



Prof. dr. hab. Hanna Kmita  
kmita@amu.edu.pl

Poznań, 13.07.2023

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Ostróžki

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

Bioindykacja to metoda wykorzystująca żywe organizmy (tzw. organizmy wskaźnikowe) dla określenia stopnia zmian w środowisku. Skorupiaki to jedne z częściej wykorzystywanych organizmów wskaźnikowych dla środowiska wodnego, głównie w przypadku wód morskich i oceanicznych. Stąd, szersze wykorzystanie skorupiaków jako organizmów wskaźnikowych dla wód słodkich wymaga badań polegających na określeniu wrażliwości potencjalnych gatunków wskaźnikowych, obejmujących także gatunki ważne gospodarczo, na określone warunki panujące w wodach słodkich, w tym obecność czynników toksycznych, takich jak jony metali ciężkich. Podobnie jak u innych bezkręgowców, u skorupiaków funkcję bariery pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a ciałem zwierzęcia, oprócz powłok ciała, pełni układ pokarmowy, w tym jego odcinek nazywany jelitem środkowym. Jest ono odpowiedzialne za między innymi syntezę i uwalnianie enzymów trawiennych, wchłanianie i gromadzenie materiałów zapasowych oraz detoksykację. Stąd, określenie wpływu czynników środowiska na funkcjonowanie komórek w obrębie jelita środkowego to logiczny, ale także niezbędny, etap badań w poszukiwaniu gatunków skorupiaków możliwych do wykorzystania jako organizmy wskaźnikowe dla wód słodkich. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy to istotny krok prowadzący do osiągnięcia takiego celu. Rozprawa ta powstała pod opieką prof. dr hab. Magdaleny Rost-Roszkowskiej, w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska (Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach).

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań  
tel. +48 61 829 5553

[biologia.amu.edu.pl](http://biologia.amu.edu.pl) [ibmib.amu.edu.pl](http://ibmib.amu.edu.pl)

Rozprawa doktorska mgr Anny Ostróżki dotyczy określenia zmian jakościowych i ilościowych w komórkach nabłonka jelita środkowego, czyli jelita oraz wątrobotrzustki, słodkowodnej krewetki *Neocaridina davidi*, powstałych w wyniku jej ekspozycji na jony niklu i po przeniesieniu do środowiska tych jonów niezawierających. Dlatego mgr Anna Ostróżka skoncentrowała się na następujących zagadnieniach: (1) wyznaczenie stężenia jonów niklu w ciele zwierząt; (2) określenie zmian w ultrastrukturze komórek nabłonka jelita środkowego; (3) określenie zmian dotyczących materiałów zapasowych w komórkach nabłonka jelita środkowego; (4) zbadanie poziomu autofagii i śmierci komórkowej w komórkach nabłonka jelita środkowego; (5) wyznaczenie poziomu stresu oksydacyjnego i stanu funkcjonalnego mitochondriów w komórkach nabłonka jelita środkowego i (6) określenie zmian w przebiegu cyklu komórkowego i namnażania komórek nabłonka jelita środkowego. W przeprowadzonych badaniach mgr Anna Ostróżka zastosowała jakościowe i ilościowe metody szacowania stanu strukturalnego i funkcjonalnego komórek, obejmujące mikroskopię świetlną, transmisyjną mikroskopię elektronową, mikroskopię konfokalną i cytometrię przepływową. Nie ulega zatem wątpliwości, że opisane wyniki mgr Anna Ostróżka uzyskała dzięki pracochłonnym eksperymentom, przeprowadzonym dla dużej liczby próbek materiału badawczego. Co więcej, istotność statystyczna tych wyników została przez nią zweryfikowana. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że mgr Anna Ostróżka jest współautorką pięciu prac eksperymentalnych opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, w tym w jednej z tych prac jest pierwszą autorką, które stanowią bardzo dobre merytoryczne i metodyczne przygotowanie do niniejszej rozprawy.

Na podstawie zawartego w rozprawie przedstawienia i opracowania wyników, można sformułować następujące wnioski:

1. W zastosowanym stężeniu jony niklu, w sposób zależny od czasu trwania ekspozycji i „detoksykacji”, wywołują zmiany degeneracyjne o różnym nasileniu, które przejawiają się zmianami w strukturze badanych komórek nabłonka jelita środkowego i ich stanu funkcjonalnego.
2. Na poziomie komórkowym dochodzi do zmian w przebiegu cyklu komórkowego, osłabienia namnażania komórek oraz nasilenia autofagii i procesów śmierci komórkowej, a także zmian struktury organelli, w tym mitochondriów.
3. Zmiany w strukturze mitochondriów współwystępują ze zmianami ich stanu funkcjonalnego, w tym poziomu potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ( $\Delta\psi$ ) i poziomu syntezy ATP oraz nasileniem stresu oksydacyjnego.
4. W zastosowanym czasie trwania „detoksykacji”, uruchomione przez jony niklu zmiany w obrębie komórek nabłonka jelita środkowego nie podlegają całkowitej eliminacji.
5. Krewetka *N. davidi* wykazuje względną tolerancję na jony niklu, pod warunkiem krótkiego czasu ekspozycji i długiego „detoksykacji”, przy czym w przypadku nabłonka jelita środkowego silniejszy efekt cytotoksyczny obserwowany jest dla jelita.

Podsumowując, wyniki uzyskane przez mgr Annę Ostróżkę dostarczyły istotnych informacji dotyczących wrażliwości krewetki *N. davidi* na jony niklu oraz zmian komórkowych w obszarze nabłonka jelita środkowego, stanowiących odpowiedź na ekspozycję i „detoksykację”. Zatem, przyczyniają się one do zwiększenia wiedzy dotyczącej komórkowych podstaw toksycznego działania niklu, co ma

kluczowe znaczenie dla pełnego wyjaśnienia podstaw wrażliwości tego gatunku krewetki na jony niklu, także w kontekście jego wykorzystania jako gatunku wskaźnikowego dla wód słodkich.

Rozprawa doktorska mgr Anny Ostróżki dość nietypowo składa się z dwóch części. Część pierwsza ma klasyczną formę i obejmuje Spis treści, Wstęp, Cele pracy i hipotezy badawcze, Materiały i Metody, Wyniki (bez rysunków), Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski i Streszczenie (w języku polskim i angielskim) oraz Bibliografię obejmującą 322 pozycje!. Część druga to 36 rysunków ilustrujących otrzymane wyniki. Pozytywnie oceniam merytoryczną zawartość pracy, jednak muszę zaznaczyć, że zawiera ona błędy redakcyjne i językowe oraz niestety nieścisłości i niezręczności terminologiczne. Za najbardziej istotne usterki uznaję: (1) Dyskusja: liczne powtórzenia informacji oraz brak wykorzystania nowszej literatury przy omawianiu procesów śmierci komórkowej (np. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4), a także przedstawianie autofagii jako procesu z zasady degeneracyjnego; (2) Wyniki i Dyskusja: pomijanie typu omawianych komórek; o ile jest to zrozumiałe w przypadku jelita, informacja ta bardzo by się przydała w przypadku wątrobotrzustki, w której poza komórkami typu E, występują jeszcze trzy inne typy komórek; (3) Wyniki: Fig. 16-19 są bardzo nieczytelne, a ich zawartość wydaje się być niezgodna z przedstawionym w tekście opisem; (4) nieścisłości i niezręczności terminologiczne w tekście, wynikające także z tłumaczenia z języka angielskiego: np. „aktywacja gromadzenia reaktywnych form tlenu” (str. 19), opis analizy statystycznej (str. 32), „Wzrasta liczba zdegenerowanych mitochondriów, które są rozdęte i mają skrócone grzebienie i jasną elektronowo cytoplazmę” (str. 36), „nekroza mitochondriów” (str. 60), „aktywacja mitochondriów zależnych od ROS” (str. 66), „Potencjał transbłonowy mitochondrium jest więc wywołany rozproszeniem gradientu protonów” – w kontekście syntezy ATP (str. 68), „zmieniając strukturę enzymu klirensowego ROS hamując jego aktywność” i „apoptoza mitochondriów” (str. 69), „integralnie zaburzone na skutek apoptozy błony komórkowej” (str. 82), „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.” (str. 87), „Zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego występują prawie równocześnie we wszystkich mitochondriach w obrębie danej komórki (Marzo i inni, 1998) (str. 90); (5) Bibliografia: wykorzystanie podręczników akademickich.

Byłabym także wdzięczna za uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania:

1. W tabeli 4, przedstawiającej liczbę osobników wykorzystanych w poszczególnych eksperymentach, uwzględniono liczbę samic i samców. Dlaczego zatem pominięto kryterium płci przy omawianiu wyników?
2. Dlaczego przy prezentacji wyników pominięto kwestię śmiertelności w poszczególnych wariantach eksperymentalnych? Jeśli planowano wskazać zmiany degeneracyjne, czy to oznacza, że badano tylko osobniki o osłabionej żywotności i/lub martwe?
3. Jak można wyjaśnić zwiększoną zawartość jonów niklu w wariancie Ni:2.1? Czy w analizie stężenia jonów niklu gromadzonego w krewetkach uwzględniano żywotność osobników?
4. Jak można wyjaśnić brak obecności komórek późnoapoptotycznych w analizie ultrastrukturalnej (w przypadku wczesnoapoptotycznych jest to zrozumiałe)? I jak można wyjaśnić wyższy poziom apoptozy w komórkach wątrobotrzustki osobników kontrolnych w porównaniu z komórkami jelita osobników kontrolnych?

5. W jaki sposób, wykorzystując zestaw „Annexin V-FITC apoptosis detection”, odróżniano nekrozę od apoptozy?
6. W jaki sposób można byłoby wytłumaczyć niezgodność wyników dotyczących stresu oksydacyjnego i spadku  $\Delta\psi$  w analizowanych komórkach?
7. Dlaczego badano gromadzenie materiałów zapasowych w komórkach D jelita, skoro komórki te nie gromadzą tych materiałów? I na jakie rezerwy energetyczne wskazuje doktorantka w p. 2 Wniosków?
8. Czy na podstawie wyników dotyczących zmian w rozkładzie procentowym poszczególnych faz cyklu komórkowego i poziomu białka Ki67 można wnioskować o roli komórek typu E w regeneracji nabłonka jelita i wątrobotrzustki?

Wymienione powyżej uwagi i pytania nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr Anny Ostróżki i mają wyłącznie na celu przedyskutowanie uzyskanych wyników i głębsze ich zrozumienie. Uzyskane wyniki dotyczą ważnych aspektów wrażliwości krewetki *Neocardina davidi* na jony niklu, w tym zachodzących w komórkach nabłonka jelita środkowego zmian degeneracyjnych i możliwych mechanizmów cytoprotekcyjnych, uruchamianych po wyeliminowaniu ekspozycji na jony niklu. Uzyskane wyniki są punktem wyjścia dla ważnych ustaleń dotyczących wykorzystania tego gatunku krewetki jako gatunku wskaźnikowego.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Anny Ostróżki jest świadectwem jej wiedzy i umiejętności przeprowadzania badań naukowych przy wykorzystaniu nowoczesnych metod eksperymentalnych, uzasadniającym ubieganie się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne. Dostarczona dokumentacja potwierdza, że mgr Anna Ostróżka ma umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i przedyskutowania uzyskanych wyników. Co więcej, rozprawa doktorska mgr Anny Ostróżki stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest wyjaśnienie komórkowych mechanizmów leżących u podłoża wrażliwości krewetki *Neocardina davidi* na jony niklu. W związku z tym, niniejsza rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zatem, wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Ostróżki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Hanna Kmita