana. Liczba mitochondriów zmniejszyła się, a pozostałe mitochondria były rozmyte i miały prawie nie do odróżnienia grzebienie (Zhu i inni 2018). Natomiast

zmiany nekrotyczne w wątrobotrzustce obserwowano u młodych osobników *Scylla serrata* wystawionych na działanie uranu (Barathkumar i inni 2022). Krewetka tygrysia *Penaeus monodon* eksponowana na Cd nie wykazywała ziarnistości detoksykacyjnych w wątrobotrzustce, ale widoczne były wyraźne objawy cytopatologiczne, zarówno pod względem obserwowanej śmiertelności, jak i ultrastruktury komórek. Po 10 dniach zaobserwowano szczególnie wyraźne dezorganizacje w proksymalnych częściach cewek i przewodów zbiorczych. Wszystkie typy komórek wykazywały liczne zmiany degeneracyjne w organellach komórkowych. Najbardziej rzucającymi się w oczy objawami w komórkach R było rozjaśnienie cytoplazmy i wyraźna redukcja kropeł lipidów, RER i wolnych rybosomów. W komórkach F aparaty Golgiego były zwakuolizowane. Doszło także do zmiany gęstości elektronowej składnika włóknistego jąderka, które w próbie kontrolnej było jednorodnie gęste elektronowo (Vogt 2020). *Penaeus monodon* eksponowany na miedź, ołów, rtęć i żelazo nie wykazał żadnych cytopatologii (Vogt 2020). Jednak gęste elektronowo ziarnistości detoksykacyjne powstały w komórkach R po ekspozycji na miedź oraz w mniejszych ilościach, po ekspozycji na Hg. Natomiast po ekspozycji na Fe i Pb nie pojawiły się opisywane zmiany (Vogt i Quintio 1994).

Analiza histochemiczna jelita i wątrobotrzustki *N. davidi* poddanych ekspozycji na nikiel w porównaniu z grupą kontrolną wykazała brak materiałów zapasowych w komórkach trawiennych (komórki D) jelita, natomiast w wątrobotrzustce w komórkach B gromadzone materiały zapasowe PAS pozytywne (polisacharydy) i Sudan Czarny B pozytywne (lipidy) uległy znacznej redukcji. Redukcja materiałów zapasowych pod wpływem pojawiającego się stresora z jednoczesną aktywacją procesu autofagii uważane są za procesy dostarczające energii wykorzystywanej na uruchamianie różnych procesów detoksykacyjnych w narządach (Fontanetti i inni 2006, Liu i Czaja 2013, Lipovšek i inni 2014, 2018, Lipovšek i Novak 2016, Rost-Roszkowska i inni 2019, Włodarczyk i inni 2019). Lipidy są na przykład metabolizowane w trakcie lipofagii (autofagia selektywna) lub w trakcie lipolizy, a w rezultacie będą wpływały na fizjologię komórek (Singh i inni 2009, Zechner i inni 2017). W procesie autofagii ma miejsce degradacja różnych organelli komórkowych i innych składników cytoplazmatycznych, poprzez otoczenie ich strukturą błoniastą, z wytworzeniem autofagosomu, następnie autolizosomu i ciała resztkowego. Może także dochodzić do

trawienia materiałów zapasowych, będących źródłem energii dla licznych przemian biochemicznych w komórce. Tak więc autofagia będzie procesem chroniącym komórki przed śmiercią (Levine i Klionsky 2004, Kourtis i Tavernarakis 2009, Klionsky i inni 2016, 2021). Dochodzi do zneutralizowania uszkodzonych organelli wewnątrz autofagosomów, a nawet do ich strawienia (powstają ciała resztkowe), w wyniku czego nie dochodzi do aktywacji degeneracji. W jelicie środkowym wielu bezkręgowców opisano udział autofagii w utrzymaniu homeostazy tkanek i narządów (Lipovšek i inni 2014, 2018, Wilczek i inni 2014, Lipovšek i Novak 2016, Włodarczyk i inni 2019b, Rost-Roszkowska i inni 2021a, 2022). Jednak gdy zbyt dużo struktur autofagicznych jest nagromadzonych na terenie cytoplazmy komórek, dochodzi do aktywacji śmierci komórkowej. W tym przypadku intensywna autofagia wywołuje proces degeneracyjny (Levine i Klionsky 2004; Giusti i inni 2007; Rost-Roszkowska i inni 2010b, 2015, 2018, 2019; Franzetti i inni 2012).

Wpływ na ultrastrukturę komórek, w tym na procesy degeneracyjne może mieć rodzaj działającego na organizm stresora (np. fizyczny, chemiczny), a także czas jego działania. W pracy Włodarczyk i inni (2017) autorzy zaobserwowali, że w przypadku 7 dniowego głodzenia osobników *N. davidi* nie obserwuje się znaczących zmian w obrębie ultrastruktury komórek jelita środkowego. Obecność długotrwałego stresora w postaci 14-to dniowego głodzenia krewetek *N. davidi* aktywuje procesy degeneracyjne, a także zwiększenie odsetka zdepolaryzowanych mitochondriów oraz redukcję materiałów zapasowych. Odnotowano więc intensyfikację procesu autofagii i apoptozy w tym układzie eksperymentalnym, zwłaszcza przy dłuższym głodzeniu (Włodarczyk i inni 2019b). Ekspozycja krewetek *N. davidi* na pestycyd – dimetoat, także przyczyniła się do pojawienia się zmian w obrębie jelita środkowego. Ilość zmian degeneracyjnych, podobnie jak w niniejszych badaniach, zwiększała się wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji na pestycyd. Analiza ilościowa procesu nekrozy wykazała, że w jelicie proces ten występuje częściej niż w wątrobotrzustce. Natomiast autofagię obserwowano na podobnym poziomie w jelicie i wątrobotrzustce (Ostróžka i inni 2022). W badaniach nad wpływem kadmu na ultrastrukturę komórek jelita środkowego glebowych bezkręgowców także wykazano wzrost intensywności procesów degeneracyjnych, czy zmian w ilości materiałów zapasowych skorelowane z

autofagią wraz z wydłużającym się czasem trwania narażenia zwierzęcia na działanie stresora (Rost-Roszkowska i inni 2020ab, 2021, 2022).

Analiza ilościowa wpływu niklu na proces śmierci komórkowej u *N. davidi* przy użyciu Aneksyny V wykazała, że niezależnie od czasu ekspozycji więcej komórek apoptotycznych (zarówno wczesno-, jak i późnoapoptotycznych) obserwuje się w wątrobotrzustce, natomiast w jelicie różnice te nie są istotne statystycznie. Z kolei ilość komórek ze zmianami nekrotycznymi w obu analizowanych tkankach była na podobnym poziomie (w wątrobotrzustce nekroza zachodzi nieco intensywniej). Wraz z wydłużającym się czasem ekspozycji zwierząt na działanie metalu, zwiększał się procent komórek zarówno apoptotycznych, jak i nekrotycznych w nabłonku wątrobotrzustki, przy czym szczególny wzrost % komórek późnoapoptycznych zaobserwowano w wątrobotrzustce zwierząt z grupy **Ni 2:0**. Analiza ilościowa śmierci komórkowej z udziałem aktywnych kaspaz wykazała, że w wątrobotrzustce wraz z wydłużającym się czasem ekspozycji zwierząt na działanie niklu (**Ni 1:0**, **Ni 2:0**) spada odsetek komórek żywych kaspazo-pozytywnych oraz martwych kaspazo-negatywnych, ale wzrasta odsetek komórek martwych kaspazo-pozytywnych (**Ni 1:0** i **Ni 2:0**), co świadczy o aktywacji apoptozy wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji zwierząt na działanie ksenobiotyku. W przypadku jelita *N. davidi* analiza wykazała, że główny udział w procesach degeneracyjnych ma nekroza, co potwierdzone zostało wzrostem liczby komórek martwych kaspazo-negatywnych wraz z wydłużającym się czasem ekspozycji krewetek na działanie niklu. W przypadku tego narządu analiza wykazała także nieznaczny wzrost liczby komórek martwych kaspazo-pozytywnych.

Nekroza jest ogólnie charakteryzowana jako niekontrolowana i niezależna od energii śmierć komórki, pojawiająca się na skutek ciężkiego urazu, bądź nagłego szoku (promieniowanie, ciepło, chemikalia, niedotlenienie itp.), na tyle poważnego, że komórka nie jest w stanie funkcjonować i reaguje obrzękiem (proces znany jako onkoza), pojawiającym się ponieważ komórka nie utrzymuje homeostazy ze swoim środowiskiem. Proces ten często obejmuje regulację różnych białek i związków prozapalnych, takich jak czynnik jądrowy- κ B, co powoduje pęknięcie błony komórkowej, powodując rozlanie zawartości komórki do otaczających obszarów, a to skutkuje kaskadą zapalenia i uszkodzeniem tkanek (D'Arcy 2019).

W przeciwieństwie do nekrozy (martwicy), apoptoza jest wysoce regulowanym i kontrolowanym procesem, który zapewnia korzyści w czasie cyklu życia organizmu (Menze i inni 2010). Zmiany apoptotyczne obejmują kurczenie się komórek, fragmentację jądra komórkowego, kondensację chromatyny, fragmentacja chromosomalnego DNA i globalny rozpad RNA (Zhang i inni 2018). Istnieją dwie główne ścieżki, dzięki którym komórki mogą ulegać śmierci apoptotycznej. Pierwsza jest aktywowana przez sygnały wewnątrzkomórkowe generowane, gdy komórki pod wpływem stresora aktywują białka z rodziny Bcl-2. Druga ścieżka apoptozy jest aktywowana przez zewnątrzkomórkowe wiązanie ligandów do receptorów śmierci na powierzchni komórki (TNF, *Tumor Necrosis Factor*), co prowadzi do wytwarzania kompleksu sygnalizacyjnego wywołującego śmierć. W ścieżce wewnętrznej śmierć komórki następuje z powodu stresu komórkowego, podczas gdy w ścieżce zewnętrznej komórka "zabija się" z powodu otrzymanych sygnałów z innych komórek. Oba szlaki indukują jednak śmierć poprzez aktywację kaspaz (proteaz cysteinowych) lub enzymów rozkładających białka (Genchi i inni 2020a). Jony niklu umożliwiają uwolnienie Cyt c z mitochondriów w cytozolu, gdzie Cyt C rozszczepia prokaspazę-9 z aktywacją kaspazy-9, która z kolei aktywuje kaspazy 3, 6 i 7. Na powierzchni komórki jony Ni promują interakcję między Fas (pierwszy sygnał apoptotyczny) a FasL (ligand Fas) z utworzeniem indukującego śmierć kompleksu sygnalizacyjnego, który zawiera FADD oraz prokaspazę-8 i -10. Tak więc stopniowo dochodzi do aktywacji kolejnych kaspaz (8, 10, 3, 6 i 7) (Genchi i inni 2020a). Analiza ilościowa z wykorzystaniem MUSE® Multicaspase Kit pozwoliła na ocenę liczby komórek kaspazo-pozytywnych lub kaspazo-negatywnych, a co za tym idzie określenie który z procesów, apoptoza czy nekroza, jest w głównej mierze odpowiedzialny za procesy degeneracyjne wywołane obecnością niklu w środowisku życia zwierząt. Jak widać wątrobotrzustka wydaje się być narządem bardziej wrażliwym na działanie ksenobiotyku. Szybciej pojawiają się w niej zmiany degeneracyjne nabłonka, zarówno apoptoza, jak i nekroza, a to może świadczyć o tym, że w jelicie będą istniały jakieś dodatkowe mechanizmy ochronne. Porównując z autofagią, która zachodzi w wątrobotrzustce intensywniej niż w jelicie, można przypuszczać, że w jelicie będą musiały być uruchamiane dodatkowe mechanizmy chroniące nabłonek przed aktywacją śmierci komórkowej. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że zbyt duża liczba struktur autofagicznych (zwłaszcza ciał

resztkowych) będzie aktywowała śmierć komórkową (Lipovšek i Novak 2016; Włodarczyk i inni 2019b, Rost-Roszkowska i inni 2021a, 2022), można wywnioskować, że w wątrobotrzustce w wyniku intensywniej zachodzącej autofagii, doszło szybciej do aktywacji apoptozy i nekrozy niż w przypadku jelita *N. davidi*.

W aktywacji procesów śmierci komórkowej (apoptozy, nekrozy) ważną rolę odgrywa stres oksydacyjny, pojawiający się na skutek wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu. ROS (z ang. *reactive oxygen species*) czyli reaktywne formy tlenu są aktywnymi chemicznie cząsteczkami powstającymi w przeważającej mierze w enzymatycznych lub nieenzymatycznych reakcjach metabolizmu komórkowego. W ramach reakcji enzymatycznych, wyróżnić można łańcuch oddechowy, fagocytozę, syntezę prostaglandyn i układ cytochromu P-450. Natomiast w przypadku reakcji nieenzymatycznych, ROS mogą być wytwarzane w reakcjach tlenu ze związkami organicznymi oraz w ramach odpowiedzi komórek na niekorzystne warunki środowiskowe, jak np. promieniowanie nadfioletowe czy jonizujące, bądź obecność toksycznych związków chemicznych (Lobo i inni 2010). Reaktywne formy tlenu pełnią istotne funkcje fizjologiczne poprzez branie udziału w szlakach sygnalizacyjnych wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych zaangażowanych w procesy proliferacji komórek, ich różnicowania, wzrostu, starzenia, czy apoptozy komórek (Ray i inni 2012, Ye i inni 2015, Zuo i inni 2015). Dlatego też nie stanowią zagrożenia w prawidłowym funkcjonowaniu komórek tak długo, jak utrzymywana będzie w nich tzw. homeostaza redoksowa, czyli stan równowagi pomiędzy ilością reaktywnych form tlenu a stężeniem substancji przeciwutleniających. Za kontrolowanie poziomu ROS odpowiedzialny jest antyoksydacyjny system obronny organizmu. W sytuacji, gdzie nadmiar ROS nie zostanie zneutralizowany, w obrębie komórek może wytworzyć się stres oksydacyjny, który z kolei może powodować oksydacyjne uszkodzenie wielu cząsteczek, jak lipidów, białek i kwasów nukleinowych (Rahman i inni 2012, Schieber i Chandel 2014, Sies 2015).

W wyniku ekspozycji na nikiel krewetek *N. davidi* zaobserwowano stopniowy wzrost poziomu reaktywnych form tlenu w obu analizowanych narządach w stosunku do wydłużającego się czasu ekspozycji zwierząt na nikiel. Porównując jelito i wątrobotrzustkę można zauważyć, że wzrost ten był silniejszy w przypadku tego drugiego narządu, co potwierdzałoby intensywniej zachodzące w wątrobotrzustce

procesy degeneracyjne. Chociaż molekularne mechanizmy toksyczności indukowanej nikiem nie są jeszcze jasne, uważa się, że ważną rolę odgrywa stres oksydacyjny i dysfunkcje mitochondrialne. Może wystąpić uszkodzenie mitochondriów wywołane przez nikiel, z powodu upośledzenia potencjału błony mitochondrialnej, zmniejszenia stężenia mitochondrialnego ATP i destrukcji DNA mitochondriów (Genchi i inni 2020a). Z kolei dysfunkcje mitochondriów mogą zakłócać funkcjonowanie łańcucha oddechowego i zwiększyć poziom ROS w komórkach (Xu i inni 2015). Apoptoza indukowana siarczanem niklu została opisana w komórkach Leydiga jąder szczura poprzez aktywację mitochondriów zależnych od ROS (*activating ROS-dependent mitochondria*). Wyniki badań wykazały, że siarczan niklu indukował wytwarzanie ROS z deformacją jądra i apoptozą w komórkach Leydiga (Zou i inni 2017). Z kolei Kong i inni (2016) wykazali, że nanocząstki niklu wywołują efekt toksyczny w ujęciu reprodukcyjnym u samic szczurów. Badacze eksponowali zwierzęta na nikiel drogą pokarmową i jako wyznacznik wybrali następujące parametry: ROS, enzymy utleniające, przeciwutleniające i czynniki związane z apoptozą komórek. Nanocząstki niklu zmniejszyły istotnie aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) oraz zwiększyły poziom ROS, dialdehydu malonowego (MDA, marker peroksydacji lipidów) i tlenku azotu (NO) w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, autorzy wykazali pęcznienie mitochondriów i zanik grzebieni w mitochondriach jajników eksponowanych szczurów. Ekspresje mRNA kaspaz (proteazy cysteinowe) i ekspresja białek Cyt C, Bax i Bid w jajnikach istotnie wzrosły, podczas gdy ekspresja białka Bcl-2 drastycznie spadła (Kong i inni 2016). Wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, a także zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych (np. dysmutazy ponadtlenkowe, katalaza, peroksydaza) wywołane obecnością niklu w środowisku życia zwierząt bezkręgowych opisano głównie u owadów, między innymi u *Acheta domesticus* (Orthoptera) (Deska 2020), *Blaps polychresta* (Coleoptera) (El-Ashram i inni 2021), czy *Spodoptera litura* (Lepidoptera) (Sun i inni 2008). Podwyższenie poziomu ROS w wyniku różnych stresorów zaobserwowano także między innymi u krewetek *N. davidi* poddanych stresowi w postaci głodzenia (Włodarczyk i inni 2019b), krewetek *N. davidi* eksponowanych na pestycyd – dimetoat (Ostróżka i inni 2022), w wyniku ekspozycji na kadm u wija z gatunku *Lithobius forficatus* (Rost – Roszkowska i

inni 2020), gluten u wija *Telodeinopus aoutii* (Błaszczuk 2022), czy *Pardosa cupreus* (Opisthothelae) pod wpływem kadmu (Wilczek i inni 2004).

U słodkowodnych skorupiaków także analizowano zmiany poziomu ROS oraz zmiany poziomu enzymów detoksykacyjnych wywołane obecnością stresorów. Ekspozycja na kadm słodkowodnej krewetki *Macrobrachium nipponense* przyczyniła się do wzrostu ROS, stresu oksydacyjnego i apoptozy w wątrobotrzustce (Wang i inni 2021). Osobniki słodkowodnego raka luzijańskiego *Procambarus clarkii* eksponowano na kadm, co w rezultacie wiązało się z podwyższeniem poziomu ROS (Wei i inni 2020). Ekspozycja na kadm i miedź u tego zwierzęcia wywołała wzrost poziomu enzymów antyoksydacyjnych w wątrobotrzustce. Zawartość/aktywność MDA, GSH, CZ-SOD i CAT była znacząco zwiększona w grupie stymulowanej Cu^{2+} . Tymczasem w grupie stymulowanej Cd^{2+} GPx, MDA, GSH, CZ-SOD i CAT były istotnie podwyższone. Dodatkowo metale indukowały uszkodzenia w wątrobotrzustce (Wang i inni 2022). Natomiast stresor w postaci amoniaku i temperatury również wiązał się z podwyższeniem poziomu ROS u tego gatunku oraz wpływał na poziom SOD, POD, GPX i CAT. Wyniki eksperymentu wskazują, że wpływ amoniaku (lub temperatury) może być modyfikowany przez temperaturę (lub amoniak). Połączone wpływy amoniaku i temperatury są bardziej wyraźne niż każdy z tych dwóch czynników osobno. Stres oksydacyjny jest wzmacniany przez połączone wpływy amoniaku i temperatury, co prowadzi do nadmiernej produkcji ROS. System enzymów antyoksydacyjnych jest aktywowany w celu usunięcia nadmiaru ROS - różna odpowiedź enzymatyczna w zależności od grupy eksperymentalnej (Zhang i inni 2023).

Przeprowadzono badania na czterech gatunkach krabów – *Cardiosoma armatum*, *Goniopsis pelli*, *Callinectes amnicola*, *Portunus validus* egzystujących w ich naturalnym środowisku życia i zbadano antyoksydacyjny mechanizm obronny w odniesieniu do stężenia metali ciężkich w tkankach krabów. Wśród mierzonych metali (kadm, ołów, kobalt, miedź, cynk) najwyższe gromadzone stężenie przypadło na kadm. U wszystkich gatunków zaobserwowano wysoki poziom biomarkerów (antyoksydantów). Zaobserwowano, że *C. armatum* miał podwyższony poziom dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, glutationotransferazy, zredukowanego glutationu i peroksydazy glutationowej w porównaniu z innymi gatunkami, przy czym *C. amnicola* odnotowała najniższe stężenie biomarkerów (Lawal-Are i inni 2019).

Natomiast niemetaliczny stresor w postaci mikroplastiku u raka błotnego *Scylla serrata* indukował stres oksydacyjny w wątrobotrzustce i aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Yang i inni 2023). Także obecność nanocząsteczek (średnica poniżej 100 nm) przyczynia się do wzrostu zmian degeneracyjnych u organizmów wodnych poprzez wzrost ROS (Singh i inni 2023).

Strategie obrony antyoksydacyjnej stosowane przez wodne skorupiaki (Decapoda) różnią się w zależności od gatunku. Enzymy przeciwutleniające mogą być indukowane lub hamowane przez metale w zależności od gatunku, stężenia i czasu ekspozycji. Niektóre enzymy przeciwutleniające, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, zwiększają swoją aktywność przy niskich poziomach metali i krótszej ekspozycji, ale ich aktywność jest hamowana przy wyższych stężeniach metali i dłuższym czasie ekspozycji (Frías-Espericueta i inni 2022).

W przypadku osobników *N. davidi* poddanych ekspozycji na nikiel można wywnioskować, że wzrost poziomu ROS w komórkach obu narządów miał wpływ na aktywację procesów degeneracyjnych.

W syntezę ROS włączone są mitochondria. Pojawiające się w nich zmiany będą świadczyły zarówno o intensywnej syntezie ROS, ale także rozpoczęciu procesów śmierci komórkowej (Włodarczyk i inni 2017, Villalpando-Rodriguez i Gibson, 2021). Wpływ metali ciężkich na aktywność mitochondrialną w wielu narządach i tkankach zwierząt został opisany jako aktywujący degenerację tych organelli i często prowadzący do zmian w ich potencjale błonowym (Meyer i inni 1991, Ahearn i inni 2004, Júdová 2006, Sanni i inni 2008, Genchi i inni 2020b, Rost-Roszkowska i inni 2021ab).

Mitochondria są głównym miejscem syntezy ATP w komórkach, ale uczestniczą także w wielu procesach metabolicznych komórek związanych z ich proliferacją, wzrostem, różnicowaniem, czy degeneracją. Liczne badania wykazały, że większa liczba tych organelli wiąże się z większym zapotrzebowaniem na energię w komórce (De Paz 1986, Moyes i inni 1998). W wyniku stresu oksydacyjnego dochodzi do zmian w przepuszczalności błon tych organelli, a więc do zmiany w ich potencjale (potencjał ładunków elektrycznych wzdłuż wewnętrznej błony mitochondrialnej). Zmiany w potencjale, a więc przepływ elektronów/protonów ma miejsce, gdy istnieje zapotrzebowanie na syntezę ATP (Hames i Hooper 2002, Rupniewska i Bojarska-Junak 2004). Potencjał transbłonowy mitochondrium jest więc wywołany rozproszeniem

gradientu protonów. Obniżony potencjał błonowy mitochondriów może świadczyć o zaburzeniu funkcji tych organelli (Wilczek 2008).

Stresory mogą wpływać na zmiany ultrastrukturalne mitochondriów (Kalashnikova 1979, Rost-Roszkowska i inni 2012, Cano i inni 2014, Karpeta-Kaczmarek i inni 2016a). Metale ciężkie zmieniają przepuszczalność błony mitochondrialnej, generują zwiększoną ilość reaktywnych form tlenu (ROS), zmieniając strukturę enzymu klirensowego ROS hamując jego aktywność. Ze względu na szybkie i wzmożone wytwarzanie ROS oraz obniżony stan enzymów antyoksydacyjnych, w narażonych organizmach gromadzą się różne zanieczyszczenia środowiskowe, co prowadzi do indukcji stresu oksydacyjnego w mitochondriach. Zwiększona generacja ROS powoduje również uszkodzenie mitochondrialnego łańcucha oddechowego, rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej, zaburzenia syntezy ATP i apoptozę mitochondriów (Sun i inni 2022).

Podczas degeneracji mitochondria mogą być spuchnięte lub skurczone, ich grzebienie mogą się skrócić i ostatecznie zniknąć. Macierz mitochondrialna staje się elektronowo gęsta lub elektronowo jasna (Greene i inni 2003, Karpeta-Kaczmarek i inni 2016a, Rost-Roszkowska i inni 2015). Zdegenerowane mitochondria mogą być zneutralizowane w selektywnym procesie autofagii, zwanym mitofagią (Youle i Narendra 2001, Narendra i inni 2008, Rost-Roszkowska i inni 2015, Karpeta-Kaczmarek i inni 2016a). Zmiany w ultrastrukturze mitochondriów, w tym ich grzebieni razem ze zmianami potencjału błonowego mitochondriów mogą być związane z aktywacją śmierci komórkowej, m.in. apoptozy (Sonakowska i inni 2016). Wydzielanie cytochromu c i innych kofaktorów z wewnętrznej błony mitochondrialnej jest związane z rekonstrukcją grzebieni mitochondrialnych (Frezza i inni 2006). Natomiast jak wspomniano wcześniej, uwolniony z mitochondriów Cyt c do cytozolu rozszczepia prokaspazę-9, która z kolei przyczynia się do aktywacji apoptozy (Genchi i inni 2020a).

Mitochondria odgrywają kluczową rolę zarówno w apoptozie, jak i nekrozie poprzez otwarcie mega-kanałów (MPTP z ang. *mitochondrial permeability transition pore*). Otwarcie MPTP powoduje pęcznienie i rozprzęganie mitochondriów, co prowadzi do nekrozy. Przejściowe otwarcie MPTP może być również zaangażowane w apoptozę, początkowo powodując obrzęk i pęknięcie błony zewnętrznej skutkując

uwolnieniem cytochromu c (cyt c), który następnie aktywuje kaskadę kaspazy i wprawia w ruch apoptozę. Późniejsze zamknięcie MPTP pozwala na utrzymanie poziomów ATP, zapewniając, że śmierć komórki pozostaje apoptotyczna, a nie nekrotyczna (Halestrap i inni 2000).

Wzrost poziomu zdegenerowanych mitochondriów na skutek ekspozycji na stresor zaobserwowano między innymi u: krewetek *N. davidi* poddanych stresowi w postaci głodzenia (Włodarczyk i inni 2019b), krewetek *N. davidi* ekspozycywnych na pestycyd – dimetoat (Ostróżka i inni 2022), w wyniku ekspozycji na kadm u wija z gatunku *Lithobius forficatus* (Rost – Roszkowska i inni 2021), gluten u wija *Telodeinopus aoutii* (Błaszczuk 2022), *Pardosa cupreus* (Opisthothelae) pod wpływem kadmu (Wilczek i inni 2004). Zwiększenie odsetka zdepolaryzowanych mitochondriów zaobserwowano także w: jelicie środkowym muszki owocówki (*Drosophila melanogaster*) w wyniku spożywania nanocząstek bezpostaciowej krzemionki (Pandey i inni 2013), czy u rozwielitki wielkiej (*Daphnia magna*) ekspozycywnych na fluoksetynę (lek z grupy antydepresantów) (Över i inni 2020).

Ekspozycja krewetek z gatunku *N. davidi* na nikiel wpływała na ultrastrukturę mitochondriów oraz ich potencjał błonowy. Uzyskane wyniki różnią się w zależności od analizowanej tkanki. Obserwowane zmiany w większym stopniu obserwowano w obrębie jelita, natomiast w niewielkim w wątrobotrzustce.

W obrębie komórek D jelita po tygodniowej ekspozycji (grupa **Ni 1:0**) obserwowano wiele komórek ze zdegenerowanymi mitochondriami, w porównaniu do kontroli, gdzie takie mitochondria występują sporadycznie. W grupie **Ni 2:0** obserwowano zniszczone, rozdęte mitochondria bez grzebieni. Uzyskane wyniki potwierdza analiza ilościowa potencjału mitochondrialnego, gdzie w grupie **Ni 1:0** odnotowano wzrost ilości komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami. Natomiast po dwóch tygodniach ekspozycji (**Ni 2:0**) zaobserwowano dwukrotny wzrost tej wartości w porównaniu do kontroli.

W wątrobotrzustce ultrastrukturalnie w kontroli dużo mitochondriów obserwuje się w komórkach B. Tydzień ekspozycji na nikiel (grupa **Ni 1:0**) spowodowała pojawienie się pojedynczych zmian w analizowanych organellach, natomiast przy wydłużającej się ekspozycji na nikiel do 2 tygodni (**Ni 2:0**) w obrębie komórek F obserwowano liczne zdegenerowane mitochondria. W ujęciu ilościowym poziomu

komórek ze zdegenerowanymi mitochondriami, największy wzrost tego parametru zaobserwowano w grupie **Ni 2:0**, natomiast w grupie **Ni 1:0** wzrost parametru w odniesieniu do kontroli nie był istotny statystycznie.

W trakcie niniejszych badań dokonano także analizy stężenia ATP oraz wskaźnika ADP/ATP. Wraz z wydłużającym się czasem ekspozycji na nikiel wzrastała wartość wskaźnika ADP/ATP w obu analizowanych narządach. Wzrost wskaźnika ADP/ATP wskazuje na spadek stężenia ATP i wzrost stężenia ADP, wskazując na możliwość zahamowania wzrostu i/lub nasilenia procesów degeneracyjnych w komórce (Rost-Roszkowska i inni 2020b). Stężenie ATP było znacznie zmniejszone w komórkach nabłonka jelita środkowego, szczególnie w grupie **Ni 2:0**. Proporcjonalny do czasu ekspozycji spadek stężenia ATP zaobserwowano w wątrobotrzustce. Fizjologiczną różnicą w przebiegu apoptozy i nekrozy jest poziom wewnątrzkomórkowego ATP. Wyczerpanie ATP indukuje nekrozę, co wskazuje, że nekroza jest procesem niezależnym od ATP, podczas gdy apoptoza jest zależna od ATP. Wysokie poziomy ATP kierują komórkę na drogę apoptozy, podczas gdy niskie poziomy ATP sprzyjają nekrozie (Eguchi i inni 1997). Uzyskane dane wskazują, że ze względu na indukowaną obecnością niklu w środowisku zmniejszone stężenie ATP mogło stanowić przyczynę obserwowanej nekrozy jako głównego obserwowanego rodzaju śmierci komórkowej.

5.4. Zmiany w jelicie i wątrobotrzustce po przywróceniu *N. davidi* do czystej wody po uprzedniej ekspozycji na nikiel

Wiedza o właściwościach toksykokinetycznych, gdzie toksykokinetyka jest definiowana jako przenoszenie toksycznych substancji / związków chemicznych między organizmem a jego środowiskiem, jest kluczowa dla zrozumienia jego kumulacji w organizmie i jest pierwszym krokiem w przewidywaniu jego potencjalnych skutków toksycznych. Toksykokinetyka metali śladowych, takich jak cynk, miedź, kadm lub nikiel jest szczególnie interesująca, ponieważ metale nie ulegają degradacji przez organizm i jedyna regulacja ich wewnętrznego stężenia w ciele następuje poprzez

wychwyt, unieruchomienie i oczyszczenie. Metale śladowe mają ogólnie podobne właściwości fizykochemiczne, więc można oczekiwać, że będą miały podobne właściwości toksykokinetyczne. W organizmach zwierząt stężenia niezbędnych substancji, czy pierwiastków, w tym metali (jak np. Zn, Cu), muszą być utrzymywane w zakresach (normach, granicach fizjologicznych), aby możliwe było zaspokojenie potrzeb fizjologicznych. Czyli stężenie potrzebnych substancji musi być na odpowiednim poziomie, nie może być ani niedoboru, ani nadmiaru. To z kolei wiąże się z odpowiednią regulacją procesów asymilacji i eliminacji. Spełnienie tych wymagań oznacza, że w przypadku niskich stężeń substancji w środowisku, metal musi być aktywnie asymilowany i sekwestrowany przez organizm, podczas gdy w wysokich stężeniach musi być skutecznie eliminowany z ciała by zapobiec potencjalnym efektom toksycznym. W normalnych warunkach środowiskowych metale ksenobiotyczne (np. Pb lub Cd) nie są potrzebne do prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych, ani zwykle nie występują w środowisku na niebezpiecznie wysokim poziomie stężenia. Postawiono więc hipotezę, że regulacja stężenia metali w organizmie powinna być bardziej efektywna dla metali odżywczych niż ksenobiotyków (Spurgeon i Hopkin 1999, Kramarz 1999ab, Bednarska i inni 2015, 2016), natomiast nieznane są mechanizmy fizjologiczne, które mogą być odpowiedzialne za ogólną regulację metali oraz różnic między nimi.

Według Argasiński i inni (2012) wewnętrzne stężenie metali u bezkręgowców, pojawiające się w wyniku spożywania żywności zanieczyszczonej metalami o wysokim stężeniu, może być skutkiem ubocznym gromadzenia się metali w komórkach nabłonka jelita, skutkując toksycznością w obrębie komórek, które stanowią pierwszą linię obrony przed nadmiernym skupieniem metali w organizmie i ich toksycznością (Rost-Roszkowska i inni 2008).

Uszkodzenie komórek jelitowych powinno zależeć zarówno od stężenie metalu, jak i jego naturalnej toksyczności. Wyższe stężenia metali, zwłaszcza jeśli metal jest bardzo toksyczny, powinny powodować rozległe uszkodzenie nabłonka jelit oraz co się z tym wiąże, zwiększone usuwanie martwych i/lub dysfunkcyjnych komórek. W badaniu toksykokinetycznym można to zaobserwować jako zwiększoną szybkość eliminacji z powodu wydalania złuszczonej komórek i spadek szybkości asymilacji z przewodu pokarmowego z powodu uszkodzenia nabłonka jelitowego. Wyjaśnienie

obserwowanego specyficznego zjawiska w niektórych badaniach nad toksykokinetyką metali u bezkręgowców, a mianowicie nagłym wzrostem wewnętrznego stężenia metalu po ekspozycji na żywność zanieczyszczona metalami, a następnie stopniowe zmniejszanie się stężenia, nawet jeśli zwierzę było nadal narażone na skażoną żywność, tłumaczy model teoretyczny sformułowany przez Argasinskiego i innych (2012) (Bednarska i inni. 2011, Lagisz i inni 2005).

Tradycyjnie opisano toksykokinetykę metali u bezkręgowców przez klasyczny jedno-kompartментowy model z pobieraniem metalu, który zależy od jego stężenia w pożywieniu oraz stałej asymilacji, która może być specyficzna dla metali i gatunku. Przypuszcza się, że skoro asymilacja zależy między innymi od stężenia substancji, tak w przypadku nadmiaru metali o jego wydalaniu z organizmu będzie decydowała (zależna od gatunku/metalu) stała eliminacji. Na przykład Janssen i inni (1991) wykazali, że wchłanianie kadmu i wskaźnik eliminacji różniły się znacznie między gatunkami reprezentującymi różne pozycje taksonomiczne. Do podobnych wniosków można dojść porównując toksykokinetykę metali Cd i Zn u chrząszcza biegacza *Poecilus cupreus* (Kramarz 1999a) i wija *Lithobius mutabilis* (Kramarz 1999b). Po zbadaniu parametrów toksykokinetycznych dla zakresu narażenia na różne stężenia Zn i Cd świerszcza *Gryllus assimilis*, autorzy doszli do wniosku, że zarówno współczynnik asymilacji, jak i eliminacji mogą się zmieniać w zależności od stężenia podczas ekspozycji. Odkrycie to pośrednio potwierdza sformułowaną tezę przez Argasińskiego i innych (2012), a więc, że to wewnętrzne stężenie metalu u bezkręgowców może być, przynajmniej w pewnym stopniu, bezpośrednim wynikiem toksyczności metali dla komórek nabłonka jelita. Uszkodzenie jelita powinno skutkować zmniejszeniem tempa przyswajania metali, natomiast wydalanie martwych komórek – zwiększeniem tempa eliminacji (Bednarska i inni 2016).

Przywrócenie krewetek *N. davidi* do czystej wody na czas 1 i 2 tygodni po tygodniowej ekspozycji na nikiel (Ni 1:1 i Ni 1:2) przyczyniło się do proporcjonalnego do czasu oczyszczania, spadku wartości kumulowanego pierwiastka. Natomiast w grupach Ni 2:1 i Ni 2:2 stężenie niklu było podobne do grupy Ni 2:0. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że nawet czas 2 tygodni przebywania zwierząt w czystej wodzie po dwóch tygodniach ekspozycji na nikiel nie jest czasem wystarczającym do całkowitego oczyszczenia organizmu z ksenobiotyku. Podobne

rezultaty uzyskano podczas karmienia chrząszczy z gatunku *Pterostichus oblongopunctatus* pokarmem zanieczyszczonym w kadm (Cd), nikiel (Ni) oraz cynk (Zn), a następnie karmienia pokarmem pozbawionym tych metali (Bednarska i inni 2016).

Analiza ultrastrukturalna komórek w obrębie jelita *N. davidi* wykazała, że przywrócenie krewetek do życia w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na nikiel wiąże się ze zmniejszeniem liczebności i intensywności obserwowanych zmian degeneracyjnych w komórkach trawiennych jelita (komórkach D). Ultrastruktura komórek D grupy **Ni 1:1** jest podobna do grupy **Ni 1:0**. W obrębie cytoplazmy komórek tych obserwuje się nieliczne autofagosomy, zniekształcone mitochondria, a w niektórych komórkach skrócone mikrokosmki, jednakże wiele komórek ma strukturę prawidłową. Natomiast ultrastruktura komórek D z grupy **Ni 1:2** przypomina grupę kontrolną, choć zaobserwować można pojedyncze komórki ze zdegenerowanymi mitochondriami i komórki nekrotyczne. Ultrastruktura komórek D grupy **Ni 2:1** przypomina grupę **Ni 2:0**. Nabłonek jest w przeważającej mierze całkowicie zdegenerowany. Występują silne zmiany nekrotyczne, uszkodzone są otoczki jądrowe jąder komórkowych, natomiast spada intensywność autofagii. Wzrasta także liczba zdegenerowanych mitochondriów, rozdętych ze skróconymi grzebieniami. W grupie **Ni 2:2** wiele komórek nadal jest nekrotycznych. W obrębie cytoplazmy wielu komórek z grupy tej zaobserwować można pojedyncze autofagosomy, uszkodzone i rozdęte mitochondria oraz cysterny retikulum endoplazmatycznego oraz silnie skrócone mikrokosmki. W grupie **Ni 2:2** występują też komórki o prawidłowej ultrastrukturze, a mitochondria komórek tych są rozdęte i posiadają skrócone grzebienie. Pomimo przywrócenia do czystej wody na czas dwóch tygodni zmiany są wciąż obserwowane, w tym obserwowana była intensywna nekroza. 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). Przywrócenie krewetek do czystej wody przyczyniło się także do częściowej regeneracji komórek budujących wątrobotrzustkę *N. davidi*, zwłaszcza po 2 tygodniach przywrócenia do czystej wody. Komórki w tym narządzie u zwierząt z grup **Ni 1:1** oraz **Ni 1:2**

charakteryzują się pojedynczymi zmianami wskazującymi na proces nekrozy, tj. rozdęte organelle z pękniętymi błonami komórkowymi. W grupach tych obserwuje się wzrost procesu autofagii i spadek ilości materiałów zapasowych. Komórki wątrobotrzustki z grupy **Ni 1:2** w budowie ultrastrukturalnej przypominają grupę kontrolną. Wyniki z barwienia LysoTracker wskazują na obniżenie intensywności sygnałów, natomiast w grupach **Ni 1:1** i **Ni 1:2** sygnały są nadal silne, rozproszone, przy czym w grupie **Ni 1:2** sygnały stopniowo słabną. Natomiast przywrócenie do czystej wody na tydzień i dwa po dwutygodniowej ekspozycji na nikiel (grupy **Ni 2:1** i **Ni 2:2**) nie było wystarczającym czasem dla pełnej regeneracji na poziomie ultrastrukturalnym komórek wątrobotrzustki. W grupie **Ni 2:1** wciąż obserwuje się silne zmiany nekrotyczne we wszystkich komórkach, których organelle są rozdęte, a cytoplazma jasna elektronowo z niewielką ilością organelli. Komórki F mają silnie zwakuolizowane obszary cytoplazmy, ale w mniejszym stopniu niż w grupie **Ni 2:0**. Mniej też występuje autofagosomów, natomiast w dalszym ciągu występują rozdęte cysterny retikulum endoplazmatycznego. Podobne zmiany obserwuje się w komórkach B, w cytoplazmie których dodatkowo występują liczne kule materiału zapasowego. W grupie **Ni 2:2** komórki F w dalszym ciągu posiadają liczne wakuole, natomiast zmiany dotyczą pojedynczych obszarów cytoplazmy. Obserwuje się liczne autofagosomy i rozdęte cysterny retikulum endoplazmatycznego. W komórkach B z kolei oprócz obecności licznych autofagosomów występują materiały zapasowe w trakcie trawienia (co nie było obserwowane w grupie **Ni 2:1**). Wyniki barwienia LysoTracker były zbieżne z wynikami uzyskanymi z TEM. Przy czym sygnały w grupach **Ni 2:1** i **Ni 2:2** były bardziej skupione, w przeciwieństwie do rozproszonych pojedynczych sygnałów w grupach **Ni 1:1** i **Ni 1:2**. Podobne zależności obserwowano u *N. davidi* ekspozowanej na dimetoat i przywracanej do czystej wody, gdzie 1 tydzień w czystej wodzie nie był wystarczający dla całkowitej regeneracji, zwłaszcza przy dłuższych ekspozycjach (Ostróžka i inni 2022), a także poddanej stresowi w postaci głodzenia i ponownie karmionej (Włodarczyk i inni 2017). Wydłużenie czasu przywrócenia do warunków kontrolnych wiązało się ze zmniejszeniem częstotliwości i intensywności obserwowanych zmian ultrastrukturalnych. Jednak zwłaszcza przy dłuższych czasach ekspozycji na stresor czasem nawet taki sam czas przywrócenia do warunków kontrolnych, nie jest czasem wystarczającym i zmiany degeneracyjne są nadal obecne.

Autofagia w trakcie oczyszczania *N. davidi* jest wyciszana w jelicie, natomiast w wątrobotrzustce wciąż zachodzi intensywnie. U krewetki *Artemesia longinaris* zbadano wpływ zasolenia na ultrastrukturę komórek wątrobotrzustki. Zwierzęta stopniowo i gwałtownie ekspozowano na różne wartości zasolenia w różnych przedziałach czasowych, po czym przywracano do wartości początkowych na 30 dni. Drastyczne obniżenie poziomu zasolenia wiązało się z dużą śmiertelnością krewetek, natomiast w przypadku niewielkich zmian zasolenia i przywrócenia warunków kontrolnych, wątrobotrzustka odzyskała niezmienną strukturę. Powrót do wyższych wartości zasolenia wiązał się z obserwowanym wzrostem wysokości komórek F, R, B, natomiast spadek zasolenia wiązał się ze zmniejszeniem wysokości tych komórek, co autorzy tłumaczyli stresem osmotycznym (Masson i inni 2012). U przypadku chrząszcza *P. oblongopunctatus*, po 6 dniach oczyszczania po wcześniejszej ekspozycji na nikiel, pojawiły się pierwsze symptomy regeneracji jelita środkowego, przejawiające się bardziej regularnymi kryptami w jelicie środkowym i odnową w pierwszej warstwie komórek nabłonkowych. Mimo to, wysokość nabłonka była znacznie niższa niż przed ekspozycją nawet pod koniec eksperymentu. Nabłonek nie został zregenerowany także w przypadku przywrócenia tych zwierząt do nieskażonego pożywienia po ekspozycji na cynk. Pod koniec doświadczenia nabłonek miał nieregularną budowę, przy czym jego wysokość była taka sama jak w grupie kontrolnej. Sugeruje się, że uzyskane wyniki zarówno ze stężeń gromadzonych metali, jak i stanu jelita środkowego, mogą się różnić ze względu na zmienność międzyosobniczą. Wysoka zmienność obserwowana w stężeniach metali u chrząszczy w całym okresie eksperymentu może być odzwierciedleniem tych różnic w jelicie środkowym tempa wymiany komórek u poszczególnych chrząszczy (Bednarska i inni 2016).

Przywrócenie krewetek *N. davidi* do czystej wody nie miało wpływu na gromadzenie materiałów zapasowych w obrębie cytoplazmy komórek D jelita, natomiast w wątrobotrzustce zaobserwowano w grupie Ni 2:1 dodatkowe (oprócz lipidów i polisacharydów, jak w grupie kontrolnej) gromadzenie ciał białkowych jako materiałów zapasowych. W przypadku *N. davidi* ekspozowanej na dimetoat w obrębie komórek trawiennych (komórek D) jelita obserwuje się gromadzenie kropeł tłuszczowych przy krótszych ekspozycjach i przywróceniu do czystej wody. Natomiast w wątrobotrzustce materiały te uległy redukcji w porównaniu do kontroli, ale

przywrócenie do czystej wody spowodowało zwiększenie ich ilości w porównaniu do grup ekspozycyjnych (Ostróżka i inni 2022). Ponadto zaobserwowano, że ponowne karmienie krabów *Cherax quadricarinatus* głodzonych przez 80 dni, następnie karmionych przez 30 dni przyczyniło się do wzrostu stężenia glikogenu i lipidów w obrębie wątrobotrzustki w porównaniu do osobników głodzonych przez ten czas (Sacristán i inni 2016). Gromadzenie materiałów zapasowych może być związane z faktem, że u organizmów żyjących w zanieczyszczonym środowisku lub narażonych na działanie stresorów wzrasta wydatek energetyczny zwierzęcia, związany z detoksykacją i wydalaniem szkodliwych substancji (Sibly i Calow 1989). Może to prowadzić do gromadzenia się w narządach substancji magazynujących (Bednarska i inni 2013), które mogą być wykorzystane w utrzymaniu homeostazy energetycznej w komórkach (Stone i inni 2001, De Coen i Janssen 2003a, Moolman i inni 2007, Lipovšek i inni 2018). Niektóre analizy związane z budżetami energetycznymi (akumulacja lipidów, białek i polisacharydów) zostały przeprowadzone na kilku organizmach wodnych (De Coen i Janssen 1997, 2003a, 2003b, Verslycke i inni 2004, Graham i Thompson 2009, Smolders i inni 2003) i lądowych (Donker 1992, Bednarska i inni 2013). Zmiany zachodzące w komórkach i tkankach pod wpływem substancji toksycznych są łatwiej regenerowane w przypadku zwiększonego wydatku energetycznego (Rowe i inni 1998, Calow 1991, Maryański i inni 2002, Pook i inni 2009, Bednarska i inni 2013, Bednarska i Stachowicz 2013). Pojawienie się materiału o charakterze białkowym w grupie **Ni 2:1** w wątrobotrzustce może być związane z intensyfikacją syntezy licznych enzymów, w tym biorących także udział w procesach śmierci komórkowej, czy procesach detoksykacji (Sukharev i inni 1997). Świadczy o tym duży wzrost liczby komórek żywych kaspazo-pozytywnych w wątrobotrzustce *N. davidi*. Kaspazy są białkami enzymatycznymi należącymi do proteaz cysteinowych (Nicholson 1999). Podobny wzrost tych komórek zaobserwowano w jelicie w tej samej grupie eksperymentalnej. Jednak komórki D jelita *N. davidi* nie pełnią w organizmie roli magazynującej substancje zapasowe, a białka wymagane do syntezy odpowiednich enzymów, w tym między innymi kaspaz będą dostarczane właśnie z narządów je magazynujących (tu: wątrobotrzustka).

Podczas apoptozy pojawiają się zmiany na poziomie ultrastrukturalnym takie jak na przykład kurczenie się komórek, fragmentacja jądra komórkowego, kondensacja

chromatyny, fragmentacja chromosomalnego DNA (Zhang i inni 2018). Zanim jednak pojawią się jakiegokolwiek zmiany na tym poziomie, uruchamiana jest cała kaskada procesów mających na celu aktywację enzymów apoptotycznych (Menze i inni 2010, Zhang i inni 2018, Genchi i inni 2020a), stąd też pomimo, że zmiany na poziomie ultrastrukturalnym nie będą widoczne, to jednak proces apoptozy zostaje uruchomiony. Dlatego też w niniejszych badaniach przeprowadzona została analiza ilościowa z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Analiza związana z procesami śmierci komórkowej w jelicie *N. davidi* wykazała, że w grupie **Ni 1:1** występuje najwyższy odsetek komórek apoptotycznych w całym jelicie, a nekrotycznych jak w grupie **Ni 1:0**. Natomiast udział komórek apoptotycznych w grupie **Ni 1:2** jest zbliżony do poziomu grupy kontrolnej. Z kolei udział komórek nekrotycznych w grupie tej jest zdecydowanie wyższy niż w grupie **Ni 1:0**. W grupie **Ni 2:1** udział komórek apoptotycznych jest wyższy niż w grupie **Ni 2:0**, natomiast ilość komórek nekrotycznych wzrasta proporcjonalnie do czasu oczyszczania. W obrębie wątrobotrzustki zaobserwowano inne niż w jelicie zależności między czasem przywracania zwierząt do czystej wody a aktywacją apoptozy i nekrozy. W przeciwieństwie do jelita, przywrócenie do czystej wody na 1 i 2 tygodnie po tygodniowej ekspozycji na nikiel (grupy **Ni 1:1** oraz **Ni 1:2**) przyczyniło się do spadku intensywności apoptozy poniżej wartości kontrolnych, przy czym spadek ten był większy w grupie z 2 tygodniami oczyszczania (**Ni 1:2**). Z kolei pod względem nekrozy, w przeciwieństwie do jelita, gdzie czas oczyszczania stopniowo wzmagał nekrozę, tak w wątrobotrzustce we wszystkich grupach z przywróceniem do wody czystej (tj. grupy **Ni 1:1**, **Ni 1:2**, **Ni 2:1** oraz **Ni 2:2**) zaobserwowano powrót parametru do poziomu grupy kontrolnej. Ogólnie można stwierdzić, że przywrócenie zwierząt do życia w wodzie czystej powodowało stopniowy i postępujący spadek liczby komórek apoptotycznych, późnoapoptotycznych i nekrotycznych w wątrobotrzustce do poziomu kontrolnego, podczas gdy w jelicie ich liczba wzrastała po jednym lub dwóch tygodniach przebywania w nieskażonej wodzie. Zestawiając intensywność autofagii oraz apoptozy/nekrozy można stwierdzić, że w jelicie w trakcie oczyszczania organizmu intensywność autofagii spada, natomiast apoptoza i nekroza wciąż zachodzą intensywnie. Natomiast w wątrobotrzustce zaobserwowano zjawisko odwrotne, wzrost autofagii oraz spadek liczby komórek apoptotycznych/nekrotycznych wraz z wydłużającym się czasem życia zwierząt w wodzie czystej. Można wywnioskować, że

w wątrobotrzustce w trakcie oczyszczania organizmu intensywne autofagia będzie pełniła funkcję ochronną, powodując spadek intensywności procesów śmierci komórkowej. Autofagia będzie więc odgrywała ważną rolę w ochronie komórek tego narządu, co jak wiadomo jest elementem szlaku przeżycia (Levine i Klionsky 2004, Broker i inni 2005, Tettamanti i inni 2011, Chandra i Tang 2009, Kourtis i Tavernarakis 2009, Franzetti i inni 2012, Klionsky i inni 2016, 2021). Natomiast w przypadku jelita, autofagia nie będzie procesem wystarczającym, który chroniłby komórki przed dalszą degeneracją. Jednak ze względu na fakt, że jelito uważane jest jako jeden z pierwszych narządów (obok pokrycia ciała), który stanowi barierę dla całego organizmu przed wpływem na niego ksenobiotyków (das Dores Teixeira i inni 2013, Wilczek i inni 2014), można przypuszczać, że śmierć uszkodzonych komórek w tym narządzie będzie chronić pozostałe narządy przed na przykład powstaniem stanu zapalnego. To mogłoby także wyjaśniać stopniową i szybszą regenerację wątrobotrzustki. W przypadku obu narządów można więc zaobserwować typową zależność między autofagią a apoptozą (Rost-Roszkowska i inni 2018, 2019).

Analiza ilościowa śmierci komórkowej z udziałem aktywnych kaspaz wykazała korelację z powyższymi analizami apoptozy i nekrozy w badanych narządach. W jelicie grupy **Ni 1:1** poziom komórek żywych kaspazo-pozytywnych (wczesna apoptoza) jest podobny do grupy **Ni 1:0**, natomiast w grupie **Ni 1:2** odsetek ten jest już niższy niż w grupie kontrolnej. Wartości poniżej kontrolnych obserwuje się także w grupach **Ni 1:1** i **Ni 1:2** pod względem komórek martwych kaspazo-pozytywnych (późna apoptoza). W grupie **Ni 2:1** poziom komórek żywych kaspazo-pozytywnych był kilkukrotnie wyższy niż w kontroli, natomiast w grupie **Ni 2:2** poziom ten był poniżej wartości notowanych dla grupy kontrolnej. Komórki martwe kaspazo-pozytywne miały niższy udział procentowy w porównaniu z grupą kontrolną. W obrębie wątrobotrzustki, poziom komórek żywych kaspazo-pozytywnych w wyniku przywrócenia do czystej wody w odniesieniu do kontroli był następujący: w grupie **Ni 1:1** podobny, **Ni 1:2** niższy, **Ni 2:1** wyższy, **Ni 2:2** niższy, natomiast martwych kaspazo-pozytywnych poniżej wartości kontrolnych z wyjątkiem grupy **Ni 1:1**. Uzyskane wyniki wskazują na różnice w analizowanych narządach. Choć zmiany degeneracyjne po tygodniowej i dwutygodniowej ekspozycji na nikiel były zdecydowanie silniejsze w wątrobotrzustce, tak też to wątrobotrzustka w wyniku przywrócenia do czystej wody zdecydowanie

szybciej się regeneruje. Na podstawie powyższego można stwierdzić, że wątrobotrzustka ze względu na pełnione funkcje, posiada mechanizmy detoksykujące. Komórki budujące jelito i wątrobotrzustkę w celu regulacji i przywrócenia homeostazy tkanek wykorzystują zarówno apoptozę, jak i nekrozę. Głównym obserwowanym rodzajem śmierci komórkowej jest nekroza, natomiast po przywróceniu zwierząt do czystej wody apoptozę można uważać za proces wspomagający naprawę tkanek. Ekspozycja krewetek *N. davidi* na dimetolat i przywrócenie do czystej wody, również wiązało się z obniżeniem ilości zmian nekrotycznych w wątrobotrzustce, zwłaszcza przy krótkich ekspozycjach i długim czasie oczyszczania, natomiast w obrębie jelita te zmiany były zdecydowanie częstsze. W tym układzie eksperymentalnym, żaden czas przywrócenia do czystej wody nie spowodował obniżenia nekrozy do wartości kontrolnych (Ostróżka i inni 2022). Powrót do karmienia głodzonych *N. davidi* przyczynił się z kolei do obniżenia intensywności apoptozy (Włodarczyk i inni 2019b). Znaczącą poprawę zaobserwowano także w obrębie ultrastruktury komórek wątrobotrzustki krabów *Cherax quadricarinatus* głodzonych przez 80 dni, następnie karmionych przez 30 dni (Sacristán i inni 2016). W eksperymencie polegającym na ekspozycji chrząszczy *P. oblongopunctatus* metalami ciężkimi, powrót do warunków kontrolnych wiązał się z pojawieniem zależnych od metalu zmian. W 32 dniu doświadczenia (ekspozycji na cynk), po 4 dniach oczyszczania, większość komórek w kryptach regeneracyjnych była TUNEL-pozytywna, a więc aktywowana była apoptoza (Bednarska i inni 2016).

W warunkach fizjologicznych apoptoza umożliwia zachowanie równowagi między tempem proliferacji a eliminacją zniszczonych lub niepotrzebnych komórek (Zakeri i Lockshin 2002). Natomiast częściej wśród badaczy wpływu metali ciężkich na bezkręgowce obserwowana była autofagia niż apoptoza. Jednak autofagię i apoptozę nie należy traktować jako wzajemnie wykluczające się zjawiska, ale raczej jako procesy współdziałające w tworzeniu odpowiedzi komórek na zmiany warunków środowiska (Bednarska i inni 2016, Rost-Roszkowska i inni 2022). Procesy te mogą zachodzić w tym samym czasie i w tej samej tkance. W tym przypadku autofagia pośredniczy w indukcji apoptozy (Eisenberg-Lerner i inni 2009, Franzetti i inni 2012). Natomiast, co ciekawe, pomimo faktu, że nekroza w przeważającej mierze jest rodzajem dominującego rodzaju śmierci komórkowej w badaniach z użyciem stresorów, prawie

nie zarejestrowano komórek nekrotycznych (martwiczych) przy zastosowaniu różnych stężeń kadmu u ślimaka winniczka *Helix pomatia* (Chabicovsky i inni 2004).

Opisane wyżej wyniki badań nad krewetką traktowaną niklem nie przekładają się jednak na wynik badań apoptozy mierzony przy pomocy Aneksyny V, w których to grupach (zarówno tych z jedno- jak i dwutygodniowym z przywróceniem do czystej wody) w przypadku jelita poziom apoptozy nie rośnie aż tak znacząco, jak mogłaby wskazywać liczba komórek kaspazo-pozytywnych, a w wątrobotrzustce wręcz poziom apoptozy i nekrozy jest poniżej wartości kontrolnych, choć poziom komórek kaspazo-pozytywnych w grupach tych ponad trzykrotnie przekraczał wartości grupy kontrolnej. Aneksyna V wykorzystywana jest do analizy apoptozy zarówno na jej wczesnych, jak i późnych etapach. Wczesne etapy apoptozy są wykrywane poprzez połączenie barwnika z fosfatydyloseryną na powierzchni błony komórkowej. Fosfatydyloseryna jest w żywych komórkach wbudowana w wewnętrzną warstwę błony komórkowej, natomiast kiedy pojawi się sygnał apoptotyczny, zostaje ona przeniesiona na powierzchnię, co umożliwia rozpoznanie komórki (Darzynkiewicz i inni 2001, Martinez i Freyssinet 2001). Co warto zaznaczyć, na tym etapie apoptozy następuje utrata symetrii w rozmieszczeniu lipidów błonowych w warstwie zewnętrznej i wewnętrznej, która pojawia się bez naruszenia integralności błony komórkowej (Lizarbe i inni 2013). Chociaż proporcje w lipidach błonowych są różne w zależności od typu komórki, ważnym jest utrzymanie w błonie komórkowej składu lipidów, dla zachowania struktury i funkcji w komórce. Jak wcześniej wspomniano fosfatydyloseryna, będąca glicerofosfolipidem, występuje w wyższych ilościach po wewnętrznej stronie błony. Jest ujemnie naładowana, dlatego też wewnętrzna warstwa błony jest bardziej ujemnie naładowana niż zewnętrzna, a za utrzymanie tego stanu odpowiada enzym nazywany flipazą. Kiedy pojawia się sygnał apoptotyczny i flipaza zostaje zablokowana, a skramblaza aktywowana, dochodzi do wyrównania lipidów wewnętrznej i zewnętrznej warstwy błony, w tym pojawienie się fosfatydyloseryny na powierzchni błony (Bratton i inni 1997, Blankenberg i inni 2000). A konkretniej, w komórkach apoptotycznych aktywna kaspaza-3 rozszczepia flipazę (ATP11A/C) w nieodwracalnie nieaktywny stan, ponadto kaspaza-3 rozszczepia skramblazę (XKR8), powodując jej dimeryzację i nieodwracalną aktywację (Shlomovitz i inni 2019). Jak dowiedziono, przemieszczenie fosfatydyloseryny jest wczesnym etapem apoptozy.

Zjawisko to zachodzi przed obniżeniem się potencjału transbłonowego mitochondriów oraz uwolnieniem z ich przestrzeni międzłonowych cytochromu c (Denecker i inni 2001).

Aneksyny z kolei stanowią rodzinę białek cytoplazmatycznych, które wiążą wapń, a także cechują się zdolnością do (zależnej od Ca^{2+}) interakcji z błoną o ujemnym ładunku (Lizarbe i inni 2013). W metodzie wykorzystanej do badań nad krewetką traktowaną nikiem, aneksyna związana jest chemicznie z FITC (tioizocyjaninem fluoresceiny), w związku z czym po połączeniu z fosfatydyloseryną można zaobserwować fluorescencję (Skierski 2008). Natomiast przemieszczenie się fosfatydyloseryny i aktywacja kaspaz stanowią sygnał do rozpoczęcia wykonawczej fazy apoptozy (Blankenberg i inni 2000).

Komórki będące we wczesnych etapach apoptozy pod względem morfologicznym są trudne do rozpoznania (Darzynkiewicz i inni 1997), ponieważ zachowana jest jeszcze integralność strukturalna komórki, a także zachowanych jest większość funkcji pełnionych przez błonę komórkową (Israel i Israel 1999, Nagata 2000, Trzcńska 2003). Ponadto, pomimo spadku mitochondrialnego potencjału transbłonowego, organelle komórkowe nie są uszkodzone (Pollack i Leeuwenburgh 2001). Odróżnienie komórek apoptotycznych na późnym etapie procesu jest możliwe do zmierzenia poprzez wykorzystywany w metodzie (Aneksyna V) jodek propidyny, który będzie przenikał przez integralnie zaburzone na skutek apoptozy błony komórkowe, następnie będzie gromadził się wewnątrz komórki i wykazywał mierzalną fluorescencję komórki (Darzynkiewicz i inni 2001, Martinez i Freyssinet 2001, Skierski 2008).

Morfologicznie, w obrębie komórek apoptotycznych wiodący udział mają zmiany w jądrze komórkowym. Na początku, w pobliżu błony jądrowej, chromatyna ulega zagęszczeniu, potem zaczyna wypełniać całe jądro komórkowe, które następnie staje się pyknotyczne. Endonukleazy przyczyniają się do fragmentacji DNA, a następnie na kolejnym etapie powstają tzw. ciała apoptotyczne, będące fragmentami jądra komórkowego oraz nieuszkodzonych organeli komórkowych, które są szczelnie otoczone błoną komórkową (Cory 1998, Halicka i inni 2000). Z kolei użycie MultiCaspase Kit umożliwia detekcję poziomu kaspaz (według informacji zawartych na stronie producenta: kaspza-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8 oraz -9), które są zaangażowane w fazę kontrolno-decyzyjną i wykonawczą apoptozy. Tak więc aktywowane są po

rozpoznaniu bodźca i decyzji o skierowaniu komórki na ten szlak śmierci komórkowej. Kaspazy spełniają różne funkcje. Podstawowa ich klasyfikacja, bez uwzględniania metakaspaz i parakaspaz (Minina i inni 2020) dzieli kaspazy na 3 grupy, mianowicie na: aktywatory cytokin (kaspazy: 1, -4, -5, -11, -12, -13, -14), inicjujące szlak apoptotyczny (8, -9, -10) oraz odpowiedzialne za fazę wykonawczą apoptozy (-3, -6, -7) (Chang i Yang 2000). Chociaż przekazywanie sygnałów do wejścia komórki w apoptozę może przebiegać z wykorzystaniem różnych skomplikowanych szlaków sygnalizacyjnych, tak kaspazy wykonawcze uważa się za centralny punkt, który skupia różne sygnały apoptotyczne. Kiedy następuje ich aktywacja przez kaspazy inicjujące, czy też inne białka (np. GrB) wówczas osiągnięty zostaje “punkt kontrolny”, w którym nie ma już odwrotu w apoptozie (ang. *point of no return*). Etap ten podlega ścisłej regulacji między innymi przez białka z rodziny Bcl2 (ang. *B-cell leukemia/lymphoma-2*) oraz przez IAP (ang. *inhibitor apoptosis proteins*) (Gross i inni 1999). Wszystkie spośród dotychczas poznanych kaspaz cechują się tym, że przecinają łańcuch białkowy substratu w miejscu, gdzie znajduje się w nim kwas asparaginowy oraz tym, że same dla siebie stanowią enzymy aktywujące. To oznacza, że aktywacja jednej z kaspaz może wywołać kaskadę reakcji, podczas których z zymogenów (prokaspaz) aktywuje się wiele aktywnych kaspaz. Kaspazy natomiast przyczyniają się do niszczenia białek enzymatycznych i strukturalnych komórki. Dla przykładu, podczas apoptozy w obrębie wielu komórek obserwuje się proteolityczny rozpad takich białek jak: laminy jądrowe, histony, polimeraza poli-ADP-rybozy (PARP), białka strukturalne, czy białka decydujące o przebiegu cyklu komórkowego. Natomiast degradacja białkowej kinazy DNA i PARP czyni niemożliwym naprawę uszkodzonego DNA (Smolewski i inni 2001, Trzcinińska 2003). Brak korelacji między wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem Aneksyny V oraz MultiCaspase Kit można więc tłumaczyć adaptacją krewetek do zmieniającego się środowiska z niklowego na czystą wodę. W związku z brakiem konieczności przeprowadzania intensywnych procesów degeneracyjnych/regeneracyjnych, bo ekspozycja na ksenobiotyk się skończyła, musiały nastąpić procesy regulacyjne zatrzymujące śmierć komórki poprzez apoptozę.

Jak wcześniej wspomniano, apoptoza jest procesem programowanej śmierci komórki, który podlega regulacji. Ekspresja odpowiednich genów będzie przyczyniała się do aktywowania, bądź hamowania apoptozy. W przypadku organizmu modelowego

niczenia *Caenorhabditis elegans*, ekspresja genów ced-3 i ced-4 będzie powodowała wejście komórki w apoptozę. Mutacja w obrębie tych genów powoduje, że komórki, które powinny zostać wyeliminowane przeżywają. Natomiast ekspresja tych genów jest zależna od genu ced-9, który to gen dodatkowo jest odpowiedzialny za kodowanie białka hamującego proces apoptozy. W wyniku ekspresji genu ced-9 powstaje białko CED-9, które stanowi główną ochronę komórek przed śmiercią (Rudner i inni 2001). U ssaków odpowiednikami dla genu ced-9 jest gen bcl-2, którego ekspresja stanowi silny inhibitor apoptozy. Obniżenie ekspresji tego genu przyczynia się do skierowania komórki na drogę apoptozy, natomiast nadmierna aktywność doprowadzi do inhibicji procesu (Gączarzewicz i inni 2000). U krewetek występuje także ekspresja genu bcl-2, między innymi u gatunku *Litopenaeus vannamei* (Fei i inni 2020). Produkt białkowy ekspresji genu bcl-2 przyczynia się do blokowania sygnalizacji apoptozy na krytycznym etapie procesu, czyli uwolnienia/wypływu jonów wapnia znajdujących się w siateczce śródplazmatycznej. Z kolei uwolnione jony Ca^{2+} biorą udział w aktywacji dwóch enzymów, które przyczyniają się do procesów dezintegracji, mianowicie endonukleazy DNA oraz transglutaminazy związanej z tworzeniem ciał apoptotycznych (Nakamura i inni 2000, Trzcńska 2003). Spadek ilości wolnego wapnia opóźnia rozpoczęcie się procesu apoptozy (Fuller i Shields 2000). W obrębie rodziny białek Bcl-2 występują te białka, które będą stymulowały apoptozę (jak np. Bax, Bak, Bcl-Xs, Bok/Mtd) oraz te białka, które będą hamowały apoptozę (Bcl-2, Bcl-X-L, Bcl-W, Mcl-1, Nr-13) (Fadeel i inni 1999, Gross i inni 1999, Trzcńska 2003). Wspomniane białka występują w błonach siateczki śródplazmatycznej, otoczki okołojądrowej oraz mitochondrialnej. Są odpowiedzialne za regulację przepuszczalności błon mitochondrialnych. W fazie wykonawczej apoptozy dochodzi do zaburzenia potencjału błon w mitochondriach (spadku mitochondrialnego potencjału transbłonowego), zwiększeniu ulega przepuszczalność błon mitochondrialnych, a to z kolei skutkuje uwolnieniem z mitochondriów czynników indukujących apoptozę AIF (*apoptosis inducing factor*) oraz cytochromu c (Apaf-2) (Shimizu i inni 2001, Trzcńska 2003). W warunkach fizjologicznych cytochrom c uczestniczy w przekazywaniu elektronów w łańcuchu oddechowym, jednakże w czasie apoptozy, uwolniony do cytozolu, łączy się z kaspazą 9 przyczyniając się do wspomnianej wcześniej kaskady kaspaz doprowadzającej w rezultacie do śmierci komórki. Co więcej, białka Bax i Bak są w stanie łączyć się z

białkiem VDAC (z ang. *voltage-dependent anion channel*), które to białko należy do jednego z głównych składników zewnętrznej błony mitochondrialnej w komórkach eukariotycznych. W warunkach fizjologicznych kanał VDAC nie jest przepuszczalny dla cytochromu c, natomiast gdy połączy się z białkami Bax i Bak wówczas staje się przepuszczalny dla cytochromu c, przyczyniając się do swobodnego przechodzenia cytochromu c przez kanał z mitochondriów do cytoplazmy. Natomiast białko Bcl-2 powoduje inhibicję uwalniania AIF i cytochromu c oraz hamuje bezpośrednią interakcję z Apaf-1 (odpowiednik białka CED-4 u *C. elegans*) (Fadeel i inni 1999, Trzcinińska 2003).

Wysoki poziom komórek kaspazo-pozytywnych w trakcie eksperymentu na krewetkach hodowanych w wodzie niklowej, nie korespondujący z wysokim poziomem komórek na wczesnym i późnym etapie apoptozy (mierzony za pomocą Aneksyny V) tłumaczyć można także faktem, że aneksyna mierzy poziom apoptozy poprzez: z jednej strony obecność fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej, która na zewnętrznej błonie pojawia się dzięki aktywności kaspazy 3 (wczesny etap apoptozy), a z drugiej strony poprzez zaburzenia przepuszczalności błony komórkowej (późna apoptoza). Natomiast ogólny poziom kaspaz w obrębie cytoplazmy mierzony za pomocą MultiCaspase Kit może wzrosnąć na skutek obecności innych kaspaz, np. inicjatorowych, lub innych niż kaspaza-3 kaspaz wykonawczych, które sprawiają, że w bawieniu komórka będzie kaspazo-pozywna. Będzie to jednak etap zachodzący przed aktywacją kaspazy 3. Stężenie kaspaz w obrębie cytoplazmy komórki może wzrosnąć zewnętrznie (droga zewnątrzpochodna), bądź wewnętrznie (droga wewnątrzpochodna). Z kolei drogi aktywacji kaspaz można podzielić ze względu na źródło pochodzenia sygnału, mianowicie na: receptorowe, indukowane stresem np. uszkodzenie DNA oraz pochodzenia mitochondrialnego (Zou i inni 1999, Srinivasula i inni 1998). W przypadku zewnątrzpochodnej indukcji apoptozy ligand przyłącza się do zewnątrzkomórkowej domeny receptorów śmierci. Przykładami ligandów dla wspomnianych receptorów mogą być: ligand Fas (FasL) albo czynnik martwicy nowotworu (TNF) (Peter i inni 1998, Wajant 2002). Kiedy receptor śmierci Fas jest aktywny, wówczas może poprzez domenę FADD związać cytoplazmatyczne białko DED (dla receptora TNFR domena to TRADD). Natomiast w obrębie białka DED uaktywniona efektorowa domena śmierci wiąże się z domenami kaspazy-8,

zlokalizowanej przy cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej. To prowadzi do powstania kompleksu DISC, dochodzi do oligomeryzacji i autoaktywacji kaspazy-8. W kompleksie DISC niezależnie od kaspazy-8 może dojść do aktywacji kaspazy-10 (Hsu i inni 1995, Kischkel i inni 1995, Kelliher i inni 1998). Wymienione kaspazy mogą przyczynić się do aktywacji prokaspazy-3, a także do mitochondrialnej drogi autodestrukcji dzięki aktywacji białka Bid, będącego proapoptotycznym białkiem z rodziny Bcl-2 (Li i inni 1998). Aktywację kaspazy-8 może także wywołać cytochrom c (białko mitochondrialne) oraz cięcie przez kaspazę-6. Wówczas będzie to niezależna od kompleksu DISC droga aktywacji kaspazy-8. Ponadto, błonowe receptory śmierci kiedy są aktywowane mogą też związać prokaspazę-2 za pośrednictwem białka RIP (Holler i inni 2000). Natomiast w wewnątrzkomórkowej drodze aktywacji kaspaz, kaspazą zależną od mitochondrium jest prokaspaza-9. Jak wcześniej wspomniano, w konsekwencji stresu oksydacyjnego w mitochondrium następują zmiany prowadzące do uwolnienia do cytoplazmy cytochromu c (Garrido i inni 2006). Obecność w obrębie cytoplazmy cytochromu c, prokaspazy-9, Apaf-1 (czynnik aktywujący proteazy), ATP przyczynia się do powstania apoptosomu (Goldstein i inni 2000), kompleksu mającego na celu aktywację kaspaz inicjatorowych (Bao i Shi 2007). Natomiast oddziaływanie Apaf-1 i prokaspazy-9 powoduje aktywację kaspazy-9. Ta z kolei będzie uaktywniać kaspazę-3, -7. Kaspaza-3 z kolei może uaktywnić prokaspazę-9 na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego. Jak wcześniej wspomniano, kaspazy wykonawcze są kluczowymi kaspazami zbierającymi sygnały apoptotyczne. Kaspaza-3 stanowi najważniejszą kaspazę efektorową, której aktywacja może nastąpić w wyniku obecności enzymów i białek, jak kaspaza-8, -9, -10, czy granzymu B, białka CPP-32. Z kolei kaspaza-3 może następnie oddziaływać na prokaspazę-3, -6, -9, polimerazę poli-ADP-rybozę (PARP), enzym fosfokinazę (PKC) (Lazebnik i inni 1994). A cięcie białek strukturalnych komórki przez kaspazy ma wpływ na charakterystyczny obraz komórki apoptotycznej (Gervais i inni 1998). Do dużej grupy substratów kaspaz należą białka, które decydują o naprawie DNA, jak np. ICAD – inhibitor deoksyrybonukleazy, gdzie kaspaza może uskutecznić degradację DNA (Enari i inni 1998ab, Sakahira i inni 1998). Wśród białek ciętych przez kaspazy podczas apoptozy można wymienić białka regulujące cykl komórkowy. Oddziaływanie kaspaz może dotyczyć także: kinaz antyapoptotycznych, czynników transkrypcyjnych, kinaz promujących śmierć komórki, sygnałowych

molekuł dla czynników transkrypcyjnych (Fischer i inni 2003). Dla kaspazy-3 homologicznymi są kaspazy-6, -7, przez co mają one wiele wspólnych substratów i wymiennie mogą działać w różnych komórkach jako kaspazy efektorowe (Lassus i inni 2002). Zlokalizowana w siateczce śródplazmatycznej kaspaza-12 także uczestniczy w kaskadzie sygnalizacyjnej, choć w głównej mierze jej substratem jest prokaspaza-9. Ze względu na rozmieszczenie, najczęściej kaspaz znajduje się w cytoplazmie, aczkolwiek niektóre prokaspazy występują w mitochondriach (prokaspaza-3), a także w aparacie Gogliego (kaspaza-2, -9) (Zhivotovsky i inni 1999).

Wysoki poziom kaspaz niekorespondujący z wysokimi wynikami uzyskanymi z analizy z wykorzystaniem Aneksyny V, można tłumaczyć też faktem, iż aktywowane kaspazy biorą udział także w wydarzeniach komórkowych nie będących apoptozą. Poddając analizie dobrze znane cele apoptotyczne kaspaz, badacze dochodzą do wniosku, że cięcie ograniczonej liczby wybranych substratów odgrywa główną rolę podczas nieapoptotycznych funkcji kaspaz. Selektywne cięcie substratu może podlegać regulacji przez: aktywację czynników antyapoptotycznych, podzieloną na przedziały aktywację kaspaz, czy poprzez ograniczoną aktywność kaspaz podczas funkcji niezależnych od apoptozy. Aktywne kaspazy wykazują funkcje podczas proliferacji wielu komórek, regulacji cyklu komórkowego, a także uczestniczą w różnicowaniu różnych komórek. W niektórych typach komórek różnicowanie może morfologicznie wyglądać jak niepełna apoptoza (Schwerk i Schulze-Osthoff 2003).

W przypadku inicjacji wewnątrzopochodnej, gdzie inicjacja jest niezależna od białek błony komórkowej, a sygnał pochodzi z białkowych czynników wewnątrzkomórkowych (powstających na skutek aktywności w obrębie mitochondriów) na skutek wzrostu ROS, który przyczynia się do degradacji DNA i prowadzi do apoptozy. Z kolei wysoki poziom ROS pomimo przywrócenia krewetek *N. davidi* do czystej wody po ekspozycji na nikiel występuje w obu analizowanych narządach.

Wiele przeprowadzonych badań wskazuje, że mitochondria biorą główny udział w procesie apoptozy. Wystąpienie stresu oksydacyjnego może przyczynić się do otwarcia megakanalu mitochondrialnego i wypływu jonów wapnia. Ma to miejsce przed pojawieniem się charakterystycznych dla apoptozy cech jak: kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA, zmiany w obrębie błony komórkowej. To może doprowadzić do

wzrostu poziomu ROS. W tej zależności (podwyższony poziom ROS – brak obserwowanych zmian w ultrastrukturze komórek) prawdopodobnie może brać udział białko Bcl-2, które z racji bycia przeciwutleniaczem, zmniejsza uszkodzenia błon mitochondrialnych wywołanych przez ROS, a co się z tym wiąże utrzymanie poziomu Ca^{2+} (Bartos 1998).

Analiza jakościowa i ilościowa poziomu ROS u krewetek traktowanych niklem i hodowanych w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na nikiel wykazała, że przywrócenie do czystej wody nie wpływa na spadek liczby sygnałów emitowanych przez komórki ROS(+). W jelicie poziom ROS jest nieco wyższy niż w grupach eksperymentalnych, natomiast w wątrobotrzustce w grupach zwierząt poddanych oczyszczaniu przez dwa tygodnie (Ni 1:2 i Ni 2:2) parametry są nieco niższe w porównaniu z tygodniowym oczyszczaniem. Niezależnie natomiast od analizowanego narządu, szczególnie wysokie poziomy ROS obserwuje się w grupie Ni 2:1. Przywrócenie do karmienia głodzonych osobników *N. davidi* przyczyniło się do spadku poziomu ROS, jednak nie do wartości kontrolnych w obu analizowanych narządach (Włodarczyk i inni 2019a). Podobną zależność wysokiego poziomu ROS pomimo przywrócenia do kontrolnych warunków zaobserwowali badacze sprawdzający wpływ przywrócenia normalnych warunków krewetce *Litopenaeus vannamei* poddanej wcześniej stresowi w postaci niedostatecznie nasyconej tlenem wody oraz obecnością w wodzie wysokiego poziomu dwutlenku węgla. Wzięli pod uwagę ekspresję genów antyoksydacyjnych w wątrobotrzustce. Eksperyment zaplanowano na 4 i 24 h ekspozycji na stresor, następnie regenerację przez 0, 1, 6 lub 24 h. O ile podczas ekspozycji na stresor odpowiedź transkrypcyjna rosła, tak przy przywróceniu do normalnych warunków parametry zmniejszyły się lub nie zmieniły w większości długoterminowych rekonwalescencji. Ekspresja genów antyoksydacyjnych została zmniejszona lub wyciszona przez silniejszą ekspozycję na te warunki, pozostawiając krewetki potencjalnie podatne na uszkodzenia wywołane przez ROS (Kniffin i inni 2014). Z kolei Jiang i inni (2019) badali wpływ stresu temperaturowego na metabolizm tlenu i energii w wątrobotrzustce krewetki *Penaeus monodon*, poprzez wpływ wspomnianego czynnika na produkcję ROS, przeciwutleniaczy oraz ATP. Zarówno ekspozycja na obniżoną temperaturę (15°C), jak i podwyższoną (temp powyżej 30°C) indukowała produkcję ROS, aktywność antyoksydantów (różna

odpowieź zależna od enzymu), czy produkcję ATP. Dodatkowa produkcja ATP w wyniku stresu sugeruje wzrost zapotrzebowania organizmu na energię w celu utrzymania homeostazy w narządach. Odpowiedź antyoksydacyjna pojawiająca się w wyniku wzrostu stężenia ROS na skutek zastosowania różnych stresorów może być różna w zależności od samego stresora, czasu ekspozycji i regeneracji. W przypadku eksperymentu z ekspozycją krewetek *N. davidi* na nikiel na skutek działającego stresora wzrasta poziom ROS, który nie powraca do poziomów kontrolnych po przywróceniu zwierząt do normalnych warunków i przekracza zdolności antyoksydacyjne komórek. Stężenie ATP w jelicie i wątrobotrzustce *N. davidi* przywróconej do czystej wody w dalszym ciągu jest na niskim poziomie, w porównaniu z osobnikami kontrolnymi. Natomiast wskaźnik ADP/ATP pomimo przywrócenia krewetek do czystej wody jest wyższy niż wartości kontrolne. Najwyższe spadki współczynnika ADP/ATP obserwowano w grupach z 2 tygodniami przebywania w czystej wodzie. Uzyskane wyniki wskazywać mogą, że przywrócenie do czystej wody po ekspozycji na nikiel nie było wystarczająco długie do pełnej regeneracji i uszkodzone mitochondria nie produkują odpowiedniej ilości ATP. Innym wytłumaczeniem niskiego stężenia ATP może być fakt zwiększonego zapotrzebowania komórek na ATP, zużywanego do odbudowy tkanek, na co z kolei także redukcja materiałów zapasowych może mieć wpływ. Natomiast ekspozycja na stresory może powodować, że poziom ATP jest zbyt niski, aby mogła się aktywować apoptoza (Richter i inni 1996). Porównując wyniki związane z liczbą komórek ROS(+) oraz pomiarów stężenia ATP w badanych tkankach *N. davidi* eksponowanej na nikiel i przywróconej do życia w czystej wodzie, obserwuje się, że wraz ze wzrostem liczby komórek ROS(+) zmniejsza się stężenie ATP. Zależność ta nie jest zaskakująca wzięwszy pod uwagę fakt, iż nieneutralizowane ROS działają destrukcyjnie na mitochondria i mogą zaburzyć funkcjonowanie łańcucha oddechowego, a co się z tym wiąże produkcję ATP. Tylko w grupie **Ni 1:0** w jelicie obserwuje się, że dwukrotny wzrost udziału komórek ROS-pozytywnych nie przyczynił się do spadku stężenia ATP, a wręcz spowodował jego wzrost. Zjawisko to można tłumaczyć faktem, że tygodniowa ekspozycja na nikiel, z perspektywy długości trwania eksperymentu, była zbyt krótkim czasem, podczas którego nastąpiła mobilizacja metabolizmu oraz wykorzystanie rezerw energetycznych w postaci trawienia materiałów zapasowych. Ponadto, tygodniowa ekspozycja nie zdążyła wywołać jeszcze

znaczących zmian na poziomie ultrastrukturalnym mitochondriów. Jak wcześniej wspomniano, wewnątrzkomórkowe stężenie ATP stanowi czynnik wpływający na rodzaj śmierci komórkowej. ATP w procesie apoptozy wykorzystywane jest między innymi we wszystkich szlakach aktywacji kaspaz, enzymów proteolitycznych, które kontrolują apoptozę (Richter i inni 1996, Wilczek 2008). Niskie stężenie ROS chwilowo zmienia poziom ATP, co będzie prowadziło do apoptotycznej śmierci komórki. Natomiast wysokie stężenie nadtlenu wodoru, które przyczynia się do trwałego obniżenia ATP, będzie prowadziło do śmierci komórki na drodze nekrozy (Gardner i inni 1997, Wilczek 2008). Jak się okazuje, utrzymanie stężenia ATP w komórkach, które przekracza 50% wartości wyjściowych jest wystarczające, aby zmienić szlak śmierci komórkowej z nekrotycznej na apoptotyczną. Może jednak nastąpić także przejście z apoptozy do nekrozy, gdy obniżeniu ulegnie poziom ATP (Herceg i Wang 2001, Wilczek 2008). Przejściu komórki ze szlaku śmierci apoptotycznej na nekrotyczną może także towarzyszyć zwiększony poziom nadtlenu wodoru, który bezpośrednio działa hamująco na kaspazy, poprzez utlenienie grup tiolowych w centrum aktywnym enzymów (Chandra i inni 2000). Powstający na skutek zaburzeń w przepływie elektronów w łańcuchu oddechowym nadtlenek wodoru może przyczyniać się do otwarcia megakanałów oraz zmian w transbłonowym potencjale mitochondrialnym. Natomiast spadek potencjału poniżej wartości bramkującej kanały może stanowić pierwszy sygnał wejścia na drogę apoptozy (Zamzami i inni 1995, Wilczek 2008). Zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego występują prawie równocześnie we wszystkich mitochondriach w obrębie danej komórki (Marzo i inni 1998). Jeśli potencjał mitochondrialny długotrwale utrzymuje się na niskim poziomie, jest to znak, że komórka wchodzi w apoptozę. Natomiast jeśli depolaryzacja, wynikająca z obniżonego potencjału, dotyczy tylko pojedynczych mitochondriów w komórce, wówczas mitochondria takie są rozpoznawane jako nieprawidłowe i są utylizowane na drodze autofagii (mitofagii). Jednak gdy obniżony potencjał mitochondrialny pojawia się w większej liczbie mitochondriów, dochodzi do uwolnienia cytochromu c i AIF (czynnik indukcji apoptozy), a w warunkach odpowiedniego stężenia ATP następuje także aktywacja kaspaz. Do nekrozy natomiast dochodzi, gdy w większości mitochondriów wystąpiło gwałtowne załamanie się potencjału oraz wyczerpanie ATP. Zaobserwowano, że gdy ponad 90% mitochondriów w obrębie

komórki utrzymuje wysokie wartości potencjału mitochondrialnego, komórka taka charakteryzuje się także znaczną wydolnością energetyczną (Lecoeur i inni 2004). W związku z powyższym uznano, że analizowanie zmian potencjału mitochondrialnego jest dobrym wskaźnikiem kondycji energetycznej i fizjologicznej w obrębie komórek, ale też i tkanek oraz całych narządów (Saleh i inni 2003, Wilczek 2008).

Analiza ultrastrukturalna mitochondriów wykazała, że przywrócenie krewetek do czystej wody przyczyniło się do zmniejszenia częstotliwości i intensywności obserwowanych zmian degeneracyjnych w obrębie mitochondriów, proporcjonalnie do czasu oczyszczania, zwłaszcza w jelicie, gdzie w wyniku ekspozycji te zmiany były najsilniejsze. W grupie **Ni 1:1** w jelicie, tydzień oczyszczania po tygodniu ekspozycji na nikiel nie był wystarczający dla pełnej regeneracji. W grupie tej w komórkach D mitochondria są zniekształcone, natomiast w grupie **Ni 1:2**, ultrastrukturalnie przypominają grupę kontrolną. W grupie **Ni 2:1** wzrasta liczba zdegenerowanych mitochondriów, które są rozdęte i mają skrócone grzebienie. W grupie **Ni 2:2** w obrębie pojedynczych zdegenerowanych komórek obserwuje się rozdęte mitochondria. Natomiast w obrębie prawidłowych komórek tej grupy, mitochondria wciąż są rozdęte i posiadają skrócone grzebienie. Podobne rezultaty uzyskano eksponując *N. davidi* na dimetoat i przywracając do czystej wody (Ostróżka i inni 2022) oraz *N. davidi* ponownie karmionej po stresorze w postaci głodzenia (Włodarczyk i inni 2017, 2019a). Analiza ilościowa poziomu komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (o niskim potencjale błonowym) wykazała, że przywrócenie krewetek do czystej wody wiązało się ze zwiększeniem odsetka badanego parametru w grupach **Ni 1:1** i **Ni 1:2** w jelicie. Przy czym w jelicie w grupie **Ni 1:2** wzrost był największy. W grupach **Ni 2:1** i **Ni 2:2** zaobserwowano spadek poniżej wartości notowanych dla grupy ekspozycyjnej **Ni 2:0**. Podobną zależność zaobserwowano w wątrobotrzustce. Przywrócenie do czystej wody nie przyczyniło się do powrotu parametrów do wartości kontrolnych zarówno w jelicie, jak i wątrobotrzustce. Długotrwałe głodzenie *N. davidi* aktywuje wzrost liczby nieaktywnych mitochondriów w obu endodermalnych obszarach układu pokarmowego. Natomiast powrót do karmienia przyczynił się do spadku udziału zdepolaryzowanych mitochondriów. Ultrastrukturalnie mitochondria uległy drastycznym zmianom: zaobserwowano nabrzmiałe mitochondria ze zmniejszoną liczbą krótkich grzebieni. Zmniejszenie liczby komórek z nieaktywnymi mitochondriami w jelicie i

wątrobotrzustce *N. davidi* po ponownym odżywieniu mogą być związane z aktywacją autofagii (mitofagii jako autofagii selektywnej) (Włodarczyk i inni 2017, 2019ab). Zmiany mitochondrialnego potencjału błonowego traktowane są jako dobre markery wszystkich zmian prowadzących do śmierci komórki (Wilczek i inni 2014), a obserwowane były u raka błotnego (*Scylla paramamosain*) zainfekowanego wirusem WSSV (z ang. *White Spot Syndrome Virus*) (Lin i inni 2020). Jednak dane dotyczące tej tematyki są bardzo ubogie w przypadku słodkowodnych bezkręgowców, w tym skorupiaków poddanych ekspozycji na ksenobiotyki występujące w środowisku ich życia.

5.5. Analiza cyklu komórkowego i proliferacji komórek w jelicie i wątrobotrzustce *Neocaridina davidi* eksponowanej na nikiel i przywróconej do wody czystej

W nabłonku jelita środkowego bezkręgowców występują komórki odpowiedzialne za jego odnowę, regenerację. Są to tak zwane komórki regeneracyjne (embrionalne), które traktowane są jako komórki macierzyste dla całego nabłonka jelita środkowego. Tak więc zdolne są do proliferacji oraz do różnicowania w różne typy komórek nabłonkowych. Zlokalizowane są albo pojedynczo pomiędzy bazalnymi regionami pozostałych komórek tworzących nabłonek lub formują grupy nazywane kryptami lub gniazdami regeneracyjnymi (Szklarzewicz i Tylek 1987, Rost-Roszkowska i inni 2007, 2010b, Christofolletti i inni 2012, Sosinka i inni 2014, Fontanetti i inni 2015). W przypadku skorupiaków opisane zostały one jako **komórki E** i zlokalizowane mogą być albo w przedniej części jelita, albo w dystalnej i medialnej części cewek wątrobotrzustki w zależności, z jakich odcinków/narządów zbudowane jest jelito środkowe. U niektórych gatunków żyjących przez krótki okres czasu komórki regeneracyjne nie zostały opisane (Arnaud i inni 1978, Mycles 1979, Prosi i inni 1983, Muskó 1988, Ceccaldi 1989, Sousa i Petriella 2001, Sousa i inni 2005, Tam i Avenant-Oldewage 2009ab, Rost-Roszkowska i inni 2012). U *N. davidi* komórki regeneracyjne zlokalizowane są w przedniej części jelita, a także w dystalnej części cewek wątrobotrzustki, gdzie ulegają one proliferacji. W regionie środkowym tych cewek komórki E różnicują się w komórki F, B oraz R, które tworzą proksymalne

regiony cewek i jednocześnie odpowiadają za funkcje związane z sekrecją, magazynowaniem, absorpcją, czy detoksykacją (Sonakowska i inni 2015, Sonakowska-Czajka i inni 2021). W trakcie przeprowadzonych analiz zmiany degeneracyjne nie były obserwowane na terenie komórek E jelita ani wątrobotrzustki *N. davidi*. Wszystkie zmiany dotyczyły pozostałych komórek budujących nabłonek. Podobne wyniki uzyskano w przypadku prowadzenia eksperymentów polegających na głodzeniu (Włodarczyk i inni 2017) oraz ekspozycji dorosłych osobników tego gatunku na dimetoat (Ostróżka i inni 2022), czy bisfenol A (dane niepublikowane). Podczas gdy komórki regeneracyjne w jelicie nie mają kontaktu ze światłem tego narządu, a więc nie mają bezpośredniego kontaktu z ksenobiotykiem, to w przypadku regionów dystalnych i medialnych cewek wątrobotrzustki komórki te mają już ze światłem kontakt (Sonakowska i inni 2015, Sonakowska-Czajka i inni 2021). Tak więc brak jakichkolwiek zmian na poziomie ultrastrukturalnym w komórkach E obu narządów tworzących u *N. davidi* jelito środkowe będzie prawdopodobnie związane z występowaniem innych mechanizmów utrzymujących homeostazę w tych komórkach.

W niniejszym projekcie zaplanowano przeprowadzenie analizy cyklu komórkowego w jelicie oraz wątrobotrzustce badanej krewetki, aby sprawdzić czy pod wpływem niklu lub w trakcie oczyszczania organizmu po wcześniejszej ekspozycji na nikiel, dochodzi do zmian w liczbie komórek będących w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Ponieważ zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce komórkami zdolnymi do podziałów mitotycznych są tylko komórki E, to pomimo, że badane ilościowo było całe jelito oraz cała wątrobotrzustka (wyizolowanie pojedynczych wszystkich komórek E z nabłonka obu narządów nie byłoby możliwe) to zmiany liczby komórek będących w poszczególnych fazach cyklu komórkowego będą wskazywać na zmiany dotyczące właśnie komórek E. Komórki D jelita oraz komórki F, B i R wątrobotrzustki są w pełni wyspecjalizowanymi komórkami nie zdolnymi do podziałów komórkowych (Sousa i inni 2005, Sonakowska i inni 2015, Sonakowska-Czajka i inni 2021).

Cykl komórkowy jest procesem wysoce regulowanym, w którym zachodzą kolejne fazy: pierwsza faza G_0/G_1 obejmująca m.in. biosyntezę białek i enzymów potrzebnych do replikacji DNA, faza S - replikacji DNA oraz faza G_2/M - synteza histonów oraz mitozy. W pozytywnej regulacji całego cyklu biorą udział kinazy

zależne od cyklin (CDKs - *cyclin-dependent kinases*) oraz cykliny (John i inni 2001). Komórki zwierzęce zawierają co najmniej dziewięć CDK, z których cztery, CDK1, 2, 3 i 4, są bezpośrednio zaangażowane w regulację cyklu komórkowego (Morgan 2007). Jak nazwa wskazuje, CDKs będą aktywowane wówczas, gdy nastąpi (zależna od fazy cyklu komórkowego) synteza cyklin. Spełnienie tego warunku umożliwi stworzenie kompleksów cyklina – kinaza zależna od cykliny (John i inni 2001, Morgan 2007), które z kolei będą fosforylowały substraty odpowiednie dla danej fazy cyklu komórkowego (Morgan 1997). Kompleksy cyklina - CDK z wcześniejszej fazy cyklu komórkowego pomagają aktywować kompleksy cyklina - CDK w późniejszej fazie (Morgan 2007) i będą regulowały przechodzenie komórki na kolejny etap cyklu komórkowego (John i inni 2001). Wśród dwóch głównych grup cyklin wyróżnia się: cykliny G_1/S oraz cykliny G_2/M . Cykliny G_1/S są niezbędne dla kontroli cyklu komórkowego w przejściu komórki z fazy G_1 na S. Stężenie danego rodzaju cykliny wzrasta, po czym gwałtownie maleje na skutek degradacji w określonym etapie cyklu komórkowego (John i inni 2001).

W regulacji cyklu komórkowego biorą udział także „punkty kontrolne” (ang. *checkpoint*) w fazach: G_1 , G_2 oraz M. Będąc z fazy G_1 , w zależności od warunków zewnętrznych i wewnętrznych komórka może opóźnić G_1 , może wejść w stan spoczynku G_0 lub przejść ten punkt kontrolny (Alberts i inni 2007). Uszkodzenie DNA jest główną przyczyną nie przechodzenia komórki w cykl komórkowy. Decyzja o zaangażowaniu się w nową rundę podziału komórki następuje, gdy komórka aktywuje transkrypcję zależną od kompleksu cykliny-CDK, która promuje wejście w fazę S (Bertoli i inni 2013). W czasie wczesnej fazy G_1 , represory (*pocket proteins*) wiążą się z czynnikami transkrypcyjnymi E2F. Rodzina genów E2F stanowi grupę czynników transkrypcyjnych, których celami jest wiele genów ważnych dla kontroli cyklu komórkowego. W punkcie kontrolnym G_2 komórka ponownie sprawdza DNA pod kątem uszkodzenia, czy niepełnej replikacji, a w miejscach uszkodzeń rekrutowane są odpowiednie kinazy, jak również ma miejsce aktywacja między innymi białka p53 w celu zatrzymania cyklu na tym etapie (Morgan 2007). Natomiast punkt kontrolny w mitozie występuje na etapie wrzeciona kariokinetycznego.

Dzięki analizie z wykorzystaniem MUSE Cell Cycle Kit uzyskano procent komórek będących w kolejnych fazach cyklu komórkowego: G_0/G_1 , S, G_2/M . Uzyskane

wyniki wskazują, że ekspozycja na nikiel przyczynia się do zmian w przebiegu cyklu komórkowego komórek budujących zarówno jelito, jak i wątrobotrzustkę *N. davidi*. Zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce w wyniku ekspozycji na metal wzrósł udział procentowy komórek będących w fazie G_0/G_1 , natomiast spadł udział komórek będących w fazie S i G_2/M . Obserwowane zmiany były intensywniejsze w jelicie niż w wątrobotrzustce. Tak więc można wywnioskować, że niezależnie od czasu trwania ekspozycji zwierząt na nikiel dochodziło do zablokowania syntezy DNA oraz mitoz, którym ulegają komórki E.

Jak wspomniano wcześniej, ekspozycja na nikiel przyczynia się do indukowania zmian degeneracyjnych w obrębie analizowanych narządów, w tym powodując uszkodzenie DNA. Kiedy DNA komórki zostaje uszkodzone, wówczas komórka taka ulega zatrzymaniu w fazie G_1 do czasu usunięcia defektu. Jeśli się tak jednak nie dzieje, wtedy następuje uruchomienie procesów prowadzących do śmierci komórki. Komórki takie nie wchodzi w fazę S i nie są w stanie kontynuować cyklu komórkowego, a to z kolei indukuje proces apoptozy (Trzcńska 2003). Na wczesnych etapach apoptozy komórki są w stanie podzielić się jedno- lub kilkukrotnie, dlatego też morfologicznie mogą być trudne do rozróżnienia (Darzynkiewicz i inni 1997, Trzcńska 2003).

Zwiększenie liczby komórek w fazie G_0/G_1 z równoczesnym obniżeniem odsetka komórek w fazie S na skutek głodzenia zaobserwowano między innymi u kraba *Eriocheir sinensis*, u którego autorzy tłumaczyli, że zatrzymanie proliferacji mogło nastąpić ze względu na oszczędzanie energii (Huang i inni 2020).

Przywrócenie krewetek do czystej wody przyczyniło się do spadku ilości komórek będących w fazie G_0/G_1 , obserwowane zwłaszcza w grupach **Ni 1:1**, **Ni 1:2**, gdzie uzyskane wartości są niższe niż kontrolne. W przypadku grup **Ni 2:1** i **Ni 2:2** parametr przypomina wartości kontrolne. Analizując parametr S, zaobserwowano, że w grupach **Ni 1:1** oraz **Ni 1:2** wartości wzrosły znacząco, natomiast w grupie **Ni 2:1** wartość jest wyższa niż kontrolna, ale grupa **Ni 2:2** pod tym względem przypomina kontrolę. Natomiast w przypadku fazy G_2/M największy wzrost zaobserwowano w grupach **Ni 1:1** i **Ni 1:2**, choć proporcjonalny do czasu oczyszczania wzrost udziału komórek tych zaobserwowano także w grupach **Ni 2:1** i **Ni 2:2**. W wątrobotrzustce obserwowano nieznaczne zmiany w badanych parametrach cyklu komórkowego, gdzie największe różnice w otrzymanych wartościach wynoszą około 1-2%. Natomiast

uzyskane wyniki odzwierciedlają zależności zaobserwowane w jelicie. Wzrost wartości odsetka komórek będących w fazie S lub G₂/M (zarówno w jelicie, jak i wątrobotrzustce) krewetki *N. davidi* na skutek przywrócenia do czystej wody może świadczyć o naprawie uszkodzonego DNA (będącego powodem zatrzymania w fazie G₀/G₁) i wznowienie cyklu.

Pośrednią rolę w regulacji faz G₀/G₁/S i G₂M cyklu komórkowego zaangażowana jest cyklina C, będąca wysoce konserwatywnym białkiem, które funkcjonalnie jest zaangażowane zarówno w pozytywną, jak i negatywną regulację transkrypcji we wszystkich organizmach eukariotycznych (Liu i inni 1998). Funkcja ta jest realizowana we współpracy z kinazami cyklinozależnymi (CDK) CDK8 i CDK3 podczas progresji cyklu komórkowego (Janpoom i inni 2021). Cykliny C, A oraz B opisane zostały na przykład u krewetki *Penaeus monodon* (Visudtiphole i inni 2009, Janpoom i inni 2021) oraz CDK1 (Phinyo i inni 2013). U krewetki *Litopenaeus vannamei* poddanej stresowi w postaci hipoksji (niewystarczającej ilości tlenu) badano rolę białka p53 w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy w obrębie wątrobotrzustki. Eksperyment skonstruowano w taki sposób, że wyciszono p53 przez RNAi i następnie krewetki eksponowano na wspomniany stresor. Jako wskaźnik postępu cyklu komórkowego wybrano Cdk2, a kaspazę-3 jako wskaźnik apoptozy. W rezultacie przeprowadzonego eksperymentu poziom p53 był znacząco wyższy po 48h ekspozycji. Zwiększony poziom ekspresji Cdk-2 zaobserwowano u krewetek z wyciszonym p53 zarówno w grupach kontrolnych, jak i eksperymentalnych (24 i 48 h). Wzrost ekspresji kaspazy-3 zaobserwowano w grupie z wyciszonym p53, poddanej hipoksji, ale też w grupie normoksycznej po 24 h. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na możliwą rolę p53 w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy u analizowanej krewetki (Nuñez-Hernandez i inni 2018).

Ekspresję genu enzymu sprzęgającego ubikwitynę E2 (z ang. *ubiquitin conjugating enzyme E2 gene*), odpowiedzialnego między innymi za regulację cyklu komórkowego, badano u krewetki *Penaeus monodon* poddając zwierzęta na stres wynikający z różnych wartości zasolenia. W niższych warunkach zasolenia zaobserwowano niższą ekspresję genu w jelicie, natomiast wyższą w mięśniach (Shekhar i inni 2013). W przypadku blisko spokrewnionej krewetki *Homarus americanus* z kolei stres osmotyczny wywołał zwiększone poziomy poliubikwityny

mRNA podczas obu rodzajów stresu hipo- i hiperosmotycznego w mięśniach, a w wątrobotrzustce zaobserwowano znaczny wzrost poliubikwityny mRNA tylko podczas stresu hipoosmotycznego. Te zmiany w ekspresji genów ubikwityny obserwowane podczas stresu osmotycznego wskazują, że białka mogą być bardziej podatne na fluktuacje jonowe wpływając na fałdowanie powstających białek po translacji (Spees 2002). Enzym sprzęgający ubikwitynę E2, został zidentyfikowany z chińskiej białej krewetki (*Chinese white shrimp*) *Fenneropenaeus chinensis* (FcUbc). Wstrzyknięcie rekombinowanego białka FcUbc wykazało zmniejszoną śmiertelność krewetek zakażonych wirusem zespołu plamistego (WSSV - *white spot syndrome virus*) i zahamował replikację WSSV wskazując na przeciwwirusową funkcję Ubc E2 u krewetek (Chen i inni 2011). Badania nad wpływem stresorów na cykl komórkowy prowadzono także między innymi na owadach. U świerszcza domowego (*Acheta domestica*) podanie z pożywieniem tlenku grafenu indukuje uszkodzenia DNA na poziomie około 35% i przyczynia się do zaburzenia faz cyklu komórkowego oraz powoduje nasilenie apoptozy (Dziewięcka i inni 2017). Natomiast żywność z dodatkiem nanodiamentów nie wpływa na cykl komórkowy u tego gatunku przy krótkich ekspozycjach (Karpeta-Kaczmarek i inni 2016b). Przeprowadzono także badania nad wpływem metali ciężkich bezpośrednio na linię komórek embrionalnych komara tygrysiego *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Niskie stężenia MeHgCl powodowały zarówno śmierć komórek, jak i hamowanie proliferacji komórek; HgCl₂ przede wszystkim rozrywał błony komórkowe, podczas gdy CdCl₂ głównie przyczynił się do hamowania proliferacji komórek (Braeckman i inni 1997). Cykl komórkowy u owadów może także się zmienić, kiedy pod wpływem niesprzyjających warunków zwierzęta te wchodzi w diapauzę. Wprowadzenie w warunkach laboratoryjnych muchówki *Chymomyza costata* w diapauzę spowodowało zatrzymanie komórek w cyklu komórkowym w fazie G₀/G₁ (86,6%) i G₂ (12,8%) (Kostal i inni 2009).

Analiza z wykorzystaniem MUSE Ki67 Proliferation Kit umożliwiła uzyskanie informacji dotyczących procentowego rozkładu komórek nieproliferujących oraz proliferujących. Podczas interfazy antygen Ki67 można wykryć wyłącznie w jądrze, podczas gdy w mitozie większość białka jest przenoszona na powierzchnię chromosomów. Fakt, że białko Ki67 jest obecne we wszystkich aktywnych fazach cyklu komórkowego (G₁, S, G₂ i mitoz), ale nie występuje w komórkach spoczynkowych

(G₀), czyni je doskonałym markerem do określania tzw. frakcji wzrostu danej populacji komórek (Scholzen i Gerdes 2000, Cuylen i inni 2016). Badacze twierdzą, że antygen Ki67 działa jako środek powierzchniowo czynny, który umożliwia ruchliwość chromosomu i jego interakcję z wrzecionem mitotycznym, zapobiegając w ten sposób zapadnięciu się chromosomu w masę chromatyny po rozerwaniu otoczki jądrowej (Cuylen i inni 2016). Ki67 odgrywa rolę w transkrypcji rRNA, co może wyjaśniać związek między proliferacją komórek i jego ekspresją (Rahmanzadeh i inni 2007). Z kolei Sobecki i inni (2016) sugerują, że Ki67 bierze udział w zagęszczaniu i organizacji heterochromatyny przez kompleksy metylacji histonów wymagane dla utrzymania heterochromatyny (Sobecki i inni 2016, Menon i inni 2019).

Poziom proliferacji komórek mierzony z wykorzystaniem detekcji komórek Ki67(+) wykazał wpływ przeprowadzonego eksperymentu na jelito i wątrobotrzustkę *N. davidi*. W jelicie tygodniowa ekspozycja (grupa **Ni 1:0**) wywołała najwyższy wzrost ilości komórek Ki67(+), a dwutygodniowa ekspozycja (grupa **Ni 2:0**) spadek poniżej wartości kontrolnych. Przywrócenie do czystej wody spowodowało w grupach **Ni 1:1** i **Ni 1:2** spadek komórek Ki67(+) proporcjonalny do czasu oczyszczania, podczas gdy w grupie **Ni 2:1** obserwuje się zwiększenie liczby tych komórek, powyżej wartości kontrolnych, a w grupie **Ni 2:2** najwyższy spadek wartości parametru w całym jelicie. W wątrobotrzustce analiza wykazała wzrost odsetka komórek Ki67(+) w prawie wszystkich grupach eksperymentalnych, z wyjątkiem grupy **Ni 1:2**, gdzie obserwowano najniższe wartości. Wzrost komórek Ki67 (+) w obrębie grup **Ni 1:0** i **Ni 1:2** oraz **Ni 2:0** i **Ni 2:1** występował proporcjonalnie do czasu trwania eksperymentu. Uzyskane wyniki wskazują na to, że w wyniku ekspozycji na nikiel, a także ponownego przywrócenia do wody czystej następuje regulacja cyklu komórkowego i proliferacji, wykorzystywanych jako jeden z mechanizmów przywrócenia homeostazy.

6. PODSUMOWANIE

Podczas eksperymentu dorosłe osobniki *Neocaridina davidi* były eksponowane na nikiel przez tydzień oraz 2 tygodnie, a następnie były przywrócone do czystej wody na tydzień i 2 tygodnie w celu weryfikacji odwracalności potencjalnie pojawiających się zmian. Przy użyciu technik ilościowych oraz jakościowych zbadano wpływ przeprowadzonego eksperymentu na następujące parametry:

- stężenie niklu gromadzonego w krewetkach;
- gromadzenie materiałów zapasowych w komórkach jelita i wątrobotrzustki;
- aktywację autofagii oraz ogólny poziom degeneracji komórek;
- zmiany strukturalne i funkcjonalne w mitochondriach;
- poziom stresu oksydacyjnego;
- wskaźniki śmierci komórkowej, w tym kaspazy, procesy apoptozy i nekrozy;
- proliferację komórek.

Uzyskane wyniki wskazują, że obecność niklu w środowisku życia krewetki *N. davidi* wpływa na w/w parametry. Ekspozycja na nikiel przyczynia się do zwiększenia stężenia gromadzonego niklu w ciele zwierząt, a także powoduje intensyfikację zmian degeneracyjnych w jelicie środkowym (jelicie i wątrobotrzustce), włączając w to degenerację organelli komórkowych, mitochondriów, intensyfikując stres oksydacyjny, prowadząc do procesów śmierci komórkowej w postaci apoptozy i nekrozy oraz zatrzymując cykl komórkowy i proliferację komórek. Obserwowane zmiany były intensywniejsze zwłaszcza przy dwóch tygodniach ekspozycji na metal. A porównując oba narządy, w jelicie zmiany zachodziły intensywniej.

Przywrócenie krewetek do czystej wody przyczyniło się z kolei do częściowego odwrócenia zmian wywołanych obecnością ksenobiotyku. Regeneracja była intensywniejsza zwłaszcza po przywróceniu zwierząt do czystej wody na 2 tygodnie i szybciej następowała w wątrobotrzustce. Nie mniej jednak, nawet przywrócenie zwierząt do czystej wody na 2 tygodnie nie było wystarczającym czasem do pełnej regeneracji analizowanych narządów i przywrócenia parametrów poziomów kontrolnych w większości przeprowadzonych analiz.

Podsumowanie i zestawienie uśrednionych wartości uzyskanych wyników przedstawiają tabele odpowiednio: dla stężenia niklu (Tabela 6), dla jelita (Tabela 7), dla wątrobotrzustki (Tabela 8). Szczegółowe opisy wykorzystanych metod oraz analiza uzyskanych wyników znajdują się w rozdziałach Materiały i Metody oraz Wyniki.

Tabela 6. Uśrednione wartości stężenia niklu gromadzonego w krewetkach *Neocaridina davidi* w wyniku przeprowadzonego eksperymentu

PARAMETR		CT	Ni 1:0	Ni 1:1	Ni 1:2	Ni 2:0	Ni 2:1	Ni 2:2
Stężenie niklu [mg kg ⁻¹ suchej masy]	oznaczenie I	<LOD	85	52	48	36	56	42
	oznaczenie II	<LOD	73	60	36	52	90	54
	oznaczenie III	<LOD	85	60	34	54	63	67

Objaśnienia: <LOD - poniżej granicy wykrywalności

Tabela 7. Uśrednione wartości uzyskanych wyników z analizowanych parametrów w jelicie *Neocaridina davidi* w rezultacie przeprowadzonego eksperymentu

Parametr	Jelito													
	K	Ni 1:0	Ni 1:1	Ni 1:2	Ni 2:0	Ni 2:1	Ni 2:2							
Histochemia - gromadzenie materiałów zapasowych (aj)														
PAS	-	-	-	-	-	-	-							
BPB	-	-	-	-	-	-	-							
Sudan Czarny B	-	-	-	-	-	-	-							
Autofagia i ogólna degeneracja komórek (aj)														
TEM - ogólna degeneracja	-	+	+	-	+++	+++	++							
LysoTracker	-	-	+	-	++	-	-							
TEM - autofagia	-	+	+	-	+++	++	+							
Mitochondria														
TEM - degeneracja, (aj)	-	+	+	+/-	+++	+++	++							
MitoPotential, (ai) [%]	3,5	4,3	4,6	7,5	5,9	4,2	4,5							
ATP, (ai) [nmol/mg białka]	5,5	6,2	3,4	3,1	2,2	3,1	3,4							
ADP/ATP, (ai)	0,25	0,2	1,3	0,8	1,25	2,1	0,8							
Stres oksydacyjny														
Oxidative Stres, (ai) [%]	5	10	14	13	16	20	24							
ROS, (aj)	+/-	+	+	+	++	+++	+++							
Wskaźniki śmierci komórkowej														
MultiCaspase Kit, (ai) [%]	żywe (+)	8	5,5	6	1	8	40	6						
	martwe (+)	2,3	0,85	1,8	0,4	2,5	1,1	0,25						
Apoptoza - TEM, (aj)														
Aneksyna V, (ai) [%]	Apoptoza wczesna	0,8	1	9,7	1	1	2,5	2,5						
	Apoptoza późna	2	2,5	3,5	3	2	5,5	4,5						
	Nekroza	6	10	8,5	22,5	8	13	16,5						
Nekroza - TEM, (aj)														
Proliferacja komórek (ai)														
CellCycle [%]	G ₀ /G ₁	94	98,5	88	87	98	92	93						
	S	2,3	0,8	4,8	6	1,3	3,3	2						
	G ₂ /M	3,8	0,7	7,2	7	0,7	4,7	5						
Ki67 [%]														
Ki67 [%]								9,8	15,8	6,6	5,2	9	11	3,2

Objaśnienia: (ai) - analiza ilościowa, (aj) - analiza jakościowa, kolor różowy wartości wyższe od kontroli, kolor niebieski wartości niższe od kontroli, gradient kolorystyczny przedstawia stopień oddalenia wyniku od wartości kontrolnych (im intensywniejsza barwa tym wyższa różnica w porównaniu do kontroli), brak wypełnienia oznacza brak istotnych różnic w stosunku do kontroli

Tabela 8. Uśrednione wartości uzyskanych wyników z analizowanych parametrów w wątrobotrzustce *Neocaridina davidi* w wyniku przeprowadzonego eksperymentu

Parametr	Wątrobotrzustka							
	K	Ni 1:0	Ni 1:1	Ni 1:2	Ni 2:0	Ni 2:1	Ni 2:2	
Histochemia - gromadzenie materiałów zapasowych w komórkach B (aj)								
PAS	+++	+	+	+	+	++	+	
BPB	-	+	-	-	-	+	-	
Sudan Czarny B	+++	++	+	+	+	+	+	
Autofagia i ogólna degeneracja komórek (aj)								
TEM - ogólna degeneracja	-	+	+	-	++	++	+	
LysoTracker	++	+++	+	+	++	+	+/-	
TEM - autofagia	-	+	++	++	++	+	++	
Mitochondria								
TEM - ogólna degeneracja, (aj)	-	-	-	-	++	-	-	
MitoPotential, (ai) [%]	0,01	0,14	0,2	0,37	0,5	0,05	0,13	
ATP, (ai) [nmol/mg białka]	10,5	6	3,75	4,75	2	4,5	2,75	
ADP/ATP, (ai)	0,2	0,2	1,2	0,75	1,9	0,4	0,25	
Stres oksydacyjny								
Oxidative Stres, (ai) [%]	5	10	32	24	24	29	20	
ROS, (aj)	+/-	+	++	+	++	++	+	
Wskaźniki śmierci komórkowej								
MultiCaspase Kit, (ai) [%]	żywe (+)	7,5	22,5	8,5	1,5	12	23,5	4
	martwe (+)	1	0,1	2,8	0,25	0,7	0,85	0,65
Apoptoza - TEM, (aj)								
Aneksyna V, (ai) [%]	Apoptoza wczesna	4,5	5,1	2,8	1,8	6,5	3,6	1,8
	Apoptoza późna	10	14	6,5	6	3,1	6,5	6,5
	Nekroza	6	12,5	6,1	5,8	10,5	5	4
Nekroza - TEM (aj)								
Proliferacja komórek (ai)								
CellCycle [%]	G ₀ /G ₁	98	98,5	96	96	99,4	98	98,4
	S	1,25	1	2,5	2,25	0,4	1,45	1
	G ₂ /M	0,75	0,5	1,5	1,75	0,2	0,55	0,6
Ki67 [%]								
		9,5	12	14,8	4,2	11,8	16,4	12,5

Objaśnienia: (ai) - analiza ilościowa, (aj) - analiza jakościowa, kolor różowy- wartości wyższe od kontroli, kolor niebieski- wartości niższe od kontroli, gradient kolorystyczny przedstawia stopień oddalenia wyniku od wartości kontrolnych (im intensywniejsza barwa tym wyższa różnica w porównaniu do kontroli), brak wypełnienia oznacza brak istotnych różnic w stosunku do kontroli

Przeprowadzenie eksperymentu umożliwiło potwierdzenie następujących hipotez badawczych:

1. Obecność niklu w wodzie wywołuje zmiany na poziomie ultrastrukturalnym w komórkach nabłonka jelita i wątrobotrzustki słodkowodnych krewetek.
2. Wraz z wydłużającym się czasem życia słodkowodnych krewetek w wodzie zawierającej nikiel pojawiają się liczne zmiany degeneracyjne w komórkach nabłonka jelita i wątrobotrzustki.
3. Obecność niklu w wodzie wpływa na aktywację autofagii i/lub apoptozy u badanego gatunku słodkowodnej krewetki, co może być związane ze strategią przetrwania w czasie działania niekorzystnych warunków bytowania lub uszkodzeniami wywołanymi obecnością metalu w środowisku życia.
4. Obecność niklu w wodzie wpływa na aktywację gromadzenia reaktywnych form tlenu, zmiany mitochondrialne i/lub poziom ATP w komórkach jelita i wątrobotrzustki słodkowodnej krewetki.
5. Hodowanie zwierząt w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na nikiel ma wpływ na procesy regeneracyjne w komórkach jelita i wątrobotrzustki.
6. W wybranych do badań narządach zachodzą podobne procesy degeneracyjne/regeneracyjne wywołane obecnością niklu w środowisku lub po umieszczeniu zwierząt ponownie w wodzie czystej.

7. WNIOSKI

Na podstawie wyników uzyskanych z przeprowadzonego eksperymentu można wywnioskować, że:

1. Nikiel jest dla krewetki *Neocaridina davidi* metalem cytotoksycznym. Gromadzi się w ciele zwierząt w wysokich stężeniach i pozostaje w nich pomimo oczyszczania. Krewetki nie dysponują wystarczająco wydajnym mechanizmem oczyszczania w sytuacji obecności w środowisku wysokiego stężenia metalu.
2. W odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska, wykorzystane zostały rezerwy energetyczne, nastąpiła aktywacja procesów autofagii, apoptozy i nekrozy. Dominujący udział w degeneracji nabłonków miała nekroza.
3. Nikiel w środowisku życia zwierząt przyczynił się do zaburzenia struktury i funkcji mitochondriów oraz przyczynił się do indukcji stresu oksydacyjnego w obu analizowanych narządach.
4. Obecność ksenobiotyku przyczyniła się do zatrzymania cyklu komórkowego oraz spowolniła proliferację komórek.
5. Ekspozycja na nikiel, zwłaszcza wydłużająca się, proporcjonalnie intensyfikowała pojawiające się zmiany w analizowanych parametrach zarówno w jelicie, jak i wątrobotrzustce. Natomiast w jelicie zmiany były intensywniejsze niż w wątrobotrzustce, co może wiązać się z funkcją narządu i obecnością mechanizmów dektoksyfikacyjnych/ regenerujących
6. Wydłużający się powrót do czystej wody po wcześniejszej ekspozycji na nikiel wiązał się z proporcjonalnym do czasu oczyszczania spadkiem wartości w analizowanych parametrach. Jednak czas regeneracji nie był wystarczający do powrotu do wartości kontrolnych w większości analizowanych parametrów.
7. Krewetki wykazują względną tolerancję na nikiel, pod warunkiem krótkiego czasu ekspozycji i długiego regeneracji.

8. STRESZCZENIE

Nikiel jest jednym z wielu pierwiastków szeroko rozprzestrzenionym w środowisku lądowym, czy słodkowodnym, a pochodzić może zarówno ze źródeł naturalnych, jak i na skutek działalności antropogenicznej. Jest jednak niezbędnym metalem dla niektórych gatunków zwierząt, mikroorganizmów oraz roślin, dlatego też przy niewystarczającej, bądź nadmiernej podaży tego pierwiastka mogą wystąpić objawy niedoboru, czy toksyczności. Jednym z narządów, które mają bezpośredni kontakt z ksenobiotykami występującymi w środowisku życia, czy spożywanej wodzie i pokarmie jest u bezkręgowców jelito środkowe. U słodkowodnych skorupiaków, jak na przykład u popularnej wśród hodowców na całym świecie krewetce *Neocaridina davidi*, jest zbudowane z jelita oraz watrobotrzustki. Narządy te wyścielone są nabłonkiem tworzonym przez wyspecjalizowane komórki: D (w jelicie), czy B, F i R (w watrobotrzustce), a za funkcje regeneracyjne odpowiadają w tych narządach komórki E.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu niklu na jelito środkowe słodkowodnej krewetki *Neocaridina davidi*, który naturalnie nie występuje w wysokich stężeniach w ich środowisku życia. Zwierzęta były ekspozycjonowane na nikiel obecny w wodzie przez tydzień i 2 tygodnie, a następnie przywrócone do czystej wody na tydzień i 2 tygodnie w celu weryfikacji, czy potencjalnie pojawiające się zmiany są odwracalne.

Przy użyciu metod ilościowych i jakościowych zbadano wpływ przeprowadzonego eksperymentu na:

- gromadzenie się metalu w ciele zwierząt;
- aktywację procesów degeneracyjnych, w tym autofagię, apoptozę, nekrozę;
- strukturę i funkcję mitochondriów, w tym na gospodarkę energetyczną komórek;
- indukcję stresu oksydacyjnego;
- cykl komórkowy oraz proliferację.

Uzyskane wyniki wskazują na szkodliwe działanie niklu na krewetki *N. davidi*. W grupach ekspozycyjnych obserwowano proporcjonalną do długości ekspozycji intensyfikację zmian w/w parametrów. W jelicie zmiany były intensywniejsze niż w

wątrobotrzustce. Przywrócenie krewetek do czystej wody po wcześniejszej ekspozycji na metal wiązało się ze stopniową regeneracją, intensywniejszą przy 2 tygodniach oczyszczania. Natomiast w większości analizowanych parametrów czas ten nie był wystarczający do przywrócenia parametrów kontrolnych.

Część uzyskanych wyników powstała w związku z realizacją projektu badawczego nr 2021/41/N/NZ8/01436

pt. Ocena zmian w mitochondriach oraz aktywności wybranych enzymów i białek mitochondrialnych u słodkowodnych krewetek poddanych ekspozycji na nikiel oraz przywróconych do życia w wodzie nieskażonej

finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN)

9. ABSTRACT

Nickel is one of the elements widely distributed in the terrestrial or freshwater environment, and it can come from both natural sources and as a result of anthropological activity. However, it is an essential metal for some species of animals, microorganisms, and plants, therefore, with insufficient or excessive supply of this element, symptoms of deficiency or toxicity may occur. One of the invertebrates' organs that have direct contact with xenobiotics in the living environment, or the water and food consumed, is the midgut. In freshwater crustaceans, such as the *Neocaridina davidi*, popular among breeders worldwide, it is composed of the intestine and the hepatopancreas. These organs are covered with epithelium formed by specialized cells: D (in the intestine) or B, F, and R (in the hepatopancreas), while E-cells are responsible for regenerative functions in these organs.

This study aimed to investigate the effect of nickel on the midgut of the freshwater shrimp *N. davidi*, which is not naturally present in high concentrations in their habitat. The animals were exposed to nickel in the water for one week and two weeks and then returned to clean water for one week and two weeks to verify that the changes that appeared were reversible. Using quantitative and qualitative methods, several parameters were checked:

- accumulation of metal in the body of animals;
- activation of degenerative processes, including autophagy, apoptosis, and necrosis;
- the structure and function of mitochondria, including the ATP level in cells;
- induction of oxidative stress;
- the cell cycle and proliferation.

The obtained results indicate the harmful effect of nickel on *N. davidi* shrimps. In the exposure groups, an intensification of changes in the above-mentioned conditions was observed, proportional to the length of exposure. In the intestine, the changes were more intense than in the hepatopancreas. Returning the shrimp to clean water after previous exposure to metal was associated with a gradual regeneration, more intensive after 2 weeks of purification. However, in most of the analyzed parameters, this time was not sufficient to restore the control parameters.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Ahearn G.A., Mandal P.K., Mandal A. 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*. 174: 439-452.
2. Al-Dhafar Z.M., Sharaby A. 2012. Effect of zinc sulfate against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* with reference to their histological changes on the larval midgut and adult reproductive system. *J Agricult Sci Technol*. 2(7A): 888–936.
3. Al-Mohanna S.Y., Nott J.A. 1985. The accumulation of metals in the hepatopancreas of the shrimp *Panaeus semisulcatus* de Haan (Crustacea, Decapoda) during the moult cycle. pp. 195–207. In. *Proc. Conf. Mar. Envir. Poll. Kuwait, February 7–9 1982*.
4. Al-Mohanna S.Y., Nott J.D. 1986. B-cells and ingestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J Mar Biol Assoc UK*. 66: 403–414.
5. Al-Mohanna S.Y., Nott J.D. 1987. M-“midget” cells and the moult cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J Mar Biol Assoc UK*. 67: 803–813.
6. Al-Mohanna S.Y., Nott J.D. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Mar Biol*. 101: 535–544.
7. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. 2007. *Molecular biology of the cell* (5th ed.). New York: Garland Science. ISBN 9780815341055.
8. Ali M.H.H., Fishar, M.R.A. 2005. Accumulation of trace metals in some benthic invertebrate and fish species relevant to their concentration in water and sediment of lake Qarun, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 31(1): 289-301.
9. Allen H.E., Halley-Henderson M.A., Hass C.N. 1989. Chemical composition of bottled mineral water. *Arch Environ Health*. 44: 102–16.

10. Andersen J.T., Baatrup E. 1988. Ultrastructural localization of mercury accumulations in the gills, hepatopancreas, midgut, and antennal glands of the brown shrimp, *Crangon crangon*. *Aquat Toxicol.* 13: 309–324.
11. Argasinski K., Bednarska A., Laskowski R. 2012. The toxicokinetics cell demography model to explain metal kinetics in terrestrial invertebrates. *Ecotoxicology.* 21:2186–2194.
12. Arnaud J., Brunet M., Mazza J. 1978. Studies on the midgut of *Centropages typicus* (Copepod, Calanoid). I. Structural and ultrastructural data. *Cell Tissue Res.* 187: 333–353. PMID: 630601
13. Banumathi B., Vaseeharan B., Ishwarya R., Govindarajan M., Alharbi N.S., Kadaikunnan S. 2017. Toxicity of herbal extracts used in ethno-veterinary medicine and green-encapsulated ZnO nanoparticles against *Aedes aegypti* and microbial pathogens. *Parasitol Res.* 116(6): 1637–51.
14. Bao Q., Shi Y. 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death & Differentiation.* 14(1): 56-65.
15. Barańkiewicz D., Siepak J. 1999. Chromium, nickel and cobalt in environmental samples and existing legal norms. *Polish J. Environ. Studies* 8 (4): 201.
16. Barathkumar S., Padhi R.K., Parida P.K., Marigoudar S.R. 2022. In vivo appraisal of oxidative stress response, cell ultrastructural aberration and accumulation in Juvenile *Scylla serrata* exposed to uranium. *Chemosphere*, 300: 134561.
17. Barceloux D.G., Barceloux, D. 1999. Nickel. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology.* 37(2): 239-258.
18. Barker P.L., Gibson R. 1978. Observations of the structure of the mouthparts, histology of the alimentary tract, and digestive physiology of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) (Decapoda, Portunidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 32: 177–196.
19. Bartosz G. 1998. Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Postępy Biochemii.* 44(1): 22-31.
20. Bednarska A.J., Brzeska A., Laskowski R. 2011. Two-phase uptake of nickel in the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* (Coleoptera: Carabidae):

- implications for invertebrate metal kinetics. *Arch Environ Contam Toxicol.* 60:722–733.
21. Bednarska A.J., Laskowski R., Pyza E., Semik D., Świątek Z., Woźnicka O. 2016. Metal toxicokinetics and metal-driven damage to the gut of the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus*. *Environmental Science and Pollution Research.* 23: 22047-22058.
 22. Bednarska A.J., Opyd M., Żurawicz E., Laskowski R. 2015. Regulation of body metal concentrations: toxicokinetics of cadmium and zinc in crickets. *Ecotoxicol Environ Saf.* 119: 9–14.
 23. Bednarska A.J., Stachowicz I. 2013. Costs of living in metal polluted areas: respiration rate of the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* from two gradients of metal pollution. *Ecotoxicology.* 22: 118-124.
 24. Bednarska A.J., Stachowicz I., Kuriańska L. 2013. Energy reserves and accumulation of metals in the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* from two metal-polluted gradients. *Environmental Science and Pollution Research.* 20: 390-398.
 25. Bedner E., Smolewski P., Amstad P., Darzynkiewicz Z. 2000. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Experimental cell research.* 259(1): 308-313.
 26. Bencko V. 1983. Nickel: A review of its occupational and environmental toxicology. *J. Hyg. Epidem. Micro. Immun.* 27: 237.
 27. Bertoldi D., Bontempo L., Larcher R., Nicolini G., Voerkelius S., Lorenz G.D. 2011. Survey of the chemical composition of 571 European bottled mineral waters. *J Food Compost Anal.* 24: 376–85.
 28. Bertoli C., Skotheim J.M., De Bruin R.A. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews Molecular cell biology.* 14(8): 518-528.
 29. Blankenberg F.G., Tait J.F., Strauss H.W. 2000. Apoptotic cell death: its implications for imaging in the next millennium. *European journal of nuclear medicine.* 27: 359-367.

30. Blaylock B.G., Frank M.L. 1979. Comparison of the toxicity of nickel to the developing eggs and larvae of carp (*Cyprinus carpio*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. (United States). 21.
31. Blewett T.A., Glover C.N., Fehsenfeld S., Lawrence M.J., Niyogi S., Goss G.G., Wood C.M. 2015. Making sense of nickel accumulation and sub-lethal toxic effects in saline waters: Fate and effects of nickel in the green crab, *Carcinus maenas*. Aquatic Toxicology. 164: 23-33.
32. Błaszczyk F. 2022. Zmiany w strukturze i ultrastrukturze komórek jelita środkowego i ciała tłuszczowego dwuparca *Telodeinopus aoutii* (Myriapoda, Diplopoda) pod wpływem diety wzbogaconej w gluten. Praca doktorska. UŚ. Katowice 2022.
33. Bonelli M., Bruno D., Caccia S., Sgambetterra G., Cappellozza S., Jucker C., Tettamanti G., Casartelli M. 2019. Structural and functional characterization of *Hermetia illucens* larval midgut. Frontiers in Physiology 10: 204.
34. Braeckman B., Raes H., Van Hove D. 1997. Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. Cell biology and toxicology. 13: 389-397.
35. Bratton D.L., Fadok V.A., Richter D.A., Kailey J.M., Guthrie L.A., Henson P. M. 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. Journal of Biological Chemistry: 272(42): 26159-26165.
36. Broker L.E., Kruyt F.A., Giaccone G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. Clinical Cancer Research. 11(9): 3155-3162.
37. Caceci T., Neck K.F., Lewis D.H., Sis R.F. 1988. Ultrastructure of hepatopancreas of the pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). J Mar Biol Assoc UK. 68: 323-337.
38. Calow P. 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology. 100(1-2): 3-6.

39. Cano M., Wang L., Wan J., Barnett B. P., Ebrahimi K., Qian J., Handa J. T. 2014. Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction and a protective unfolded protein response in RPE cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 69: 1-14.
40. Carocci A., Catalano A., Lauria G., Sinicropi M.S., Genchi G. 2016. Lead Toxicity, antioxidant defense and environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 238: 45–67.
41. Cebollero E., Reggiori F., Kraft C. 2012. Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories. *International Journal of Cell Biology*. 6: 182834.
42. Ceccaldi H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Adv Trop Aquacult*. 9: 243–259.
43. Ceccaldi H.J. 1998. Synopsis of the Morphology and Physiology of the Digestive System of Some Crustacean Species Studied in France, *Reviews in Fisheries Science*. 6:1-2, 13-39.
44. Cempel M., Nikel G.J.P.J.S. 2006. Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. *Polish journal of environmental studies*. 15(3).
45. Chabicovsky M., Klepal W., Dallinger R. 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: programmed cell death and metallothionein overload. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 23(3): 648-655.
46. Chandra D., Tang D.G. 2009. Detection of apoptosis in cell-free systems. *Apoptosis: Methods and Protocols*. Second Edition. 65-75.
47. Chandra J., Samali A., Orrenius S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free radical biology and medicine*. 29(3-4): 323-333.
48. Chang H.Y., Yang X. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64(4): 821-846.
49. Chen A.J., Wang S., Zhao X.F., Yu X. Q., Wang J.X. 2011. Enzyme E2 from Chinese white shrimp inhibits replication of white spot syndrome virus and ubiquitinates its RING domain proteins. *Journal of virology*. 85(16): 8069-80.
50. Chiodi Boudet L.N., Polizzi P., Romero M.B., Robles A., Marco-Vecchio J.E., Gerpe M.S. 2015. Histopathological and biochemical evidence of

- hepatopancreatic toxicity caused by cadmium in white shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 113: 231–240.
51. Christofolletti C.A., Francisco A., Fontanetti C.S. 2012. Biosolid soil application: toxicity tests under laboratory conditions. *Applied and Environmental Soil Science*, 2012.
 52. Clarkson T.W. 1988. *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Plenum Press: New York. pp 265-282.
 53. Clayton G.D., Clayton F.E. 1994. *Patty's Industrial Hygiene Toxicology*, 4th ed.; A Wiley-Interscience Publication: New York, pp 2157-2173.
 54. Coleman ChO. 1990. Anatomy of the alimentary canal of *Parandania boeckii* (Stebbing, 1888) (Crustacea, Amphipoda, Stegocephalidae) from the Antarctic Ocean. *J Nat Hist.* 24: 1573–1585.
 55. Coogan T.P., Latta D.M., Snow E.T., Costa M. 1989. Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 19 (4): 341.
 56. Correia A.D., Pereira A.L., Costa M.H., Carrapiço F. 2002. Functional anatomy of the midgut gland of *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J Mar Biol Assoc UK.* 82: 201–204.
 57. Cory S. 1998. Cell death throes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 95(21): 12077-12079.
 58. Cuylen S., Blaukopf C., Politi A.Z., Müller-Reichert T., Neumann B., Poser I., ... & Gerlich D.W. 2016. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature.* 535(7611): 308-312.
 59. D'arcy M.S. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international.* 43(6): 582-592.
 60. Darzynkiewicz Z., Bedner E., Smolewski P. 2001. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. In *Seminars in hematology.* 38(2): 179-193).
 61. Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology.* 27(1): 1-20.
 62. das Dores Teixeira A., Fialho M.D.C.Q., Zanuncio J.C., de Souza Ramalho F., Serrão J.E. 2013. Degeneration and cell regeneration in the midgut of *Podisus*

- nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) during post-embryonic development. *Arthropod Structure & Development*. 42(3): 237-246.
63. Das K.K., Reddy R.C., Bagoji I.B., Das S., Bagali S., Mullur L., (...), Biradar M. S. 2019. Primary concept of nickel toxicity—an overview. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 30(2): 141-152.
64. Davis L.E., Burnett A.L. 1964. A study of growth and cell differentiation in the hepatopancreas of the crayfish. *Dev Biol*. 10:122–153.
65. De Coen W.M., Janssen C.R. 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6: 43-55.
66. De Coen W.M., Janssen C.R. 2003a. The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 22(7): 1632-1641.
67. De Coen W.M., Janssen C.R. 2003b. A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 22(9): 2195-2201.
68. De Paz O. 1986. Age estimation and postnatal growth of the greater mouse bat *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797) in Guadalajara, Spain.
69. Denecker G., Vercammen D., Declercq W., Vandenabeele P. 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 58: 356-370.
70. Deska M. 2020. Activity of antioxidant enzymes under induced oxidative stress. *Journal of Ecological Engineering*. 21(7).
71. Diagonanolin V., Farhang M., Ghazi-Khansari M., Jafarzadeh N. 2004. Heavy metals (Ni, Cr, Cu) in the Karoon waterway river, Iran. *Toxicol. Lett*. 151 (1): 63.
72. Diwan B.A., Kasprzak K.S., Rice J.M. 1992. Transplacental carcinogenic effects of nickel(II) acetate in the renal cortex, renal pelvis and adenohypophysis in F344/NCr rats. *Carcinogenesis*. 13: 1351–7.

73. Donker M.H. 1992. Energy reserves and distribution of metals in populations of the isopod *Porcellio scaber* from metal-contaminated sites. *Functional ecology*. 445-454.
74. Dziewięcka M., Karpeta-Kaczmarek J., Augustyniak M., Rost-Roszkowska M. 2017. Short-term in vivo exposure to graphene oxide can cause damage to the gut and testis. *Journal of Hazardous Materials*. 328: 80-89.
75. Dziock F., Henle K., Foeckler F., Follner K., Scholz M. 2006. Biological indicator systems in floodplains - a review. *Int Rev Hydrobiol*. 4:271-291. DOI: 10.1002/iroh.200510885.
76. Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer research*. 57(10): 1835-1840.
77. Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H.U., Kimchi A.J.C.D. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death & Differentiation*. 16(7): 966-975.
78. El-Ashram S., Ali A.M., Osman S.E., Huang S., Shouman A.M., Kheirallah D.A. 2021. Biochemical and histological alterations induced by nickel oxide nanoparticles in the ground beetle *Blaps polychresta* (Forskl, 1775)(Coleoptera: Tenebrionidae). *Plos one*. 16(9): e0255623.
79. El-Saad A.M., Kheirallah D.A., El-Samad L.M. 2017. Biochemical and histological biomarkers in the midgut of *Apis mellifera* from polluted environment at Beheira Governorate, Egypt. *Environ Sci Pollut Res Int*. 24(3):3181-93.
80. Enari M., et al. 1998a. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD *Nature*. 391: 43-50.
81. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. 1998b. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391: 43-50.
82. Ezemonye L.I., Adebayo P.O., Enuneku A.A., Tongo I., Ogbomida E. 2019. Potential health risk consequences of heavy metal concentrations in surface water, shrimp (*Macrobrachium macrobrachion*) and fish (*Brycinus longipinnis*) from Benin River, Nigeria. *Toxicology Reports*. 6: 1-9.

83. Fadeel B., Zhivotovsky B., Orrenius S. 1999. All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *The FASEB journal*. 13(13): 1647-1657.
84. Fei F., Liu B., Gao X., Wang X., Liu Y., Bin H. 2020. Effects of supplemental ultraviolet light on growth, oxidative stress responses, and apoptosis-related gene expression of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 520: 735013.
85. Fernández-Ruiz R. 2022. TXRF spectrometry in the bioanalytical sciences: A brief review. *X-Ray Spectrometry*. 51(3): 279-293.
86. Fischer. U., Jänicke R.U., Schulze-Osthoff K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*. 10(1): 76-100.
87. Fontanetti C.S., Moreira-de-Sousa C., Pinheiro T.G., de Souza R.B., Francisco A. 2015. Diplopoda—digestive system. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda*.(2): 109-127.
88. Fontanetti C.S., Tiritan B., Camargo-Mathias M.I. 2006. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. 23: 487-493.
89. Franceschini-Vicentini I.B., Ribeiro K., Papa L.P., Marques Junior J., Vicentini C.A., Valenti PMCM. 2009. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Int J Morphol*. 27(1): 121–128.
90. Franzetti E., Huang Z.J., Shi Y.X., Xie K., Deng X.J., Li J.P., Feng Q. 2012. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*. 17: 305-324.
91. Frezza C., Cipolat S., De Brito O.M., Micaroni M., Beznoussenko G.V., Rudka T., Scorrano L. 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*. 126(1): 177-189.
92. Frías-Espéricueta M.G., Bautista-Covarrubias J.C., Osuna-Martínez C.C., Delgado-Alvarez C., Bojórquez C., Aguilar-Juárez M., Páez-Osuna F. 2022. Metals and oxidative stress in aquatic decapod crustaceans: A review with special reference to shrimp and crabs. *Aquatic Toxicology*. 242: 106024.

93. Fuller G. M., Shields D. 2000. Podstawy molekularne biologii komórki. Aspekty medyczne, PZWL, Warszawa, 2000.
94. Gaillardet J., Viers J., Dupré B. 2003. Trace elements in river waters. In: Treatise on geochemistry. Holland H.D., Turekian K.K. (eds.) Elsevier, Oxford. 5: 225-272.
95. Gardner A.M., Xu F.H., Fady C., Jacoby F.J., Duffey D.C., Tu Y., Lichtenstein, A. 1997. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. Free radical biology and medicine. 22(1-2): 73-83.
96. Garrido C., Galluzzi L., Brunet M., Puig P.E., Didelot C., Kroemer G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ. 13: 1423–33.
97. Gączarzewicz D., Udała J., Błaszczuk B. 2000. Apoptosis of gametogenic cells during spermatogenesis. Medycyna Weterynaryjna. 56(10): 639-644.
98. Gehrman S. 2021. Allgemeine Süßwasserkrebspraxis: Flusskrebse, Garnelen, Krabben, Mittelkrebse & Pfeilschwanzkrebse des Süß- und Brackwassers. BoD – Books on Demand, 2021. ISBN 3748102380, 9783748102380
99. Genchi G., Carocci A., Lauria G., Sinicropi M.S., Catalano A. 2020a. Nickel: Human health and environmental toxicology. International journal of environmental research and public health. 17(3): 679.
100. Genchi G., Sinicropi M.S., Lauria G., Carocci A., Catalano A. 2020b. The effects of cadmium toxicity. International journal of environmental research and public health. 17(11): 3782.
101. Gervais F.G., Thornberry N.A., Ruffolo S.C., Nicholson D.W., Roy S. 1998. Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. Journal of Biological Chemistry. 273(27): 17102-17108.
102. Giusti F., Dallai L., Beani L., Manfredini F., Dallai R. 2007. The midgut ultrastructure of the endoparasite *Xenos vesparum* (Rossi) (Insecta, Strepsiptera) during post-embryonic development and stable carbon isotopic analyses of the nutrient uptake. Arthropod Struct Dev. 36: 183–197.
103. Goldstein J. C., Waterhouse N.J., Juin P., Evan G.I., Green D.R. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. Nature cell biology. 2(3): 156-162.

104. Graham E.R., Thompson J.T. 2009. Deposit-and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 368(1): 22-29.
105. Grandjean P. 1984. Human exposure to nickel. *IARC Sci. Publ.* 53: 469.
106. Greene J.C., Whitworth A.J., Kuo I., Andrews L.A., Feany M.B., Pallanck L.J. 2003. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(7): 4078-4083.
107. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*. 13(15): 1899-1911.
108. Haber L.T., Erdreich L., Diamond G.L., Maier A.M., Ratney R., Zhao Q., Dourson M.L. 2000. Hazard identification and dose response of inhaled nickel-soluble salts. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31: 210.
109. Halestrap A.P., Doran E., Gillespie J.P., O'Toole A. 2000. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans.* 28: 170-177.
110. Halicka H.D., Bedner E., Darzynkiewicz Z. 2000. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Experimental cell research*. 260(2): 248-256.
111. Hames B.D., Hooper N.M. 2002. Transport elektronów i fosforylacja oksydacyjna. W: *Biochemia (Krótkie Wykłady)*. Wyd: PWN, Warszawa. 394–407.
112. Hames C.A., Hopkin S.P. 1991. A daily cycle of apocrine secretion by the B cells in the hepatopancreas of terrestrial isopods. *Can J Zool.* 69: 1931–1937.
113. Harasim P., Filipek T. 2015. Nickel in the environment. *Journal of Elementology*. 20(2).
114. Herceg Z., Wang Z. Q. 2001. Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 477(1-2): 97-110.

115. Herrera-Alvarez L., Fernandez I., Benito J., Pardos F. 2000. Ultrastructure of the midgut and hindgut of *Derocheilocaris remanei* (Crustacea, Mystacocarida). *J Morphol.* 244: 177–189.
116. Hirsch G.C., Jacobs W. 1928. Der arbeitsrhythmus der mitteldarmdruse von *Astacus leptodactylus*. I. Teil.: Methodik und Technick. Der berweis der periodizitat. *Z. vergl. Physiol.* 8: 102–144.
117. Hirsch G.C., Jacobs W. 1930. Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdruse von *Astacus leptodactylus*. II. Wachstum als primarer Factor des Rhythmus eines polyphasischen, organischen Sekretionssystems. *Z. Vergl. Physiol.* 12: 524–558.
118. Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., ... & Tschopp J. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology.* 1(6): 489-495.
119. Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell.* 81(4): 495-504.
120. Huang X., Feng Y., Duan J., Xiong G., Fan W., Liu S., ... & Yin L. 2020. Antistarvation strategies of *E. sinensis*: regulatory networks under hepatopancreas consumption. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 20200.
121. Hyra M., Poprawa I., Włodarczyk A., Student S., Sonakowska L., Kszuk-Jendrysik M., Rost-Roszkowska M. M. 2016. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840) (Tardigrada, Eutardigrada, Hypsibiidae) in relation to oogenesis. *Journal Article In: Zoological Journal of the Linnean Society.* 178(4): 897-906. ISSN: 00244082, (19).
122. Icely J D., Nott, J. A. 1992. Digestion and absorption: digestive system and associated organs. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Decapod Crustacea.* 10: 14–201.
123. Icely J.D., Nott J.A. 1984. On the morphology and fine structure of the alimentary canal of *Corophium volutator* (Pallas) (Crustacea: Amphipoda). *Phil Trans R Soc Lond B.* 306: 49–78.
124. Israel L.G., Israel E.D. 1999. Apoptosis. *Stem Cells.* 17: 306-313.

125. Jabłońska A., Mamos T., Gruszka P., Szlauer-Łukaszewska A., Grabowski M. 2018. First record and DNA barcodes of the aquarium shrimp, *Neocaridina davidi*, in Central Europe from thermally polluted River Oder canal, Poland. Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems (419): 14.
126. Janpoom S., Prasertlux S., Rongmung P., Menasveta P., Lamkom T., Sae-Li, P., ... & Klinbunga S. 2021. Identification of a Growth-Associated Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in Cyclin C of the Giant Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. Biochemical Genetics. 59: 114-133.
127. Janssen M., Bruins A., De Vries T., Van Straalen N. 1991. Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch Environ Contam Toxicol. 20: 305–312.
128. Jiang S., Zhou F., Yang Q., Huang J., Yang L., Jiang S. 2019. Impact of temperature stress on oxygen and energy metabolism in the hepatopancreas of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Pak. J. Zool. 51: 141-148.
129. John P.C., Mews M., Moore R. 2001. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. Protoplasma. 216: 119-142.
130. Júdová J. 2006. Crustacea and heavy metal accumulation. Oecologia Montana. 15(1-2): 29-37.
131. Kalashnikova M.M. 1979. Physiological and reparative regeneration of mitochondria. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 88: 771-774.
132. Karpeta-Kaczmarek J., Augustyniak M., Rost-Roszkowska M. 2016a. Ultrastructure of the gut epithelium in *Acheta domesticus* after long-term exposure to nanodiamonds supplied with food. Arthropod Structure & Development. 45(3): 253-264.
133. Karpeta-Kaczmarek J., Dziewięcka M., Augustyniak M., Rost-Roszkowska M. 2016b. Effects of short-term exposure of *Acheta domesticus* to nanodiamonds in food: DNA damage but no histological alteration in tissues. Carbon. 110: 458-468.

134. Kelliher M.A., Grimm S., Ishida Y., Kuo F., Stanger B.Z., Leder P. 1998. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity*. 8(3): 297-303.
135. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H., Peter M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*. 14(22): 5579-5588.
136. Klaassen C.D. 1996. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, 5th ed.; International Edition. pp 712-714.
137. Klionsky D. i inni. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12: 1–222.
138. Klionsky D. i inni. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 17: 1–382.
139. Kniffin C.D., Burnett L.E., Burnett K.G. 2014. Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 170: 43-49.
140. Kong L., Gao X., Zhu J., Cheng K., Tang M. 2016. Mechanisms involved in reproductive toxicity caused by nickel nanoparticle in female rats. *Environ. Toxicol.* 31: 1674–1683.
141. Koss-Mikołajczyk I., Baranowska M., Namieśnik J., Bartoszek A. 2017. Determination of antioxidant activity of phytochemicals in cellular models by fluorescence/luminescence methods. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. 71: 602-617.
142. Košťál V., Šimůnková P., Kobelková A., Shimada K. 2009. Cell cycle arrest as a hallmark of insect diapause: changes in gene transcription during diapause induction in the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 39(12): 875-883.
143. Kourtis N., Tavernarakis N. 2009. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ.* 16: 21–30.

144. Kramarz P.E. 1999a. Dynamics of accumulation and decontamination of cadmium and zinc in carnivorous invertebrates. 1. The ground beetle, *Poecilus cupreus* L. Bull Environ Contam Toxicol. 63: 531–537.
145. Kramarz P.E. 1999b. Dynamics of accumulation and decontamination of cadmium and zinc in carnivorous invertebrates. 2. The centipede *Lithobius mutabilis* Koch. Bull Environ Contam Toxicol. 63: 538–545.
146. Lagisz M., Kramarz P., Niklinska M. 2005. Metal kinetics and respiration rates in F1 generation of carabid beetles (*Pterostichus oblongopunctatus* F.) originating from metal-contaminated and reference areas. Arch Environ Contam Toxicol. 48: 484–489.
147. Lassus P., Opitz-Araya X., Lazebnik Y. 2002. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. Science. 297(5585): 1352-1354.
148. Lawal-Are A.O., Moruf R.O., Oluseye-Are S.O., Isola T.O. 2019. Antioxidant Defense System Alternations in Four Crab Species as a Bio-Indicator of Environmental Contamination. Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture. 76(1).
149. Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G., Earnshaw W.C. 1994. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature. 371(6495): 346-347.
150. Lecoeur H., Langonné A., Baux L., Rebouillat D., Rustin P., Prévost M.C., ... & Jacotot E. 2004. Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. Experimental cell research. 294(1): 106-117.
151. Leonard E.M., Barcarolli I., Silva K.R., Wasielesky W., Wood C.M., Bianchini A. 2011. The effects of salinity on acute and chronic nickel toxicity and bioaccumulation in two euryhaline crustaceans: *Litopenaeus vannamei* and *Excirologana armata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 154(4): 409-419.
152. Levine B., Klionsky D.J. 2004. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev. Cell. 6: 463–477.

153. Li H., Zhu H., Xu C J., Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94(4): 491-501.
154. Lin S., He Y., Gong Y., Zhang Y., Ma H., Zheng H., Li S. 2020. SpBOK inhibits WSSV infection by regulating the apoptotic pathway in mud crab (*Scylla paramamosain*). *Developmental & Comparative Immunology*. 106: 103603.
155. Lipovšek S., Janžekovič F., Novak T. 2014. Autophagic activity in the midgut gland of the overwintering harvestmen *Gyas annulatus* (Phalangidae, Opiliones). *Arthropod Structure and Development*. 43: 493–500.
156. Lipovšek S., Leitinger G., Novak T., Janžekovič F., Gorgoń S., Kamińska K., Rost-Roszkowska M. M. 2018. Changes in the midgut cells in the European cave spider, *Meta menardi*, during starvation in spring and autumn. *Journal Article In: Histochemistry and Cell Biology*. 149(3): 245-260. ISSN: 09486143, (18).
157. Lipovšek S., Novak T. 2016. Autophagy in the fat body cells of the cave cricket *Troglophilus neglectus* Krauss, 1878 (Rhaphidophoridae, Saltatoria) during overwintering. *Protoplasma*. 253: 457–466.
158. Litwin JA. 1985. Light microscopic histochemistry on plastic sections. *Prog Histochem Cytochem*. 16(2): 1-84. PMID: 2417278.
159. Liu K., Czaja M.J. 2013. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death Differentiation*. 20: 3–11.
160. Liu Z.J., Ueda T., Miyazaki T., Tanaka N., Mine S., Tanaka Y., ... & Minami Y. 1998. A critical role for cyclin C in promotion of the hematopoietic cell cycle by cooperation with c-Myc. *Molecular and cellular biology*. 18(6): 3445-3454.
161. Lizarbe M.A., Barrasa J. I., Olmo N., Gavilanes F., Turnay J. 2013. Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *International journal of molecular sciences*. 14(2): 2652-2683.
162. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev*. 4: 118-126.

163. Manisseri M.K., Menon N.R. 1995. Copper-induced damage to the hepatopancreas of the penaeid shrimp *Metapenaeus dobsoni*—an ultrastructural study. *Dis Aquat Org.* 22: 51–57.
164. Martínez M.C., Freyssinet J. M. 2001. Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry. *BMC cell biology.* 2(1): 1-11.
165. Maryanski M., Kramarz P., Laskowski R., Niklinska M. 2002. Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetles (*Poecilus cupreus* L.) exposed to zinc-or cadmium-contaminated food. *Ecotoxicology.* 11: 127-139.
166. Marzo I., Brenner C., Kroemer G. 1998. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomedicine & pharmacotherapy.* 52(6): 248-251.
167. Masson I., Díaz A.C., Petriella A.M. 2012. Effect of salinity changes on the midgut gland of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae). *Latin american journal of aquatic research.* 40(2): 358-366.
168. Menon S.S., Guruvayoorappan C., Sakthivel K.M., Rasmi R.R. 2019. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clinica chimica acta* 491: 39-45.
169. Menze M.A., Fortner G., Nag S. 2010. Mechanisms of apoptosis in Crustacea: what conditions induce versus suppress cell death? *Apoptosis.* 15: 293–312.
170. Meyer W., Kretschmer M., Hoffmann A., Harisch G. 1991. Biochemical and histochemical observations on effects of low-level heavy metal load (lead, cadmium) in different organ systems of the freshwater crayfish, *Astacus astacus* L.(Crustacea: Decapoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 21(2): 137-156.
171. Minina E.A., Staal J., Alvarez V.E., Berges J.A., Berman-Frank I., Beyaert R., ... & Bozhkov P.V. 2020. Classification and nomenclature of metacaspases and paracaspases: no more confusion with caspases. *Molecular cell.* 77(5): 927-929.

172. Moolman L.J.H.J., Van Vuren J.H.J., Wepener V. 2007. Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 68(3): 443-450.
173. Morgan D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 13: 261–91.
174. Morgan D.O. 2007. *The Cell Cycle: Principles of Control* (1st ed.). London: New Science Press. ISBN 978-0-87893-508-6.
175. Moritz K.V., Storch V., Buchhwein W. 1973. Zur Feinstruktur der Mitteldarmanhänge von Peracarida (Mysidacea: Amphipoda, Isopoda). *Cytobiologia*. 8: 39–54.
176. Moyes C.D., Battersby B.J., Leary S.C. 1998. Regulation of muscle mitochondrial design. *The Journal of experimental biology*. 201(3): 299-307.
177. Muskó I.B. 1988. Ultrastructural studies on the alimentary tract of *Eudiaptomus gracilis* (Copepoda, Calanoida). *Zool Anz*. 220: 152–162.
178. Mycles D.L. 1979. Ultrastructure of alimentary epithelia of lobsters, *Homarus americanus* and *H. gammarus*, and crab *Cancer magister*. *Zoomorphology*. 92: 201–215.
179. Naboka A., Marenkov O., Kovalchuk J., Shapovalenko Z., Nesterenko O., Dzhobolda B. 2018. Parameters of the histological adaptation of Marmorkrebs *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) (Decapoda, Cambaridae) to manganese, nickel and lead ions pollution. *Int Lett Nat Sci*. 70: 24–33.
180. Nagata S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*. 256(1): 12-18.
181. Nakamura K., Bossy-Wetzler E., Burns K., Fadel M.P., Lozyk M., Goping I.S., ... & Michalak M. 2000. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *The Journal of cell biology*. 150(4): 731-740.
182. Narendra D., Tanaka A., Suen D.F., Youle R.J. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell. Biol.* 183: 795-803. PMID: 19029340

183. Nassiri Y., Rainbow P.S., Triquet-Amiard C., Raingglet F., Smith B.D. 2000. Trace-metal detoxification in the ventralcaeca of *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda). *Mar Biol.* 136: 477–484. PMID: 10840735
184. Nicholson D.W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation.* 6(11): 1028-1042.
185. Nriagu J.O., Pacyna J.M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature.* 333: 134.
186. Nuñez-Hernandez D.M., Felix-Portillo M., Peregrino-Uriarte A.B., Yepiz-Plascencia G. 2018. Cell cycle regulation and apoptosis mediated by p53 in response to hypoxia in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere.* 190: 253-259.
187. Ogura K. 1959. Midgut gland cells accumulating iron and copper in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Annot. Zool. Japonenses.* 32 (3): 133–142.
188. Ostróżka A., Tiffert Z., Wilczek G., Rost-Roszkowska M. 2022. Can insecticide-free clean water regenerate the midgut epithelium of the freshwater shrimp after dimethoate treatment? *Micron.* 155. 103162.
189. Ottaviano O., Scapini F. 2010. Can fluctuating asymmetry in *Talitrus saltator* (Montagu, 1808) (Crustacea, Amphipoda) populations be used as a bioindicator of stress on sandy beach ecosystems? *Oceanologia* 52(2): 259-280.
190. Över S.B., Güven C., Taskin E., Sevgiler Y. 2020. Oxidative and apoptotic effects of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in *Daphnia magna*. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* 71(3): 211-221.
191. Pandey A., Chandra S., Chauhan L.K.S., Narayan G., Chowdhuri D.K. 2013. Cellular internalization and stress response of ingested amorphous silica nanoparticles in the midgut of *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 1830(1): 2256-2266.
192. Pantaleão J.A.F., Barros-Alves S.D.P., Tropea C., Alves D.F., Negreiros-Fransozo M.L., López-Greco L.S. 2015. Nutritional vulnerability in early stages of the freshwater ornamental “Red Cherry Shrimp” *Neocaridina davidi* (Caridea: Atyidae). *Journal of Crustacean Biology.* 35(5): 676-681.

193. Peter M.E., Krammer P.H. 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Current opinion in immunology*. 10(5): 545-551.
194. Phinyo M., Visudtiphole V., Roytrakul S., Phaonakrop N., Jarayabhand P., Klinbunga S. 2013. Characterization and expression of cell division cycle 2 (Cdc2) mRNA and protein during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *General and comparative endocrinology*. 193: 103-111.
195. Pickering Q.H. 1974. Chronic toxicity of nickel to the fathead minnow. *Journal Water Pollution Control Federation*. 760-765.
196. Pollack M., Leeuwenburgh Ch. 2001. The journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences. 56. B457-B482.
197. Pook C., Lewis C., Galloway T. 2009. The metabolic and fitness costs associated with metal resistance in *Nereis diversicolor*. *Marine Pollution Bulletin*. 58(7): 1063-1071.
198. Poprawa I., Chajec Ł., Chachulska-Żymełka A., Wilczek G., Student S., Leśniewska M., Rost-Roszkowska M. 2022. Ovaries and testes of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda) react differently to the presence of cadmium in the environment. *Scientific Reports*. 12(1): 6705.
199. Potet M., Giambérini L., Pain-Devin S., Louis F., Bertrand C., Devin S. 2018. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. *Scientific reports*. 8(1): 1-14.
200. Prosi F., Storch V., Janssen H.H. 1983. Small cells in the midgut glands of terrestrial isopoda: sites of heavy metal accumulation. *Zoomorphology*. 102: 53-64.
201. Rahman T., Hosen I., Islam M.M., Shekhar H.U. 2012. Oxidative stress and human health. *J. Adv. Biosci. Biotechnol.* 3: 997-1019.
202. Rahmanzadeh R., Hüttmann G., Gerdes J., Scholzen T. 2007. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell proliferation*. 40(3): 422-430.
203. Rainbow P.S., Fialkowski W., Sokołowski A., Smith B.D., Wolowicz M. 2004. Geographical and seasonal variation of trace metal bioavailabilities in Gulf

- of Gdańsk, Baltic Sea Rusing mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*Balanus improvisus*) as biomonitors. *Mar Biol.* 144(2): 271-286.
204. Rajfur M., Kłos A., Waclawek M. 2010. Sorption properties of algae *Spirogyra sp.* and their use for determination of heavy metal ions concentrations in surface water. *Bioelectrochemistry.* 80(1): 81-86.
205. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24: 981-990.
206. Richter C., Schweizer M., Cossarizza A., Franceschi C. 1996. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS letters.* 378(2): 107-110.
207. Rinderhagen M., Ritterhoff J., Zauke G.P. 2000. Crustaceans as Bioindicators. *Environ. Res.* 16.
208. Rost-Roszkowska M.M., Janelt K., Poprawa I. 2018. The role of autophagy in the midgut epithelium of *Parachela* (Tardigrada). *Zoomorphology* 137: 501-509.
209. Rost-Roszkowska M.M., Janelt K., Poprawa I. 2020b. Ultrastructure of the midgut epithelium in three species of Macrobiotidae (Tardigrada: Eutardigrada: *Parachela*). *Journal Article In: Zoological Journal of the Linnean Society.* 188(3): 788-796. ISSN: 00244082, (2).
210. Rost-Roszkowska M.M., Machida R., Fukui M. 2010b. The role of cell death in the midgut epithelium in *Filientomon takanawanum* (Protura). *Tissue and Cell.* 42(1): 24-31.
211. Rost-Roszkowska M.M., Poprawa I., Chachulska-Żymełka A. 2010a. Apoptosis and autophagy in the midgut epithelium of *Acheta domesticus* (Insecta, Orthoptera, Gryllidae). *Zoological Science.* 27(9): 740-745.
212. Rost-Roszkowska M.M., Poprawa I., Chajec Ł., Chachulska-Żymełka A., Wilczek G., Skowronek M., Leśniewska M. 2022. Hazards related to the presence of cadmium in food—Studies on the European soil centipede, *Lithobius forficatus*. *Science of the Total Environment.* 845: 157298.
213. Rost-Roszkowska M.M., Poprawa I., Chajec Ł., Chachulska-Żymełka A., Wilczek G., Wilczek P., Leśniewska M. 2021b. Effects of cadmium on mitochondrial structure and function in different organs: studies on the soil

- centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). The European Zoological Journal. 88(1): 632-648.
214. Rost-Roszkowska M.M., Poprawa I., Chajec Ł., Chachulska-Żymełka A., Wilczek G., Wilczek P., Student S., Skowronek M., Nadgórska-Socha A., Leśniewska M. 2020a. Influence of soil contaminated with cadmium on cell death in the digestive epithelium of soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). Journal Article In: European Zoological Journal. 87(1): 242-262. ISSN: 24750263, (9).
215. Rost-Roszkowska M.M., Poprawa I., Klag J., Migula P., Mesjasz-Przybyłowicz J., Przybyłowicz W. 2008. Degeneration of the midgut epithelium in *Epilachna Cf. nylanderi* (Insecta, Coccinellidae): apoptosis, autophagy, and necrosis. Can J Zool. 86:1179–1188.
216. Rost-Roszkowska M.M., Vilimova J., Sosinka A., Skudlik J., Franzetti E. 2012. The role of autophagy in the midgut epithelium of *Eubbranchipus grubii* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). Arthropod Struct Dev. 41: 271–279.
217. Rost-Roszkowska M.M., Vilimová J., Tajovský K., Chachulska-Żymełka A., Sosinka A., Kszuk-Jendrysik M., Ostróżka A., Kaszuba F. 2019. Autophagy and apoptosis in the midgut epithelium of millipedes. Journal Article In: Microscopy and Microanalysis. 25(4): 1004-1016. ISSN: 14319276, (10).
218. Rost-Roszkowska M.M., Vilimova J., Tajovský K., Kszuk-Jendrysik M. 2015. Does autophagy in the midgut epithelium of centipedes depend on the day/night cycle? Micron. 68: 130-139.
219. Rost-Roszkowska M.M., Vilimová J., Tajovský K., Šustr, V, Ostróżka A., Kaszuba F. 2021. Structure of the midgut epithelium in four diplopod species: histology, histochemistry and ultrastructure. Journal Article In: Arthropod Systematics and Phylogeny. 79: 295-308, ISSN: 18637221, (2).
220. Rost-Roszkowska M.M., Piłka M., Szyska R., Klag, J. 2007. Ultrastructural studies of midgut epithelium formation in *Lepisma saccharina* L. (Insecta, Zygentoma). Journal of Morphology. 268(3): 224-231.
221. Rowe C.L., Kinney O.M., Nagle R.D., Congdon J.D. 1998. Elevated maintenance costs in an anuran (*Rana catesbeiana*) exposed to a mixture of trace

- elements during the embryonic and early larval periods. *Physiological Zoology*. 71(1): 27-35.
222. Rudner J., Lepple-Wienhues A., Budach W., Berschauer J., Friedrich B., Wesselborg S., ... & Belka C. 2001. Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. *Journal of cell science*. 114(23): 4161-4172.
223. Rupniewska Z., Bojarska-Junak A. 2004. Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization and the role played by Bcl-2 family proteins. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. 58.
224. Ruppert E.E., Barnes R.D., Fox R.S. 2004. *Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach*. (No. 592 RUPi).
225. Sacristán H.J., Ansaldo M., Franco-Tadic L.M., Fernandez Gimenez A.V., Lopez Greco L.S. 2016. Long-term starvation and posterior feeding effects on biochemical and physiological responses of midgut gland of *Cherax quadricarinatus* juveniles (Parastacidae). *PloS one*. 11(3): e0150854.
226. Sakahira H., Enari M., Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391: 96–9.
227. Saleh A.M., Vijayasathy C., Masoud L., Kumar L., Shahin A., Kambal A. 2003. Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 190(1): 47-57.
228. Sanni B., Williams K., Sokolov E.P., Sokolova I.M. 2008. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on mitochondrial aconitase and LON protease from a model marine ectotherm, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 147(1): 101-112.
229. Sasikumar G., Krishnakumar P.K. 2011. Aquaculture planning for suspended bivalve farming systems: The integration of physiological response of green mussel with environmental variability in site selection. *Ecol Indic*. 11(2): 734-740.
230. Schieber M., Chandel N.S. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol*. 24: R453-R462.

231. Schlacher T.A., Lucrezi S., Connolly R.M., Peterson C.H., Gilby B.L., Maslo B., Olds A.D., Walker S.J., Leon J.X., Huijbers C.M., Weston M.A., Turra A., Hyndes G.A., Holt R.A., Schoeman D.S. 2016. Human threats to sandy beaches: A meta-analysis of ghost crabs illustrates global anthropogenic impacts. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 169:56–73.
232. Schlacher T.A., Thompson L. 2012. Beach recreation impacts benthic invertebrates on ocean-exposed sandy shores. *Biological Conservation*. 147(1): 123-132.
233. Schneider S., Lindstrøm E-A. 2009. Bioindication in Norwegian rivers using non-diatomaceous benthic algae: The acidification index periphyton (AIP). *Ecol Indic*. 9(6): 1206-1211.
234. Scholzen T., Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*. 182(3): 311-322.
235. Schuwerack P.M.M., Lewis J.W. 2003. The mode of action of acute and chronic concentrations of waterborne Cd in the digestive gland of the acclimated infested freshwater crab (*Potamonautes warreni*). *Cell Tissue Res*. 312: 249–263.
236. Schwerk C., Schulze-Osthoff K. 2003. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical pharmacology*. 66(8): 1453-1458.
237. Scott-Fordsmand J.J. 1997. Toxicity of nickel to soil organisms in Denmark. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 148: 1.
238. Shekhar M.S., Kiruthika J., Ponniah A.G. 2013. Identification and expression analysis of differentially expressed genes from shrimp (*Penaeus monodon*) in response to low salinity stress. *Fish & shellfish immunology*. 35(6): 1957-1968.
239. Shimizu S., Matsuoka Y., Shinohara Y., Yoneda Y., Tsujimoto Y. 2001. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 152(2): 237-250.
240. Shlomovitz I., Speir M., Gerlic, M. 2019. Flipping the dogma—phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. *Cell Communication and Signaling*. 17(1): 1-12.

241. Sibly R.M., Calow P. 1989. A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society*. 37(1-2): 101-116.
242. Sies H. 2015 Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.*4: 180-183.
243. Singh R., Kaushik S., Wang Y., Xiang Y., Novak I., Komatsu M., Tanaka K., Cuervo A.M., Czaja M.J. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 458: 1131–1135.
244. Singh S., Prasad S.M., Bashri G. 2023. Fate and toxicity of nanoparticles in aquatic systems. *Acta Geochimica*. 42(1): 63-76.
245. Skierski J. 2008. Badanie działania cytotoksycznego substancji chemicznych. *Post. Biol. Kom.* 35(24): 147-163.
246. Smolders R., De Boeck G., Blust R. 2003. Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 22(4): 890-899.
247. Smolewski P., Bedner E., Du L., Hsieh T.C., Wu J.M., Phelps D.J., Darzynkiewicz Z. 2001. Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 44(1): 73-82.
248. Sobecki M., Mrouj K., Camasses A., Parisis N., Nicolas E., Lleres D., ... Fisher D. 2016. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *elife*. 5: e13722.
249. Sonakowska L., Włodarczyk A., Poprawa I., Binkowski M., Śróbka J., Kamińska K., Kszuk-Jendrysik M., Chajec Ł., Zajusz B. 2015. Structure and Ultrastructure of the Endodermal Region of the Alimentary Tract in the Freshwater Shrimp *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca). *PLoS ONE* 10(5): e0126900.
250. Sonakowska L., Włodarczyk A., Wilczek G., Wilczek P., Student S., Rost-Roszkowska M.M. 2016. Cell Death in the Epithelia of the Intestine and Hepatopancreas in *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca). *PLoS ONE* 11(2):e0147582.

251. Sonakowska-Czajka L., Śróbka J., Ostróżka A., Rost-Roszkowska M.M. 2021. Postembryonic development and differentiation of the midgut in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca, Decapoda) larvae. *Journal of Morphology*. 282: 48–65.
252. Sosinka A., Rost-Roszkowska M. M., Vilimova J., Tajovský K., Kszuk-Jendrysik M., Sonakowska L., ... & Poprawa I. 2014. The ultrastructure of the midgut epithelium in millipedes (Myriapoda, Diplopoda). *Arthropod Structure & Development*. 43(5): 477-492.
253. Sousa L.G., Cuartas E.I., Petriella A.M. 2005. Fine structural analysis of the epithelial cells in the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea). *Biocell*. 29(1): 25–31. PMID: 15954464
254. Sousa L.G., Petriella A.M. 2000. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea). *Biocell*. 24(3): 189–195. PMID: 11201654
255. Sousa L.G., Petriella A.M. 2001. Changes in the hepatopancreas histology of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Caridea) during moult. *Biocell*. 25(3): 275–281. PMID: 11813543
256. Sousa L.G., Petriella A.M. 2006. Morphology and histology of *P. argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) digestive tract. *Biocell*. 30(2): 287–294. PMID: 16972553
257. Sousa L.G., Petriella A.M. 2007. Functional morphology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda): influence of environmental pollution. *Rev Biol Trop*. 55: 79–86.
258. Spees J.L., Chang S.A., Snyder M.J., Chang E.S. 2002. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. *The Biological Bulletin*. 203(3): 331-337.
259. Spurgeon D.J., Hopkin S.P. 1999. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Appl Soil Ecol*. 11: 227–243.
260. Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular cell*. 1(7): 949-957.

261. Stangl G.I., Kirchgessner M. 1996. Nickel deficiency alters liver lipid metabolism in rats. *J Nutr.* 126: 2466–2473.
262. Stone D., Jepson P., Kramarz P., Laskowski R. 2001. Time to death response in carabid beetles exposed to multiple stressors along a gradient of heavy metal pollution. *Environmental Pollution.* 113(2): 239-244.
263. Štrus J., Žnidaršič N., Mrak P., Bogataj U., Vogt G. 2019. Structure, function and development of the digestive system in malacostracan crustaceans and adaptation to different lifestyles. *Cell and tissue research.* 377: 415-443.
264. Suciú M.C., Tavares D.C., Zalmon I.R. 2018. Comparative evaluation of crustaceans as bioindicators of human impact on Brazilian sandy beaches. *Journal of Crustacean Biology.* 38(4): 420–428.
265. Suen C., Gillett-Kaufman J.L. 2021. Cherry Shrimp *Neocaridina davidi* (Bouvier 1904)(Crustacea: Decapoda: Atyidae): EENY751/IN1301, 3/2020. EDIS, 2021(2).
266. Sukharev S.A., Pleshakova O.V., Sadovnikov V.B. 1997. Role of proteases in activation of apoptosis. *Cell Death & Differentiation.* 4(6): 457-462.
267. Sun H., Zhou Q., Tang W., Shu Y., Zhang G. 2008. Effects of dietary nickel on detoxification enzyme activities in the midgut of *Spodoptera litura* Fabricius larvae. *Chinese Science Bulletin.* 53(21): 3324-3330.
268. Sun Q., Li Y., Shi L., Hussai, R., Mehmood K., Tang Z., Zhang H. 2022. Heavy metals induced mitochondrial dysfunction in animals: molecular mechanism of toxicity. *Toxicology.* 153136.
269. Symonova R. 2007. Ultrastructure of hepatopancreas and its possible role as a hematopoietic organ in non-marine cypridoidean ostracods (Crustacea). *Hydrobiologia.* 585: 213–223.
270. Szefer P. 2002a. Trace Metals in the Environment 5. Metals, Metalloids and Radionuclides in the Baltic Sea Ecosystem. Elsevier: London, pp 699-703.
271. Szefer P. 2002b. Metals, metalloids and radionuclides in the Baltic Sea Ecosystem. Elsevier, Amsterdam. 766 pp.
272. Szklarzewicz T., Tylek W. 1987. Ultrastructure of midgut epithelial cells of *Campodea sp.* (Diplura). *Acta Biologica Cracoviensia. Series Zoologia.* 29.

273. Tam Q., Avenant-Oldewage A. 2009a. The ultrastructure of the digestive cells of *Argulus japonicus*, Thiele 1900 (Crustacea: Branchiura). *Arthropod Struct Dev.* 38: 45–53.
274. Tam Q., Avenant-Oldewage A. 2009b. The effect of starvation on the ultrastructure of the digestive cells of *Dolops ranarum* (Stuhlmann, 1891) (Crustacea: Branchiura). *Arthropod Struct Dev.* 38: 391–399.
275. Tettamanti G., Cao Y., Feng Q., Grimaldi A., De Eguileor M. 2011. Autophagy in Lepidoptera: more than old wine in new bottle. *Invertebrate Survival Journal.* 8(1): 5-14.
276. Tomczak E., Dominiak A. 2016. Organizmy żywe w systemie biomonitoringu jakości wody. *Proceedings of ECOpole.* 10(1): 315-323.
277. Traczewska T.M. 2011. Biologiczne metody oceny skażenia środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej. Wrocław 2011. ISBN 978-83-7493-597-5
278. Tropea C., Stumpf L., López Greco L.S. 2015 Effect of Temperature on Biochemical Composition, Growth and Reproduction of the Ornamental Red Cherry Shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda* (Decapoda, Caridea). *PLoS ONE.* 10(3): e0119468.
279. Trzcińska M. 2003. Apoptosis-molecular mechanism of the process and selected detection methods in biology of reproduction. *Biotechnologia.* 60(1): 93-105.
280. Urdes L., Walster C., Tepper J. 2023. Pathology and Epidemiology of Aquatic Animal Diseases for Practitioners. Comprehensive reference on the diseases and applied epidemiology of all aquatic animal taxa, including invertebrates and vertebrates. John Wiley & Sons. 7 mar 2023 - 448.
281. Verslycke T., Roast S.D., Widdows J., Jones M.B., Janssen C.R. 2004. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. *Journal of experimental marine biology and ecology.* 306(1): 1-16.
282. Villalpando-Rodriguez G.E., Gibson S.B. 2021. Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2021.

283. Visudtiphole V., Klinbunga S., Kirtikara K. 2009. Molecular characterization and expression profiles of cyclin A and cyclin B during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 152(4): 535-543.
284. Vogt G. 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphol.* 114: 83–101.
285. Vogt G. 2020. Cytopathology and immune response in the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Diseases of Aquatic Organisms*. 138: 41-88.
286. Vogt G., Quinitio E.T. 1994. Accumulation and excretion of metal granules in the prawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium. *Aquat Toxicol.* 28: 223–241.
287. Vogt G., Stöcker W., Storch V., Zwilling R. 1989. Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. *Histochem.* 91:373–38.
288. Vogt G., Stocker W., Zwilling R. 1989. Biosynthesis of *Astacus* proteases, a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry*. 91: 373–381. PMID: 2656593
289. Von Burg R. 1997. Toxicology update. *J. Appl. Toxicol.* 17: 425.
290. Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 296(5573): 1635-1636.
291. Wang C., Hu H., Zeng L., Ni C., An J., Gang Y., Hu B. 2022. MafG-like contribute to copper and cadmium induced antioxidant response by regulating antioxidant enzyme in *Procambarus clarkii*. *Gene*. 847: 146848.
292. Wang L., Feng J., Wang G., Guan T., Zhu C., Li J., Wang H. 2021. Effects of cadmium on antioxidant and non-specific immunity of *Macrobrachium nipponense*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 224: 112651.
293. Wdowczyk A. 2018. Testy toksyczności jako uzupełnienie monitoringu na składowiskach odpadów komunalnych. *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu*. (542): 201-212.
294. Weber S., Traunspurger W. 2016. Influence of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) on freshwater meiofaunal assemblages. *Limnologica*. 59: 155–161.

295. Wei K., Wei Y., Song C. 2020. The response of phenoloxidase to cadmium-disturbed hepatopancreatic immune-related molecules in freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish & shellfish immunology*. 99: 190-198.
296. Wilczek G. 2008. Komórkowe strategie reakcji pająków na stres środowiskowy. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego. Katowice 2008.
297. Wilczek G., Babczyńska A., Augustyniak M., Migula P. 2004. Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient. *Environmental Pollution* 132(3): 453-461.
298. Wilczek G., Rost-Roszkowska M., Wilczek P., Babczyńska A., Szulińska E., Sonakowska L., Marek-Swędzioł M. 2014. Apoptotic and necrotic changes in the midgut glands of the wolf spiders *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) in response to starvation and dimethoate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 101: 157–167.
299. Włodarczyk A., Sonakowska L., Kamińska K., Marchewka A., Wilczek G., Wilczek P., Student S., Rost-Roszkowska M. 2017. The effect of starvation and re-feeding on mitochondrial potential in the midgut of *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). *PLoS ONE* 12(3): e0173563.
300. Włodarczyk A., Student S., Rost-Roszkowska M. 2019b. Autophagy and apoptosis in starved and re-fed *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) midgut. *Canadian Journal of Zoology*. doi:10.1139/cjz-2018-0104
301. Włodarczyk A., Wilczek G., Wilczek P., Student S., Ostróżka A, Tarnawska M., Rost-Roszkowska M. 2019a. Relationship between ROS production, MnSOD activation and periods of fasting and re-feeding in freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). *PeerJ*. DOI 10.7717/peerj.7399
302. Wróbel B., Zienkiewicz K., Smoliński D.J., Niedojadło J., Świdziński M. 2005. Podstawy mikroskopii elektronowej. Skrypt dla studentów biologii. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Toruń.
303. Wu H., Li Y., Lang X. 2015. Bioaccumulation, morphological changes, and induction of metallothionein gene expression in the digestive system of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* after exposure to cadmium. *Environ Sci Pollut Res*. 22, 11585–11594.

304. Xu S., He M., Zhong M., Li L., Lu Y., Zhang Y.; Zhang L, Yu Z., Zhou Z. 2015. The neuroprotective effects of taurine against nickel by reducing oxidative stress and maintaining mitochondrial function in cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 590: 52–57.
305. Yang Y., Li R., Liu A., Xu J., Li L., Zhao R., Di Y. 2023. How does the internal distribution of microplastics in *Scylla serrata* link with the antioxidant response in functional tissues? *Environmental Pollution.* 324: 121423.
306. Ye Z.W., Zhang J., Townsend D.M., Tew K.D. 2015. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1850: 1607-1621.
307. Yılmaz A.B., Yılmaz L. 2007. Influences of sex and seasons on levels of heavy metals in tissues of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* de Hann, 1844). *Food Chemistry.* 101(4): 1664-1669.
308. Youle R.J., Narendra D.P. 2001. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12: 9-14.
309. Young R.A. 1995. Toxicity Profiles. Toxicity summary for nickel and nickel compounds. 1995. Web site: <http://risk.lsd.ornl.gov/tox/profiles/nickel> (accessed 03.03.2005). za Cempal i Nikiel 2006.
310. Zakeri Z., Lockshin R.A. 2002. Cell death during development. *Journal of immunological methods.* 265(1-2): 3-20.
311. Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Decaudin D., Mach, A., Hirsch T., ... & Kroemer G. 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of experimental medicine.* 182(2): 367-377.
312. Zarnescu O., Petrescu A. M., Gaspar A., Craciunescu O. 2017. Effect of sublethal nickel chloride exposure on crayfish, *Astacus leptodactylus* ovary: an ultrastructural, autometallographic, and electrophoretic analyses. *Microscopy and Microanalysis.* 23(3): 668-678.
313. Zechner R., Madeo F., Kratky D. 2017. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18: 671–684.
314. Zhang Y., Chen X., Gueydan C., Han J. 2018. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* 28: 9–21. [CrossRef]

315. Zhang Y., Lambiase S., Fasola M., Gandini C., Grigolo A., Laudani U. 2001. Mortality and tissue damage by heavy metal contamination in the German cockroach, *Blattella germanica* (Blattaria, Blattellidae). *Italian J Zool.* 68(2): 137–45.
316. Zhang Y., Wang L., Ma X., Guan T., Shi W., Zhu C., Li J. 2023. Response of antioxidation and immunity to combined influences of ammonia and temperature in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Aquaculture.* 563: 738906.
317. Zhivotovsky B., Samali A., Gahm A., Orrenius S. 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death & Differentiation.* 6(7): 644-651.
318. Zhu Q.H., Zhou Z.K., Tu D.D., Zhou Y.L. 2018. Effect of cadmium exposure on hepatopancreas and gills of the estuary mud crab (*Scylla paramamosain*): histopathological changes and expression characterization of stress response genes. *Aquat Toxicol.* 195: 1–7.
319. Žnidaršč N., Štrus J., Drobne D. 2003. Ultrastructural alterations of the hepatopancreas in *Porcellio scaber* under stress. *Environ Toxicol Phar.* 13: 161–174.
320. Zou H., Li Y., Liu X., Wang X. 1999. An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry.* 274(17): 11549-11556.
321. Zou L., Su L., Sun Y., Han A., Chang X., Zhu A., Liu F., Li J., Sun Y. 2017. Nickel sulfate induced apoptosis via activating ROS-dependent mitochondria and endoplasmic reticulum stress pathways in rat Leydig cells. *Environ. Toxicol.* 32: 1918–1926.
322. Zuo L., Zhou T., Pannell B.K., Ziegler A.C., Best T.M. 2015. Biological and physiological role of reactive oxygen species – the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.* 214: 329-348.

UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH
WYDZIAŁ NAUK PRZYRODNICZYCH
ZESPÓŁ HISTOLOGII I EMBRIOLOGII ZWIERZĄT

ANNA OSTRÓŻKA

ANALIZA ZMIAN W STRUKTURZE I ULTRASTRUKTURZE KOMÓREK
NABŁONKA JELITA ŚRODKOWEGO SŁODKOWODNEJ KREWETKI,
NEOCARIDINA DAVIDI (CRUSTACEA, MALACOSTRACA) WYWOŁANYCH
OBECNOŚCIĄ NIKLU W ŚRODOWISKU ŻYCIA

ROZPRAWA DOKTORSKA

CZEŚĆ II

PROMOTOR
PROF. DR HAB. MAGDALENA
ROST-ROSZKOWSKA

KATOWICE 2023

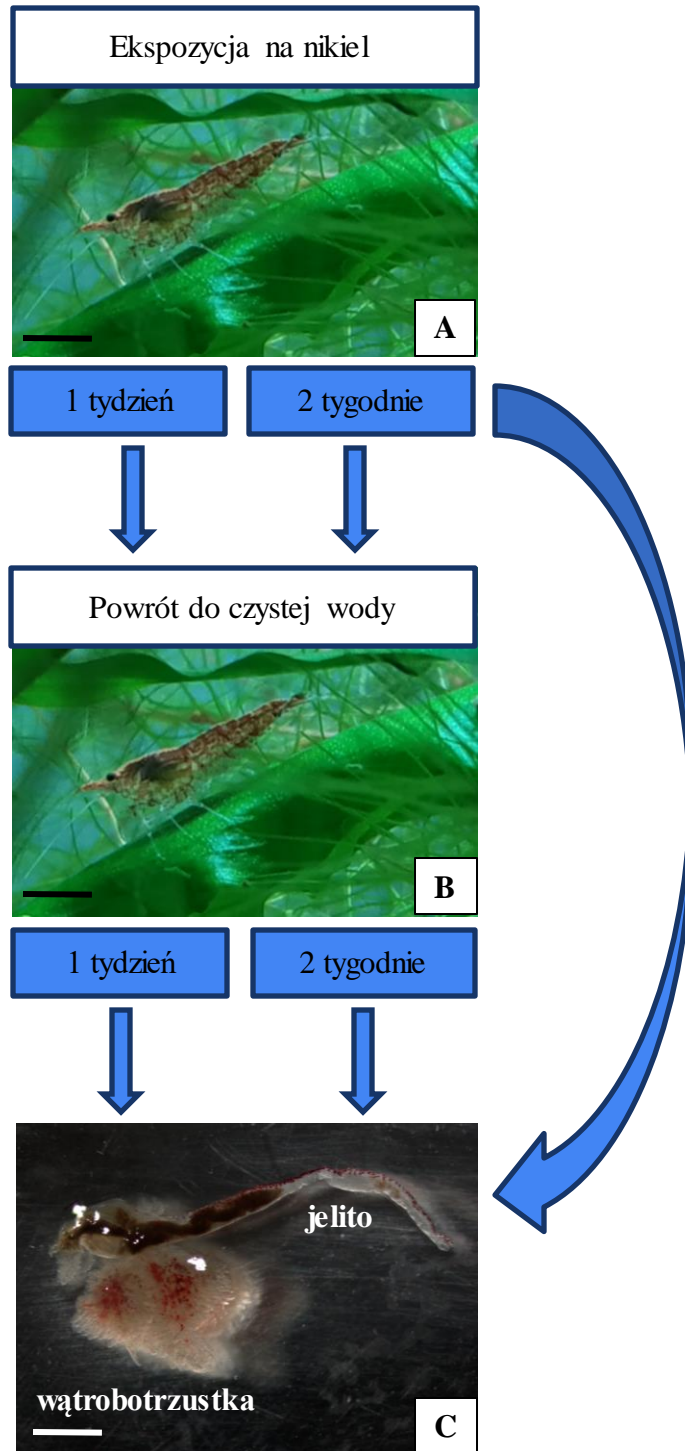


Fig. 1. Schemat układu eksperymentalnego

(A, B) pokrój ciała krewetki *Neocaridina davidi*, Bar = 0,54 cm
 (C) jelito środkowe krewetki *Neocaridina davidi*, Bar = 0,23 cm

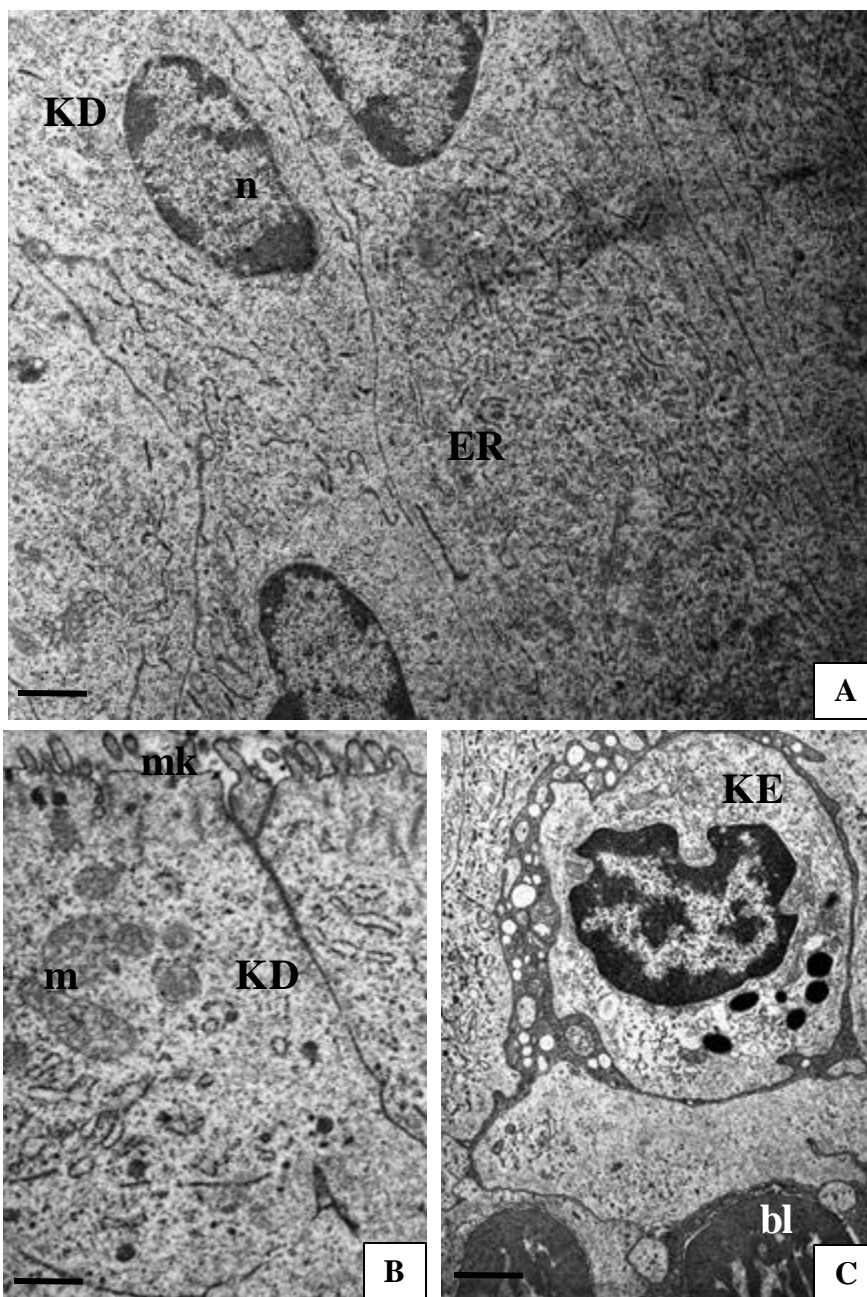


Fig. 2. Ultrastruktura nabłonka jelita *Neocaridina davidi* grupy kontrolnej (CT). Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**KD**) - komórka D, (**KE**) - komórka regeneracyjna, (**n**) - jądro komórkowe, (**m**) - mitochondrium, (**mk**) - mikrokosmki, (**bl**) - błona podstawna, (**ER**) - cysterny retikulum endoplazmatycznego

(A) Bar = 0,48 μm , (B) Bar = 1,13 μm , (C) Bar = 1 μm

Fig. 3. Ultrastruktura nabłonka jelita *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej **Ni 1:0**

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**l**) - światło jelita środkowego, (**mk**) - mikrokosmki, (**au**) - autofagosom, (**m**) - mitochondrium, (**n**) - jądro komórkowe, (**w kółku**) – zdegenerowane mitochondrium, (**strzałka**) – zwakuolizowany obszar cytoplazmy, (**w**) – wakuola

(A) Bar = 1 μm , (B) Bar = 0,75 μm , (C) Bar = 0,8 μm

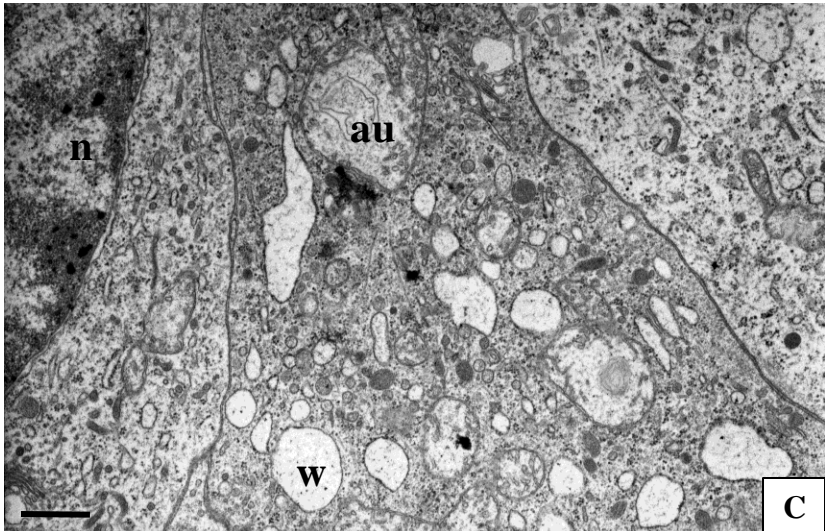
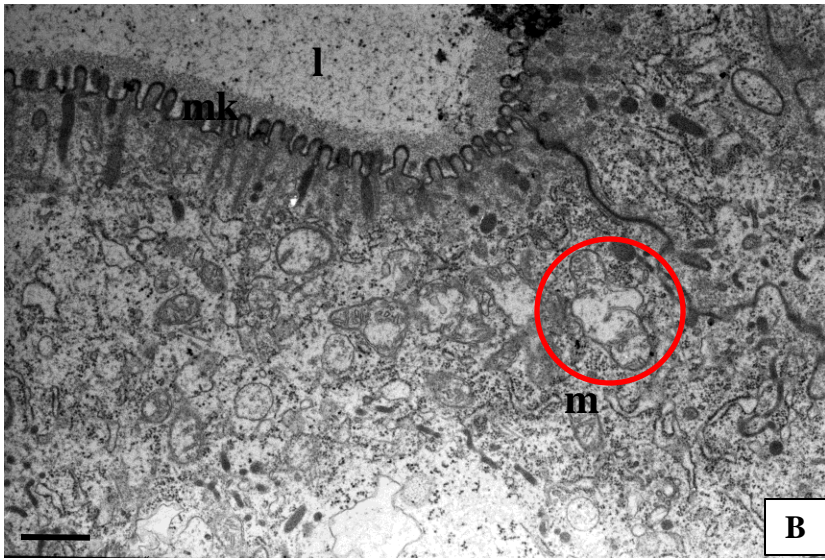
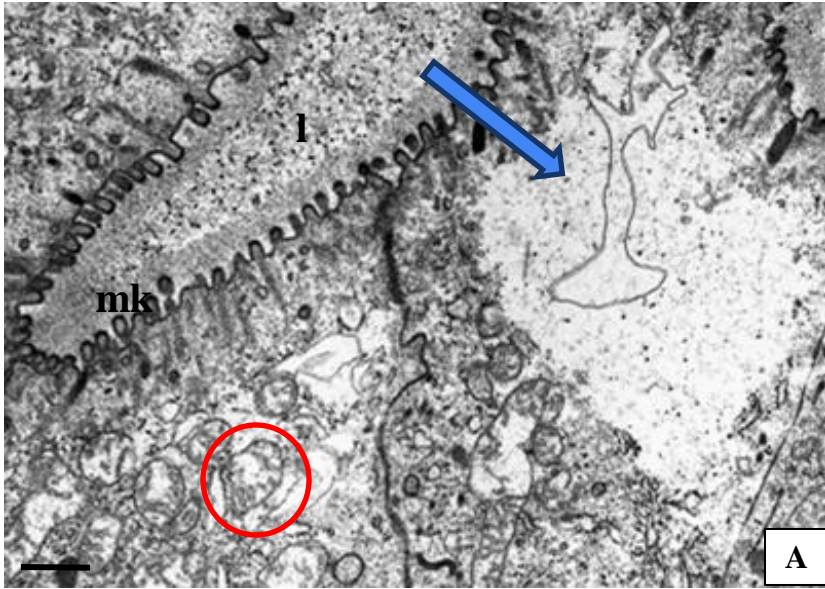


Fig. 4. Ultrastruktura nabłonka jelita *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej **Ni 2:0**. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**n**) - jądro komórkowe, (**m**) - mitochondrium, (**mk**) - mikrokosmki, (**bl**) - błona podstawna, (**l**) – światło jelita środkowego, (**au**) – autofagosom, (**w**) – wakuola, (**mw**) – mięśnie wisceralne

(A) Bar = 0,73 μm , (B) Bar = 0,8 μm , (C) Bar = 0,73 μm , (D) Bar = 0,9 μm

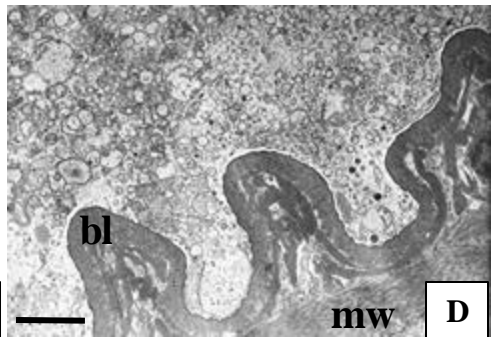
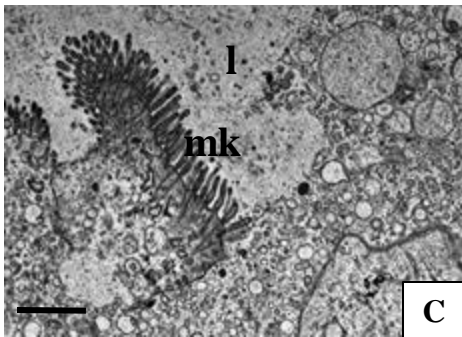
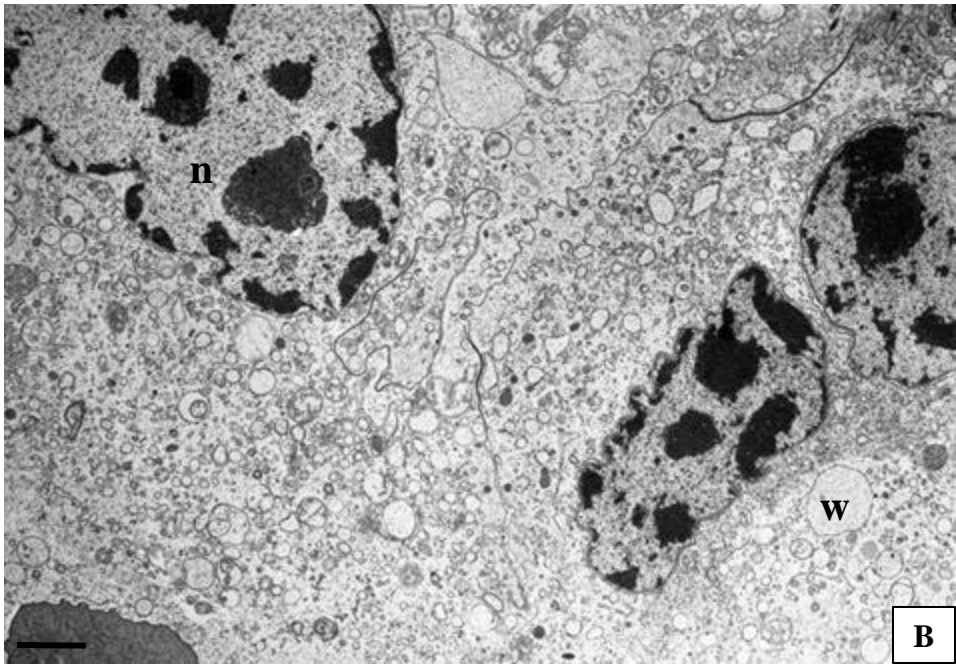
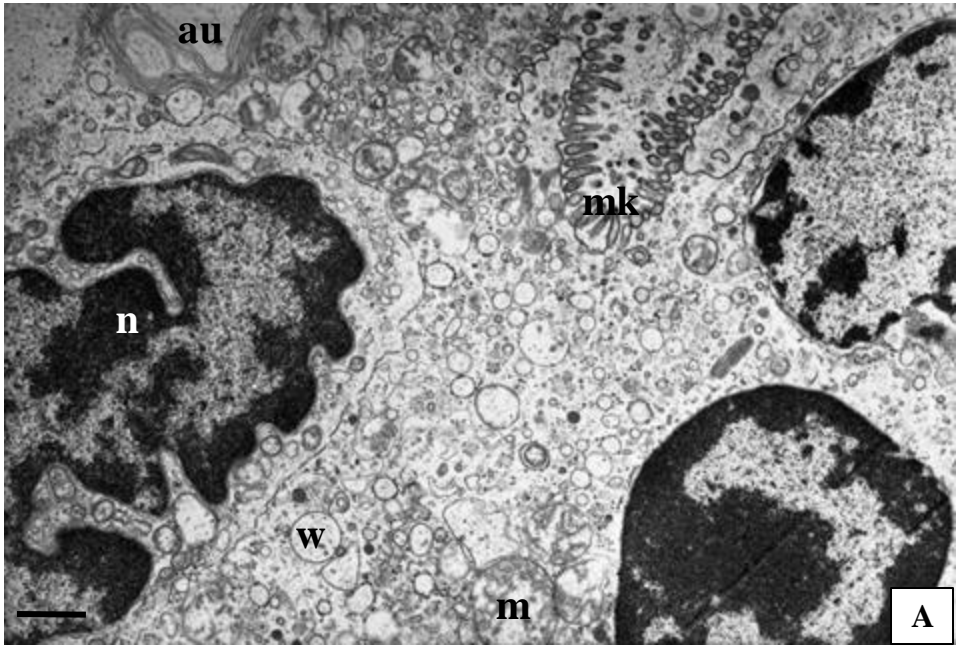
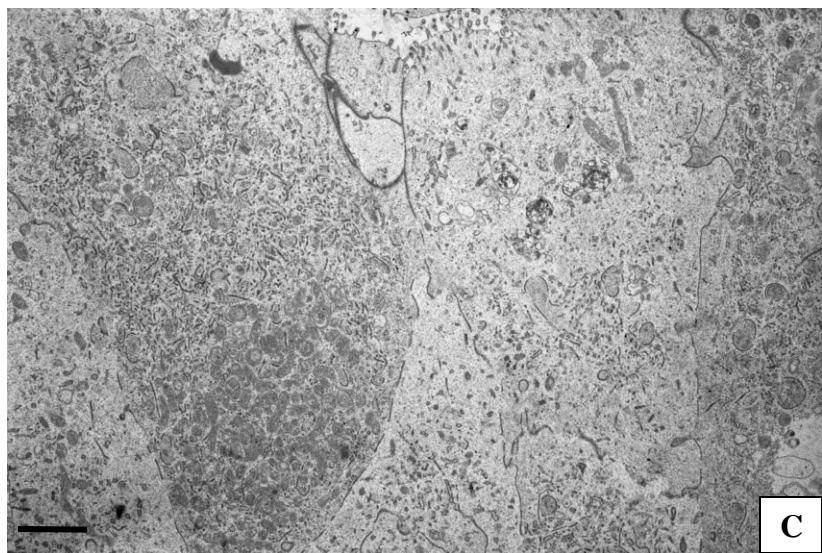
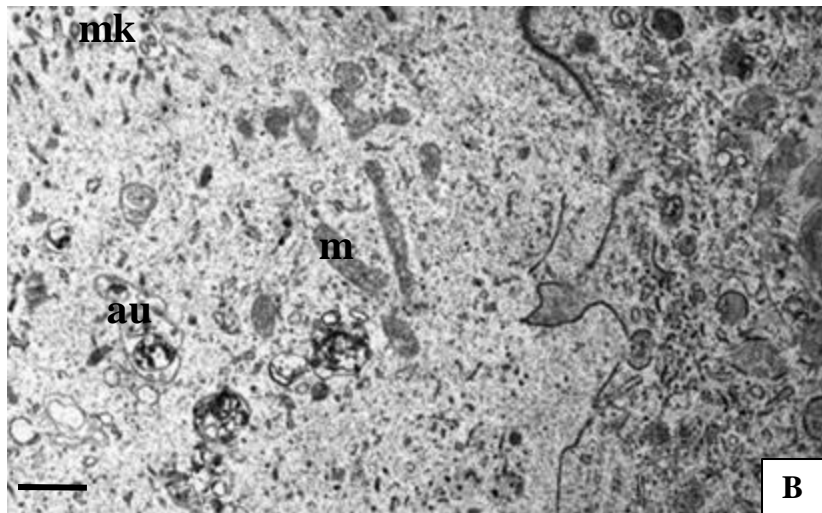
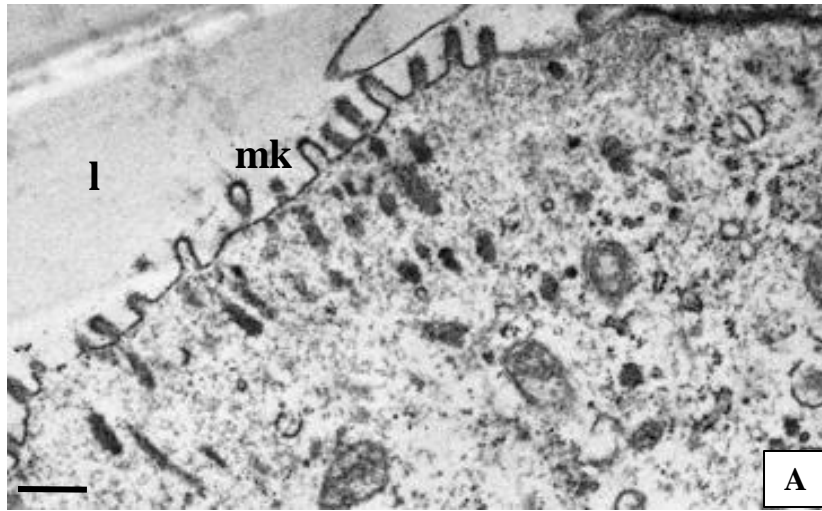


Fig. 5. Ultrastruktura nabłonka jelita *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej **Ni 1:1**.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**m**) - mitochondrium, (**mk**) - mikrokosmki, (**l**) – światło jelita środkowego, (**au**) – autofagosom

(A) Bar = 0,6 μm , (B) Bar = 1 μm , (C) Bar = 2 μm



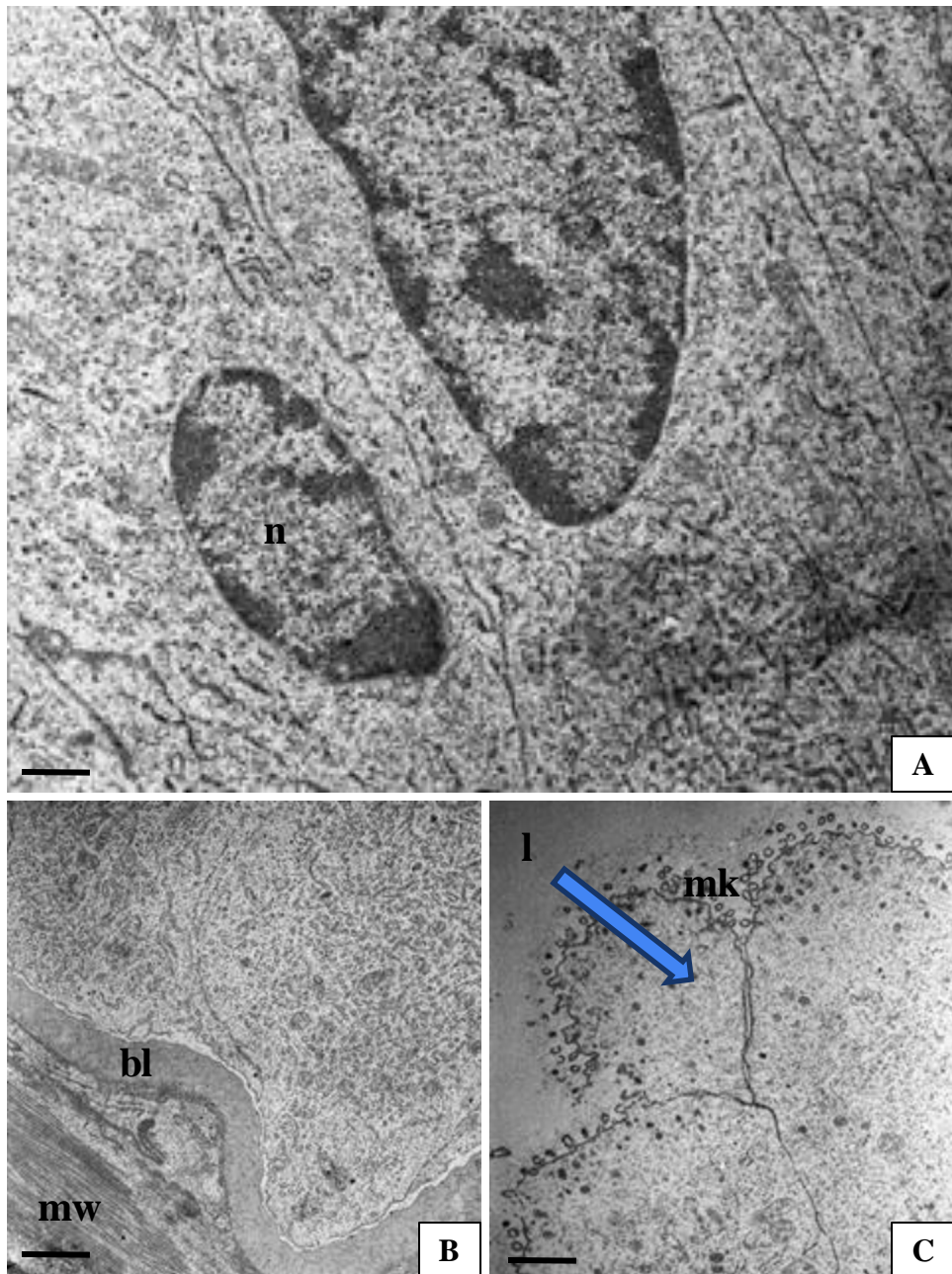


Fig. 6. Ultrastruktura nabłonka jelita *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej Ni 1:2.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(n) - jądro komórkowe, (mk) - mikrokosmki, (l) – światło jelita środkowego, (bl) - błona podstawna, (mw) – mięśnie wisceralne, (strzałka) – zmiany nekrotyczne

(A) Bar = 0,42 μ m, (B) Bar = 0,63 μ m, (C) Bar = 1 μ m

Fig. 7. Ultrastruktura nabłonka jelita *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej **Ni 2:1**.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**n**) - jądro komórkowe, (**m**) - mitochondrium, (**mk**) - mikrokosmki, (**bl**) - błona podstawna, (**au**) – autofagosom, (**strzałka**) – zmiany nekrotyczne

(A) Bar = 0,44 μm , (B) Bar = 1,86 μm , (C) Bar = 1,46 μm , (D) Bar = 0,49 μm

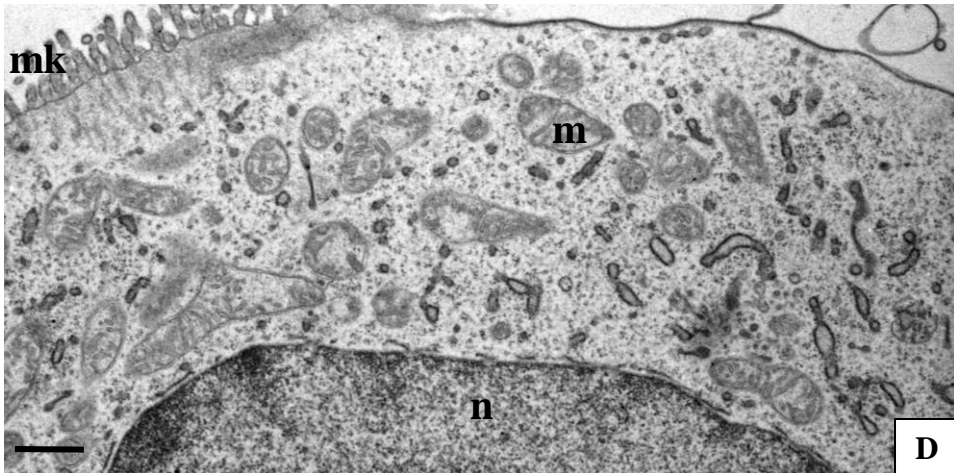
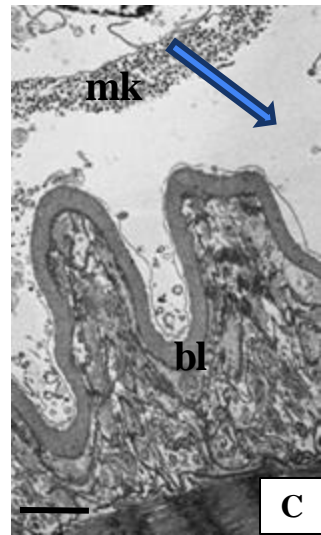
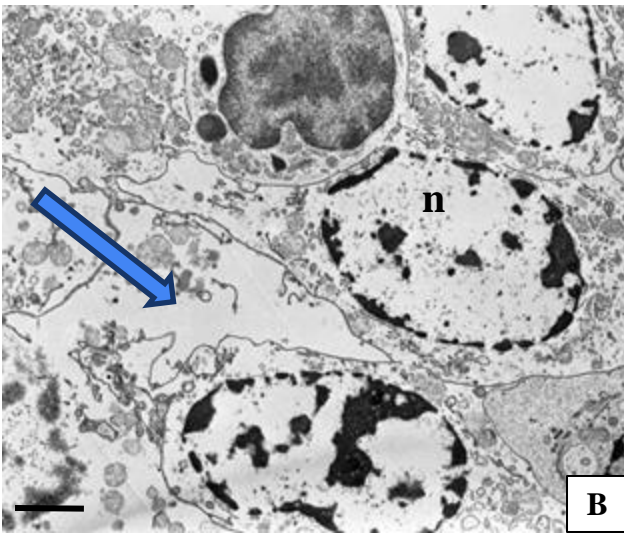
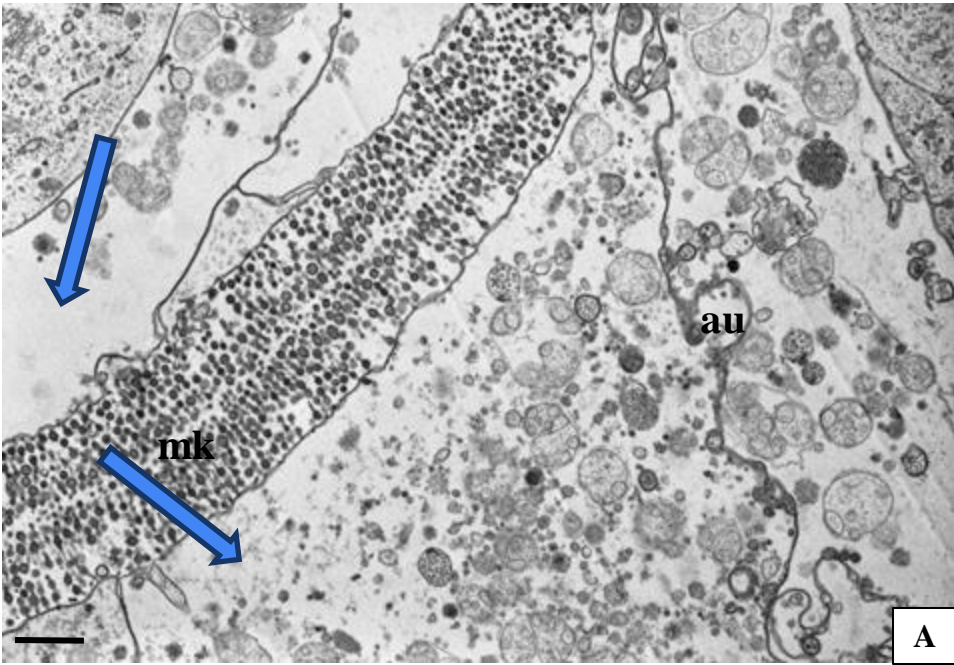
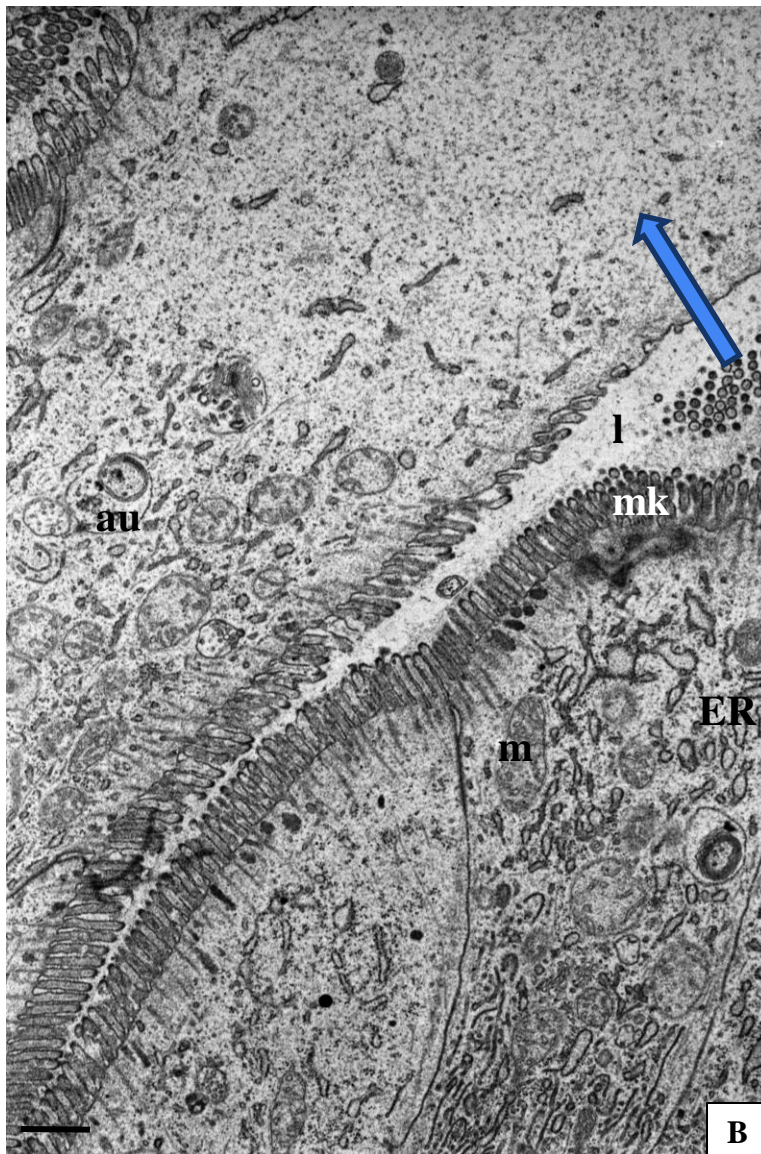
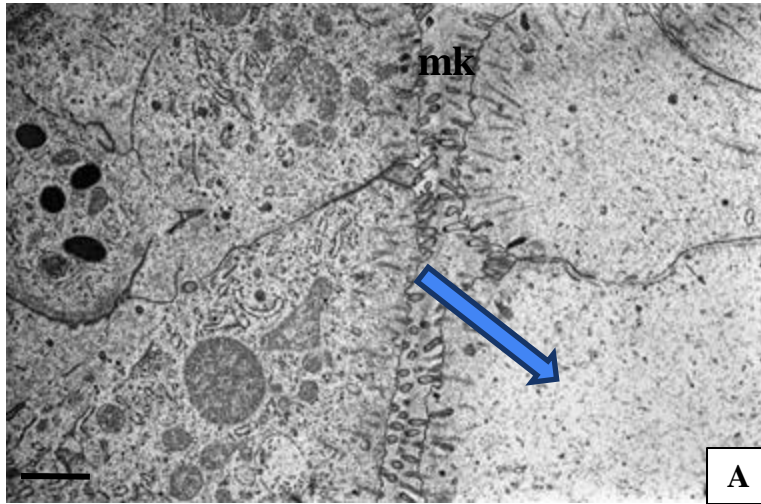


Fig. 8. Ultrastruktura nabłonka jelita *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej **Ni 2:2**.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**m**) - mitochondrium, (**mk**) - mikrokosmki, (**l**) – światło jelita środkowego, (**au**) – autofagosom, (**strzałka**) – zmiany nekrotyczne, (**ER**) – cysterny retikulum endoplazmatycznego

(A) Bar = 1,17 μm , (B) Bar = 0,49 μm



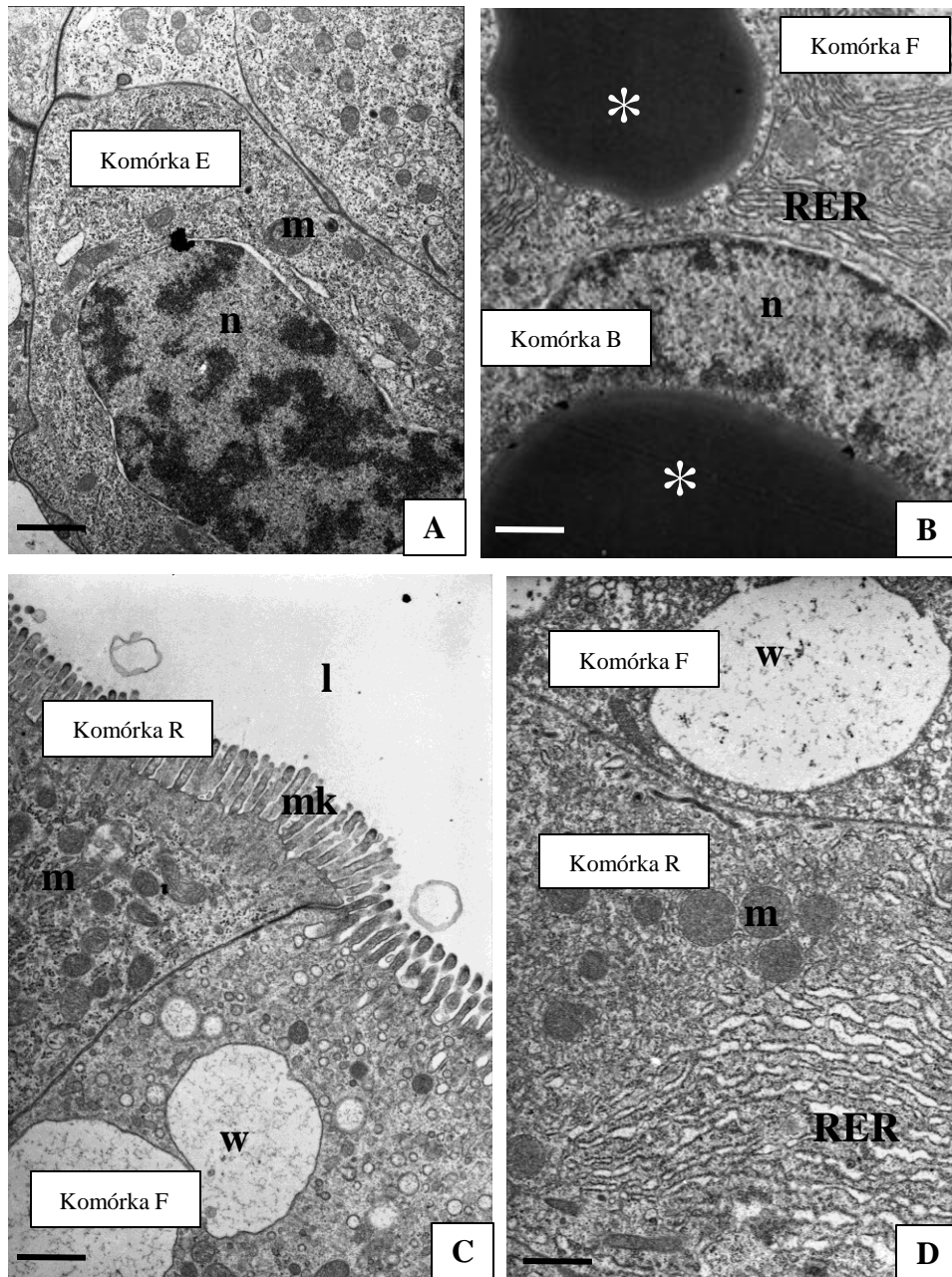


Fig. 9. Ultrastruktura wątrobotrzustki *Neocaridina davidi* grupy kontrolnej (CT). Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**n**) – jądro komórkowe, (*) - kula materiału zapasowego, (**l**) – światło jelita środkowego, (**mk**) – mikrokosmki, (**m**) – mitochondrium, (**w**) – wakuola, (**RER**) – cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego

(A) Bar = 1,66 μm , (B) Bar = 1,43 μm , (C) Bar = 0,75 μm , (D) Bar = 1,11 μm

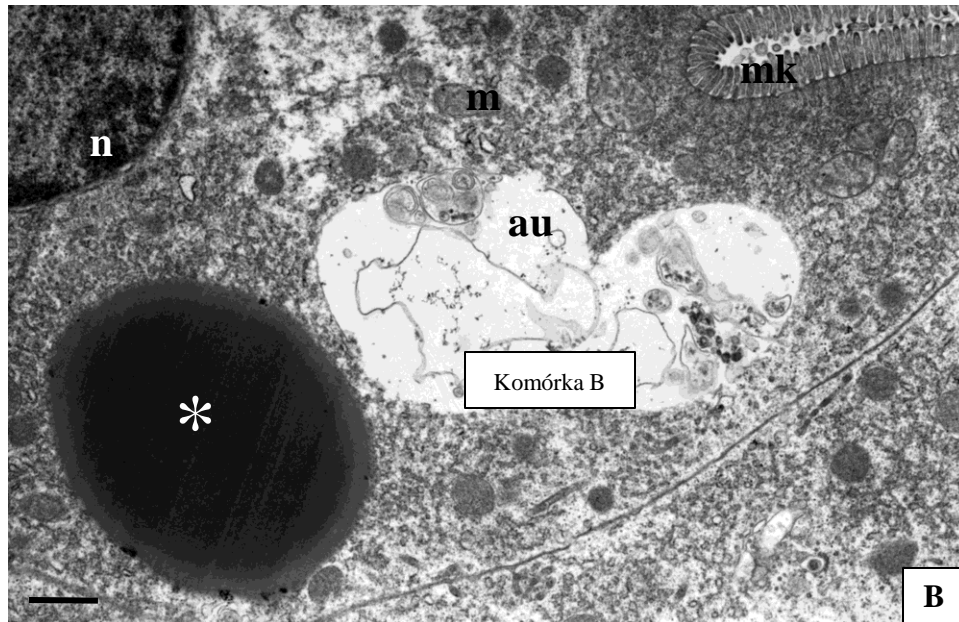
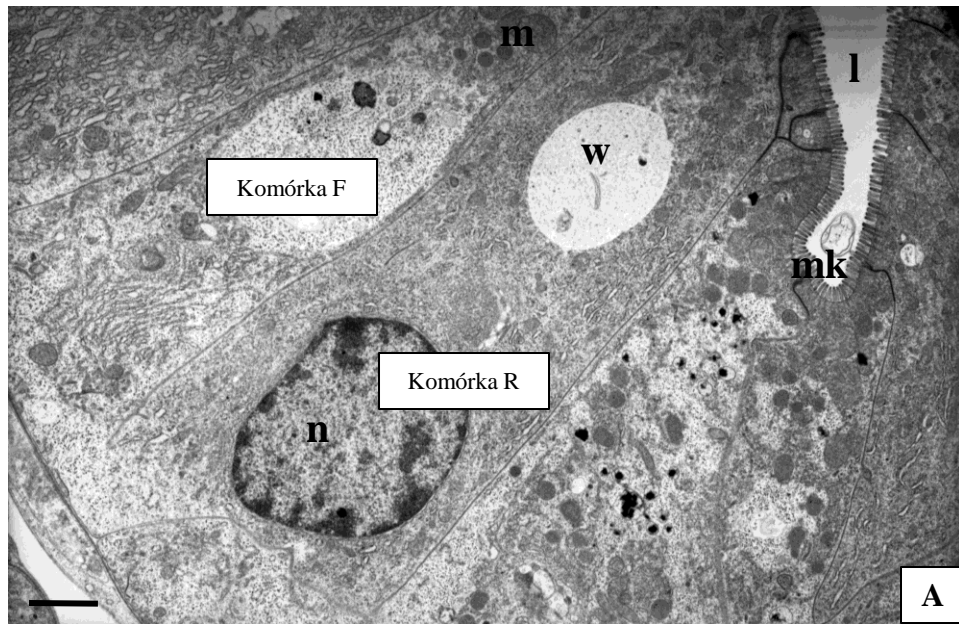


Fig. 10. Ultrastruktura wątrobotrzustki *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej **Ni 1:0**.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**n**) - jądro komórkowe, (**m**) - mitochondrium, (**mk**) - mikrokosmki, (**l**) – światło jelita środkowego, (**au**) – autofagosom, (*) - kula materiału zapasowego, (**w**) – wakuola

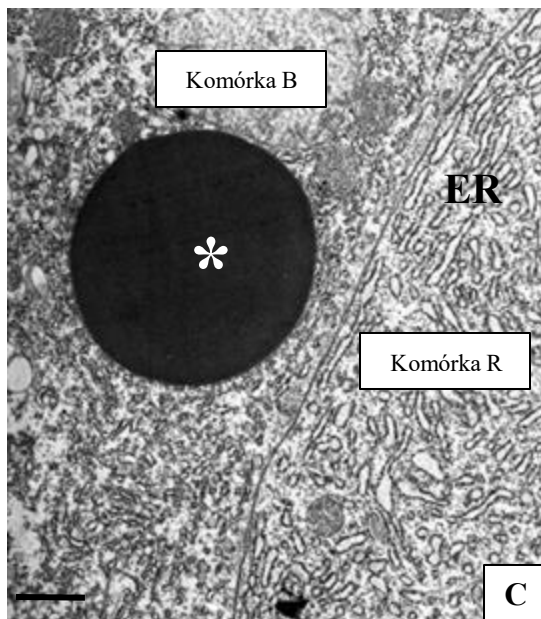
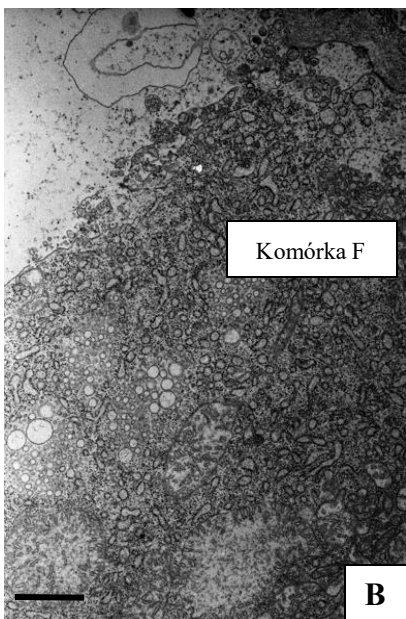
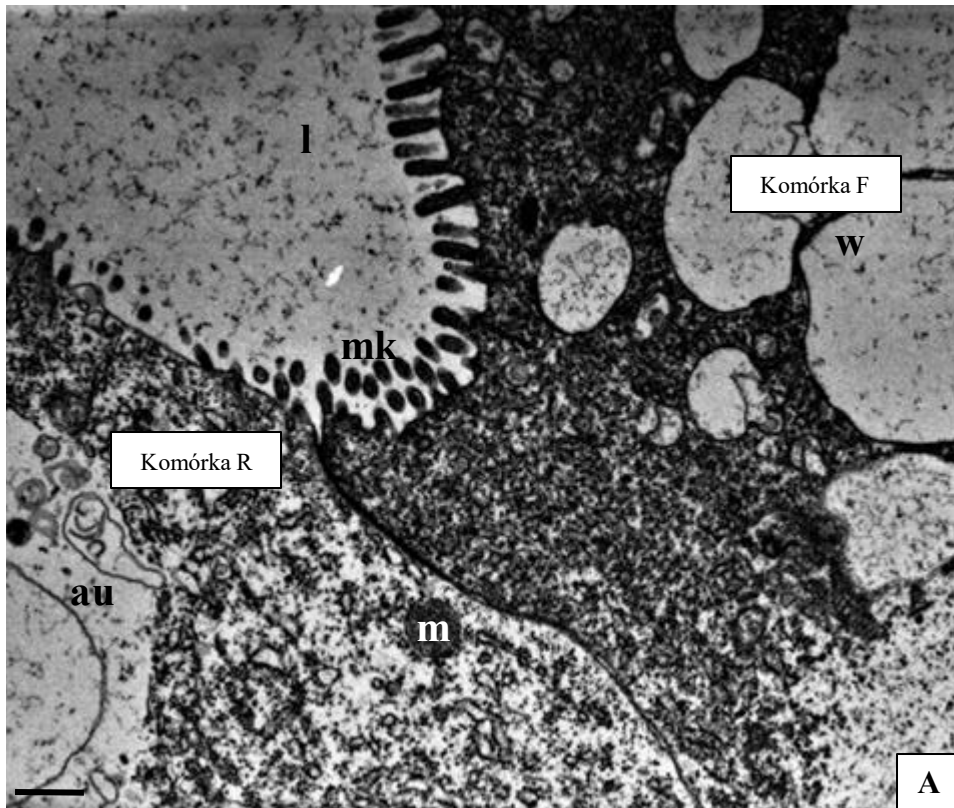
(A) Bar = 4,5 μm , (B) Bar = 1,5 μm

Fig. 11. Ultrastruktura wątrobotrzustki *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej **Ni 2:0**.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**m**) - mitochondrium, (**mk**) - mikrokosmki, (**l**) – światło jelita środkowego, (**au**) – autofagosom, (*) - kula materiału zapasowego, (**w**) – wakuola, (**ER**) – cysterny retikulum endoplazmatycznego

(A) Bar = 1 μm , (B) Bar = 1,43 μm , (C) Bar = 1 μm



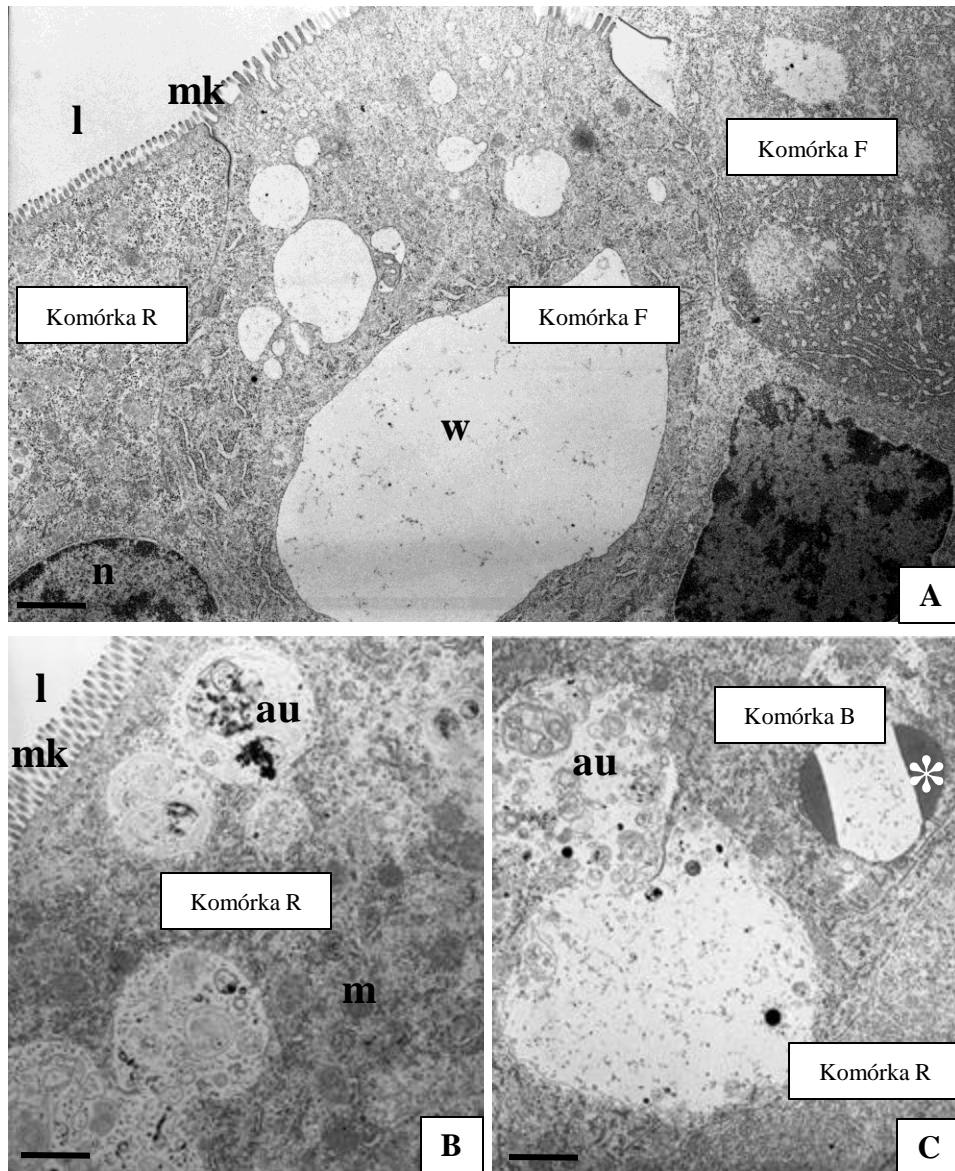


Fig. 12. Ultrastruktura wątrobotrzustki *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej Ni 1:1.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(n) - jądro komórkowe, (m) - mitochondrium, (mk) - mikrokosmki, (l) – światło jelita środkowego, (*) - kula materiału zapasowego, (au) – autofagosom, (w) – wakuola

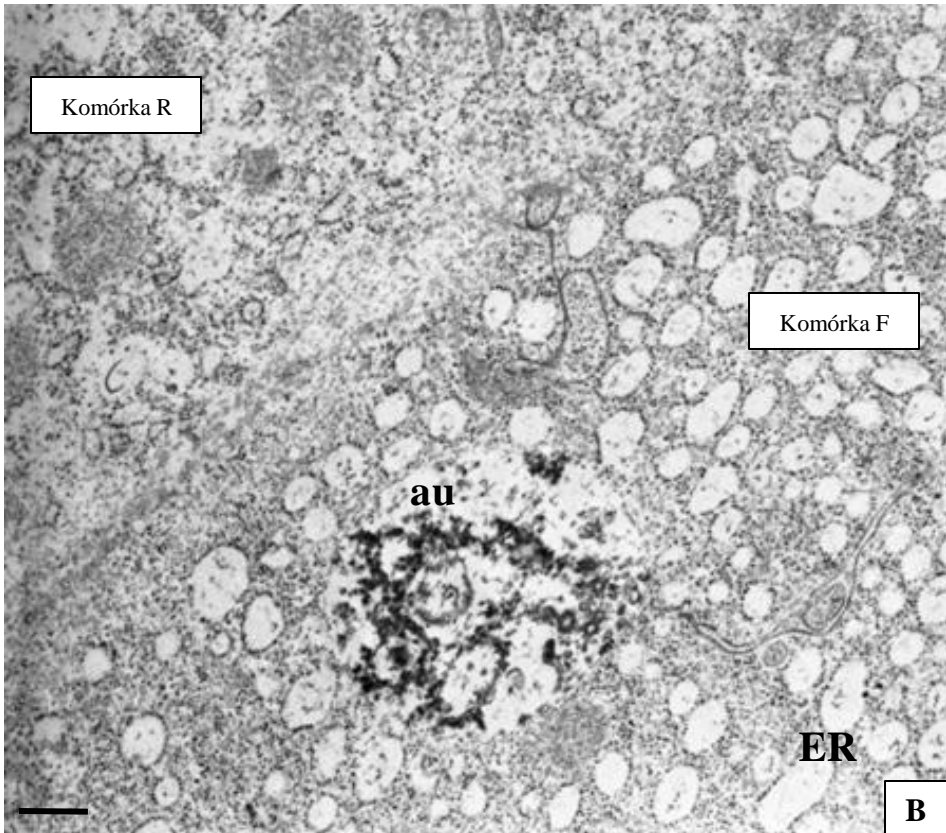
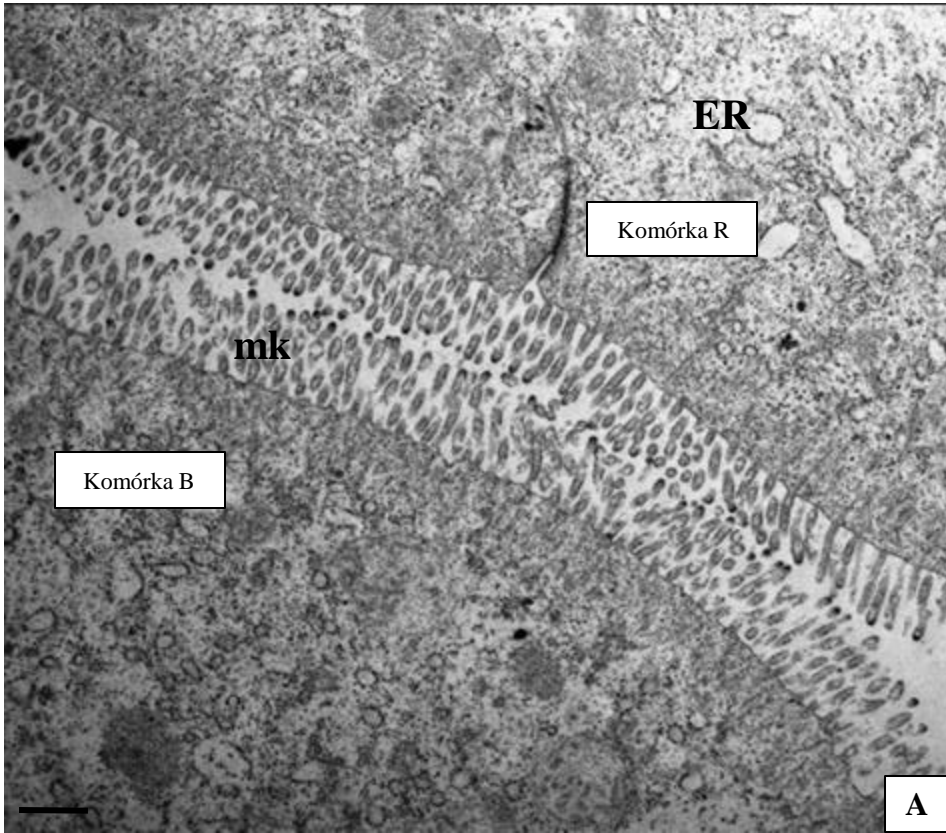
(A) Bar = 2,6 μm , (B) Bar = 1,28 μm , (C) Bar = 1,19 μm

Fig. 13. Ultrastruktura wątrobotrzustki *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej **Ni 1:2**.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**mk**) - mikrokosmki, (**au**) – autofagosom, (**ER**) – cysterny retikulum endoplazmatycznego

(A) Bar = 0,64 μm , (B) Bar = 0,48 μm



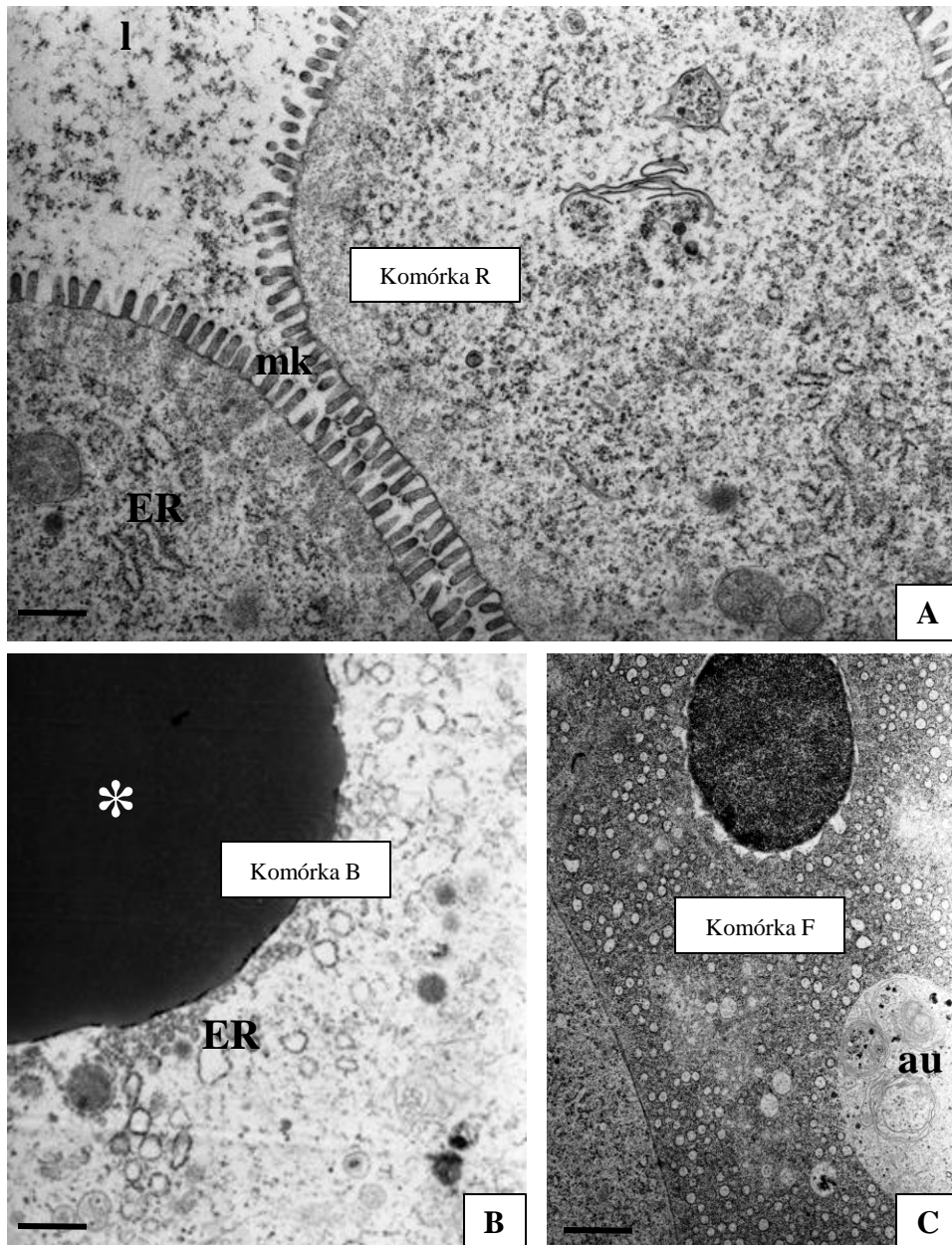


Fig. 14. Ultrastruktura wątrobotrzustki *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej Ni 2:1.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(**m**) - mitochondrium, (**mk**) - mikrokosmki, (**l**) – światło jelita środkowego, (*****) - kula materiału zapasowego, (**au**) – autofagosom, (**ER**) – cysterny retikulum endoplazmatycznego

(A) Bar = 1,33 μ m, (B) Bar = 0,6 μ m, (C) Bar = 3,6 μ m

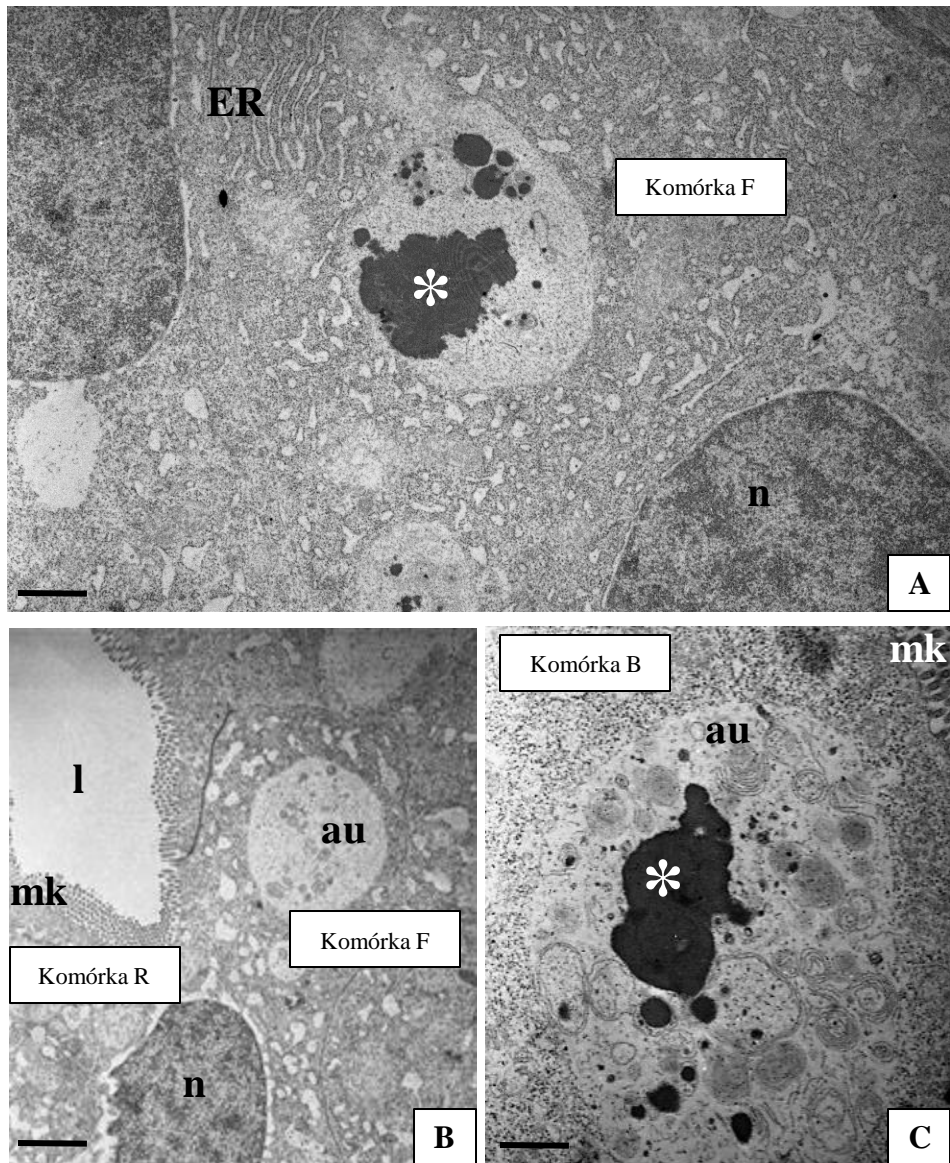


Fig. 15. Ultrastruktura wątrobotrzustki *Neocaridina davidi* grupy eksperymentalnej Ni 2:2.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

(n) - jądro komórkowe, (m) - mitochondrium, (mk) - mikrokosmki, (ER) – cysterny retikulum endoplazmatycznego

(A) Bar = 1 μm , (B) Bar = 2,25 μm , (C) Bar = 0,6 μm

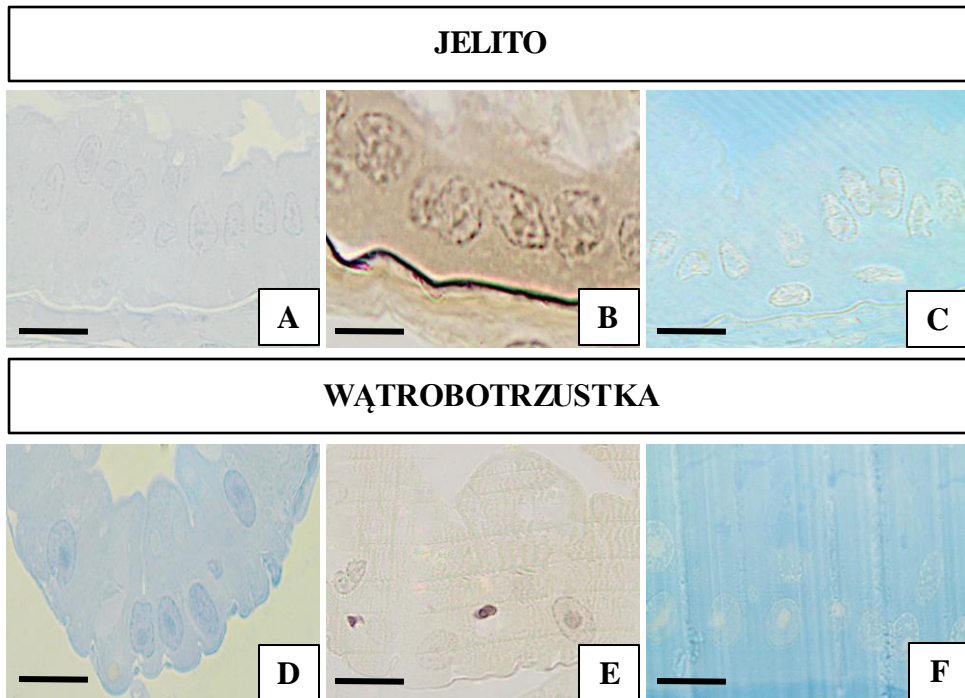


Fig. 16. Barwienie histochemiczne jelita i wątrobotrzustki *Neocaridina davidi* w grupie kontrolnej (CT).
Mikroskopia świetlna, powiększenie 100x

(A i D) - Błękit rtęciowo bromofenolowy,
(B i E) - PAS,
(C i F) - Sudan Czarny B

Bary: (A) = 12 μm , (B) = 12 μm , (C) = 12,41 μm , (D) = 16,47 μm , (E) = 14,53 μm , (F) = 12,5 μm

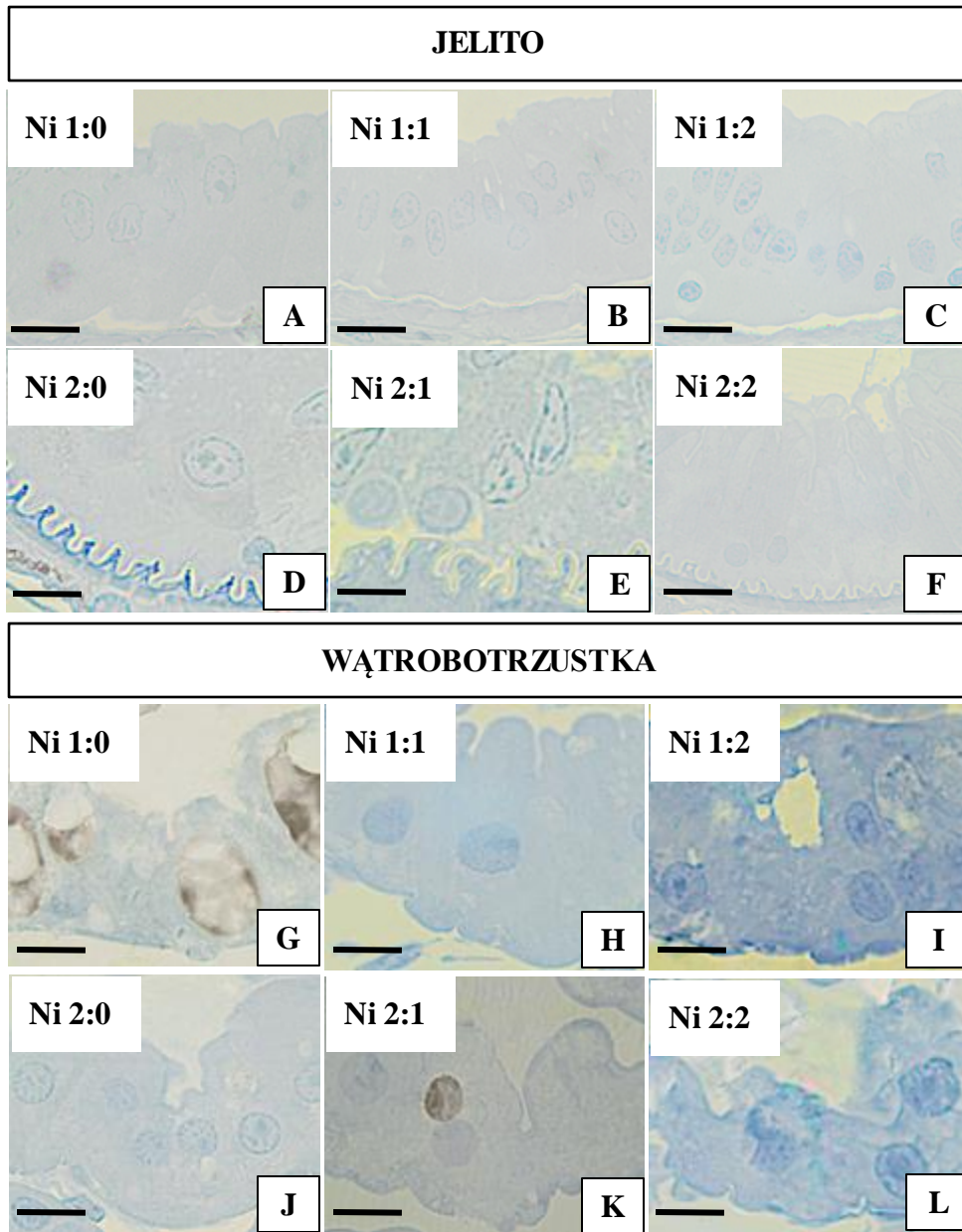


Fig. 17. Barwienie histochemiczne jelita i wątrobotrzustki *Neocaridina davidi*, błękitem rtęciowobromofenolowym. Mikroskopia świetlna, powiększenie 100x.

grupy eksperymentalne - Ni 1:0, Ni 2:0, Ni 1:1, Ni 1:2, Ni 2:1, Ni 2:2 – (opis w Metodologii).

Bary: (A) = 12 μm , (B) = 14,4 μm , (C) = 9,47 μm , (D) = 10 μm , (E) = 4,8 μm , (F) = 11,61 μm , (G) = 13 μm , (H) = 14,53 μm , (I) = 13 μm , (J) = 14,44 μm , (K) = 15 μm , (L) = 17,14 μm

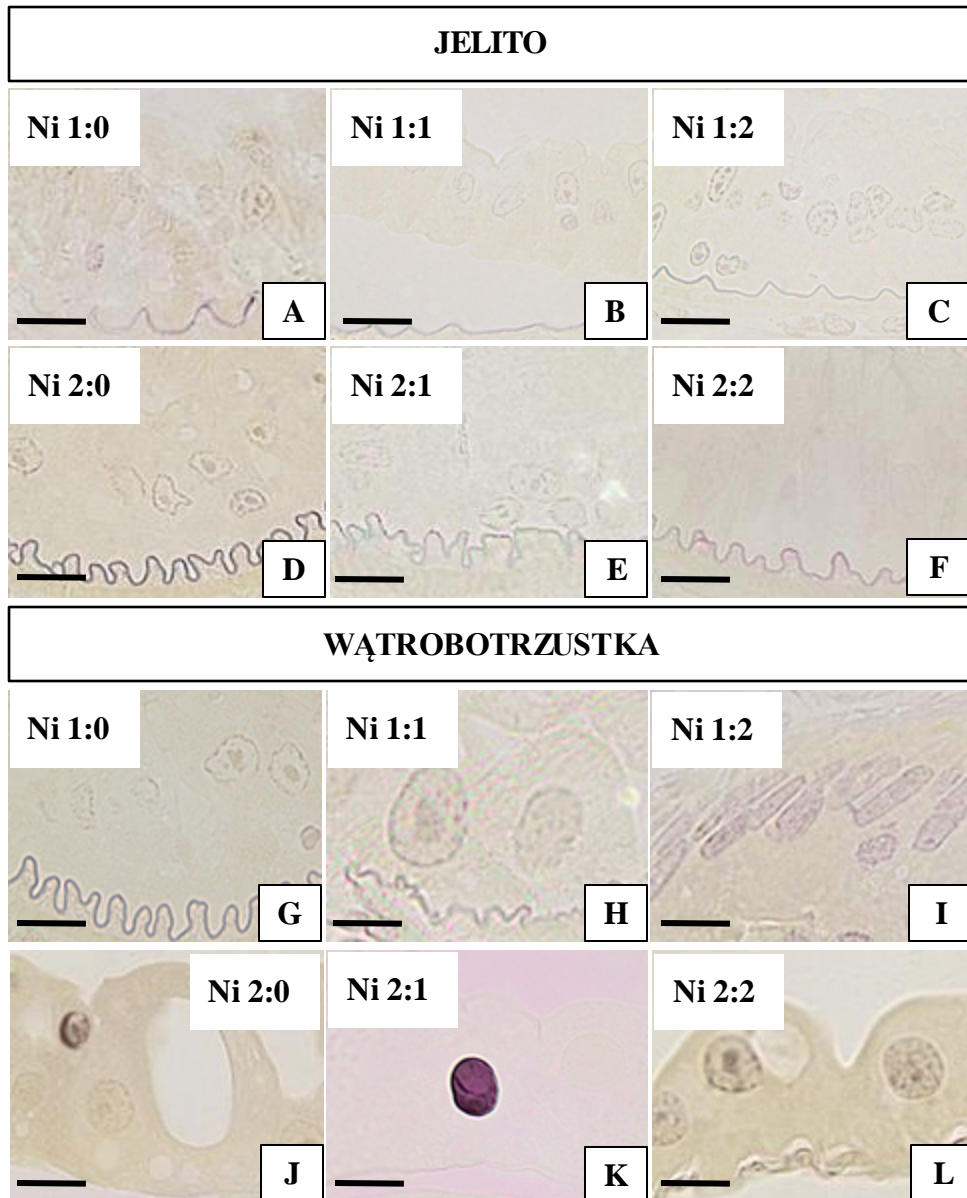


Fig. 18. Barwienie histochemiczne jelita i wątrobotrzustki *Neocaridina davidi*, PAS.

Mikroskopia świetlna, powiększenie 100x.

grupy eksperymentalne - Ni 1:0, Ni 2:0, Ni 1:1, Ni 1:2, Ni 2:1, Ni 2:2 – (opis w Metodologii).

Bary: (A) = 10,59 μm , (B) = 16 μm , (C) = 9,47 μm , (D) = 14,9 μm , (E) = 12,86 μm , (F) = 9,23 μm , (G) = 13 μm , (H) = 7,43 μm , (I) = 14,11 μm , (J) = 10,83 μm , (K) = 10,91 μm , (L) = 12 μm

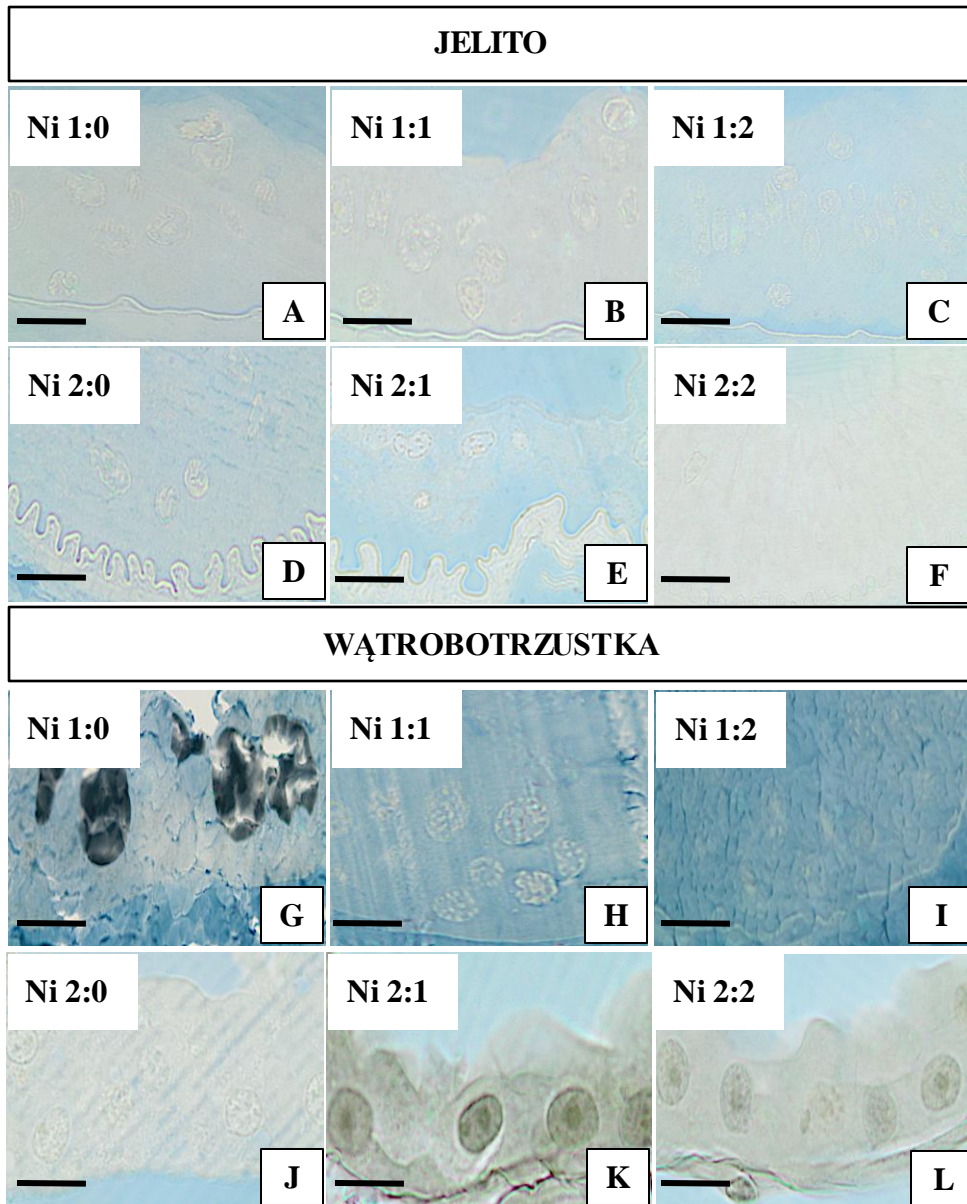


Fig. 19. Barwienie histochemiczne jelita i wątrobotrzustki *Neocaridina davidi*, Sudanem Czarnym B. Mikroskopia świetlna, powiększenie 100x.

grupy eksperymentalne - Ni 1:0, Ni 2:0, Ni 1:1, Ni 1:2, Ni 2:1, Ni 2:2 – (opis w Metodologii).

Bary: (A) = 10,91 μm , (B) = 12 μm , (C) = 10,29 μm , (D) = 10,29 μm , (E) = 12,68 μm , (F) = 13,33 μm , (G) = 13 μm , (H) = 10,4 μm , (I) = 14,86 μm , (J) = 16,47 μm , (K) = 10,83 μm , (L) = 9,63 μm

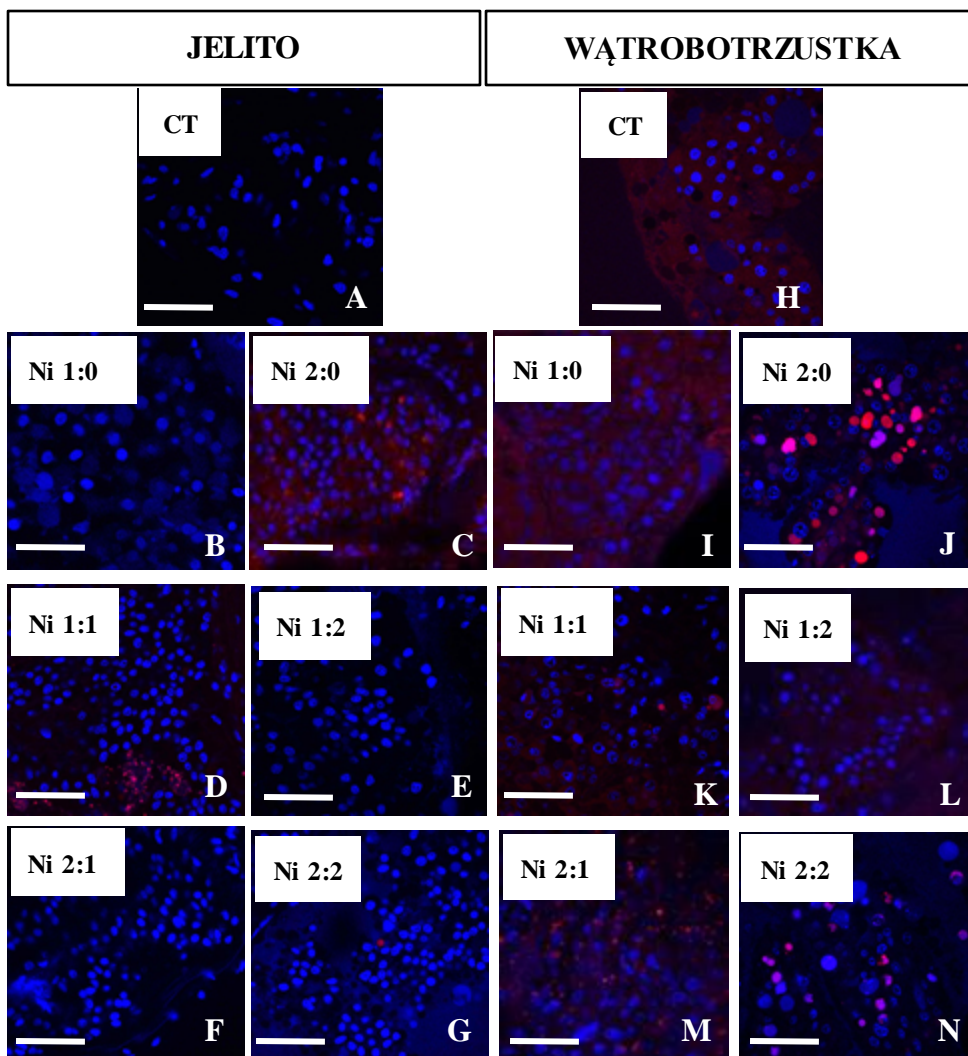


Fig. 19. Lokalizacja silnie kwaśnych struktur w nabłonku jelita i wątrobotrzustki *N. davidi*. CT – grupa kontrolna, Ni 1:0, Ni 2:0, Ni 1:1, Ni 1:2, Ni 2:1, Ni 2:2 – grupy eksperymentalne (opis w Metodologii). Silnie kwaśne struktury – sygnały czerwone, jądra komórkowe - sygnały niebieskie. Mikroskopia konfokalna, barwienie odczynnikiem LysoTracker Red i odczynnikiem DAPI.
Bar = 100 μ m

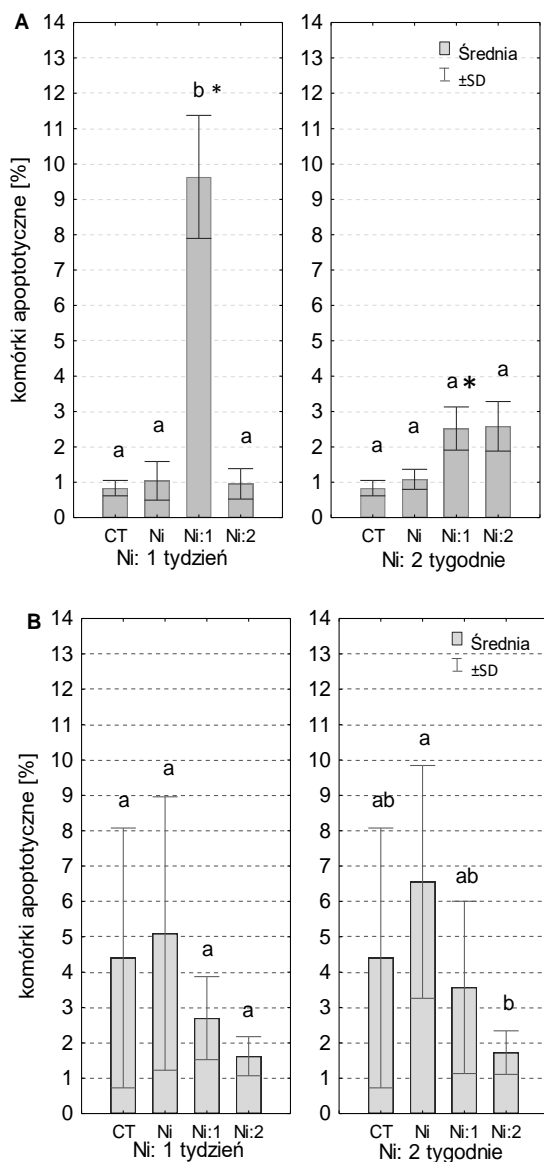


Fig. 21. Procent komórek wczesno-apoptotycznych (odchylenie standardowe \pm SE) w jelicie (A) i watrobotrzustce (B) osobników *N. davidi* poddanych ekspozycji na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0,05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0,05$).

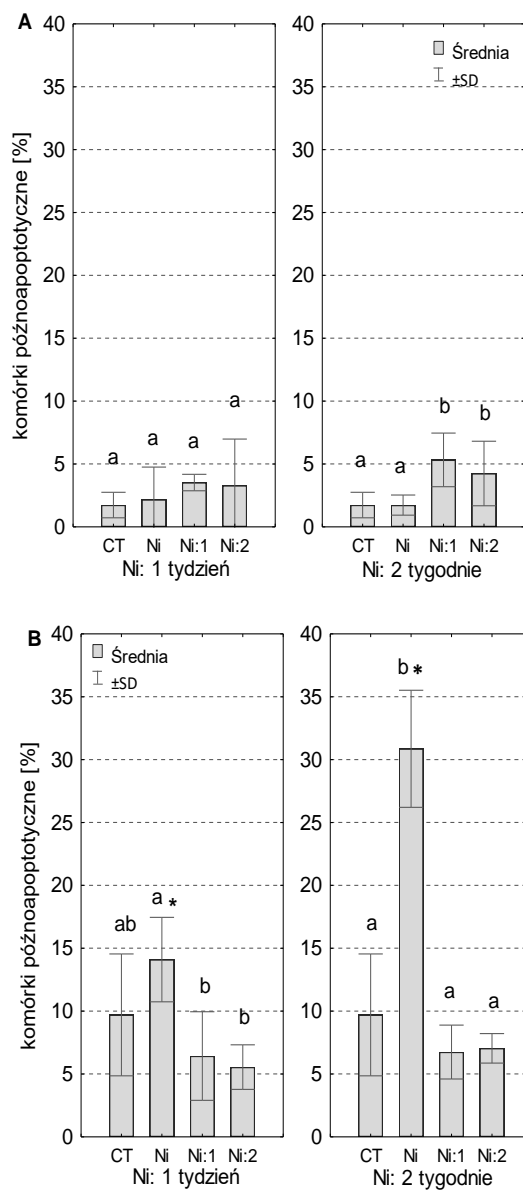


Fig. 22. Procent komórek późno-apoptycznych (odchylenie standardowe \pm SE) w jelicie (A) i wątrobotrzustce (B) osobników *N. davidi* poddanych ekspozycji na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0,05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0,05$).

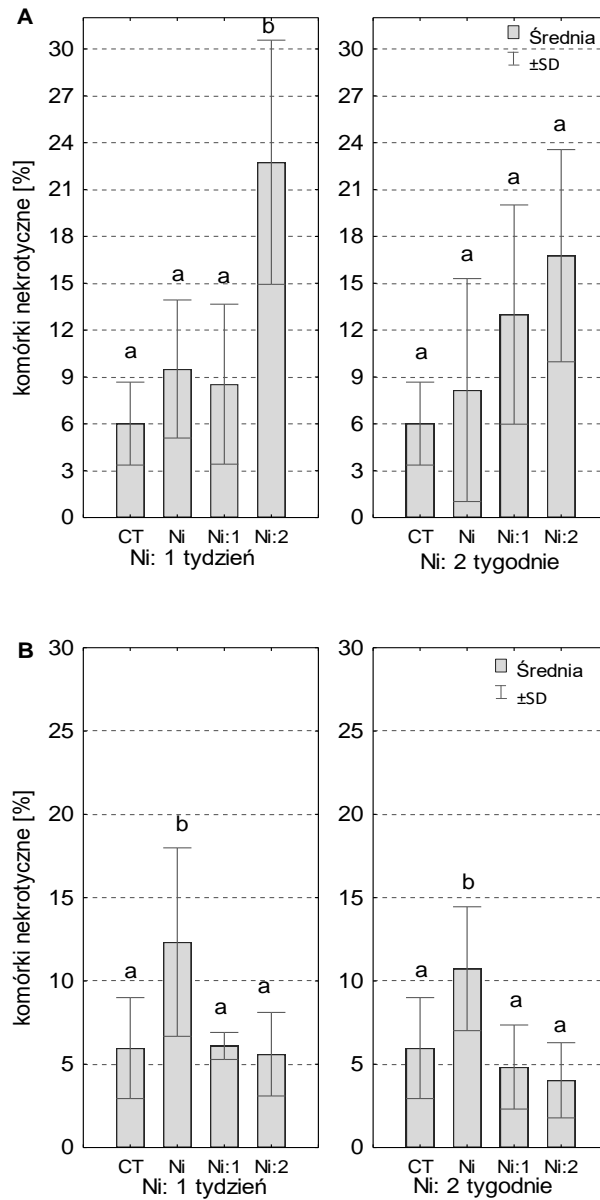


Fig. 23. Procent komórek nekrotycznych (odchylenie standardowe \pm SE) w jelicie (A) i wiotrotrzustce (B) osobników *N. davidi* poddanych ekspozycji na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0,05$).

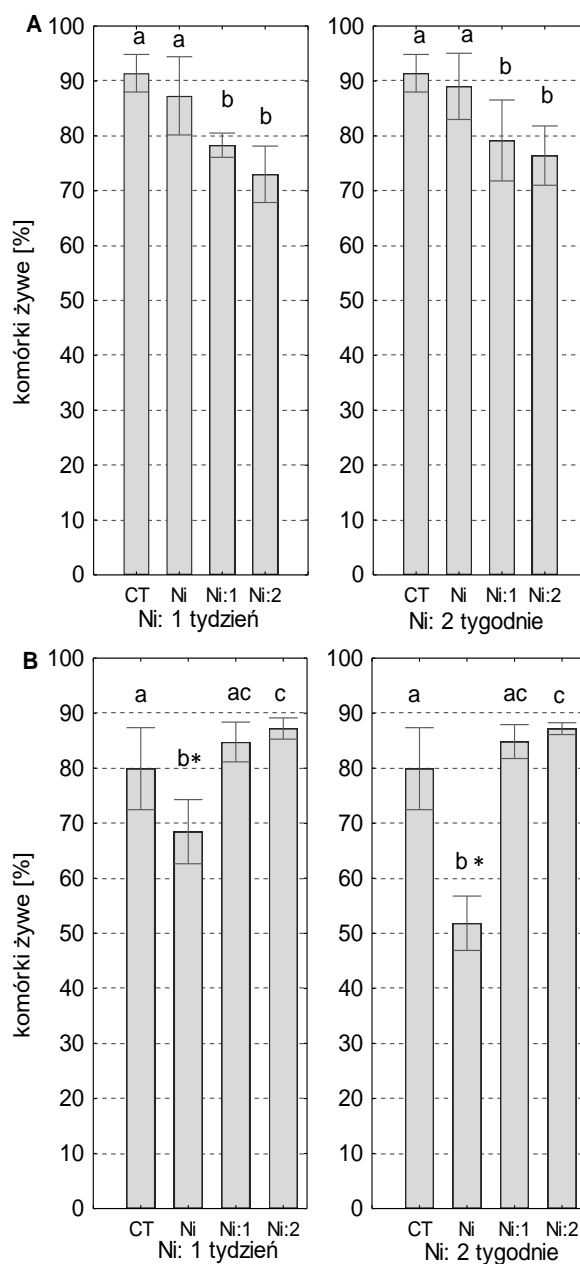


Fig. 24. Procent żywych komórek (odchylenie standardowe \pm SE) w jelicie (A) i wątrobotrzustce (B) osobników *N. davidi* poddanych ekspozycji na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0,05$).

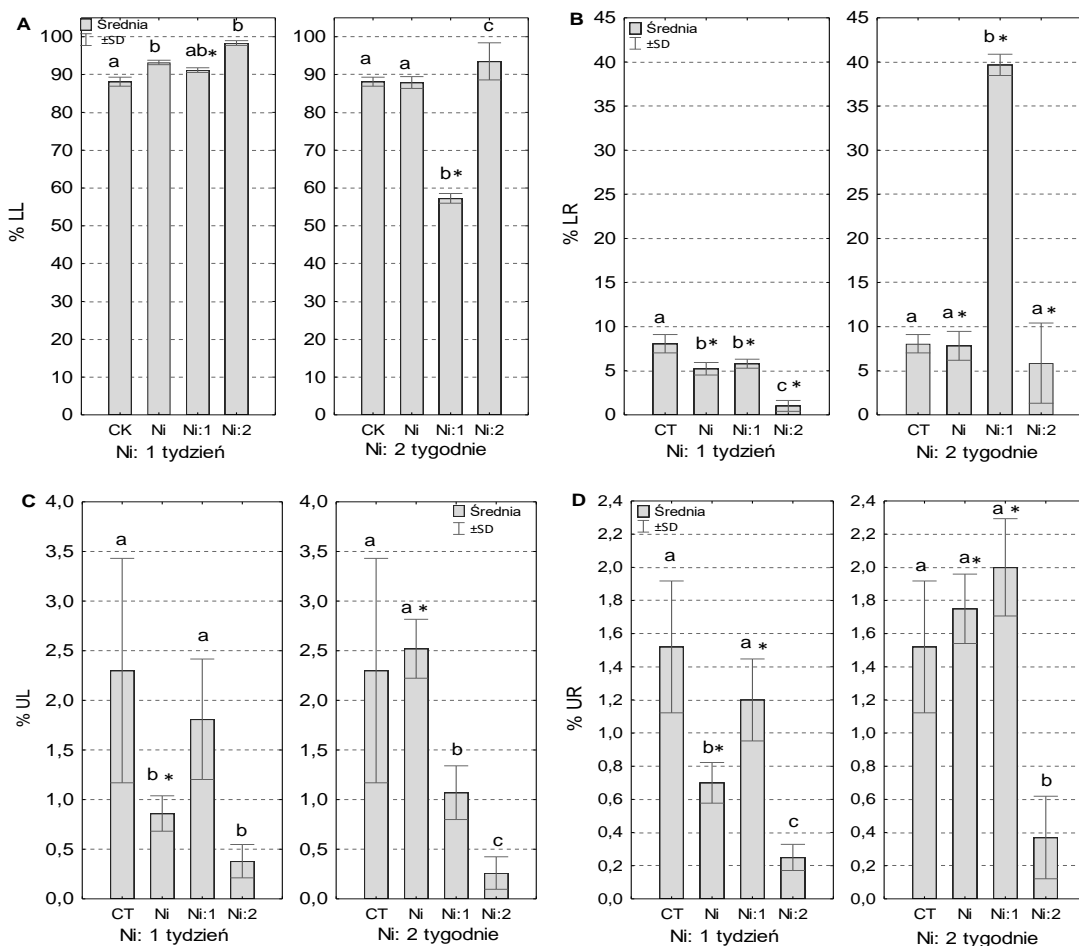


Fig. 25. Odsetek komórek żywych (A), komórek żywych kaspazo-pozytywnych (B), martwych komórek kaspazo-pozytywnych (C), komórek martwych (D) w jelicie osobników *N. davidi* ekspozowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b, c) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi (CT- kontrola; Ni- ekspozycja na nikiel; Ni: 1; ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień; Ni: 2; ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0.05$).

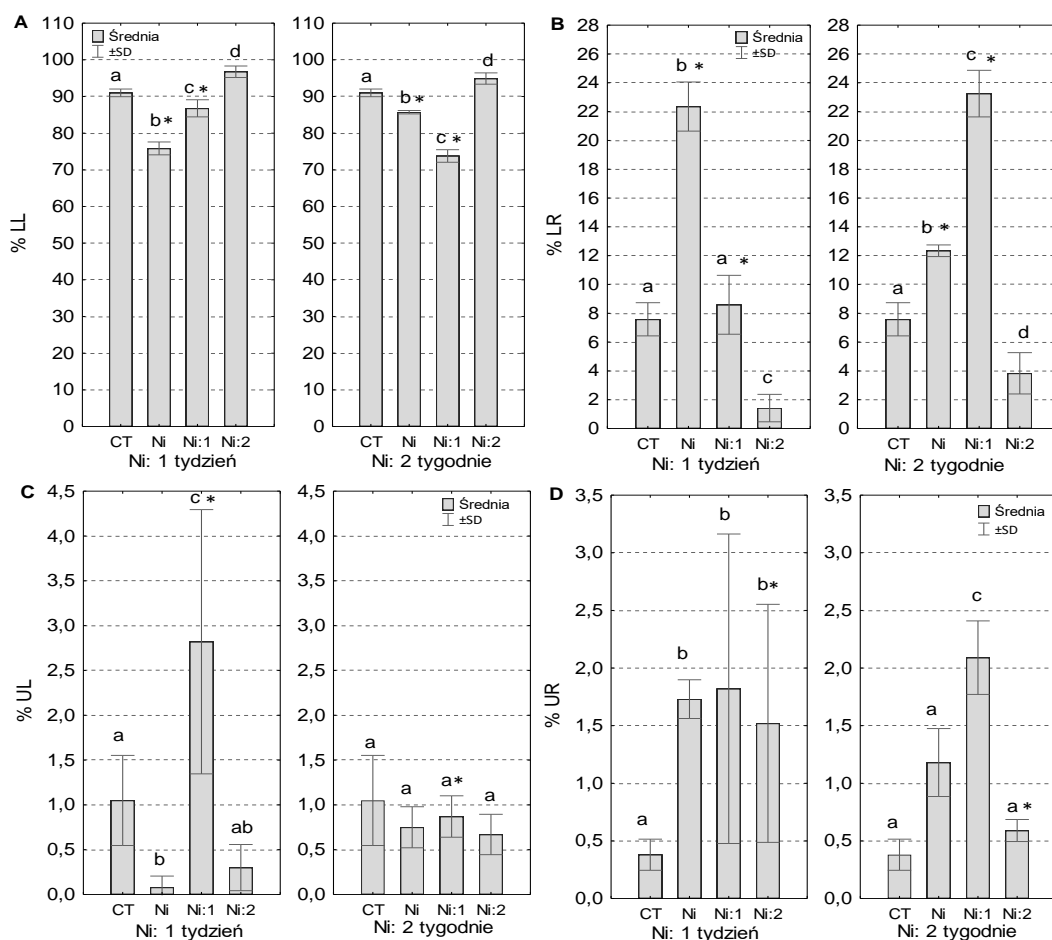


Fig. 26. Odsetek komórek żywych (A), komórek żywych kaspazo-pozytywnych (B), martwych komórek kaspazo-pozytywnych (C), komórek martwych (D) w wątrobotrzustce osobników *N. davidi* ekspozowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b, c, d) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi (CT- kontrola; Ni-ekspozycja na nikiel; Ni: 1; ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień; Ni: 2; ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0,05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0,05$).

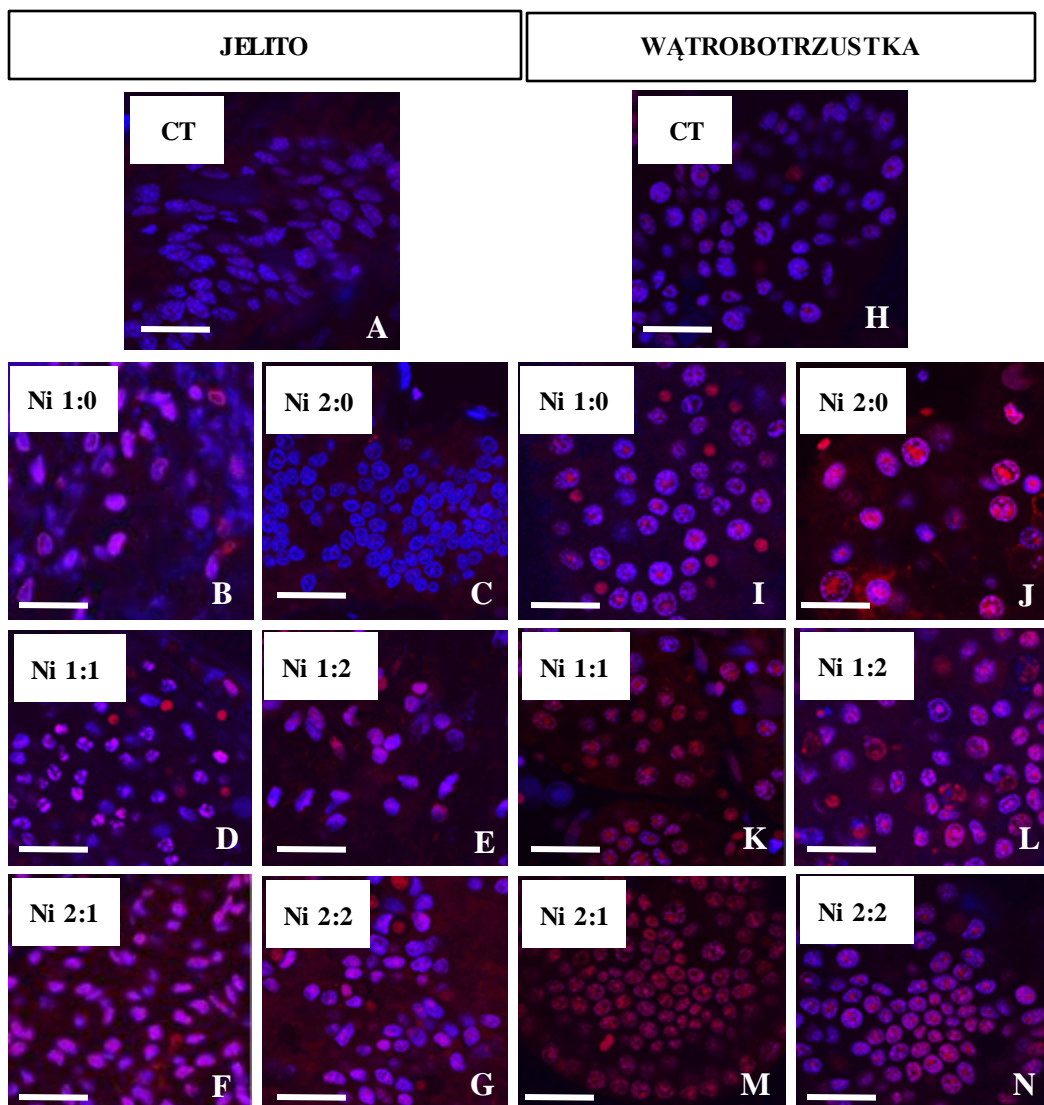


Fig. 27. Lokalizacja reaktywnych form tlenu (ROS) w nabłonku jelita i wątrobotrzustki *N. davidi*. CT – grupa kontrolna, Ni 1:0, Ni 2:0, Ni 1:1, Ni 1:2, Ni 2:1, Ni 2:2 – grupy eksperymentalne (opis w Metodologii). Struktury ROS-pozytywne – sygnały czerwone, jądra komórkowe - sygnały niebieskie. Mikroskopia konfokalna, barwienie odczynnikami DHE i odczynnikami DAPI.

Bar = 33,33 μm

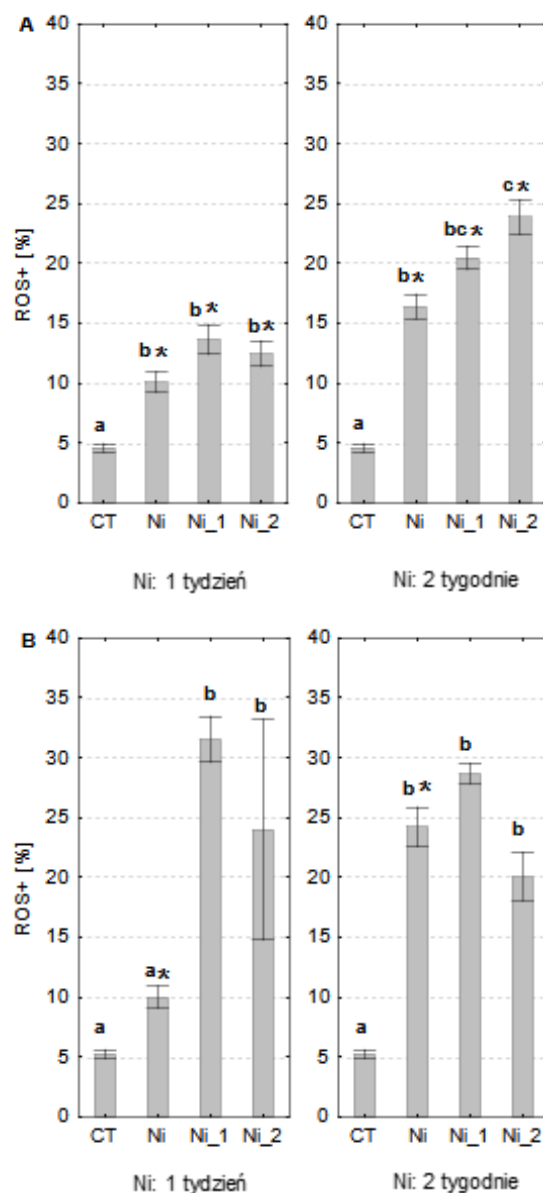


Fig. 28. Odsetek komórek ROS-pozytywnych (ROS+) (odchylenie standardowe \pm SE) w jelicie (A) i wątrobrzuszce (B) osobników *N. davidi* poddanych ekspozycji na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0,05$).

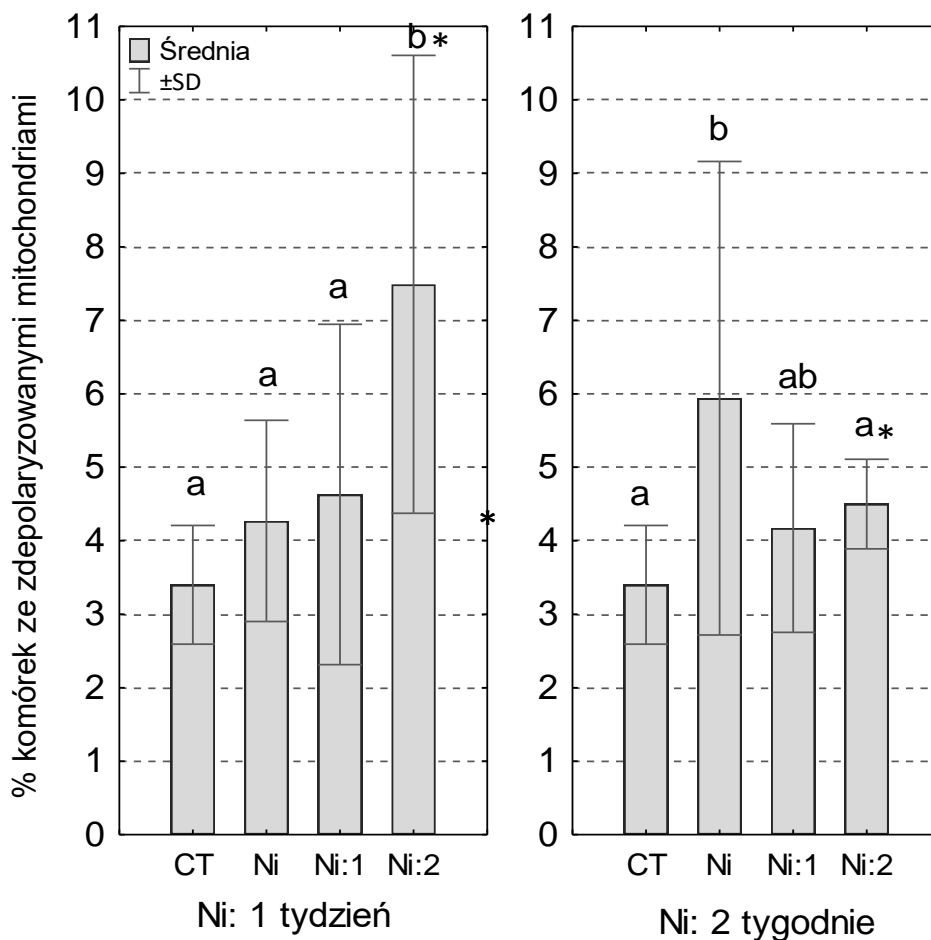


Fig. 29. Odsetek komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w jelitach *N. davidi* ekspozowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0.05$).

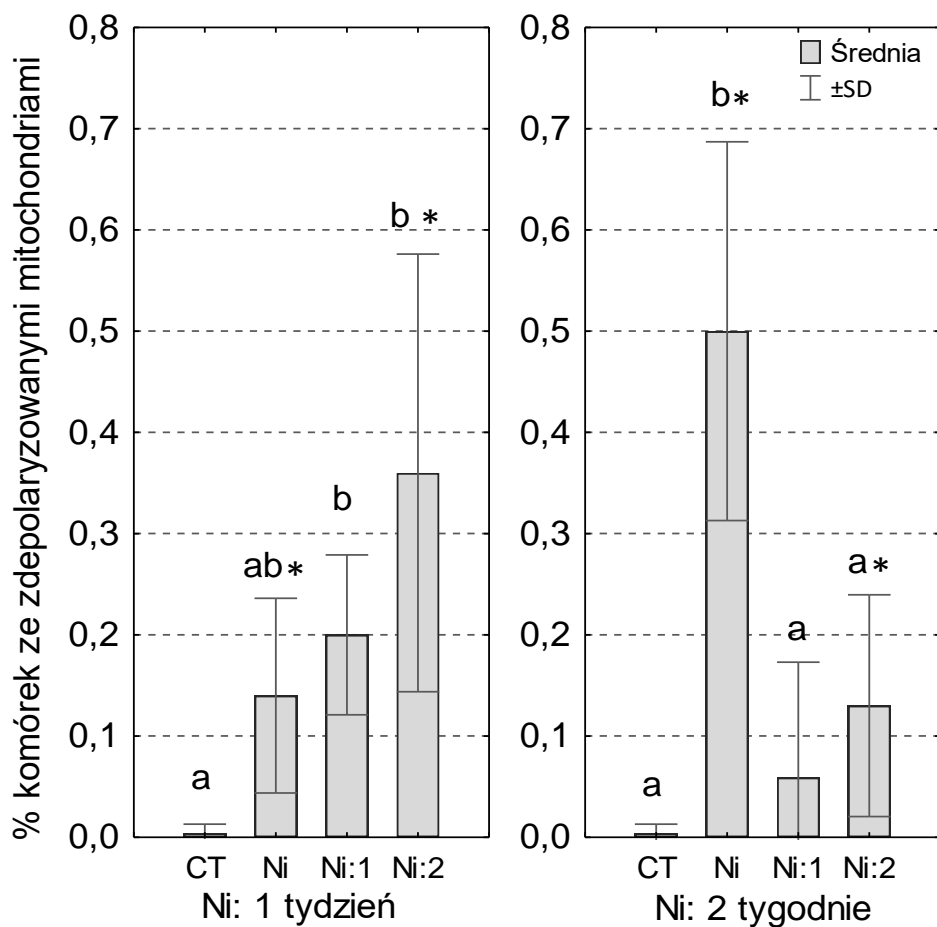


Fig. 30. Odsetek komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w wątrobotrzustce osobników *N. davidi* eksponowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0,05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0,05$).

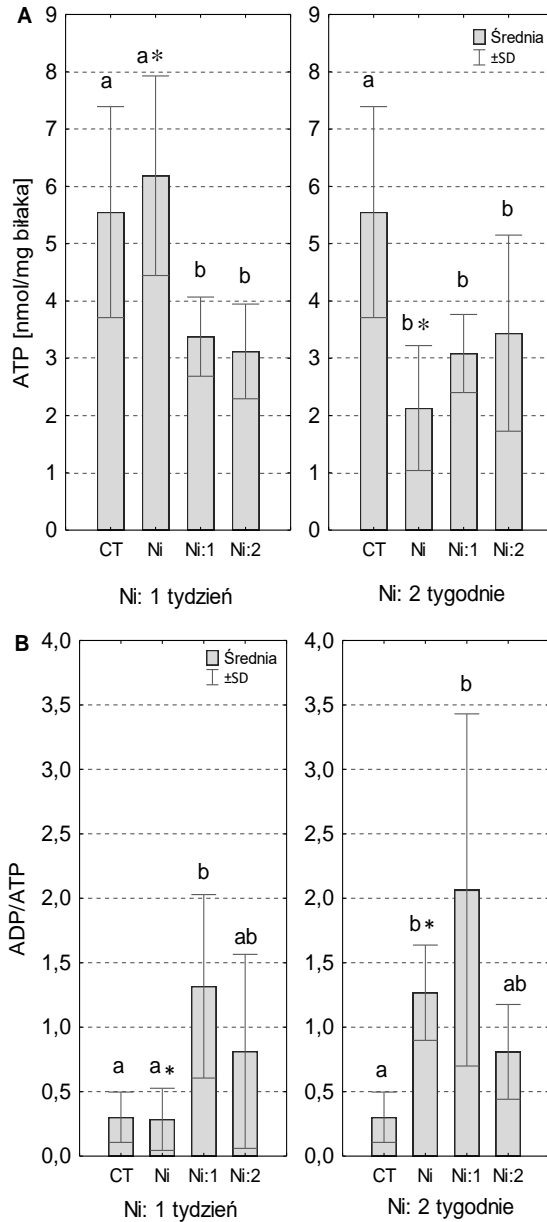


Fig. 31. Stężenie ATP (A) i wskaźnik ADP/ATP (B) w komórkach jelita osobników *N. davidi* ekspozowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0.05$).

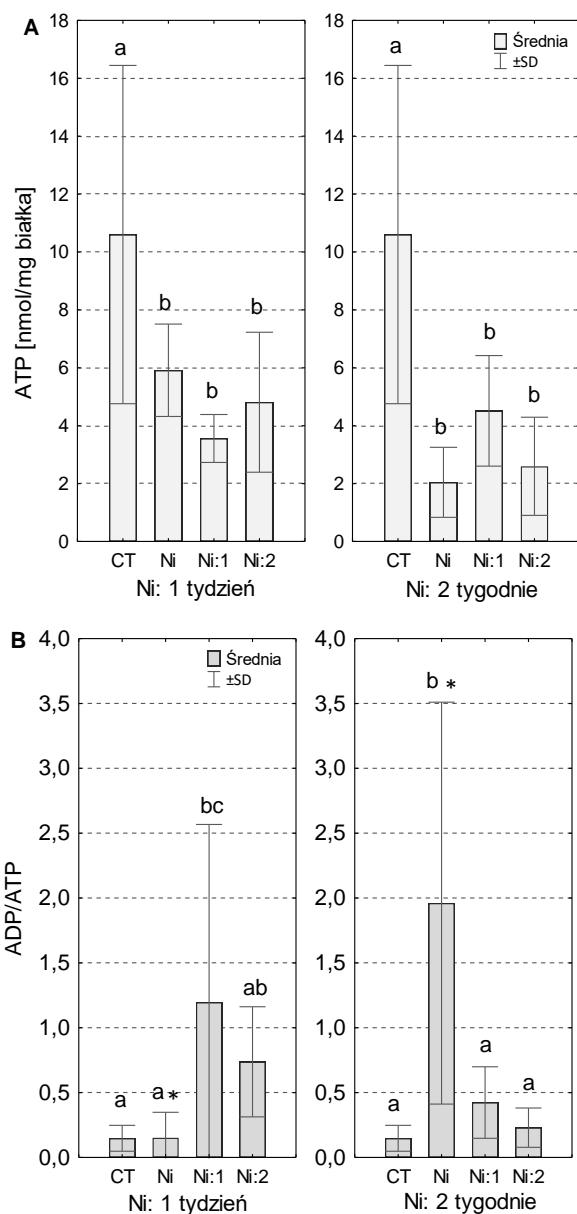


Fig. 32. Stężenie ATP (A) i wskaźnik ADP/ATP (B) w wątrobotrzustce osobników *N. davidi* ekspozowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b, c) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0.05$).

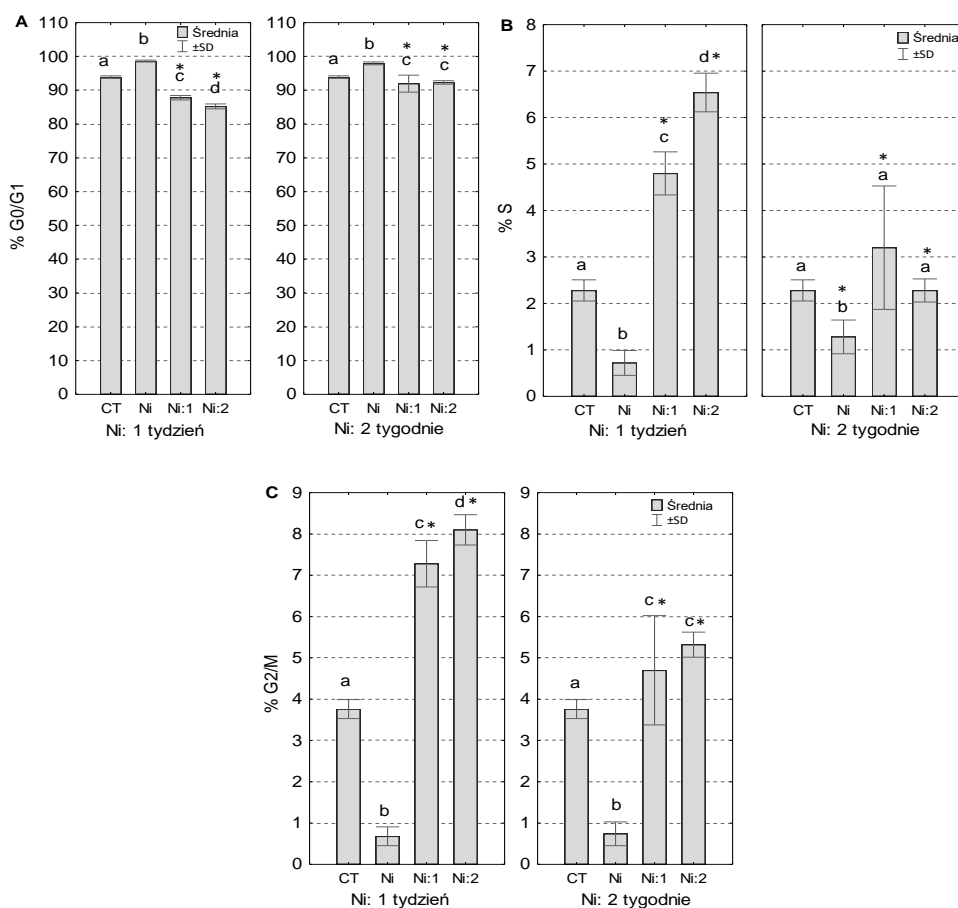


Fig. 33. Odsetek komórek w fazach: G0/G1 (A), S (B) i G2/M (C) w jelicie osobników *N. davidi* ekspozowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b, c, d) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0,05$).

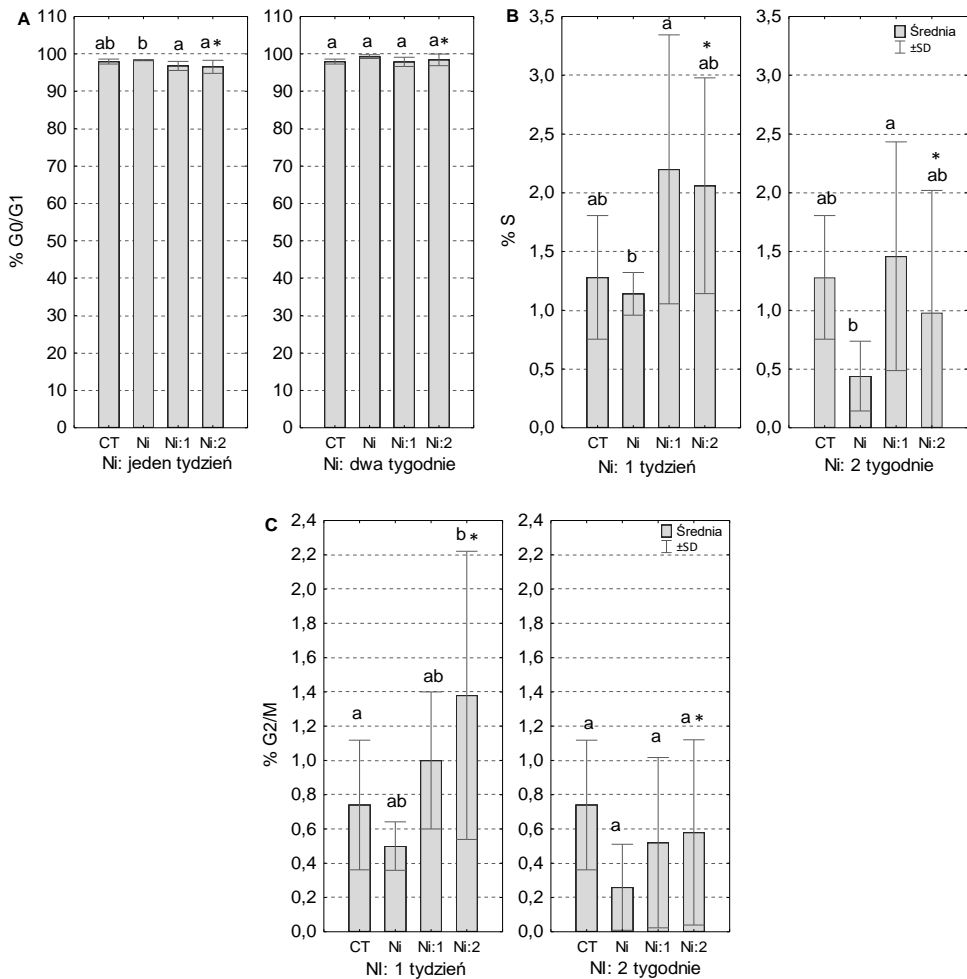


Fig. 34. Odsetek komórek w fazach: G0/G1(A), S (B) i G2/M (C) w wątrobotrzustce osobników *N. davidi* ekspozowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b, c, d) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczenie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczenie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0.05$).

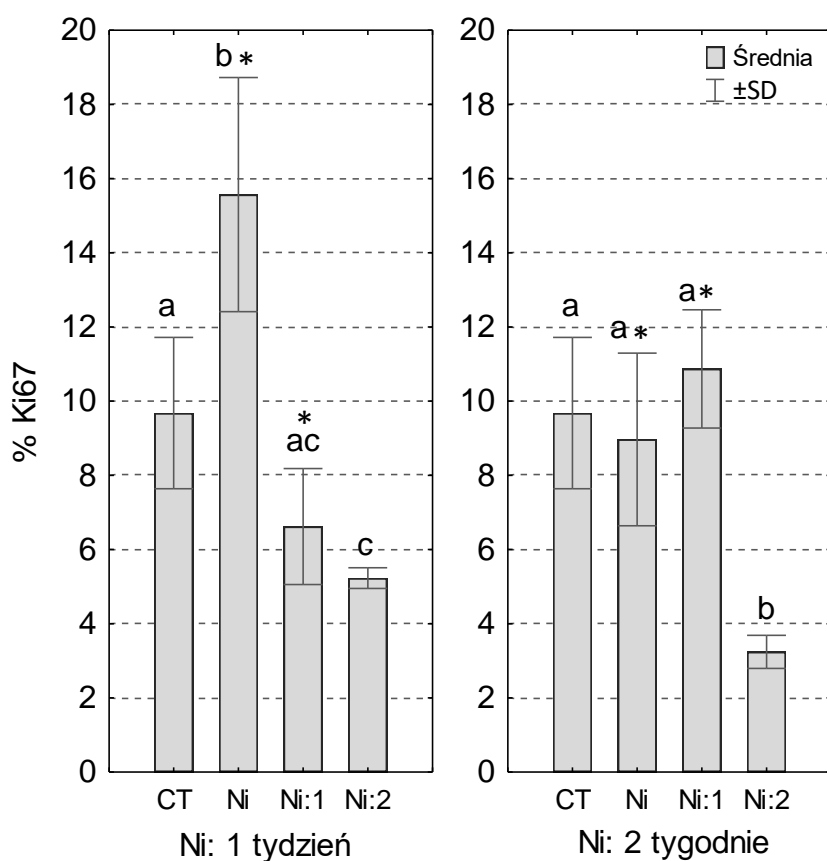


Fig. 35. Odsetek komórek Ki67-pozytywnych w jelicie osobników *N. davidi* ekspozowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b, c) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0,05$).

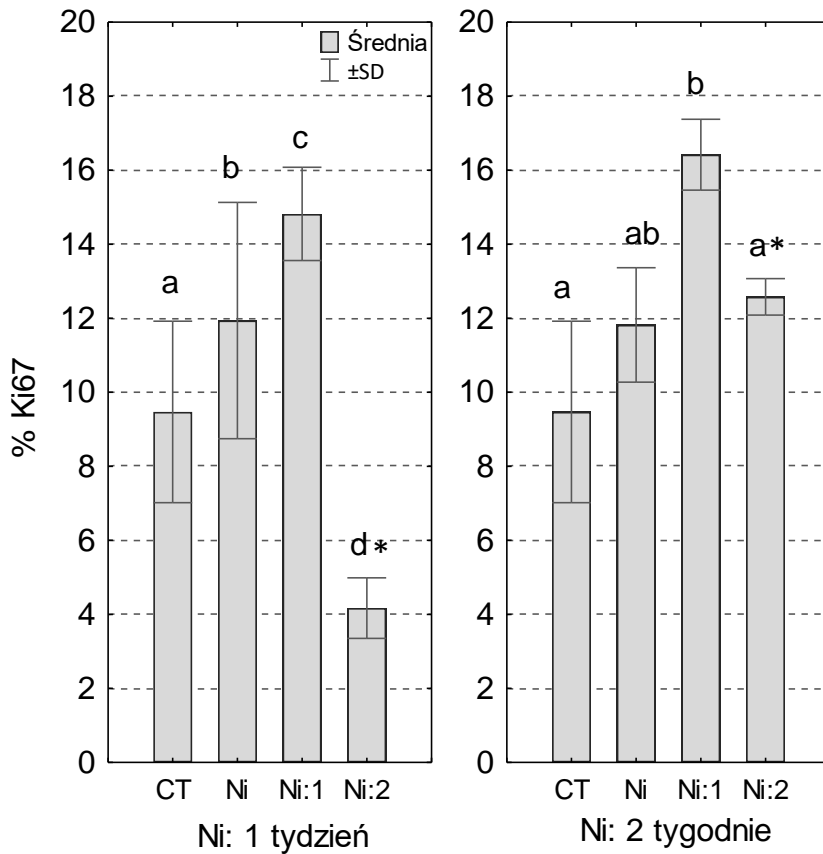


Fig. 36. Odsetek komórek Ki67-pozytywnych w wątrobotrzustce osobników *N. davidi* ekspozowanych na nikiel przez 1 tydzień (Ni: 1 tydzień) lub 2 tygodnie (Ni: 2 tygodnie). Różne litery (a, b, c) wskazują na różnice istotne statystycznie między grupami doświadczalnymi: CT (kontrola), Ni (ekspozycja na nikiel), Ni:1 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 1 tydzień), Ni:2 (ekspozycja na nikiel i oczyszczanie trwające 2 tygodnie), w obrębie każdego czasu ekspozycji (1 lub 2 tygodnie) test NIR, $p < 0.05$; * wskazują na różnice istotne statystycznie między komplementarnymi grupami doświadczalnymi w obu czasach ekspozycji na metal (Test t-Studenta, $p < 0.05$).