



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

dr hab. Katarzyna Niedojadło, prof. UMK
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 14 listopad 2024 r.

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

wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Aksmann, prof. UG
w Katedrze Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin

Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

Ze względu na powszechne stosowanie w medycynie i weterynarii niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) stanowią one coraz większe zagrożenie dla środowiska naturalnego i wywierają toksyczny wpływ na ekosystemy lądowe i wodne. Substancje te zawierają trudno degradowane pierścienie aromatyczne, co wpływa na okres ich półtrwania i sprzyja bioakumulacji farmaceutyków i produktów ich przemian w środowisku. Do najbardziej niebezpiecznej grupy NLPZ zaliczany jest diklofenak (DCF), którego obecność wykrywana jest w wodzie i osadach dennych środowisk śródlądowych. W świetle tych danych niezwykle cenne są zatem badania skupiające się nie tylko na monitorowaniu środowiska pod kątem obecności i ilości tych zanieczyszczeń ale również badania skutków ich toksycznego działania na organizmy „niedocelowe”. Wpływ NLPZ, w tym DCF, na organizmy zwierzęce jest dosyć dobrze poznany, w przeciwieństwie do nielicznych badań u roślin. Swoje eksperymenty Pani mgr Darya Harshkova zaprojektowała z wykorzystaniem modelowego organizmu jednokomórkowej zielenicy planktonowej *Chlamydomonas reinhardtii*, której biologia jest doskonale znana zespołowi Katedry Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin UG i z powodzeniem gatunek ten jest wykorzystywany w badaniach biochemicznych, fizjologicznych, molekularnych a przede wszystkim toksykologicznych, prowadzonych na poziomie



populacyjnym i komórkowym. Realizowany w ramach rozprawy doktorskiej projekt naukowy wpisuje się w aktualny nurt badań skupiających nad fitotoksycznością NLPZ a uzyskane wyniki badań mają istotne znaczenie poznawcze i dostarczają nowych i cennych informacji na temat toksycznego działania DFC na komórki glonów. Badania Doktorantki mają również potencjał aplikacyjny.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi zbiór czterech tematycznie powiązanych ze sobą oryginalnych, wieloautorskich artykułów naukowych opublikowanych w międzynarodowych, renomowanych czasopismach uwzględnionych w bazie Journal Citation Report o wysokim współczynniku oddziaływania i sumarycznej liczbie IF wynoszącej 14,3 oraz liczbie punktów zgodnej z wykazem MNiSW równej 450.

W skład cyklu wchodzi następujące prace eksperymentalne:

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(8): 1936 (IF=5,1, punkty MNiSW=140),
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. *Aquat Toxicol* 230: 105698 (IF=4,1, punkty MNiSW=140),
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 the fluorochrome JC-1. *J Appl Phycol* 31: 3691-3697 (IF=2,8, punkty MNiSW=70),
4. **Harshkova D**, Zielińska 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* 12: e18005 (IF=2,3, punkty MNiSW=100)

Znaczenie tych prac dla nauki znajduje potwierdzenie nie tylko w wysokim IF czasopism, w których artykuły zostały opublikowane ale również w ich łącznie 31-krotnym cytowaniu w literaturze, co świadczy o tym, że prace zostały dostrzeżone (według Web of Science, stan na 12 listopada 2024 r.). Należy podkreślić, że we wszystkich tych artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednym także autorem korespondencyjnym.



Ponadto zgodnie z oświadczeniami współautorów wniosła istotny wkład na każdym z etapów ich przygotowania do publikacji, począwszy od opracowania koncepcji badań, poprzez część eksperymentalną, opracowanie wyników i wniosków oraz przygotowanie manuskryptów. Badania wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były finansowane z dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki OPUS nr 2016/23/B/NZ9/00963 pt. „Synchronizacja kultury *Chlamydomonas reinhardtii* jako narzędzie w badaniach toksyczności antropogenicznych zanieczyszczeń środowiska” i OPUS nr 2019/35/B/NZ9/01567 pt. „Ocena wrażliwości i remediacyjnego potencjału zielenic planktonowych wobec niesteroidowych leków przeciwzapalnych obecnych w środowisku wodnym” (kierownik obu projektów Pani promotor dr hab. Anna Aksmann, prof. UG), w których Doktorantka była wykonawcą oraz PRELUDIUM nr 2021/41/N/NZ8/00124 pt. „Zastosowanie modelu glonowego do określenia mitotoksyczności niesteroidowych leków przeciwzapalnych na przykładzie diklofenaku”, którego Doktorantka była kierownikiem. Ponadto badania w ramach realizacji części projektu, których wyniki opublikowane zostały w czasopiśmie *Cells* wykonane zostały w jednym z najlepszych ośrodków badania glonów na świecie ALGATECH w Czechach, dzięki udziałowi Doktorantki w Programie im. Iwanowskiej, finansowanym przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej. W mojej opinii artykuły naukowe przedstawione przez Panią mgr Daryię Harshkovą spełniają wszelkie formalne wymagania stawiane rozprawom doktorskim przygotowywanym jako cykl publikacji. Wskaźniki bibliograficzne świadczą o wysokim poziomie prac i znaczeniu podjętych badań, na realizację których Doktorantka pozyskała również środki finansowe.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawiony do oceny cykl prac uzupełniono 7-stronicowym opracowaniem - Streszczeniem w języku polskim i angielskim. Pani mgr Darya Harshkova po przedstawieniu wykazu prac i bardzo syntetycznym naświetleniu problemu badawczego, krótko i zwięźle omawia kluczowe wyniki publikacji, dowodząc że opisywany cykl prac jest spójny tematycznie a każda kolejna praca jest kontynuacją poprzedniej. Streszczenie kończy się trzema najważniejszymi wnioskami i krótkim podsumowaniem. Bibliografia obejmuje 20 pozycji literaturowych. Doktorantka do każdej z publikacji dołączyła oświadczenia o udziale współautorów w powstawaniu poszczególnych prac. Część opisowa ocenianej przez ze mnie rozprawy doktorskiej nie budzi zastrzeżeń formalnych i wątpliwości, aczkolwiek pozostawia mnie z pewnym



niedosytem. Wprawdzie nie ma wytycznych Rady Doskonałości Naukowej, co do przygotowywania tego typu opracowania ale w mojej ocenie powinno ono pełnić rolę nie tylko streszczenia ale również autorskiego komentarza. W Streszczeniu zabrakło mi przedstawienia ogólnej przyjętej hipotezy badawczej a także wypunktowania szczegółowych celów badań służących zweryfikowaniu tej hipotezy, wyboru i krótkiego opisu modelu badawczego, wypunktowania bardziej szczegółowych wniosków płynących z badań, czy opisu aplikacyjnego potencjału podjętych przez Doktorantkę eksperymentów i perspektyw badawczych w przyszłości. Oczywiście wszystkie te informacje znajdujemy w poszczególnych publikacjach, dyskusyjna pozostaje tylko kwestia sposobu/koncepcji przygotowywania opisu/przewodnika do cyklu prac, czyli tzw. „spinki”. Dlatego też moja uwaga nie wpływa na merytoryczną ocenę pracy doktorskiej.

Opublikowane wyniki badań realizowanej pracy doktorskiej Pani mgr Daryi Harshkovej zostały już wnikliwie ocenione przez edytorów i recenzentów czasopism. Przygotowanie manuskryptów wymagało od Doktorantki dobrze przemyślanej koncepcji badań, doboru odpowiednich metod a następnie zebrania i analizy danych, w tym statystycznych oraz przedyskutowaniu uzyskanych wyników w oparciu o dostępne dane literaturowe. Warto również podkreślić, że Doktorantka jest także współautorem 6 publikacji, w tym jednej polskojęzycznej, przeglądowej (łącznie IF=39,7 i punktacji MNiSW=740), niebędących tematem rozprawy doktorskiej, a które ściśle wiążą się z zainteresowaniami naukowymi Doktorantki. To świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu i wiedzy teoretycznej a także warsztacie metodycznym do prowadzenia przez nią podjętych w ramach projektu doktorskiego badań.

Rozprawa doktorska pani mgr Daryi Harskovej prezentuje wysoką wartość naukową. Wyniki jej badań koncentrują się na fitotoksycznym wpływie DCF na progresję cyklu komórkowego u jednokomórkowej zielenicy planktonowej *Chlamydomonas reinhardtii*. Wybór modelu badawczego jest idealny dla badań toksykologicznych i analiz cyklu komórkowego, bowiem poprzez zastosowanie fotoperiodu Doktorantka mogła uzyskać synchroniczne hodowle tego gatunku glonów, w których wszystkie komórki znajdują się w tej samej fazie rozwojowej, tzn. w okresie światła komórki rosną, podczas gdy w ciemności dzielą się. Te właściwości komórek pozwoliły jej z jednej strony na analizę badanych



procesów na poziomie całej populacji, jak i pojedynczej komórki. Z drugiej strony pozwoliły na odróżnienie wpływu DCF na okres wzrostu komórki w fazie G1, który trwa niemal przez cały cykl, od fazy reprodukcyjnej ograniczonej do końcowego okresu, obejmujących replikację DNA, mitozę i cytokinezę. Za niezwykle cenne i pionierskie uważam osiągnięcia, które dowodzą, że DCF wywołuje efekt antyproliferacyjny w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w wyniku zaburzeń procesów mitochondrialnych. Lek wydłuża osiągnięcie przez komórki punktów kontrolnych cyklu komórkowego i replikacji DNA, a tym samym podział komórek. Doktorantka zaobserwowała zmniejszenie się liczby dzielących się komórek, jak również komórek potomnych, co ostatecznie prowadziło do istotnego zmniejszenia liczebności populacji glonów. Spowolniony ale niezahamowany okres wzrostu komórek traktowanych DCF pod koniec cyklu komórkowego, wywołany jest prawdopodobnie stopniową akumulacją i toksycznym wpływem leku na funkcjonowanie mitochondriów. DFC zatrzymuje cykl komórkowy hamując podział komórek, mimo że komórki są wystarczająco duże aby się podzielić. Jest to mechanizm odmienny do testowanej atrazyny (herbicyd triazynowy), która indukuje stres oksydacyjny w chloroplastach i hamuje wzrost pojedynczych komórek, istotnie ograniczając rozwój populacji glonów. Obniżenie mitochondrialnego potencjału membranowego (MMP), wzrost aktywności katalazy oraz niski poziom mitROS, przy jednoczesnym wzroście pobierania tlenu w ciemności, wskazują na rozprężanie fosforylacji oksydacyjnej i transportu elektronów w wyniku uszkodzenia błon mitochondrialnych w komórkach traktowanych DFC w stężeniu 135,5 mg/l (stężenia odnotowane w zbiornikach wodnych wahają się do 10 200 ng/l). Doktorantka w badaniach ultrastrukturalnych komórek glonów traktowanych DFC udowodniła destrukcyjne działanie leku na mitochondria, objawiające się m.in. degeneracją grzebieni mitochondrialnych. Ponadto zmiany funkcjonowania mitochondriów pod wpływem DFC przesuwają równowagę metaboliczną komórek na rzecz obniżenia ogólnej wydajności fotosyntezy i magazynowania węglowodanów, zamiast ich wykorzystania do pozyskiwania energii w procesach oddychania. Należy podkreślić, że niezwykle cenne dla badań było autorskie opracowanie przez Doktorantkę protokołu szacowania wartości MMP dla komórek *Chlamydomonas reinhardtii* z wykorzystaniem fluorochromu JC-1, jako markera stresu indukowanego DFC. Doktorantka udowodniła, że DCF bardziej toksycznie wpływa na komórki posiadające nieznaczne zaburzenia metaboliczne, czy rozwojowe, które czynią je bardziej podatnymi na stres.



Po zapoznaniu się z artykułami wchodzącymi w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej mam do Doktorantki kilka pytań:

1. Zastosowane w doświadczeniach stężenia DFC są wyższe od stężeń farmaceutyku odnotowywanych i istotnych dla środowiska, wahających się od 1 ng/l do 1 mg/l. Czy Doktorantka podjęła się próby badań wpływu niższych dawek, porównywalnych do tych odnotowywanych w zbiornikach wodnych i potencjalnie toksycznych dla organizmów?
2. Czy istnieją dane literaturowe dotyczące stopnia bioakumulacji NLPZ (ilości) w komórkach roślinnych? Czy prowadzono podobne badania u roślin wyższych?
3. Na podstawie zdjęć z mik. elektronowego można podejrzewać dodatkowe zmiany wywołane DFC, niż te opisane przez Doktorantkę. Czy zauważyła Pani zamiany w obrębie ściany komórkowej, czy innych struktur komórkowych pod wpływem DFC?
4. Czy analizując komórki na poziomie mikroskopu świetlnego stosując barwniki fluorescencyjne wiążące DNA, czy podczas analiz ultrastrukturalnych Doktorantka zauważyła zmiany w organizacji chromatyny, polegające m.in. na jej kondensacji w odpowiedzi na obecność DFC w środowisku, co może przekładać się także na aktywność transkrypcyjną komórek?
5. Czy według Doktorantki i wyników jej badań komórki *Chlamydomonas reinhardtii* można uznać za gatunek wskaźnikowy i wykorzystać je jako organizmy pełniące rolę bioindykatora zanieczyszczeń środowiska farmaceutykami, m.in. NLPZ?
6. Czy Doktorantka planuje kontynuację swoich badań w przyszłości, jeśli tak, to w jakim kierunku chciałaby je rozwijać?

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Analiza indukowanych diklofenakiem zaburzeń fizjologicznych i rozwojowych komórki *Chlamydomonas reinhardtii* ze szczególnym uwzględnieniem funkcjonowania mitochondriów” autorstwa mgr Daryi Harshkovej, wykonana pod opieką naukową dr hab. Anny Aksmann, prof. UG w pełni spełnia wymogi 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.). W związku



z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoką jakość opublikowanych i cytowanych wyników badań, które wnoszą istotny wkład w zrozumienie mechanizmów fitotoksycznego działania NLPZ na przykładzie DFC na komórki roślinne oraz ich potencjalne aplikacyjne znaczenie dla ochrony środowiska wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Katarzyna Niedojadło