

„Analiza indukowanych diklofenakiem zaburzeń fizjologicznych i rozwojowych komórki *Chlamydomonas reinhardtii* ze szczególnym uwzględnieniem funkcjonowania mitochondriów”
mgr Darya Harshkova

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) to jedna z powszechnie wykrywanych w środowisku wodnym grup farmaceutyków [1]. Są produkowane i wykorzystywane w dużych ilościach, a trafiając do środowiska mogą stanowić zagrożenie ekologiczne [2]. NLPZ stwarzają niebezpieczeństwo nie tylko dla zwierząt, ale również dla roślin wyższych i glonów, które mają wiele szlaków biochemicznych analogicznych do komórek zwierzęcych [3]. Przykładem takiej substancji jest diklofenak (DCF), który znajduje się obecnie na listach priorytetowych zagrożeń dla środowiska [4,5]. DCF, podobnie jak inne NLPZ, został zaprojektowany jako substancja lecznicza dla ludzi i zwierząt, dlatego obecnie aspekt jego wpływu na organizmy zwierzęce jest bardzo dobrze zbadany [6–8]. Badania wpływu DCF na organizmy roślinne są nieliczne i zwykle opisują zahamowanie wzrostu populacji oraz zaburzenia fotosyntezy, świadczące o fitotoksyczności tej substancji [9–11]. Wspomniane fitotoksyczne działanie DCF zaobserwowałam w badaniach przeprowadzonych na jednokomórkowej zielenicy planktonowej *Chlamydomonas reinhardtii* (**praca nr 1**), która jest modelowym organizmem w analizach biochemicznych, fizjologicznych, molekularnych i toksykologicznych prowadzonych na poziomie populacyjnym i komórkowym [12–14]. Badania opisane w pracy „Diclofenac alters the cell cycle progression of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*” (praca nr 1) wykonane zostały w jednym z najlepszych ośrodków badania glonów - ALGATECH, Třeboň, Czechy, dzięki udziałowi w Programie im. Iwanowskiej, finansowanym przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej. Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać, że jedną z przyczyn fitotoksyczności DCF jest zaburzenie rozwoju komórek *C. reinhardtii*, a konkretnie wydłużenie czasu osiągnięcia przez poszczególne komórki punktów kontrolnych cyklu komórkowego i opóźnienie replikacji DNA. Zaobserwowałam również zależne od DCF obniżenie ogólnej wydajności fotosyntezy, zawartości chlorofilu *a* i karotenoidów w komórkach oraz zwiększenie zawartości skrobi w komórkach traktowanych DCF, szczególnie pod koniec cyklu komórkowego. Obserwacje te wskazują na zaburzenia procesów metabolicznych prowadzące do nadmiernego magazynowania produktów fotosyntezy, zamiast wykorzystywania ich do pozyskiwania energii i syntezy nowych makromolekuł. W efekcie ww. zmian poszczególne komórki rosną wolniej, później osiągają punkt kontrolny cyklu komórkowego i dają zmniejszoną liczbę komórek potomnych. Końcowym skutkiem działania DCF jest zmniejszenie liczebności populacji glonów traktowanych tą substancją. Analogiczne antyproliferacyjne działanie DCF opisywane jest w licznych pracach dotyczących komórek zwierzęcych [7,15–17], ale, zgodnie z moją wiedzą, nie

było dotychczas wnikliwie badane w odniesieniu do komórek roślinnych, dzięki czemu omawiana tutaj praca wnosi do literatury przedmiotu nowe informacje dotyczące fitotoksyczności tej substancji leczniczej.

Uważa się, że toksyczność DCF i innych NLPZ w komórkach zwierzęcych polega m.in. na nadprodukcji reaktywnych form tlenu (RFT) prowadzącej do uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek oraz zaburzeń energetyki komórki (w tym procesów oddechowych) [8], co ostatecznie prowadzi do zahamowania wzrostu komórek i ich podziałów [17]. W odróżnieniu od komórek zwierzęcych, toksyczne działanie DCF w komórkach roślinnych rzadko wiązane jest z mitochondriami - zazwyczaj przypisuje się je inhibicji procesu fotosyntezy [9,11]. W świetle powyższego, w kolejnym etapie badań (**praca nr 2,**) postanowiłam zbadać dokładniej wpływ DCF na fotosyntezę w komórkach *C. reinhardtii*, porównując działanie DCF z działaniem atrazyny, która jest herbicydem triazynowym o dobrze znanym mechanizmie oddziaływania na procesy fotosyntetyczne. Uzyskane wyniki wykazały, że DCF i atrazyna wywołują odmienne reakcje komórek, przy czym, w porównaniu od atrazyny, toksyczny wpływ DCF wydawał się w mniejszym stopniu związany z fotosyntezą. Co ważne, zaobserwowałam niewielką stymulację pobierania tlenu w ciemności przez komórki *C. reinhardtii* traktowane DCF i nadekspresję genu kodującego katalazę – enzym antyoksydacyjny, który u *C. reinhardtii* znajduje się głównie w mitochondriach. Wyniki przeprowadzonych i opisanych w tej publikacji badań wskazywały zatem, że dużą rolę w fitotoksyczności DCF mogą odgrywać procesy zachodzące w mitochondriach komórek *C. reinhardtii*, a wpływ DCF na funkcjonowanie mitochondriów może być istotnym czynnikiem zakłócającym wzrost i rozwój poszczególnych komórek, a w związku z tym - całej populacji.

Powyższe wnioski stanowiły podstawę dalszych badań, w których istotnym elementem była przeprowadzona przeze mnie optymalizacja metody oznaczania wartości mitochondrialnego potencjału membranowego (MMP), jako czułego narzędzia do oceny funkcjonowania mitochondriów [18] oraz dostosowanie protokołu pomiarowego do szacowania MMP w komórkach zielenic planktonowych. W **pracy nr 3** przedstawiłam zoptymalizowany protokół, umożliwiający wiarygodne szacowanie wartości MMP w komórkach *C. reinhardtii*. Wykazałam również, że fluorochrom JC-1 (chlorek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylo-2,2'-benzimidazolo-karbocyaniny) może być skutecznie stosowany w przypadku komórek zielenic do oceny MMP jako markera stresu, w tym stresu indukowanego DCF. Metoda ta wykorzystana została w badaniach przedstawionych w **pracy nr 4**.

Podczas badań opisanych w tej pracy (**praca nr 4**) skupiłam się na parametrach funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów w komórkach *C. reinhardtii*

traktowanych DCF. W przypadku tego organizmu, tak jak w przypadku komórek roślin wyższych, istnieją dwie alternatywne drogi transportu elektronów: szlak oparty na działaniu kompleksu IV oksydazy cytochromowej oraz szlak wykorzystujący oksydazę alternatywną (AOX). „Cytochromowy” szlak transportu elektronów jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za translokację protonów z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej, umożliwiając tym samym syntezę ATP przez ATP-syntazę. Występująca w łańcuchu oddechowym roślin i glonów AOX jest uznawana natomiast za ważny mitochondrialny składnik odpowiedzi komórkowej na stres, ze względu na jej zdolność do utrzymania odpowiedniego stosunku między zredukowanymi i utlenionymi formami ubichinonu [19].

W celu analizy oddziaływania DCF na funkcjonowanie mitochondriów i oszacowania znaczenia kompleksu IV i AOX w toksyczności DCF, zastosowałam odpowiednie inhibitory poszczególnych ogniw łańcucha oddechowego: kwas salicylohydroksamowy (SHAM) (inhibitor szlaku AOX) oraz cyjanek potasu (KCN) (inhibitor kompleksu IV). Porównanie działania DCF z działaniem SHAM i KCN, w tym rozszerzona analiza statystyczna przeanalizowanych parametrów fizjologicznych (analiza dyskryminacyjna oraz macierze korelacji dla MMP, pobierania tlenu w ciemności i wielkości komórki) wyraźnie wskazywały na niespecyficzne działanie DCF na badane procesy. Zaobserwowane obniżenie wartości MMP i niski poziom RFT w mitochondriach pozwoliły zasugerować, że DCF powoduje rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej i transportu elektronów wskutek uszkodzenia błon mitochondrialnych. Przypuszczenie to zostało potwierdzone przez analizy obrazów komórki uzyskanych dzięki mikroskopii elektronowej i mikroskopii konfokalnej. Mitochondria komórek traktowanych DCF, widoczne w obrazie mikroskopowym, miały wydłużoną formę, nieregularne kształty i zdegradowane grzebienie błony wewnętrznej. Obserwacje te mogą sugerować nieprawidłowe podziały badanych organelli lub ich degenerację, tak jak jest opisywane w przypadku mitochondriów zwierzęcych traktowanych indometacyną [20]. Kompleksowa analiza wyników opisanych w pracy nr 4 pozwoliła zatem wywnioskować, że tendencja do wzrostu pobierania tlenu w ciemności i rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej wynikają z niespecyficznego uszkodzenia błony mitochondrialnej, co prawdopodobnie jest również przyczyną obserwowanego niskiego poziomu mitochondrialnych RFT.

Analiza ultrastruktury ujawniła także inne zmiany indukowane przez DCF, a mianowicie zanik pirenoиду w chloroplastach oraz nasilenie odkładania skrobi chloroplastowej, co potwierdza wyniki ilościowo opisane w **pracy nr 1** i wspiera sugestię, że DCF powoduje przesunięcie równowagi metabolicznej na korzyść magazynowania węglowodanów w komórkach, zamiast ich wykorzystania do celów pozyskiwania energii (procesy oddechowe).

W tym miejscu chciałabym podkreślić, że bardzo ciekawe wyniki uzyskałam dzięki wykorzystaniu mikroskopu konfokalnego, umożliwiającego wizualizację stanu mitochondriów za pomocą fluorochromu JC-1. Analiza uzyskanych w ten sposób zdjęć wykazała, że w populacji traktowanej DCF można zaobserwować dwie frakcje komórek: komórki podobne do komórek kontrolnych, z silnym sygnałem fluorescencyjnym świadczącym o wysokiej wartości potencjału membranowego oraz komórki wykazujące znacznie słabszą, bardziej zieloną fluorescencję, świadczącą o niskiej wartości MMP. Jest to nie tylko wynik nowy, nie opisywany wcześniej w literaturze przedmiotu, ale również bardzo istotny z punktu widzenia interpretacji wyników ilościowych uzyskiwanych podczas analiz MMP na poziomie populacji komórek, opartych na pomiarach intensywności fluorescencji JC-1. Wynik ten wyraźnie wskazuje, że niska wartość MMP, zaobserwowana na poziomie populacji przy ilościowych pomiarach, wynika z pojawienia się w populacji frakcji komórek z poważnie zaburzonym metabolizmem, a nie z równomiernego obniżenia parametrów życiowych wszystkich komórek w populacji. Można założyć, że DCF silniej wpływa na komórki, które posiadają nieznaczne zaburzenia metaboliczne lub rozwojowe, niewidoczne w warunkach kontrolnych, ale uwrażliwiające te komórki na działanie substancji toksycznej. Jest to zbieżne z wynikami uzyskanymi w **pracy nr 1**, w której wykazałam, że ok. 30% komórek w populacji traktowanej DCF ginie w ciągu pierwszych godzin ekspozycji na substancję badaną; są to prawdopodobnie komórki posiadające lekkie defekty metaboliczne, osłabiające ich odporność na stres. Uważam, że wykryte dysfunkcje mitochondriów mogą być jedną z przyczyn opisywanych wcześniej zaburzeń fizjologicznych i rozwojowych komórek i zmian w cyklu komórkowym.

Najważniejsze wnioski płynące z opisanych wyżej prac można przedstawić następująco:

1. DCF wpływa na procesy fizjologiczne i rozwój komórki *Chlamydomonas reinhardtii* opóźniając osiągnięcie punktów kontrolnych cyklu komórkowego, prowadząc do zmniejszenia ilości powstałych komórek potomnych, a w rezultacie zahamowania wzrostu populacji.
2. Antyproliferacyjny efekt DCF w dużej mierze jest związany z zaburzeniami procesów zachodzących w mitochondriach komórek *C. reinhardtii*.
3. DCF wpływa na mitochondria niespecyficznie, wywołując rozprzęgnięcie fosforylacji oksydacyjnej i transportu elektronów wskutek uszkodzenia błon mitochondrialnych.

Podsumowując moje badania, mogę stwierdzić, że istotnym czynnikiem fitotoksycznego działania DCF na komórki *Chlamydomonas reinhardtii* jest zaburzenie funkcjonowania mitochondriów spowodowane niespecyficznym oddziaływaniem tej substancji

na błony, co w konsekwencji prowadzi do zniszczenia struktury błon mitochondrialnych, widocznej w obrazach mikroskopowych traktowanych komórek. Wskutek naruszenia struktury błony następuje rozprzęgnięcie fosforylacji oksydacyjnej, widoczne w postaci obniżenia wartości MMP. Ze względu na ścisłą interakcję mitochondria-chloroplast w organizmach roślinnych i jej ważną rolę w utrzymaniu równowagi redoks, ogólnego metabolizmu komórkowego i tolerancji na stres, zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów mają istotny wpływ na całość procesów fizjologicznych zachodzących w komórce. To z kolei może być przyczyną nieprawidłowego wzrostu i rozwoju komórki oraz opóźnienia czasu osiągnięcia punktów kontrolnych cyklu komórkowego, prowadząc do zmniejszenia ilości powstałych komórek potomnych, a w rezultacie zahamowania wzrostu całej populacji.

Bibliografia

1. Ortúzar, M.; Esterhuizen, M.; Olicón-Hernández, D.R.; González-López, J.; Aranda, E. Pharmaceutical Pollution in Aquatic Environments: A Concise Review of Environmental Impacts and Bioremediation Systems. *Front. Microbiol.* 2022, 13, doi:10.3389/fmicb.2022.869332.
2. Deblonde, T.; Cossu-Leguille, C.; Hartemann, P. Emerging Pollutants in Wastewater: A Review of the Literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2011, 214, 442–448, doi:10.1016/j.ijheh.2011.08.002.
3. Proia, L.; Osorio, V.; Soley, S.; Köck-Schulmeyer, M.; Pérez, S.; Barceló, D.; Romaní, A.M.; Sabater, S. Effects of Pesticides and Pharmaceuticals on Biofilms in a Highly Impacted River. *Environ. Pollut.* 2013, 178, 220–228, doi:10.1016/j.envpol.2013.02.022.
4. Lonappan, L.; Brar, S.K.; Das, R.K.; Verma, M.; Surampalli, R.Y. Diclofenac and Its Transformation Products: Environmental Occurrence and Toxicity - A Review. *Environ. Int.* 2016, 96, 127–138, doi:10.1016/j.envint.2016.09.014.
5. *Directive 2013/39/EU of the European Parliament of 12 August 2013; OJEU L 226/1-L226/17; 2013;*
6. Cleuvers, M. Mixture Toxicity of the Anti-Inflammatory Drugs Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, and Acetylsalicylic Acid. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004, 59, 309–315, doi:10.1016/S0147-6513(03)00141-6.
7. Ferrari, B.; Paxéus, N.; Giudice, R. Lo; Pollio, A.; Garric, J. Ecotoxicological Impact of Pharmaceuticals Found in Treated Wastewaters: Study of Carbamazepine, Clofibric Acid, and Diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003, 55, 359–370, doi:10.1016/S0147-6513(02)00082-9.

8. Hejna, M.; Kapuścińska, D.; Aksmann, A. Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review on Eco-Toxicology and the Remediation Potential of Algae. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, *19*, 7717, doi:10.3390/ijerph19137717.
9. DeLorenzo, M.E.; Fleming, J. Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella Tertiolecta*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2008, *54*, 203–210, doi:10.1007/s00244-007-9032-2.
10. Hájková, M.; Kummerová, M.; Zezulka, Š.; Babula, P.; Váczi, P. Diclofenac as an Environmental Threat: Impact on the Photosynthetic Processes of *Lemna Minor* Chloroplasts. *Chemosphere* 2019, *224*, 892–899, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.02.197.
11. Cleuvers, M. Aquatic Ecotoxicity of Pharmaceuticals Including the Assessment of Combination Effects. *Toxicol. Lett.* 2003, *142*, 185–194, doi:10.1016/S0378-4274(03)00068-7.
12. Harris, E.H. *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*; Harrisduke, E., Ed.; 2nd ed.; Academic Press, 2009; ISBN 9780080919553.
13. Matusiak-Mikulín, K.; Tukaj, C.; Tukaj, Z. Relationships between Growth, Development and Photosynthetic Activity during the Cell Cycle of *Desmodesmus Armatus* (Chlorophyta) in Synchronous Cultures. *Eur. J. Phycol.* 2006, *41*, 29–38, doi:10.1080/09670260500502521.
14. Aksmann, A.; Pokora, W.; Baścik-Remisiewicz, A.; Dettlaff-Pokora, A.; Wielgomas, B.; Dziadziuszko, M.; Tukaj, Z. Time-Dependent Changes in Antioxidative Enzyme Expression and Photosynthetic Activity of *Chlamydomonas Reinhardtii* Cells under Acute Exposure to Cadmium and Anthracene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014, *110*, 31–40, doi:10.1016/j.ecoenv.2014.08.005.
15. Sathishkumar, P.; Meena, R.A.A.; Palanisami, T.; Ashokkumar, V.; Palvannan, T.; Gu, F.L. Occurrence, Interactive Effects and Ecological Risk of Diclofenac in Environmental Compartments and Biota - a Review. *Sci. Total Environ.* 2020, *698*, 134057, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134057.
16. Kudo, C.; Kori, M.; Matsuzaki, K.; Yamai, K.; Nakajima, A.; Shibuya, A.; Niwa, H.; Kamisaki, Y.; Wada, K. Diclofenac Inhibits Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells. *Biochem. Pharmacol.* 2003, *66*, 289–295, doi:10.1016/S0006-2952(03)00235-1.
17. Valle, B.L.; D'Souza, T.; Becker, K.G.; Wood, W.H.; Zhang, Y.; Wersto, R.P.; Morin, P.J. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Decrease E2F1 Expression and Inhibit Cell

- Growth in Ovarian Cancer Cells. *PLoS One* 2013, 8, e61836, doi:10.1371/journal.pone.0061836.
18. Prado, R.; Rioboo, C.; Herrero, C.; Cid, A. Screening Acute Cytotoxicity Biomarkers Using a Microalga as Test Organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012, 86, 219–226, doi:10.1016/j.ecoenv.2012.09.015.
 19. Vanlerberghe, G. Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 6805–6847, doi:10.3390/ijms14046805.
 20. Mazumder, S.; De, R.; Debsharma, S.; Bindu, S.; Maity, P.; Sarkar, S.; Saha, S.J.; Siddiqui, A.A.; Banerjee, C.; Nag, S.; et al. Indomethacin Impairs Mitochondrial Dynamics by Activating the PKC ζ -P38-DRP1 Pathway and Inducing Apoptosis in Gastric Cancer and Normal Mucosal Cells. *J. Biol. Chem.* 2019, 294, 8238–8258, doi:10.1074/jbc.RA118.004415.

Artykuły naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

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. <https://doi.org/10.3390/cells10081936> (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. *Aquatic Toxicology* 230, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105698> (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 JC-1. *Journal of Applied Phycology* 31, 3691–3697. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01860-3> (IF=2,8, punkty MNiSW= 70)
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* 12:e18005 <https://doi.org/10.7717/peerj.18005> (IF=2,3, punkty MNiSW= 100)