



Prof. dr hab. Iwona Cierieszko
Pracownia Fizjologii Roślin
Katedra Biologii i Ekologii Roślin
Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Białystok, 12.11.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Daryi Harshkovej pt. „Analiza indukowanych diklofenakiem zaburzeń fizjologicznych i rozwojowych komórki *Chlamydomonas reinhardtii* ze szczególnym uwzględnieniem funkcjonowania mitochondriów”

Rozprawa doktorska mgr Daryi Harshkovej, doktorantki Studiów Doktoranckich z Biologii, Ekologii i Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Aksmann, prof. UG (promotor) w Pracowni Fizjologii Roślin i Toksykologii Katedry Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Rozprawa doktorska jest kontynuacją i rozwinięciem wcześniejszej tematyki badawczej Pani Promotor. Doktorantka, wykorzystując nowoczesne techniki badawcze, przeprowadziła interesujące analizy procesów wzrostowych i fizjologicznych jednokomórkowej zielenicy, organizmu modelowego *Chlamydomonas reinhardtii*, w tym zmian dostosowawczych do niekorzystnych warunków wywołanych działaniem diklofenaku, z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), związku wpływającego na zanieczyszczenie środowiska wodnego.

Rozprawa doktorska mgr D. Harshkovej jest opracowaniem w języku angielskim - to cykl czterech powiązanych tematycznie publikacji, wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim. Zawarte są także oświadczenia współautorów publikacji, z odpowiednimi podpisami; ponadto podano informację o źródle finansowania i zaprezentowano dorobek naukowy mgr D. Harshkovej. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są pracami oryginalnymi opublikowanymi w latach 2019-2024, w dobrych czasopismach międzynarodowych: *Aquatic Toxicology*, *Cells*, *Journal of Applied Phycology* i *PeerJ*. Wszystkie artykuły są pracami zespołowymi, w których nazwisko Doktorantki umieszczone jest zawsze na pierwszym miejscu. Lista publikacji, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, obejmuje następujące pozycje:

1. **Harshkova D.**, Liakh I.; Bialevich V.; Ondrejmišková K.; Aksmann A.; Bišová K. 2021. Diclofenac alters the cell cycle progression of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cells* 10, 1936 (IF 5,1, pkt MNiSW 140, 6 cytowań)

2. **Harshkova D.**, Majewska M., Pokora W., Baścik-Remisiewicz A., Tułodziecki S., Aksmann A., 2021. Diclofenac and atrazine restrict the growth of a synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* population via various mechanisms. *Aquatic Toxicology* 230, 1-11 (IF 4,1, pkt MNiSW 140, 14 cytowań)

3. **Harshkova D.**, Zielińska E., Aksmann A. 2019. Optimization of a microplate reader method for the analysis of changes in mitochondrial membrane potential in *Chlamydomonas reinhardtii* cells using JC-1. *Journal of Applied Phycology* 31, 3691–3697 (IF 2,8, pkt MNiSW 70, 11 cytowań)

4. **Harshkova D.**, Zielinska E, Narajczyk M, Kapusta M, Aksmann A. 2024. Mitochondria dysfunction is one of the causes of diclofenac toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PeerJ* (IF 2,3, pkt MNiSW 100)

Łączny Impact Factor publikacji przedstawionych do oceny jako rozprawa doktorska wynosi ok. 14,3, sumaryczna liczba punktów MNiSW - 450. Prace były już cytowane ponad 30 razy przez innych autorów, podczas gdy wszystkie cytowania publikacji (9) wynoszą 110, a indeks H - 6 (wg *Web of Science*, dn. 8.11.2024 r.), co jest bardzo dobrym osiągnięciem na tym etapie rozwoju naukowego. Udział własny Doktorantki w powstaniu publikacji był znaczący (w jednej z prac został określony procentowy udział, ok. 50%), nazwisko „Harshkova” zawsze widnieje na pierwszym miejscu, w jednej publikacji Doktorantka jest autorem korespondencyjnym (*Cells* 2021), w innych pracach autorem korespondencyjnym jest Pani Promotor rozprawy doktorskiej. Jak wynika z oświadczeń współautorów, mgr D. Harshkova była głównym wykonawcą większości badań eksperymentalnych, pisała prace i przygotowywała manuskrypty do druku.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską poprzedzone są obszernym streszczeniem, a właściwie wprowadzeniem w tematykę naukowych zainteresowań (także w j. angielskim), w którym Doktorantka omawia pokrótce założenia i wyniki prezentowane w poszczególnych pracach. Celem nadrzędnym recenzowanej rozprawy doktorskiej było poznanie podłoża obserwowanych zaburzeń rozwojowych i fizjologicznych w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* wywołanych działaniem diklofenaku. Doktorantka stawiała odpowiednie hipotezy badawcze, kolejno weryfikowane w prezentowanych publikacjach. Analizując opublikowane prace eksperymentalne, można stwierdzić, że cele pracy zostały zrealizowane a hipotezy potwierdzone. Doktorantka przedstawiła także podsumowanie badań i wnioski. Należy przyznać, iż wprowadzenie oraz rozdziały wstępów analizowanych publikacji zawierają najbardziej istotne informacje związane z tematyką rozprawy doktorskiej i uwzględniają najważniejsze pozycje piśmiennictwa dotyczące prezentowanej tematyki; wskazuje to na dobre opanowanie ogólnej wiedzy teoretycznej przez mgr D. Harshkovą w obrębie naukowych zainteresowań.

Zastosowany w opublikowanych pracach układ eksperymentalny, metody badań i materiał badawczy nie budzą moich zastrzeżeń, rozdziały opisujące materiał doświadczalny i metodykę zawierają niezbędne informacje. Materiałem badawczym we wszystkich publikacjach były

Chlamydomonas reinhardtii, jednokomórkowe zielenice, które rosły w kulturach synchronicznych w warunkach kontrolowanych. Kultury traktowano dobranymi stężeniami diklofenaku, popularnego niesteroidowego leku przeciwzapalnego (a w jednej z prac, porównawczo, także herbicydem atrazyną). Doktorantka zastosowała w badaniach własnych wiele różnych metod i technik. Stosowała techniki obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii optycznej, fluorescencyjnej, elektronowej i konfokalnej, wraz z odpowiednimi wybarwieniami lub fluorochromami. Zastosowała dostępne narzędzia do analizy rozmiarów zielenic, podziałów komórek i ich objętości w kulturach. Wykonała szereg pomiarów spektrofotometrycznych (np. oznaczeń zawartości barwników, białek, kwasów nukleinowych, skrobi) i spektrofluorometrycznych (np. do oznaczeń H₂O₂ i mtROS oraz potencjału membranowego MMP stosowano mikroplótkowy spektrofluorymetr Varioskan, Thermo Fisher Scientific). Do pomiarów wymiany gazowej użyto elektrody tlenowej Clarka (Oxygraph, firmy Hansatech) a charakteryzując funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego zielenic mierzono fluorescencję chlorofilu *a*, z użyciem AquaPen (Photon Systems Instruments) lub Handy PEA (Hansatech). Ponadto wykonane zostały analizy ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (RealTime PCR). Należy podkreślić, iż szeroki zakres użytych metod i nowoczesnych technik badawczych jest atutem ocenianej rozprawy doktorskiej. Rozdziały dotyczące materiału i metod we wskazanych publikacjach zawierają szczegółowe informacje, wystarczające do ewentualnego powtórzenia przedstawionych doświadczeń, a jedna z prac proponuje dokładny opis/protokół do wykorzystania w badaniach. Uzyskane wyniki badań były poddane analizom statystycznym, analizy zostały odpowiednio opisane. Przegląd rozdziałów publikacji, które opisują metodykę, łącznie z prezentowanymi w publikacjach wynikami badań, pozwalają stwierdzić, że mgr D. Harshkova opanowała i zastosowała w pracy własnej aktualne metody badawcze biologii eksperymentalnej.

W pierwszej pracy ocenianego cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską, opublikowanej w 2021 roku w czasopiśmie *Cells* poddano weryfikacji hipotezę, iż przyczyną fitotoksyczności diklofenaku (niesteroidowego leku przeciwzapalnego) są zaburzenia cyklu komórkowego zielenicy. Badania przeprowadzono przy użyciu synchronicznych kultur *Chlamydomonas reinhardtii* traktowanych różnymi stężeniami diklofenaku podczas wzrostu. W celu realizacji badań Doktorantka podjęła współpracę z pracownikami Centre of Algal Biotechnology, Institute of Microbiology, Czech Academy Sciences (ALGATECH, Czechy), w ramach programu NAWA. Analizowano zmiany parametrów charakteryzujących cykl komórkowy glonów, jak replikacja DNA, wielkość komórek, liczba jąder i inne. Zastanowiły mnie opisane warunki wzrostu/namnażania *C. reinhardtii* – wartości natężenia promieniowania, jak i temperatury, odpowiednio: 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i 30°C, były wysokie. Wykonane analizy wskazały, że wzrost pojedynczych komórek pozostał niezmienny, ale podział komórek był opóźniony po krótkotrwałym traktowaniu różnymi dawkami diklofenaku. Zaobserwowano opóźnienie replikacji DNA po

traktowaniu diklofenakiem, opóźnienie podziału komórek (inny czas osiągnięcia punktów kontrolnych cyklu, CP), ponadto liczba komórek potomnych z pojedynczej komórki zmniejszyła się, nasilenie objawów zależne było od stosowanych stężeń związku oraz czasu ekspozycji. Zgodnie z deklaracją autorów, ich badania po raz pierwszy wykazały takie efekty toksycznego działania diklofenaku w kulturach *C. reinhardtii*. Dyskusja jest obszernym i ciekawym rozdziałem publikacji; zamieszczono także uzupełniające wyniki badań. Na zakończenie dyskusji zaproponowano model działania diklofenaku wskazujący możliwe miejsca modyfikacji cyklu komórkowego *C. reinhardtii* w zastosowanym wariantcie eksperymentalnym (choć pewien niedosyt może budzić brak dokładnego opisu tego modelu w omawianej publikacji). Zauważyłam w tekście publikacji jedynie niewielką ilość drobnych błędów, które umknęły podczas korekty tekstu, głównie w spisie literatury.

W drugiej pracy z ocenianego cyklu publikacji opublikowanej w 2021 r. w czasopiśmie *Aquatic Toxicology* Doktorantka analizowała i porównywała objawy stresu występujące po traktowaniu kultur zielenic diklofenakiem z objawami po działaniu herbicydu atrazyny. W pracy tej również wykorzystano synchroniczne kultury komórkowe *C. reinhardtii*. Stwierdzono, że diklofenak i atrazyna ograniczają wzrost populacji zielenic poprzez różne mechanizmy. Podanie atrazyny hamowało fotosyntetyczny łańcuch transportu elektronów i wywołało stres oksydacyjny oraz wzmagало proces respiracji, natomiast zastosowanie diklofenaku nie powodowało drastycznych zmian w transporcie elektronów i wyraźnych objawów stresu oksydacyjnego, zwłaszcza w początkowym okresie od podania związku. Stwierdzano także odmienną ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, np. wzrost ekspresji CAT1, genu kodującego katalazę był widoczny głównie po traktowaniu diklofenakiem, enzym ten uważany był za aktywny u *C. reinhardtii* głównie w mito-chondriach. Aczkolwiek, ukazały się publikacje wskazujące na obecność izoform katalazy CAT1 i CAT2 w komórkach *C. reinhardtii*, odpowiednio, w peroksysomach i retikulum endoplazmatycznym (Kato et al. 2021, 2022, *Cells*, 10, 11). Doktorantka, wraz ze współautorami, wniosowała, że fitotoksyczne oddziaływanie diklofenaku związane jest prawdopodobnie z aktywnością mitochondriów. Dyskusja jest dobrze opracowanym rozdziałem publikacji. Oczekiwałam jednak, w związku z nowszymi doniesieniami, by Doktorantka na obronie rozprawy doktorskiej omówiła peroksysomy zielenic (porównując z roślinami) i zaproponowała możliwą ich funkcję po toksycznym działaniu związków zaliczanych do grupy NLPZ.

W trzeciej pracy z ocenianego cyklu, opublikowanej w 2019 r. w *Journal of Applied Phycology* Doktorantka uczestniczyła w opracowaniu i optymalizacji metody oznaczania mitochondrialnego potencjału membranowego (MMP) w stosowanym materiale badawczym, uznając jej użyteczność w ocenie funkcjonowania mitochondriów w komórkach zielenic planktonowych. Fluorochrom JC-1 (*chlerek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylo-2,2'-benzimidazolo-karbocyjaniny*) został uznany za przydatny marker stresu, także wywołanego oddziaływaniem diklofenaku. Na zakończenie,

przedstawiono szczegółowy opis doświadczenia/protokołu, który pozwala oszacować poziom MMP w komórkach zielenicy *C. reinhardtii*. Metodę tą zastosowano później, w badaniach przedstawionych w kolejnej opublikowanej pracy, która weszła w skład rozprawy doktorskiej mgr D. Harshkovej.

W ostatniej i najnowszej pracy z ocenianego cyklu publikacji (*PeerJ* 2024) Doktorantka analizowała zmiany funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów w komórkach *C. reinhardtii* po dostarczeniu roztworu diklofenaku do kultur wzrostowych. Krótkotrwała ekspozycja na diklofenak zwiększyła oddychanie (zużycie tlenu) ale obniżyła poziom mitochondrialnego potencjału membranowego (MMP) i reaktywnych form tlenu w mitochondriach (mtROS). Doktorantka zastosowała dodatkowo inhibitory, takie jak kwas salicylohydroksamowy (SHAM), inhibitor oksydazy alternatywnej (AOX) oraz cyjanek potasu (KCN), inhibitor oksydazy cytochromowej (kompleks IV), wraz z traktowaniem kultur diklofenakiem. Nie zaobserwowała jednak istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami eksperymentalnymi, założyła więc, że oddziaływanie diklofenaku może nie być specyficzne i wynikać z uszkodzeń w mitochondriach. Zostało to poparte obrazowaniem komórek *C. reinhardtii* z użyciem mikroskopii elektronowej i konfokalnej. Mitochondria były o nieregularnych kształtach, często wydłużone, wykazywały degradację grzebieni, co może sugerować nieprawidłowe podziały tych organelli lub ich degenerację (jednak obserwowano te zmiany po czasie dłuższej ekspozycji, niż w przypadku wcześniejszych analiz). Doktorantka, wraz ze współautorami pracy, zaproponowała, że obserwowany wzrost pobierania tlenu (w ciemności) i rozprężanie fosforylacji oksydacyjnej są efektem niespecyficznych uszkodzeń błon mitochondrialnych po traktowaniu diklofenakiem. Dyskusja jest dobrze napisanym rozdziałem tej publikacji, obszerne są także wyniki uzupełniające, praca zawiera zaawansowane analizy statystyczne. Należy jednak żałować, że Doktorantka nie wykonała pomiarów zawartości ATP, najważniejszego produktu aktywności metabolicznej mitochondriów, generalnie, wskazane byłoby oznaczenie zawartości różnych metabolitów oraz aktywności/ekspresji wybranych białek związanych z metabolizmem mitochondriów, w badanym układzie doświadczalnym... Czy takie analizy były już wykonywane po traktowaniu zielenic diklofenakiem lub innym NLPZ? Być może inhibitory SHAM i KCN powinny być zastosowane wobec izolowanych mitochondriów, a nie tylko zawiesiny komórek *C. reinhardtii*. Interesuje mnie także, czy Doktorantka rozważa badania poziomu metabolitów i aktywności enzymów (syntezy białek enzymatycznych) mitochondrialnych, np. enzymu AOX zaangażowanego w alternatywny szlak oddechowy? Chciałabym, aby Doktorantka ustosunkowała się do tej kwestii, na obronie rozprawy doktorskiej, oczekuję także informacji o planowanych kolejnych doświadczeniach związanych z tematyką zainteresowań naukowych.

Podsumowując, w ramach prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr D. Harshkova uzyskała interesujące wyniki, które wskazują, że stosowane stężenia diklofenaku wpływają na rozwój kultur *Chlamydomonas reinhardtii* z reguły poprzez modyfikacje cyklu komórkowego i hamowanie

powstawania komórek potomnych, co prowadzi do ograniczenia wzrostu populacji. Doktorantka wskazała, że zahamowany wzrost zielenic może wynikać z zaburzeń procesów metabolicznych komórek, stwierdziła nieco odmienny sposób fitotoksycznego oddziaływania diklofenaku, niż w przypadku atrazyny. Doktorantka, wraz ze współpracownikami zasugerowała, że analizowane stężenia diklofenaku wpływają na funkcjonowanie mitochondriów w sposób niespecyficzny, prawdopodobnie poprzez rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej i transportu elektronów na skutek uszkodzeń błon mitochondrialnych. Oczekuję jednak rozszerzenia tej kwestii i dyskusji, czy rzeczywiście wyeliminowano inne możliwości - nie znalazłam bowiem danych o oddziaływaniu NLPZ na procesy metaboliczne zachodzące w mitochondriach (i/lub innych organellach); oczekuję także wskazania, które badania własne warto kontynuować i rozszerzyć w przyszłości.

Generalnie, w ocenie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej recenzent ma ułatwione zadanie, gdyż przed drukiem przeszły już weryfikację specjalistów - wyniki badań zostały już poddane ocenie dokonanej przez recenzentów publikowanych prac. Uważam, że tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna naukowo. Praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, a pod względem formalnym jest poprawnie skonstruowana. Oceniane prace eksperymentalne zawierają ciekawe i oryginalne wyniki badań. Należy stwierdzić, że sposób przedstawienia i opis uzyskanych wyników badań w pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest klarowny, poprawny i logiczny. Uważam, że zastosowany dobór metod i technik był właściwy a ich spektrum wystarczające. Doktorantka analizowała wyniki badań własnych i trafnie porównała z danymi opublikowanymi przez inne grupy badawcze. Własne osiągnięcia są odpowiednio podkreślone i nie znikają na tle danych literaturowych. Po analizie rozdziałów prezentujących dyskusję mogę stwierdzić, iż problematyka badawcza z zakresu zainteresowań została dobrze opanowana. Wszystkie artykuły wchodzące w skład rozprawy są pracami zespołowymi, co pokazuje, że Doktorantka potrafi pracować w zespole i współpracować z innymi badaczami. Uważam, że oceniana rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom naukowy, a Doktorantka jest badaczką o sprecyzowanych zainteresowaniach naukowych. O doświadczeniu mgr D. Harshkovej, jako badacza, świadczą też inne opublikowane prace oryginalne i publikacje przeglądowe (w których jest współautorem), jak również udział w licznych konferencjach naukowych (w tym - w międzynarodowych) oraz wykazana aktywność w realizacji kilku projektów badawczych. Rozprawa doktorska mgr D. Harshkovej jest napisana poprawnym językiem, z użyciem terminologii naukowej, bez większych pomyłek i błędów. Prace są odpowiednio zredagowane, prawidłowo cytowane są publikacje naukowe innych autorów, spisy literatury są ujednolicone. Znalaziono jedynie nieliczne niedociągnięcia, np. w części wprowadzającej: drobny błąd literowy w źródłach finansowania, brak wyjaśnienia skrótu (str. 2), powtórzone numery stron w streszczeniu w języku polskim i w języku angielskim, czy w spisie literatury (str. 6, poz. 10, j. ang. str. 6, poz. 14, str. 7, poz. 13); również w publikacjach, w spisach

bibliografii, pozycje literatury nie zawsze są odpowiednio ujednolicone i czasami zawierają drobne błędy językowe (np. *Cells* 2021, str.14, poz. 22, str. 15 poz. 30; *PeerJ* 2024, str. 18, 19, 20, 21). Wymienione nieliczne i drobne uwagi nie umniejszają znaczącej wartości naukowej recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Daryi Harshkovej mieści się w zakresie dyscypliny nauki biologiczne, jest aktualna naukowo, wymagała samodzielnej pracy, zawiera oryginalne rozwiązania problemów badawczych. Stwierdzam, iż oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 *Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. *Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.). Doktorantka zrealizowała cele postawione w pracy, opanowała współczesne metody badawcze, uzyskane wyniki eksperymentalne są oryginalne, prace napisano ze znajomością terminologii i wiedzy teoretycznej w dyscyplinie naukowej. Stwierdzam, jako recenzent, że rozprawa doktorska mgr D. Harshkovej pt. „Analiza indukowanych diklofenakiem zaburzeń fizjologicznych i rozwojowych komórki *Chlamydomonas reinhardtii* ze szczególnym uwzględnieniem funkcjonowania mitochondriów” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Występuję zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Daryi Harshkovej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Białystok, 12.11.2024 r.



*Prof. dr hab. Iwona Ciereszko
Katedra Biologii i Ekologii Roślin
Wydział Biologii UwB*