Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

ALEKSANDRA MIERNIK

Wpływ ibuprofenu na biologię niesporczaka *Paramacrobiotus experimentalis* Kaczmarek, Mioduchowska, Poprawa, Roszkowska 2020 (Tardigrada, Eutardigrada)

Promotor:
dr hab. Izabela Poprawa, prof. UŚ
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Katowice 2026

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania Pani dr hab. Izabeli Poprawie za wsparcie merytoryczne i dydaktyczne na każdym etapie powstawania tej pracy. Dziękuję za cierpliwość oraz umiejętność wyznaczania właściwych kierunków. Szczególnie wdzięczna jestem za pomoc w dostrzeganiu oraz przezwyciężaniu moich słabości, a także za wyrozumiałość i wsparcie w momentach trudności. Zrealizowanie tego celu nie byłoby możliwe bez okazanego wsparcia.

Jestem wdzięczna całemu Zespołowi Histologii i Embriologii Zwierząt za życzliwość, wsparcie oraz inspirującą atmosferę pracy naukowej oraz przede wszystkim za cierpliwość. Dziękuję za cenne uwagi, pomoc na różnych etapach realizacji badań oraz gotowość do dzielenia się wiedzą i doświadczeniem.

Z całego serca dziękuję Panu dr hab. Łukaszowi Kaczmarkowi z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu za udostępnienie materiału badawczego oraz okazane wsparcie.

Dziękuję Panu dr hab. inż. Sebastianowi Studentowi oraz dr Edycie Fiałkowskiej za poświęcony czas oraz cenny wkład w realizację badań.

Serdeczne podziękowania kieruję do mgr Dominiki Raś, mgr Filipa Wieczorkiewicza mgr Hanny Gorol, dr Magdaleny Kowalskiej, dr Pawła Kaczmarka oraz dr Łukasza Chajca za nieocenioną pomoc, a także za ogromne wsparcie emocjonalne. Nie byłabym w stanie osiągnąć tego celu bez Waszego wsparcia, za co z całego serca dziękuję.

Składam serdeczne podziękowania Justynie Janus za pokłady cierpliwości oraz okazaną przyjaźń.

Szczególne podziękowania kieruję do moich Rodziców, Edyty i Tomasza Mierników, za nieustanne wsparcie oraz wskazanie właściwej drogi. Dziękuję za wiarę we mnie i motywację w chwilach zwątpienia. Wasza miłość, troska i codzienne wsparcie były dla mnie bezcennym fundamentem, dzięki któremu mogłam wytrwać i doprowadzić tę pracę do końca.

Spis treści

I. STRESZCZENIE 4
II. ABSTRACT 6
III. WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ 7
IV. AUTOREFERAT ROZPRAWY 8
1. Wprowadzenie 8
1.1 Ibuprofen i jego wpływ na środowisko 8
1.2 Charakterystyka niesporczaków 9
1.3 Charakterystyka jelita środkowego 9
1.4 Charakterystyka ciałek spichrzowych 10
1.5 Charakterystyka jajnika niesporczaków 11
1.6 Charakterystyka anhydrobiozy 12
1.7 Charakterystyka gatunku *Paramacrobiotus experimentalis* 13
2. Cel rozprawy doktorskiej i hipotezy badawcze 15
3. Materialy i metody 17
3.1 Materiał 17
3.2 Wyznaczenie mediany stężenia śmiertelnego (LC_{50}) 17
3.3 Warunki eksperymentu 17
3.4 Analiza przeżywalności i rozrodczości 18
3.5 Anhydrobioza po inkubacji w ibuprofenie 19
3.6 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) 19
3.7 Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) 19
3.8 Mikroskopia konfokalna 20
3.8.1 LysoTracker Red - znakowanie organelli o kwaśnym pH 20
3.8.2 TUNEL - metoda wykrywania fragmentacji DNA związanej z procesem apoptozy 20
3.8.3 Dihydroetydyna (DHE) - rozróżnienie komórek ROS+ i ROS− 21
4. Wyniki i dyskusja 22
5. Wnioski 31
6. Literatura 32
V. PRACE NAUKOWE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU STANOWIACEGO PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ 40
VI. OŚWIADCZENIA AUTORÓW PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ 90
VII.DODATKOWE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE. 104

3:9418254376

I. STRESZCZENIE

Ibuprofen należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), charakteryzujących się działaniem przeciwbólowym, przeciwzapalnym oraz przeciwgorączkowym. Ze względu na swoją skuteczność i dostępność bez recepty jest jednym z najczęściej stosowanych przedstawicieli tej grupy leków na całym świecie.

W ostatnich latach obserwuje się znaczący wzrost konsumpcji niesteroidowych leków przeciwzapalnych, szczególnie tych dostępnych bez konieczności konsultacji lekarskiej. Zjawisko to przyczynia się do narastającego problemu obecności farmaceutyków w środowisku wodnym. Pomimo że związki te występują zazwyczaj w niskich stężeniach, ich ciągła emisja do środowiska oraz możliwość akumulacji budzą coraz większe zainteresowanie naukowców.

Paramacrobiotus experimentalis jest rozdzielnopłciowym, drapieżnym przedstawicielem gromady Eutardigrada, wykazującym zdolność do anhydrobiozy. W celu analizy zmian wywołanych działaniem ibuprofenu na różnych poziomach organizacji ciała wybrano do badań jelito środkowe, jajniki oraz ciałka spichrzowe.

W badaniach zastosowano szereg metod pozwalających na kompleksową ocenę wpływu ibuprofenu na organizmy. Wyznaczono medianę stężenia śmiertelnego (LC_{50}) oraz przeprowadzono analizy przeżywalności i rozrodczości po ekspozycji na badany związek. Oceniono również zdolność osobników do anhydrobiozy po inkubacji w ibuprofenie. Do analizy zmian wywołanych działaniem ibuprofenu wykorzystano mikroskopię jasnego pola, transmisyjną i skaningową mikroskopię elektronową (TEM i SEM) oraz mikroskopię konfokalną (barwienia LysoTracker Red, TUNEL oraz dihydroetydyna (DHE)). Na podstawie danych literaturowych wybrano do badań stężenia ibuprofenu 0,1 μg/l, 16,8 μg/l oraz 1 mg/l oraz okresy ekspozycji wynoszące 7 i 28 dni.

Nie wykazano wpływu ibuprofenu na śmiertelność, rozrodczość ani zdolność do anhydrobiozy badanych organizmów. Zaobserwowano natomiast zmiany na poziomie ultrastrukturalnym, obejmujące degenerację mitochondriów oraz zmiany w obrębie szorstkiej siateczki śródplazmatycznej. Ekspozycja na ibuprofen prowadziła również do aktywacji procesów autofagii i apoptozy oraz do wystąpienia stresu oksydacyjnego. Warto podkreślić, że poszczególne badane struktury komórkowe wykazywały zróżnicowaną odpowiedź na działanie tego farmaceutyku.

4:5087381851

Wyniki badań zostały opublikowane w trzech oryginalnych pracach (Miernik i in., 2024a, 2024b, 2026).

5:8225613470

II. ABSTRACT

Ibuprofen belongs to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), characterized by analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic properties. Due to its efficacy and over-the-counter availability, it is one of the most widely used drugs in this class worldwide.

In recent years, a significant increase in the consumption of NSAIDs has been observed, particularly regarding preparations available without a medical consultation. This phenomenon contributes to the growing problem of pharmaceutical residues in the aquatic environment. Although these compounds typically occur at low concentrations, their continuous release into the environment and potential for accumulation are attracting increasing scientific interest.

Paramacrobiotus experimentalis is a gonochoristic, predatory member of the class Eutardigrada that exhibits the ability to undergo anhydrobiosis. To analyze changes at various levels of body organization, the midgut, ovaries, and storage cells were selected for study.

The research employed a range of methods to comprehensively assess the impact of ibuprofen on the organisms. The median lethal concentration (LC_{50}) was determined, and analyses of survival and reproduction following exposure to the compound were conducted. The ability of the individuals to undergo anhydrobiosis after incubation in ibuprofen was also evaluated. Brightfield microscopy, transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM), and confocal microscopy (LysoTracker Red, TUNEL, and dihydroethidium (DHE) staining) were used to analyze ibuprofen-induced changes. Based on literature data, ibuprofen concentrations of 0.1 μg/L, 16.8 μg/L, and 1 mg/L were selected for the study, along with exposure periods of 7 and 28 days.

Incubation with ibuprofen had no effect on the mortality, reproduction, or anhydrobiotic capacity of the studied organisms. However, ultrastructural changes were observed, including mitochondrial degeneration and alterations in the rough endoplasmic reticulum. Exposure to ibuprofen also triggered autophagy, apoptosis, and oxidative stress. It is worth noting that the specific cellular structures examined exhibited varying responses to the pharmaceutical.

The research findings have been published in three original papers (Miernik et al., 2024a, 2024b, 2026).

6:6593842309

III. WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. **Miernik, A.,** Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2024a). Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?. *The European Zoological Journal, 91*(1), 631-648. https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2355313

   IF: 1,4 MNiSW: 140 pkt

2. **Miernik, A.,** Wieczorkiewicz, F., Student, S., & Poprawa, I. (2024b). Investigation of potential effects of ibuprofen on the storage cells and anhydrobiosis capacity of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Diversity, 16*(3), 132. https://doi.org/10.3390/d16030132

   IF: 2,1 MNiSW: 70 pkt

3. **Miernik, A.,** Wieczorkiewicz, F., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2026). How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*? *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlag098. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlag098

   IF: 3,0 MNiSW: 140 pkt

Łączna suma IF = 6,5

Łączna suma punktów MNiSW = 350

7:7813962339

IV. AUTOREFERAT ROZPRAWY

1. Wprowadzenie

1.1 Ibuprofen i jego wpływ na środowisko

Ibuprofen należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), których działanie farmakologiczne obejmuje właściwości przeciwbólowe, przeciwzapalne oraz przeciwgorączkowe. Do innych przykładów NLPZ zalicza się kwas acetylosalicylowy (aspiryna), diklofenak i naproksen (Rell, 2011; Parolini, 2020; Drosopoulou i in., 2025). Ibuprofen został zsyntetyzowany w latach 60. XX wieku jako alternatywa dla aspiryny, która miała powodować mniej działań niepożądanych. Do jego popularności przyczyniają się skuteczność kliniczna, dostępność oraz możliwość nabycia go bez recepty. Stosuje się go przede wszystkim w medycynie do łagodzenia bólu, zmniejszania stanu zapalnego i obniżania gorączki. Jest więc stosowany w leczeniu stanów zapalnych, np. chorób reumatycznych i przewlekłego bólu, zarówno u dorosłych, jak i dzieci (Rainsford, 2009; Bushra & Aslam, 2010). Mechanizm działania tego leku polega na nieselektywnym, odwracalnym hamowaniu enzymów COX-1 i COX-2, które odpowiadają za syntezę prostaglandyn (Mazaleuskaya i in., 2015).

Powszechne stosowanie ibuprofenu oraz innych leków z grupy NLPZ przyczynia się do narastającego problemu zanieczyszczenia środowiska substancjami farmaceutycznymi. Po zażyciu leki są usuwane z organizmu wraz z moczem i kałem, zarówno w formie niezmienionej, jak i w formie metabolitów (Deo, 2014). Do innych przyczyn tego zjawiska należą niewłaściwa utylizacja leków przez konsumentów i placówki medyczne oraz ograniczona skuteczność procesów oczyszczania ścieków, które nie zapewniają całkowitego usunięcia pozostałości tych związków. Przez ostatnie lata obserwuje się wzrost obecności farmaceutyków m.in. w ściekach przemysłowych, wodach powierzchniowych, osadach rzecznych, glebie oraz wodach gruntowych (Larsson, 2014; Ortúzar i in., 2022). Ma to istotne znaczenie, ponieważ długotrwała obecność farmaceutyków w ekosystemach może zaburzać ich równowagę oraz wpływać na organizmy, w tym na ich rozwój czy rozmnażanie (Pascoe i in., 2003; Mathias i in., 2018; Hong i in., 2021; Batucan i in., 2022). Istotnym aspektem tego problemu jest również oddziaływanie mieszanin farmaceutyków oraz ich kumulowanie się w łańcuchach troficznych (Rastogi i in., 2021; Rodrigues i in., 2025).

8:1111529199

1.2 Charakterystyka niesporczaków

Niesporczaki (Tardigrada), określane również jako „niedźwiedzie wodne", a rzadziej „prosiaczki mchowe", to mikroskopijne bezkręgowce o średniej długości ciała około 0,5 mm, blisko spokrewnione z pazurnicami i stawonogami, z którymi tworzą klad Panarthropoda (Mayer i in., 2013). Niesporczaki potrafią przetrwać w skrajnych warunkach, takich jak głębiny oceanów czy obszary polarne. Umożliwia im to kryptobioza, czyli stan niemal całkowitego zahamowania metabolizmu. Ze względu na działający stresor wyróżnia się jej różne formy: anhydrobiozę spowodowaną brakiem wody, kriobiozę wywołaną zamarzaniem oraz anoksybiozę wynikającą z braku tlenu (Møbjerg i in., 2011). Dzięki tej niezwykłej zdolności niesporczaki mogą zasiedlać większość znanych środowisk, w tym ekosystemy morskie, słodkowodne i lądowe. W środowiskach lądowych najczęściej spotykane są w mchach i porostach. Tam znajdują się odpowiednie warunki do życia, ponieważ utrzymanie aktywności metabolicznej wymaga obecności niewielkiej ilości wody w postaci cienkiej warstwy otaczającej ciało, określanej jako otoczka wodna (Nelson i in., 2018).

Typ Tardigrada dzieli się na gromady Eutardigrada oraz Heterotardigrada (Degma & Guidetti, 2026). Ciało niesporczaków składa się z czterech segmentów tułowiowych (każdy z nich posiada parę odnóży zakończonych pazurkami lub przylgami) oraz słabo wyodrębnionej głowy i pokryte jest kutikulą. Ich budowa wewnętrzna jest uproszczona. Posiadają segmentowany układ nerwowy, układ pokarmowy oraz układ rozrodczy. U części gatunków występuje układ wydalniczy tworzony przez cewki Malpighiego. Niesporczaki nie posiadają natomiast układu oddechowego ani krwionośnego (Nelson i in., 2015).

1.3 Charakterystyka jelita środkowego

Układ pokarmowy niesporczaków obejmuje jelito przednie, środkowe i tylne, z których jelito przednie i tylne są wyścielone cienką warstwą kutykuli. Rozpoczyna się on otworem gębowym, za którym ciągnie się rurka gardzielowa prowadząca do gardzieli. W sąsiedztwie rurki gardzielowej zlokalizowane są parzyste sztylety gębowe, umożliwiające nakłuwanie oraz pobieranie pokarmu. Gardziel jest silnie umięśniona, a jej skurcze generują podciśnienie ułatwiające zasysanie treści pokarmowej. Za gardzielą ciągnie się przełyk, który łączy się z jelitem środkowym (Hong i in., 2025).

Jelito środkowe niesporczaków przebiega wzdłuż środkowej części ciała i odpowiada za trawienie, wchłanianie oraz wydzielanie. Stanowi ono także pierwszą barierę chroniącą

9:4902056882

organizm przed czynnikami stresowymi dostającymi się wraz z pokarmem (Hyra i in., 2016; Rost-Roszkowska i in., 2018, 2019, 2020). Zbudowane jest z dwóch typów komórek: trawiennych i regeneracyjnych. Komórki regeneracyjne (posiadające wysoką zdolność do podziałów i odnowy nabłonka) zlokalizowane są po obu końcach jelita środkowego, gdzie tworzą pierścienie przedni i tylny. Komórki te spoczywają na blaszce podstawnej, a ich część apikalna nie sięga światła jelita. Charakteryzują się ubogą w organelle cytoplazmą. Z kolei komórki trawienne mają bardziej sześcienny kształt, a ich błona apikalna dochodzi do światła jelita środkowego, tworząc wpuklenia i mikrokosmki. Cytoplazma tych komórek jest bogata w organelle. Obserwuje się w niej również liczne pęcherzyki wydzielnicze oraz materiał zapasowy. Ilość materiału zapasowego (np. lipidów, białek i cukrów) w komórkach jelita środkowego niesporczaków może wzrastać, co sprzyja przetrwaniu w warunkach stresu, takich jak głodzenie (Greven, 1976). U niektórych gatunków obserwuje się także stopniowe gromadzenie struktur zapasowych w cytoplazmie komórek trawiennych w trakcie oogenezy (Rost-Roszkowska i in., 2011).

Jelito tylne niesporczaków jest końcowym odcinkiem ich układu pokarmowego i odpowiada za usuwanie niestrawionych resztek pokarmu. Układ pokarmowy może kończyć się kloaką (Eutardigrada) lub odbytem (Heterotardigrada).

1.4 Charakterystyka ciałek spichrzowych

Ciałka spichrzowe, których funkcją jest gromadzenie substancji zapasowych, występują swobodnie w płynie jamy ciała albo przylegają do błony podstawnej innych tkanek. Komórki te charakteryzują się dużymi rozmiarami, nieregularnym kształtem oraz obecnością w cytoplazmie licznych kulistych struktur o różnej gęstości elektronowej (Czerneková i in., 2018). Funkcją ich jest magazynowanie i transport substancji zapasowych (np. lipidów, glikogenu i białek), co umożliwia przetrwanie niekorzystnych warunków środowiskowych oraz stanowi źródło energii wykorzystywane podczas anhydrobiozy, rehydratacji czy głodzenia (Reuner i in., 2010; Nelson i in., 2015). Ponadto u niektórych gatunków niesporczaków komórki te uczestniczą w syntezie witelogenin. Ich wielkość zmienia się w zależności od etapu dojrzewania oocytów - rosną na początku tego cyklu, a następnie maleją, ponieważ energia jest wykorzystywana przez rozwijające się oocyty (Szymańska, 1994; Jönsson & Rebecchi, 2002; Poprawa, 2006).

10:7717777082

1.5 Charakterystyka jajnika niesporczaków

Układ rozrodczy niesporczaków składa się z nieparzystej gonady (jajnik, jądro lub ovotestis), położonej po grzbietowej stronie ciała. Nasieniowody są parzyste, natomiast jajowód u samic oraz osobników hermafrodytycznych jest nieparzysty. U niesporczaków z gromady Eutardigrada jajowód zazwyczaj łączy się z jelitem tylnym, tworząc kloakę, natomiast u niesporczaków z gromady Heterotardigrada układ rozrodczy i pokarmowy mają oddzielne ujścia (Nelson i in., 2015).

Nieparzysty, workowaty jajnik u niesporczaków znajduje się nad jelitem, po stronie grzbietowej ciała. Jego przednia (apikalna) część jest przytwierdzona do grzbietowej ściany ciała za pomocą dwóch więzadeł u Eutardigrada lub jednego więzadła u Heterotardigrada (Poprawa, 2005a; Poprawa & Janelt, 2019). Ściana jajnika składa się z jednej warstwy spłaszczonych komórek somatycznych (komórki te ulegają jeszcze silniejszemu spłaszczeniu wraz ze wzrostem oocytów w trakcie procesu witelogenezy) leżących na blaszce podstawnej. W jajniku wyróżnia się dwie strefy: germarium i witelarium. Germarium jest niewielką strefą zlokalizowaną w szczytowej części gonady. W jego obrębie znajdują się niezróżnicowane komórki płciowe, zwane oogoniami, które intensywnie się dzielą. Podziały tych komórek kończą się niepełnymi cytokinezami i prowadzą do powstania zespołów żeńskich komórek płciowych, w obrębie których komórki połączone są mostkami międzykomórkowymi. Następnie powstające zespoły komórkowe przemieszczają się do drugiej części jajnika - witelarium. Jest ona znacznie większa niż germarium. U przedstawicieli rzędu Parachela wszystkie komórki w obrębie zespołu komórek płciowych są jednojądrzaste. Jedna komórka zostaje wyselekcjonowana i różnicuje się w oocyt, podczas gdy pozostałe komórki przekształcają się w trofocyty wspierające rozwój oocytu (Poprawa i in., 2015a, 2015b, 2015c; Janelt i in., 2020; Jezierska i in., 2021). Odmienny model organizacji zespołów obserwuje się u przedstawicieli rzędu Apochela, gdzie w zespole występują zarówno komórki jednojądrzaste jak i wielojądrzaste. Kilka komórek jednojądrzastych różnicuje się w oocyty, natomiast pozostałe komórki jednojądrzaste, jak i wielojądrzaste, pełnią funkcję trofocytów (Suzuki, 2006; Poprawa i in., 2026). Trofocyty przekazują do oocytów organelle komórkowe oraz materiał zapasowy w postaci kul żółtka (Poprawa i in., 2015a, 2015b, 2015c; Janelt i in., 2019, 2020; Jezierska i in., 2021; Poprawa i in., 2026).

11:1953806975

O dużej różnorodności strategii rozrodczych w obrębie typu Tardigrada świadczy obecność gatunków rozdzielnopłciowych, hermafrodytycznych oraz partenogenetycznych (spotyka się przypadki partenogenezy także u form rozdzielnopłciowych). Jaja mogą być składane bezpośrednio do środowiska lub do wylinek (Nelson i in., 2015; Poprawa & Janelt, 2019).

1.6 Charakterystyka anhydrobiozy

Anhydrobioza jest jedną z form kryptobiozy (zobacz sekcję 1.2). Pozwala organizmom przetrwać w warunkach braku wody. Proces ten jest szczególnie ważny w niestabilnych środowiskach, takich jak mchy, porosty czy okresowe zbiorniki wodne. Podczas tego procesu zachodzi skrajne odwodnienie organizmu. Metabolizm spada niemal do zera. Ciało zmniejsza swoją objętość, a odnóża zostają podkurczone (Figura 1). Wysuszony organizm może długo pozostawać w stanie anhydrobiozy, a po nawodnieniu wraca do aktywnego życia. W przypadku większości organizmów wielokomórkowych anhydrobioza może występować jedynie na określonych etapach rozwoju i rzadko dotyczy form dorosłych. Jednak niesporczaki, a także nicienie i wrotki, należą do zwierząt znanych ze zdolności do anhydrobiozy również u form dorosłych. Badania pokazują także, że im dłużej trwa stan anhydrobiozy, tym więcej czasu zwierzęta potrzebują, aby powrócić do aktywnej formy (Crowe & Madin, 1974; Hengherr i in., 2008; Roszkowska i in., 2021).

Podczas procesu anhydrobiozy powstają związki, które pomagają w jego przebiegu, np. chronią komórki przed uszkodzeniami i stabilizują ich struktury. Białka szoku cieplnego (HSP) pomagają innym białkom poprzez korygowanie ich struktury oraz naprawianie tych, które są nieprawidłowo sfałdowane. Występują m.in. u niesporczaków, owadów oraz skorupiaków. Natomiast białka późnej embriogenezy (LEA) zapobiegają agregacji składników komórkowych oraz stabilizują błony. Spotyka się je nie tylko u niesporczaków, wrotków i bakterii, ale także w nasionach roślin w końcowych etapach embriogenezy (Kaczmarek i in., 2019). Do innych białek odgrywających istotną rolę w anhydrobiozie należą AOX - odpowiedzialne za uruchomienie alternatywnego szlaku transportu elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, zapewniającego odporność na działanie cyjanku, CAHS – zapobiegające denaturacji i agregacji białek i zachowujące aktywność enzymów podczas odwodnienia, czy SAHS, które uczestniczą w ochronie składników zewnątrzkomórkowych oraz organelli związanych z procesami

12:2873547742

sekrecyjnymi, a także mogące przyczyniać się do regulacji stresu oksydacyjnego poprzez ochronne działanie hemu i bilirubiny (Krakowiak i in., 2024). Do sacharydów istotnych w tym procesie należy trehaloza, która stabilizuje białka, kwasy nukleinowe oraz lipidy błonowe, chroniąc je przed uszkodzeniami (Wełnicz i in., 2011). Podczas tego procesu aktywowane są dwa enzymatyczne mechanizmy odpowiedzialne za detoksykację nadtlenku wodoru (H_2O_2). Obejmują one szlak glutationowy oraz układ enzymatyczny oparty na współdziałaniu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy, które wspólnie przyczyniają się do ograniczenia akumulacji reaktywnych form tlenu (Krakowiak i in., 2024).

Zdolność do wchodzenia w stan anhydrobiozy została wykazana u wielu gatunków niesporczaków, m.in. *Echiniscus testudo, Paramacrobiotus experimentalis, Pseudohexapodibius degenerans, Macrobiotus pseudohufelandi* oraz *Hypsibius exemplaris* (Richaud i in., 2020; Roszkowska i in., 2023; Miernik i in., 2024b).

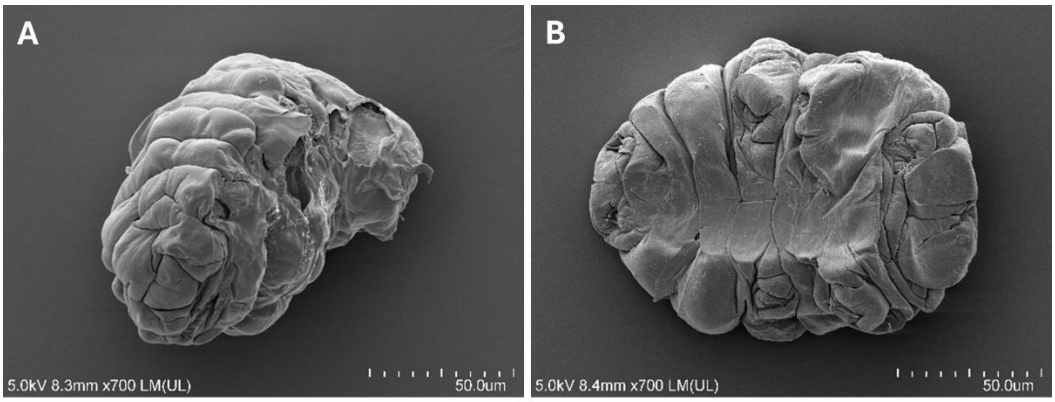


Figura 1. *Pam. experimentalis* w stanie anhydrobiozy, SEM. (A) Boczna strona ciała. (B) Brzuszna strona ciała.

1.7 Charakterystyka gatunku *Paramacrobiotus experimentalis*



Figura 2. *Pam. experimentalis*, LM, bar = 100 μm.

13:8239962359

Gatunek *Paramacrobiotus experimentalis* Kaczmarek, Mioduchowska, Poprawa, Roszkowska 2020 (Tardigrada, Eutardigrada, Macrobiotidae) został opisany na podstawie osobników zebranych w listopadzie 2013 roku w próbach mchu pochodzących z Madagaskaru (prowincje Toamasina oraz Antananarywa). Jest to gatunek o typowej budowie dla gromady Eutardigrada (Figura 2). Pozycję systematyczną gatunku przedstawiono w tabeli 1.

T**abela 1.** Przynależność systematyczna *Pam. experimentalis.*

Typ	Tardigrada
Gromada	Eutardigrada
Rząd	Parachela
Rodzina	Macrobiotidae
Rodzaj	*Paramacrobiotus*
Gatunek	*Paramacrobiotus experimentalis*

Jest to gatunek rozdzielnopłciowy, a nieznaczny dymorfizm płciowy przejawia się głównie w kształcie ciała oraz różnicach wielkości między samcami a samicami. Ciało osobników jest przezroczyste lub lekko białawego zabarwienia. Młode osobniki są roślinożerne, natomiast dorosłe są drapieżnikami. Ich charakterystycznie ornamentowane jaja nie są składane do wylinek, lecz wolno do środowiska. Mają one kulisty kształt i są pokryte wyrostkami, od których odchodzą beleczki tworzące charakterystyczną sieć zwaną areolacjami. Chorion podstawowy wypełniający areolacje jest pofałdowany (Figura 3). Gatunek ten jest zdolny do anhydrobiozy (Kaczmarek i in., 2020).

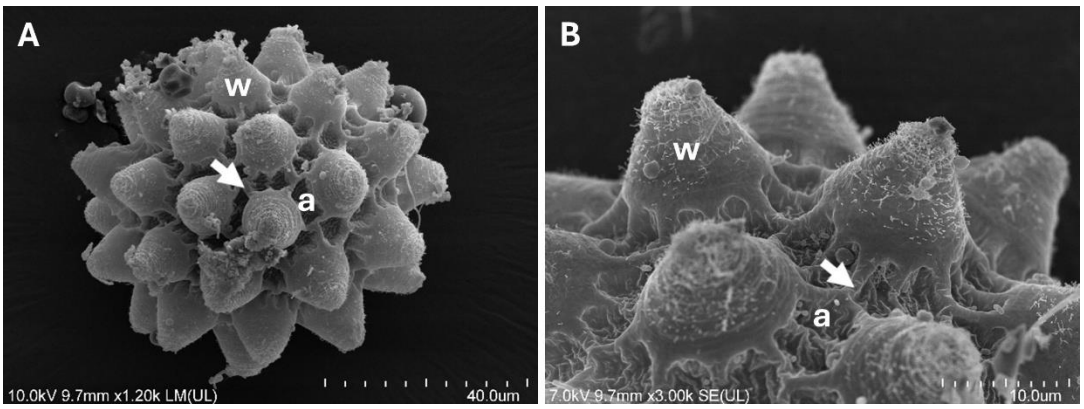


Figura 3. Jajo *Pam. experimentalis*, SEM. (A) Struktura jaja. (B) Struktura powierzchni chorionu. (w) wyrostki, (a) areolacje, (strzałka) beleczki chorionu.

14:3031614546

2. Cel rozprawy doktorskiej i hipotezy badawcze

Wzrost zużycia leków z grupy NLPZ, w tym ibuprofenu, przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska, w tym wód. Obecność tych związków może wpływać na zwierzęta zarówno kręgowe, jak i bezkręgowe, dlatego istotne jest poznanie ich oddziaływania na różnych poziomach organizacji organizmu. W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań dotyczących wpływu leków z grupy NLPZ, w tym ibuprofenu, na organizmy. Analizy obejmowały zarówno organizmy kręgowe, jak i bezkręgowe. Większość badań koncentrowała się jednak przede wszystkim na wpływie tych związków na rozmnażanie oraz przeżywalność organizmów. Znacznie rzadziej analizowano zmiany zachodzące na poziomie ultrastrukturalnym. Badania te mogłyby dostarczyć istotnych informacji na temat mechanizmów toksycznego działania NLPZ. Niniejszy projekt zakładał bardziej holistyczne podejście do tematu, skupiając się na wielu aspektach życia tych organizmów. Badania te mogą znaleźć zastosowanie w zoologii, toksykologii i ekotoksykologii.

Głównym celem projektu było opisanie zmian zachodzących pod wpływem krótko- i długoterminowego działania niesteroidowego leku przeciwzapalnego, jakim jest ibuprofen na niesporczaki. Do analiz wybrano gatunek *Pam. experimentalis*. Analizowano rozrodczość, przeżywalność, zdolność do anhydrobiozy, a także zmiany na różnych poziomach organizacji ciała (narządy, tkanki, komórki, organelle komórkowe), aktywację procesów śmierci komórkowej, autofagii, a także poziom stresu oksydacyjnego. Do analizy i porównania zmian na różnych poziomach organizacji ciała wybrano kluczowe dla funkcjonowania niesporczaków struktury: jelito środkowe jako pierwsze miejsce kontaktu z substancjami pobieranymi z pokarmem, ciałka spichrzowe związane z magazynowaniem substancji zapasowych (wykorzystywanych w warunkach stresu) oraz jajniki odpowiedzialne za funkcje rozrodcze. Na podstawie dostępnej literatury wybrano następujące stężenia farmaceutyku do eksperymentów: 0,1 μg/l - średnie stężenie występujące w wodach powierzchniowych na całym świecie (Aus der Beek i in., 2016) oraz 16,8 μg/l - stężenie odnotowane w rzekach dużych miast (Mrowiec, 2015), a także wyższe stężenie eksperymentalne 1 mg/l, które nie zostało dotychczas zarejestrowane w środowisku. Stężenie to może jednak wystąpić w sytuacji przypadkowego uwolnienia substancji czynnych leków

15:1129768617

do środowiska. Wybrano również okresy ekspozycji organizmów na ten farmaceutyk: 7 i 28 dni.

Szczegółowe cele rozprawy doktorskiej to:

1. Wyznaczenie wartości LC_{50}, czyli stężenia substancji powodującego śmierć 50 % badanych organizmów w określonych warunkach eksperymentalnych.
2. Określenie procentowej przeżywalności osobników po wybudzeniu ze stanu anhydrobiozy po inkubacji w ibuprofenie.
3. Przeprowadzenie badań przyżyciowych obejmujących ocenę przeżywalności oraz rozrodczości organizmów po ekspozycji na ibuprofen. Analizowanie liczby osobników z widocznymi oocytami w gonadach oraz liczby złożonych jaj.
4. Analizę ultrastruktury jelita środkowego, ciałek spichrzowych oraz jajnika po krótko- i długoterminowej ekspozycji na wybrane stężenia ibuprofenu.
5. Analizę mechanizmów odpowiedzi komórkowej na stres oraz procesów apoptozy zachodzących w jelicie środkowym, ciałkach spichrzowych oraz jajniku pod wpływem krótko- i długoterminowej ekspozycji na wybrane stężenia ibuprofenu.

W trakcie projektu przetestowano następujące hipotezy badawcze:

H_1: ekspozycja organizmu na działanie ibuprofenu zwiększa śmiertelność;

H_2: ekspozycja organizmu na działanie ibuprofenu zmniejsza rozrodczość;

H_3: ekspozycja organizmu na działanie ibuprofenu zmniejsza zdolność do anhydrobiozy;

H_4: ekspozycja organizmu na działanie ibuprofenu wywołuje zmiany w strukturze organelli w komórkach;

H_5: ekspozycja organizmu na działanie ibuprofenu aktywuje autofagię w komórkach narządów jako mechanizmu ochrony komórek;

H_6: ekspozycja organizmu na działanie ibuprofenu wywołuje śmierć komórek, ponieważ ibuprofen powoduje uszkodzenie organelli komórkowych;

H_7: ekspozycja organizmu na działanie ibuprofenu wywołuje stres oksydacyjny.

Wszystkie powyższe etapy przyczyniły się do realizacji założonego celu badawczego, co umożliwiło kompleksową ocenę wpływu ibuprofenu na badany gatunek i prześledzenie zarówno bezpośrednich efektów toksyczności, jak i mechanizmów adaptacyjnych w odpowiedzi na stres.

16:3553140616

3. Materialy i metody

3.1 Materiał

Osobniki gatunku *Paramacrobiotus experimentalis* (Tardigrada, Eutardigrada, Macrobiotidae) wykorzystane w niniejszym badaniu zostały pozyskane dzięki uprzejmości dr hab. Łukasza Kaczmarka, prof. UAM z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Hodowlę prowadzono w plastikowych szalkach Petriego ze zmatowionym dnem (aby ułatwić zwierzętom poruszanie się), w mieszaninie wody mineralnej Żywiec Zdrój i wody destylowanej w stosunku 1:3, w temperaturze 19 °C oraz w cyklu świetlnym 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Pokarmem niesporczaków były wrotki (*Lecane inermis*) pozyskiwane z hodowli Zespołu Ekosystemów Wodnych Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie dzięki uprzejmości dr Edyty Fiałkowskiej. Do hodowli dodawano również glony (*Chlorella* sp. oraz *Chlorococcum* sp.); stanowiły one między innymi pokarm dla młodych osobników. Ponieważ niesporczaki to zwierzęta bezkręgowe, zgoda komisji etycznej na prowadzenie badań nie była wymagana.

3.2 Wyznaczenie mediany stężenia śmiertelnego (LC_{50})

Aby wyznaczyć LC_{50}, czyli stężenie substancji, przy którym po określonym czasie ginie 50 % badanej populacji, osobniki hodowano w stopniowo rosnących stężeniach ibuprofenu w zakresie 100–950 mg/l w płytkach 12-dołkowych (po 6 osobników na dołek), zawierających po 3 ml medium z tym lekiem. Inkubacja trwała 24 godziny (temperatura 19 °C, 12 godzin światła i 12 godzin ciemności). Po czym określono liczbę osobników żywych i martwych. Uzyskane dane analizowano metodą probitową (Finney, 1952).

3.3 Warunki eksperymentu

Eksperyment obejmował cztery grupy kontrolne oraz sześć grup eksperymentalnych (Figura 4). Grupa kontrolna (PeC) była hodowana w standardowym medium (zobacz sekcję 3.1), natomiast pozostałe grupy kontrolne (PeC0, PeC7, PeC28) hodowane były w medium z dodatkiem 1 ml etanolu na litr (ponieważ ibuprofen w grupach eksperymentalnych najpierw rozpuszczano w etanolu ze względu na jego większą rozpuszczalność w związkach organicznych, takich jak etanol, niż w wodzie). Grupy kontrolne pozwoliły wykluczyć wpływ obecności alkoholu oraz starzenia się zwierząt na wyniki eksperymentu.

Wszystkie grupy hodowano w płytkach 12-dołkowych o zmatowionym dnie. Całkowita objętość roztworu dodana do jednego dołka wynosiła 3000 μl. W grupach eksperymentalnych

17:3605997392

zastosowano trzy stężenia tego związku: dwa środowiskowe: 0,1 µg/l (Aus der Beek i in., 2016) i 16,8 µg/l (Mrowiec, 2015) oraz wyższe stężenie eksperymentalne - 1 mg/l. Dla każdego stężenia eksperyment prowadzono przez 7 i 28 dni. Wszystkie grupy kontrolne i eksperymentalne inkubowano w temperaturze 19 °C oraz w cyklu świetlnym: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Podczas inkubacji osobniki karmiono wrotkami (zobacz sekcję 3.1). Pokarm podawano w roztworach zawierających odpowiednie stężenia ibuprofenu, co pozwalało na utrzymanie stałego poziomu związku w poszczególnych grupach badawczych. Liczbę dorosłych osobników wykorzystanych w każdej metodzie przedstawiono w tabeli 2.

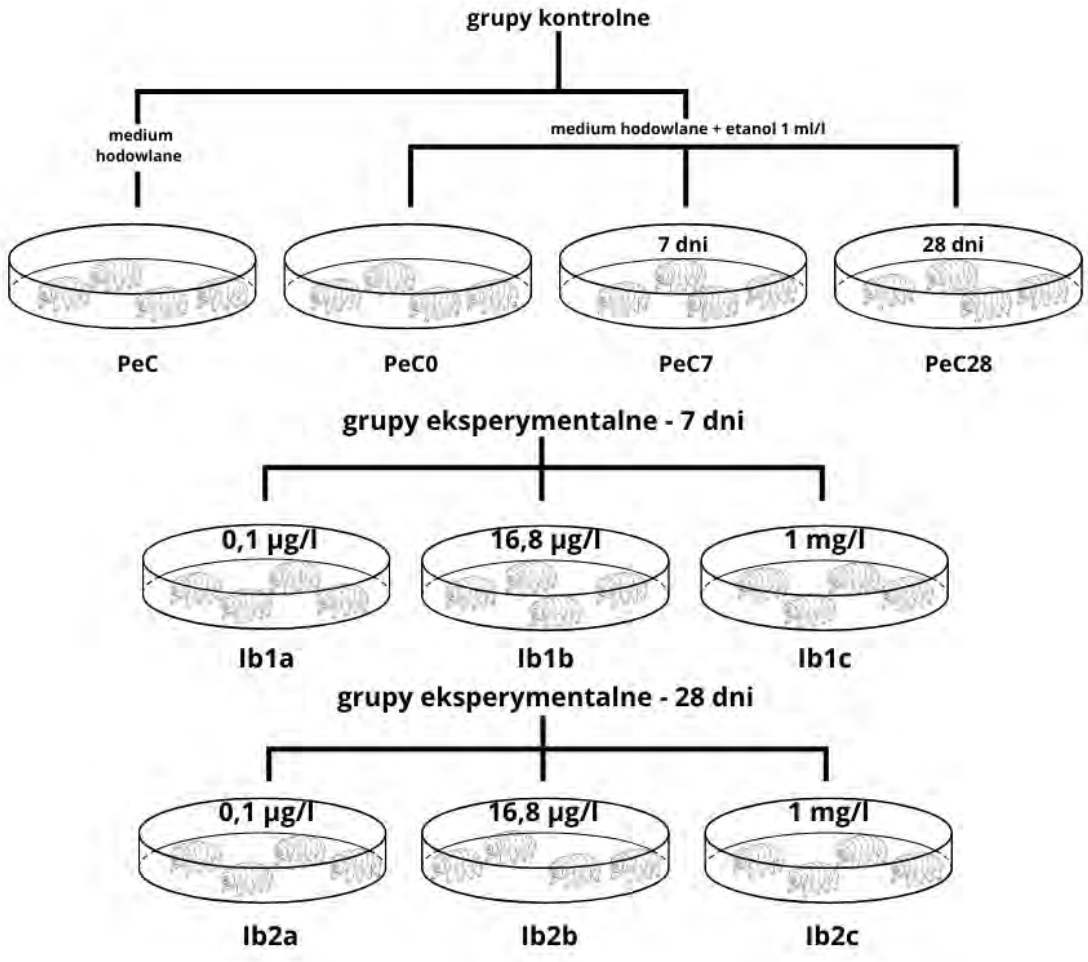


Figura 4. Grupy kontrolne i eksperymentalne.

3.4 Analiza przeżywalności i rozrodczości

Grupy kontrolne (PeC i PeC0) oraz eksperymentalne (Figura 4) hodowano w płytkach 12-dołkowych o zmatowionym dnie. Każda grupa badawcza składała się z 10 dorosłych osobników (5 samic i 5 samców, rozróżnianych na podstawie cech morfologicznych) i była

18:1043446442

analizowana w 5 niezależnych powtórzeniach. Podczas karmienia dbano o utrzymanie odpowiedniego stężenia ibuprofenu, podając pokarm (wrotki *Lecane inermis)* w roztworach o właściwych stężeniach tego związku. Fotoperiod i temperaturę utrzymywano zgodnie z warunkami opisanymi w sekcji 3.1. Codziennie, przez cały okres inkubacji dla danej grupy, rejestrowano liczbę żywych osobników oraz osobników z widocznymi oocytami. Dodatkowo monitorowano liczbę składanych jaj, które były regularnie usuwane z hodowli. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu Kruskala-Wallisa, porównując grupy eksperymentalne oraz grupę PeC0 z grupą kontrolną PeC.

3.5 Anhydrobioza po inkubacji w ibuprofenie

Osobniki z grup kontrolnych i eksperymentalnych (Figura 4) przeniesiono wraz z niewielką ilością medium hodowlanego (450 μl) do plastikowych szalek Petriego wyłożonych bibułą filtracyjną. Następnie przez 3 dni utrzymywano je w temperaturze 19 °C w cyklu 12 godzin światła - 12 godzin ciemności, co umożliwiało powolne wysychanie i wejście w stan anhydrobiozy. Po tym okresie do szalek dodawano medium hodowlane. Rehydratację oraz powrót do aktywności monitorowano po 24, 48 i 72 godzinach.

3.6 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Osobniki wprowadzone w stan anhydrobiozy (10 osobników) oraz jaja (10 sztuk) odwodniono w szeregu roztworów alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % po 2 minuty każdy), a następnie w szeregu acetonowym przygotowanym na bazie alkoholu absolutnego (25 %, 50 %, 75 %, 100 % po 2 minuty każdy). Odwodniony materiał umieszczono w pojemniku wykonanym z fragmentu eppendorfa oraz siatki limnologicznej. Materiał suszono w punkcie krytycznym, a następnie napylano go złotem. Materiał został zanalizowany przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego Hitachi UHR FE-SEM SU 8010.

3.7 Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Osobniki *Pam. experimentalis* z grup kontrolnych i eksperymentalnych (Figura 4) utrwalano w 2,5 % roztworze glutaraldehydu (sporządzonym na 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7,4) przez 7 dni w temperaturze 4 °C. Następnie materiał przepłukano w buforze fosforanowym (3 × 30 minut) i utrwalono w 2 % roztworze czterotlenku osmu (OsO_4) sporządzonym na 0,1 M buforze fosforanowym przez 2 godziny. Ten i kolejne etapy procedury prowadzono

19:1081968644

w temperaturze pokojowej. Następnie materiał poddano drugiej serii płukań w buforze fosforanowym (3 × 10 minut). Utrwalony materiał odwodniono w szeregu alkoholu etylowego (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 %, każdy po 15 minut oraz cztery razy 100 % po 15 minut), w mieszaninie alkoholu absolutnego i acetonu (1:1) przez 15 minut oraz dwa razy po 15 minut w acetonie. Po czym przepajano przygotowany materiał w mieszaninie acetonu i żywicy epoksydowej (1:1) przez 2 godziny w zamkniętych eppendorfach (po tym czasie otworzono je i zostawiono pod dygestorium przez całą noc w celu odparowania acetonu). Materiał zatopiono w żywicy epoksydowej (Epoxy Embedding Medium Kit, Sigma). Skrawki półcienkie (800 nm) krojono przy użyciu ultramikrotomu Leica UCT25, barwiono 1 % błękitem metylenowym w 1 % boraksie i analizowano w mikroskopie świetlnym Olympus BX60. Skrawki ultracienkie (70 nm) krojono na ultramikrotomie Leica EM UC7, umieszczono na siatkach miedzianych, kontrastowano octanem uranylu oraz cytrynianem ołowiu i analizowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym Hitachi H500 (napięcie 75 kV).

3.8 Mikroskopia konfokalna

3.8.1 LysoTracker Red - znakowanie organelli o kwaśnym pH

Nieutrwalone osobniki z grup kontrolnych i eksperymentalnych (Figura 4) inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności, w 2,5 μM roztworze LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, L7528, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sporządzonym na buforze TBS (pH 7,4). Następnie materiał płukano w TBS (3 × 5 minut), po czym inkubowano przez 15 minut w DAPI (barwnik wiążący się z DNA, fluorescencyjnie znakujący jądra komórkowe) rozcieńczonym w TBS w stężeniu 1 μg/ml. Po barwieniu DAPI preparaty ponownie przepłukano w TBS (3 × 5 minut). Materiał zamykano w Vectashield na szkiełkach mikroskopowych, a następnie analizowano przy użyciu mikroskopów konfokalnych Olympus FluoView FV3000 i Olympus FluoView FV1000. Wzbudzenie fluorescencji prowadzono za pomocą lasera diodowego o długości fali 405 nm (DAPI) oraz 570 nm (LysoTracker Red).

3.8.2 TUNEL - metoda wykrywania fragmentacji DNA związanej z procesem apoptozy

Osobniki nieutrwalone z grup kontrolnych i eksperymentalnych (Figura 4) inkubowano w świeżo przygotowanym 0,1 % roztworze cytrynianu sodu przez 2 minuty na lodzie. Następnie materiał płukano trzykrotnie w TBS, po 5 minut na każde płukanie. Następnie

20:1332501358

przeprowadzono barwienie metodą TUNEL z wykorzystaniem zestawu In situ Cell Death Detection Kit TMR red (Roche Applied Science), inkubując materiał w mieszaninie reakcyjnej przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C w ciemności. Po czym materiał ponownie płukano w TBS (3 × 5 minut), a następnie inkubowano w 1 μg/ml DAPI w TBS przez 15 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności. Następnie materiał płukano w TBS (3 × 5 minut) i zamykano w Vectashield na szkiełkach mikroskopowych. Kontrola negatywna została przygotowana zgodnie z protokołem podanym przez producenta. Analizę przeprowadzono z użyciem mikroskopów konfokalnych Olympus FluoView FV3000 i Olympus FluoView FV1000 (wzbudzenie fluorescencji przy długości fali 405 nm dla barwnika DAPI, 570 nm dla barwnika TMR Red, z wykorzystaniem lasera diodowego).

Próbę kontrolną pozytywną stanowiły nieutrwalone osobniki poddane działaniu deoksyrybonukleazy I (DNase I, EURx Sp., Gdańsk, Poland), wolnej od RNaz. W tym celu na lodzie rozcieńczono 2 μl DNazy I (5 U/μl) w 18 μl buforu reakcyjnego II zawierającego jony Mn^{2+}. Następnie materiał inkubowano w przygotowanym roztworze przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C, traktowano EDTA przez 5 minut i płukano w TBS (2 × 5 minut). Po płukaniu wykonano standardowe barwienie (TUNEL i DAPI).

3.8.3 Dihydroetydyna (DHE) - rozróżnienie komórek ROS+ i ROS−

Pierwszym etapem procedury było inkubowanie nieutrwalonych osobników w TBS zawierającym 0,0025 % Triton X-100 w temperaturze pokojowej, a następnie barwienie 30 μM DHE (30 mM DHE w DMSO) przez 15 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Materiał następnie płukano w TBS (3 × 5 minut), barwiono 1 μg/ml DAPI w TBS przez 15 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności, po czym ponownie płukano w TBS (3 × 5 minut). Po płukaniu materiał zamykano w Vectashield na szkiełkach mikroskopowych i analizowano przy użyciu mikroskopów konfokalnych Olympus FluoView FV3000 oraz Olympus FluoView FV1000 (wzbudzenie fluorescencji przy długości fali 405 nm – DAPI oraz 561 nm – DHE zapewniono za pomocą lasera diodowego).

Sygnały ROS+ w komórkach jajnika analizowano w programie Imaris (Bitplane). Wykorzystano funkcję wykrywania punktów, a następnie obliczono średnią liczbę sygnałów na komórkę. Zmiany wyrażono jako fold change, czyli stosunek wartości w grupach eksperymentalnych do wartości w odpowiednich grupach kontrolnych.

21:1038087533

T**abela 2.** Liczba dorosłych osobników *Pam. experimentalis* wykorzystanych w każdej metodzie.

	Analiza anhydrobiozy	Mikroskopia świetlna i TEM	LysoTracker Red	TUNEL	DHE
PeC	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**
PeC0	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**
PeC7	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**
PeC28	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**
Ib1a *(7 dni; 0,1 µg/l)*	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**
Ib1b *(7 dni; 16,8 µg/l)*	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**
Ib1c *(7 dni; 1 mg/l)*	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**
Ib2a *(28 dni; 0,1 µg/l)*	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**
Ib2b *(28 dni; 16,8 µg/l)*	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**
Ib2c *(28 dni; 1 mg/l)*	**24**	**60**	**30**	**30**	**30**

4. Wyniki i dyskusja

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z 3 opublikowanych prac oryginalnych, w których zawarto odpowiednio: wyniki badań dotyczące wyznaczenia LC_{50} ibuprofenu u badanego gatunku oraz jego działania na jelito środkowe (Miernik i in., 2024a), wyniki dotyczące wpływu ibuprofenu na anhydrobiozę i ciałka spichrzowe (Miernik i in., 2024b), rezultaty badań przyżyciowych obejmujących wpływ ibuprofenu na przeżywalność, rozrodczość oraz badania dotyczące wpływu tego farmaceutyku na ultrastrukturę jajników (Miernik i in., 2026).

Miernik, A., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2024a). Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?. *The European Zoological Journal, 91*(1), 631-648. https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2355313

Jelito środkowe, stanowiące przedmiot niniejszej pracy, pełni kluczową rolę w procesach trawienia, sekrecji i absorpcji. U niesporczaków struktura ta zbudowana jest z dwóch głównych typów komórek: trawiennych (odpowiadają one za wchłanianie składników pokarmowych) oraz regeneracyjnych (które uczestniczą w utrzymaniu homeostazy oraz odnowie nabłonka jelita). Ze względu na bezpośredni kontakt z treścią pokarmową, jelito środkowe stanowi jedną z pierwszych linii obrony organizmu przed czynnikami stresowymi,

22:1980964960

w tym substancjami potencjalnie szkodliwymi dostarczanymi wraz z pokarmem (Greven, 1976; Rost-Roszkowska i in., 2008; Hyra i in., 2016; Rost-Roszkowska i in., 2018, 2019, 2020).

Wyznaczono wartość LC_{50} dla *Pam. experimentalis* po 24-godzinnej ekspozycji na ibuprofen. Wynosi ona 282 mg/l, co jest wartością znacznie wyższą niż stężenia zastosowane w eksperymencie. Należy jednak podkreślić, że badania koncentrowały się przede wszystkim na stężeniach środowiskowych stresora oraz ewentualnym wpływie tych stężeń na ultrastrukturę komórek jelita środkowego.

Aby przeanalizować zmiany ultrastrukturalne w komórkach jelita, przeprowadzono badania za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Po 7-dniowej ekspozycji na ibuprofen w stężeniach 0,1 μg/l oraz 16,8 μg/l nie stwierdzono istotnych zmian w komórkach jelita środkowego w porównaniu z komórkami zwierząt z grup kontrolnych. Natomiast ekspozycja na ten związek przez taki sam okres, ale w stężeniu 1 mg/l, skutkowała pojawieniem się struktur autofagicznych w komórkach oraz zmianami ultrastruktury mitochondriów. Ponadto 28-dniowa ekspozycja na stresor we wszystkich badanych stężeniach prowadziła do wystąpienia podobnych zmian jak te opisane dla grupy 1 mg/l po 7-dniowej inkubacji (Tabele 3, 4) co pozytywnie weryfikuje hipotezy **H_4** i **H_5**. Obecność kwaśnych organelli w komórkach jelita środkowego została dodatkowo potwierdzona za pomocą mikroskopii konfokalnej z użyciem barwnika Lysotracker Red. Analiza ultrastrukturalna wykazała również obecność uwypukleń apikalnych błon komórek trawiennych, które nie posiadały mikrokosmków, skierowanych w stronę światła jelita środkowego. W ich obrębie gromadziły się kwaśne organelle. Może to sugerować, że fragmenty te mogłyby zostać usunięte w późniejszym czasie do światła jelita, gdzie zostałyby strawione, co przyczyniłoby się do przywrócenia homeostazy komórki.

Komórki regeneracyjne i trawienne różnie reagują na działanie ibuprofenu. Zaobserwowano, że zmiany ultrastrukturalne były szczególnie widoczne w komórkach trawiennych, podczas gdy komórki regeneracyjne nie wykazywały istotnych zaburzeń ultrastruktury. Zauważono, że zmiany w komórkach trawiennych *Pam. experimentalis* nasilały się wraz ze wzrostem stężenia i czasu działania stresora, natomiast brak zmian w komórkach regeneracyjnych może wynikać z ich lokalizacji, czyli braku bezpośredniego kontaktu ze światłem jelita, a tym samym mniejszej ekspozycji na działanie ibuprofenu. Komórki

23:1063454337

te odpowiadają głównie za odnowę tkanek i charakteryzują się niższą aktywnością metaboliczną, co może dodatkowo zwiększać ich odporność na działanie stresorów. Komórki trawienne pełnią funkcję jednej z pierwszych barier ochronnych, ponieważ mają bezpośredni kontakt z substancjami pobieranymi przez układ pokarmowy (Rost-Roszkowska i in., 2008, 2021). Dzięki dużej aktywności metabolicznej mogą częściowo ograniczać działanie szkodliwych czynników i chronić inne komórki organizmu.

Zaobserwowano, że mitochondria są organellami wrażliwymi na działanie ibuprofenu (Tabela 3). Obrzmienie mitochondriów, utrata grzebieni oraz elektronowo jasna macierz mogą wynikać z uszkodzenia błon mitochondrialnych. Organelle te odpowiadają za produkcję energii w komórce oraz mogą wytwarzać reaktywne formy tlenu (Duchen, 2004; McBride i in., 2006; Picard i in., 2013). Zaburzenia ich pracy mogą prowadzić do zakłóceń metabolizmu, nasilenia stresu oksydacyjnego (co również zaobserwowano) oraz uszkodzeń komórki.

W celu oceny fragmentacji DNA charakterystycznej dla procesu apoptozy zastosowano metodę TUNEL umożliwiającą wykrywanie wolnych końców 3'-hydroksylowych (3'-OH) DNA. Po 28-dniowej ekspozycji *Pam. experimentalis* na ibuprofen zaobserwowano zwiększoną intensywność fragmentacji DNA (Tabela 5) co potwierdza hipotezę **H**$_6$.

T**abela 3.** Wpływ ibuprofenu na degenerację mitochondriów w wybranych strukturach *Pam. experimentalis.*

	Obecność zdegenerowanych mitochondriów		
	Jelito środkowe	Ciałka spichrzowe	Jajnik
Ib1a *(7 dni; 0,1 µg/l)*	-	-	-
Ib1b *(7 dni; 16,8 µg/l)*	-	-	-
Ib1c *(7 dni; 1 mg/l)*	+	-	-
Ib2a *(28 dni; 0,1 µg/l)*	+	-	-
Ib2b *(28 dni; 16,8 µg/l)*	+	-	-
Ib2c *(28 dni; 1 mg/l)*	+	+	+

Przeprowadzone analizy wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia ibuprofenu i wydłużeniem czasu ekspozycji w komórkach jelita środkowego dochodzi do nasilenia stresu

24:8611490531

oksydacyjnego. To zjawisko zaobserwowano w komórkach jelita środkowego *Pam. experimentalis* poddanych działaniu ibuprofenu przez 28 dni, niezależnie od zastosowanego stężenia tego związku, a także po 7-dniowej ekspozycji na ibuprofen w stężeniu 1 mg/l, co potwierdza hipotezę **H**$_7$ (Tabela 6). Do detekcji stresu oksydacyjnego zastosowano barwienie DHE oraz analizę z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Stres oksydacyjny może wynikać z uszkodzeń mitochondriów w komórkach (Belhadj Slimen i in., 2014; Xu i in., 2025). W odpowiedzi komórka uruchamia mechanizmy obronne, takie jak autofagia, które usuwają uszkodzone elementy komórki (Youle & Narendra, 2011). Jednak przy silnym lub długotrwałym działaniu stresora może dochodzić do fragmentacji DNA związanej z apoptozą (Elmore, 2007).

Tabela 4. Wpływ ibuprofenu na aktywację autofagii w wybranych strukturach *Pam. experimentalis.*

	Zwiększona liczba kwaśnych organelli związana z autofagią		
	Jelito środkowe	Ciałka spichrzowe	Jajnik
Ib1a *(7 dni; 0,1 µg/l)*	-	-	-
Ib1b *(7 dni; 16,8 µg/l)*	-	-	-
Ib1c *(7 dni; 1 mg/l)*	+	-	-
Ib2a *(28 dni; 0,1 µg/l)*	+	+	-
Ib2b *(28 dni; 16,8 µg/l)*	+	+	-
Ib2c *(28 dni; 1 mg/l)*	+	+	-

25:7036173745

Tabela 5. Wpływ ibuprofenu na aktywację apoptozy w wybranych strukturach *Pam. experimentalis.*

	Zwiększony poziom fragmentacji DNA jest związany z apoptozą		
	Jelito środkowe	Ciałka spichrzowe	Jajnik
Ib1a *(7 dni; 0,1 µg/l)*	-	-	-
Ib1b *(7 dni; 16,8 µg/l)*	-	-	-
Ib1c *(7 dni; 1 mg/l)*	-	-	-
Ib2a *(28 dni; 0,1 µg/l)*	+	-	-
Ib2b *(28 dni; 16,8 µg/l)*	+	-	-
Ib2c *(28 dni; 1 mg/l)*	+	-	-

Tabela 6. Wpływ ibuprofenu na poziom stresu oksydacyjnego w wybranych strukturach *Pam. experimentalis.*

	Zwiększony poziom stresu oksydacyjnego		
	Jelito środkowe	Ciałka spichrzowe	Jajnik
Ib1a *(7 dni; 0,1 µg/l)*	-	-	-
Ib1b *(7 dni; 16,8 µg/l)*	-	-	-
Ib1c *(7 dni; 1 mg/l)*	+	+	+
Ib2a *(28 dni; 0,1 µg/l)*	+	_	+
Ib2b *(28 dni; 16,8 µg/l)*	+	+	+
Ib2c *(28 dni; 1 mg/l)*	+	+	+

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., & Poprawa, I. (2024b). Investigation of potential effects of ibuprofen on the storage cells and anhydrobiosis capacity of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Diversity, 16*(3), 132. https://doi.org/10.3390/d16030132

Ciałka spichrzowe występują zarówno swobodnie w płynie wypełniającym jamę ciała, jak i przytwierdzone do błon podstawnych narządów wewnętrznych. Zgromadzone w nich

26:15814479924

materiały zapasowe, takie jak lipidy, białka oraz węglowodany, stanowią rezerwę umożliwiającą przetrwanie okresów niedoboru pożywienia, stresu fizjologicznego lub występowania niekorzystnych warunków środowiskowych. Ponadto pełnią funkcję rezerwuaru energii, niezbędnego dla organizmu podczas przechodzenia w stan kryptobiozy. Nagromadzone substancje zapasowe umożliwiają także wznowienie aktywności metabolicznej po ustąpieniu niekorzystnych czynników środowiskowych i powrocie do aktywnego trybu życia (Szymańska, 1994; Czerneková i in., 2018).

Analiza zdolności osobników do powrotu ze stanu anhydrobiozy do aktywnego życia nie wykazała istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi a kontrolnymi, co może sugerować, że ciałka spichrzowe *Pam. experimentalis* mogą zachowywać swoją funkcję w dostarczaniu energii niezbędnej do przejścia z anhydrobiozy do stanu aktywnego, mimo ekspozycji na ibuprofen w badanych stężeniach i czasach inkubacji. Uzyskane wyniki negatywnie weryfikują hipotezę **H3.** Przypuszcza się, że ciałka spichrzowe pełnią funkcje wykraczające poza magazynowanie substancji zapasowych. Mogą uczestniczyć w syntezie metabolitów ochronnych, które zabezpieczają pozostałe tkanki przed uszkodzeniami wywołanymi odwodnieniem. Jednocześnie wyniki badań wskazują, że poszczególne gatunki niesporczaków mogą stosować odmienne strategie gospodarowania zasobami energetycznymi podczas anhydrobiozy, co sugeruje, że funkcja ciałek spichrzowych oraz mechanizmy warunkujące tolerancję na odwodnienie mogą różnić się między gatunkami (Reuner i in., 2010).

Aby scharakteryzować zmiany ultrastrukturalne zachodzące w komórkach spichrzowych, przeprowadzono analizy z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Po ekspozycji na ibuprofen trwającej 7 dni nie stwierdzono zmian ultrastrukturalnych w ciałkach spichrzowych niesporczaków, niezależnie od zastosowanego stężenia. Po 28 dniach ekspozycji zaobserwowano natomiast obecność struktur autofagicznych w cytoplazmie ciałek spichrzowych (Tabela 4). Wyniki te potwierdzono również za pomocą barwienia LysoTracker Red. Ciałka spichrzowe *Pam. experimentalis* wykazują zmiany ultrastrukturalne (degenerację mitochondriów oraz poszerzenie cystern szorstkiej siateczki śródplazmatycznej) pod wpływem ibuprofenu (Tabele 3, 7). Potwierdza to hipotezy **H4** i **H5.** Uzyskane wyniki sugerują, że ciałka spichrzowe początkowo wykazują odporność na ibuprofen, a po dłuższym działaniu występuje u nich reakcja

27:1294440793

na stresor. Ciałka spichrzowe nie są pierwszymi komórkami reagującymi na działanie ibuprofenu, gdyż szybszą odpowiedź wykazują komórki trawienne, które jako pierwsze mają kontakt ze stresorem. Przypuszcza się, że mogą one reagować w momencie przekroczenia zdolności adaptacyjnych organizmu do neutralizacji stresu wywołanego obecnością ibuprofenu.

W celu oceny fragmentacji DNA, będącej jednym z charakterystycznych markerów procesu apoptozy, zastosowano metodę TUNEL. Brak zwiększonej fragmentacji DNA w żadnej z badanych grup, niezależnie od zastosowanego stężenia ibuprofenu oraz czasu ekspozycji, sugeruje, że zmiany w ciałkach spichrzowych nie prowadzą bezpośrednio do apoptozy (Tabela 5). W odniesieniu do ciałek spichrzowych hipoteza **H_6** została zweryfikowana negatywnie. Wskazuje to na fakt, że pomimo występowania zmian na poziomie ultrastrukturalnym komórki zachowują zdolność do przetrwania oraz potencjalnej regeneracji.

W celu oceny poziomu reaktywnych form tlenu zastosowano barwienie DHE. Zwiększony poziom stresu oksydacyjnego (Tabela 6) w ciałkach spichrzowych w grupach Ib1c, Ib2b oraz Ib2c może wynikać zarówno z uszkodzenia mitochondriów, jak i z zaburzenia mechanizmów antyoksydacyjnych komórki. Uzyskany wynik potwierdza hipotezę **H_7.** Należy podkreślić, że ROS nie zawsze pełnią wyłącznie funkcję szkodliwą, ponieważ mogą uczestniczyć również w regulacji szlaków, odpowiedzi na stres oraz kontroli procesów metabolicznych. Dopiero nadmierna akumulacja ROS prowadzi do tzw. stresu oksydacyjnego, który może powodować uszkodzenia struktur komórkowych. Stres oksydacyjny to stan, w którym dochodzi do zaburzenia równowagi między produkcją reaktywnych form tlenu a zdolnością organizmu do ich neutralizacji. Gdy powstaje ich zbyt dużo lub mechanizmy obronne są niewystarczające, może dojść do uszkodzenia lipidów, białek i DNA (Sies & Jones, 2020; Juan i in., 2021; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2021).

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2026). How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*? *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlag098. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlag098

28:1399050304

U niesporczaków z gromady Eutardigrada jajnik jest połączony ze ścianą ciała za pomocą filamentu i przechodzi w pojedynczy jajowód uchodzący do kloaki. Jajnik niesporczaków ma budowę meroistyczną, co oznacza, że w trakcie oogenezy powstają zespoły komórek płciowych, a w każdym zespole jedna lub kilka komórek różnicuje się w oocyt, a pozostałe przekształcają się w trofocyty (Poprawa & Janelt, 2019). U *Pam. experimentalis*, podobnie jak u innych przedstawicieli Parachela, z każdego zespołu komórek płciowych różnicuje się jeden oocyt (Poprawa i in., 2015a, 2015b, 2015c; Janelt i in., 2019, 2020; Jezierska i in., 2021).

Badania przyżyciowe wykazały, że ibuprofen w zastosowanych stężeniach oraz przy analizowanych czasach inkubacji nie wywiera istotnego wpływu na przeżywalność badanego gatunku ani na podstawowe funkcje rozrodcze, takie jak produkcja oocytów i owipozycja. Nie potwierdza to hipotez **H_1** oraz **H_2.** Nie można jednak wykluczyć, że dłuższy czas ekspozycji, zastosowanie wyższych stężeń ibuprofenu lub mieszaniny farmaceutyków mogłyby prowadzić do efektów, które nie zostały zaobserwowane w warunkach przeprowadzonego eksperymentu.

W celu analizy ultrastruktury komórek po inkubacji w ibuprofenie wykonano badania z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Jajniki *Pam. experimentalis* wykazują zmiany ultrastrukturalne (utrata grzebieni mitochondrialnych spowodowana uszkodzeniem błony wewnętrznej; poszerzenie cystern szorstkiej siateczki śródplazmatycznej) pod wpływem ibuprofenu, a ich nasilenie zależy od stężenia substancji oraz czasu ekspozycji (Tabele 3, 7). Potwierdza to hipotezę **H_4.** Mitochondria oraz szorstka siateczka śródplazmatyczna są organellami wysoko wrażliwymi na działanie stresora, co wynika z ich dużej aktywności metabolicznej. Mitochondria odpowiadają za produkcję energii w procesie fosforylacji oksydacyjnej, a także za regulację poziomu reaktywnych form tlenu. Mitochondria pełnią też istotną rolę w regulacji śmierci komórki, a ich uszkodzenie może prowadzić do zaburzenia produkcji energii, utraty integralności błon mitochondrialnych oraz uwolnienia czynników proapoptotycznych, co w konsekwencji może inicjować proces śmierci komórkowej (Łabędzka i in., 2006). Wcześniejsze badania wskazują, że niektóre NLPZ mogą indukować nasilenie przepuszczalności błon mitochondrialnych, co prowadzi do zaburzenia homeostazy tych organelli, ich obrzęku oraz utraty ich integralności (Lal i in., 2009).

29:5477691176

Zmiany w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej mogą wskazywać na jej intensywną aktywność związaną z nasileniem syntezy białek w odpowiedzi na uszkodzenia komórkowe. Poszerzenie cystern szorstkiej siateczki śródplazmatycznej wskazuje na zaburzenie homeostazy tego organellum oraz na nagromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek. Tego typu zmiany ultrastrukturalne są często związane z aktywacją odpowiedzi UPR (zmniejszenie produkcji nowych białek, zwiększenie syntezy chaperonów, które pomagają prawidłowo fałdować białka, usuwanie uszkodzonych białek), której celem jest przywrócenie prawidłowego funkcjonowania siateczki śródplazmatycznej (Ron & Walter, 2007; Elgendy i in., 2024). Przy silnym lub długotrwałym stresie mechanizm ten może zostać przełączony na sygnał prowadzący do apoptozy (Malhotra & Kaufman, 2007). Wcześniejsze badania wykazały, że NLPZ mogą prowadzić do aktywacji odpowiedzi UPR, a nawet do śmierci komórkowej (Tsutsumi i in., 2004).

Analizy z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej obejmowały zastosowanie barwień: TUNEL w celu oceny apoptozy, LysoTracker Red do detekcji struktur kwaśnych oraz DHE do oceny poziomu reaktywnych form tlenu. W komórkach jajnika zaobserwowano zwiększony poziom stresu oksydacyjnego (Tabela 6). Potwierdza to hipotezę **H**$_7$. Jednak nie stwierdzono nasilenia procesu autofagii ani apoptozy (Tabele 4, 5). W odniesieniu do jajnika hipotezy **H**$_5$ i **H**$_6$ zostały zweryfikowane negatywnie. Wskazuje to, że ekspozycja na ibuprofen wywoływała niekorzystne zmiany w badanej strukturze, jednak nie prowadziła do aktywacji mechanizmów odpowiedzialnych za degradację uszkodzonych elementów komórkowych ani do indukcji programowanej śmierci komórki.

Komórki ściany jajnika wykazują największą podatność na zmiany pod wpływem badanego czynnika. Ściana jajnika może pełnić funkcję bariery ochronnej, ograniczając wpływ ibuprofenu na komórki linii płciowej. Oocyty, oogonia i trofocyty mogą być chronione wielopoziomowo. Komórki ściany jajnika niesporczaków pełnią przede wszystkim funkcję ochronną oraz uczestniczą w tworzeniu osłon jajowych (Poprawa, 2005b, 2011; Poprawa i in., 2015b, 2015c; Poprawa & Janelt, 2019; Jezierska i in., 2021; Treffkorn i in., 2022; Guidetti, 2025). Ich udział w innych procesach związanych z ochroną rozwijających się oocytów pozostaje przedmiotem dalszych badań.

30:3134638213

Tabela 7. Wpływ ibuprofenu na zmiany zachodzące w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej w wybranych strukturach *Pam. experimentalis.*

	Poszerzenie cystern szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (RER)		
	Jelito środkowe	Ciałka spichrzowe	Jajnik
Ib1a *(7 dni; 0,1 µg/l)*	-	-	-
Ib1b *(7 dni; 16,8 µg/l)*	-	-	-
Ib1c *(7 dni; 1 mg/l)*	-	-	+
Ib2a *(28 dni; 0,1 µg/l)*	-	-	-
Ib2b *(28 dni; 16,8 µg/l)*	-	-	-
Ib2c *(28 dni; 1 mg/l)*	-	+	+

W ramach projektu doktorskiego planowano również zbadanie wpływu ibuprofenu na gonadę męską i poddanie jej takim samym analizom jak jajnik, jelito środkowe i ciałka spichrzowe, jednak nie udało się tego zrealizować z powodu małej liczby samców w hodowli w momencie przeprowadzania analiz. W konsekwencji dokonano analizy tylko części grup eksperymentalnych, co uniemożliwiało przedstawienie pełnych wyników oraz wyciągnięcie wniosków.

5. Wnioski

Po przeprowadzeniu powyższych analiz wyciągnięto wnioski:

1) Hipotezy **H**$_1$, **H**$_2$ oraz **H**$_3$ zostały zweryfikowane negatywnie. W badanych stężeniach ibuprofenu oraz przy zastosowanych czasach inkubacji nie zaobserwowano istotnego wpływu stresora na zwiększenie śmiertelności, ograniczenie rozrodczości badanego gatunku ani na zmniejszenie jego zdolności do anhydrobiozy.
2) Pozytywnie zweryfikowano hipotezę **H**$_4$. W części badanych struktur oraz grup eksperymentalnych zaobserwowano zmiany w strukturze organelli komórkowych, obejmujące utratę grzebieni mitochondrialnych wynikającą

31:2550647733

z uszkodzenia błony wewnętrznej mitochondriów oraz poszerzenie cystern szorstkiej siateczki śródplazmatycznej.

3) Pozytywnie zweryfikowano hipotezy **H**$_5$, **H**$_6$ i **H**$_7$. W części badanych struktur oraz grup eksperymentalnych zaobserwowano aktywację procesów autofagii oraz wzrost stresu oksydacyjnego w komórkach narządów. W przypadku niewystarczającej skuteczności mechanizmów naprawczych dochodziło do indukcji procesów prowadzących do śmierci komórkowej, będącej konsekwencją postępujących uszkodzeń komórki.
4) Odpowiedź komórek jest dodatnio skorelowana ze stężeniem farmaceutyku oraz czasem ekspozycji: początkowo obserwuje się zmiany w ultrastrukturze organelli (mitochondrium, RER), wzrost stresu oksydacyjnego oraz aktywację autofagii, natomiast przy dłuższym działaniu stresora i jego wyższym stężeniu mogą pojawiać się uszkodzenia DNA oraz aktywacja apoptozy.
5) Poszczególne typy komórek badanego gatunku różniły się wrażliwością na działanie ibuprofenu. Różnice te mogą wynikać z odmiennej budowy i funkcji poszczególnych typów komórek.

Wyniki nasuwają również kolejne pytania, m.in. czy podobne zmiany ultrastrukturalne występowałyby także w innych strukturach tego gatunku, np. w męskich gonadach, czy mieszaniny związków mogłyby wywoływać silniejsze efekty lub czy samice i samce mogą wykazywać różną odporność na działanie ibuprofenu?

6. Literatura

1. Aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment - global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry, 35*(4), 823-835. https://doi.org/10.1002/etc.3339
2. Batucan, N. S. P., Tremblay, L. A., Northcott, G. L., & Matthaei, C. D. (2022). Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environmental Advances*, *7*, 100164. https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100164
3. Belhadj Slimen, I., Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M., & Abdrabbah, M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage: A review. *International Journal of Hyperthermia, 30*(7), 513-523. https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446
4. Bushra, R., & Aslam, N. (2010). An overview of clinical pharmacology of ibuprofen. *Oman Medical Journal*, *25*(3), 155-161. https://doi.org/10.5001/omj.2010.49

32:9319571033

5. Crowe, J. H., & Madin, K. A. (1974). Anhydrobiosis in tardigrades and nematodes. *Transactions of the American Microscopical Society*, *93*(4), 513-524. https://doi.org/10.2307/3225155
6. Czerneková, M., Janelt, K., Student, S., Jönsson, K. I., & Poprawa, I. (2018). A comparative ultrastructure study of storage cells in the eutardigrade *Richtersius coronifer* in the hydrated state and after desiccation and heating stress. *PLOS ONE*, *13*(8), e0201430. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201430
7. Degma, P., & Guidetti, R. (2026). *Actual checklist of Tardigrada species [45th Edition].* https://doi.org/10.5281/zenodo.20746849
8. Deo, R. P. (2014). Pharmaceuticals in the surface water of the USA: A review. *Current Environmental Health Reports*, *1*, 113-122. https://doi.org/10.1007/s40572-014-0015-y
9. Drosopoulou, K., Kosheleva, R. I., Ofrydopoulou, A., Tsoupras, A., & Mitropoulos, A. (2025). Topical and transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for inflammation and pain: Current trends and future directions in delivery systems. *Processes*, *13*(3), 907. https://doi.org/10.3390/pr13030907
10. Duchen, M. R. (2004). Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine*, *25*(4), 365-451. https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.03.001
11. Elgendy, M., Tamada, H., Taira, T., Iio, Y., Kawamura, A., Kunogi, A., Mizutani, Y., & Kiyama, H. (2024). Dynamic changes in endoplasmic reticulum morphology and its contact with the plasma membrane in motor neurons in response to nerve injury. *Cell and Tissue Research, 396*, 71-84. https://doi.org/10.1007/s00441-024-03858-x
12. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology, 35*(4), 495-516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337
13. Finney, D. J. (1952). *Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge University Press.
14. Greven, H. (1976). Some ultrastructural observations on the midgut epithelium of *Isohypsibius augusti* (Murray, 1907) (Eutardigrada). *Cell and Tissue Research*, *166*(3), 339-351. https://doi.org/10.1007/BF00220130
15. Guidetti, R. (2025). Evolution of egg deposition strategies, exaptations of exuvia, and thanatochresis in tardigrades. *Organisms Diversity & Evolution*, *25*, 3-12. https://doi.org/10.1007/s13127-024-00642-1
16. Hengherr, S., Brümmer, F., & Schill, R. O. (2008). Anhydrobiosis in tardigrades and its effects on longevity traits. *Journal of Zoology*, *275*(3), 216-220. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00427.x
17. Hong, X., Zhao, G., Zhou, Y., Chen, R., Li, J., & Zha, J. (2021). Risks to aquatic environments posed by 14 pharmaceuticals as illustrated by their effects on zebrafish behaviour. *Science of the Total Environment*, *771*, 145450. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145450
18. Hong, M. T., Lee, G., & Chang, Y. T. (2025). A non-invasive, label-free method for examining tardigrade anatomy using holotomography. *Tomography*, *11*(3), 34. https://doi.org/10.3390/tomography11030034

33:1081783339

19. 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. *Zoological Journal of the Linnean Society*, *178*(4), 897-906. https://doi.org/10.1111/zoj.12467
20. Janelt, K., Jezierska, M., & Poprawa, I. (2019). The female reproductive system and oogenesis in *Thulinius ruffoi* (Tardigrada, Eutardigrada, Isohypsibiidae). *Arthropod Structure & Development, 50*, 53-63. https://doi.org/10.1016/j.asd.2019.04.003
21. Janelt, K., Jezierska, M., Student, S., & Poprawa, I. (2020). Structure of the germarium and female germ-cell clusters in *Thulinius ruffoi* (Bertolani, 1982) (Tardigrada: Eutardigrada: Parachela). *Zoological Journal of the Linnean Society, 188*(3), 776-787. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz108
22. Jezierska, M., Miernik, A., Sojka, J., Student, S., Śliwińska, M. A., Gross, V., & Poprawa, I. (2021). Oogenesis in the tardigrade *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek, & Michalczyk, 2018 (Eutardigrada, Hypsibiidae). *Micron*, *150*, 103126. https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103126
23. Jönsson, K. I., & Rebecchi, L. (2002). Experimentally induced anhydrobiosis in the tardigrade *Richtersius coronifer*: Phenotypic factors affecting survival. *Journal of Experimental Zoology*, *293*(6), 578-584. https://doi.org/10.1002/jez.10186
24. Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(9), 4642. https://doi.org/10.3390/ijms22094642
25. Kaczmarek, Ł., Roszkowska, M., Fontaneto, D., Jezierska, M., Pietrzak, B., Wieczorek, R., Poprawa, I., Kosicki, J. Z., Karachitos, A., & Kmita, H. (2019). Staying young and fit? Ontogenetic and phylogenetic consequences of animal anhydrobiosis. *Journal of Zoology, 309*(1), 1-11. https://doi.org/10.1111/jzo.12677
26. Kaczmarek, Ł., Roszkowska, M., Poprawa, I., Janelt, K., Kmita, H., Gawlak, M., Fiałkowska, E., & Mioduchowska, M. (2020). Integrative description of bisexual *Paramacrobiotus experimentalis* sp. nov. (Macrobiotidae) from republic of Madagascar (Africa) with microbiome analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 145*, 106730. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106730
27. Krakowiak, M., Bartylak, T., Kmita, H., Kaczmarek, Ł., & Nawrot, R. (2024). Tardigrade proteins: Molecular tools in the phenomenon of anhydrobiosis. *Zoological Journal of the Linnean Society, 200*(1), 269-281. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad066
28. Lal, N., Kumar, J., Erdahl, W. E., Pfeiffer, D. R., Gadd, M. E., Graff, G., & Yanni, J. M. (2009). Differential effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on mitochondrial dysfunction during oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 490*(1), 1-8. https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.07.005
29. Larsson, D. G. J. (2014). Pollution from drug manufacturing: Review and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1656), 20130571. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0571

34:3156660518

30. Łabędzka, K., Grzanka, A., & Izdebska, M. (2006). Mitochondrium a śmierć komórki. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)*, *60*, 439-446.
31. Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *18*(6), 716-731. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.09.003
32. Mathias, F. T., Fockink, D. H., Disner, G. R., Prodocimo, V., Ribas, J. L. C., Ramos, L. P., Cestari, M. M., & de Assis, H. C. S. (2018). Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *59*, 105-113. https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.008
33. Mayer, G., Martin, C., Rüdiger, J., Kauschke, S., Stevenson, P. A., Poprawa, I., Honberg, K., Schill, R. O., Pflüger, H.-J., & Schlegel, M. (2013). Selective neuronal staining in tardigrades and onychophorans provides insights into the evolution of segmental ganglia in panarthropods. *BMC Evolutionary Biology*, *13*, 230. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-230
34. Mazaleuskaya, L. L., Theken, K. N., Gong, L., Thorn, C. F., FitzGerald, G. A., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2015). PharmGKB summary: Ibuprofen pathways. *Pharmacogenetics and genomics*, *25*(2), 96-106. https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000113
35. McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More than just a powerhouse. *Current Biology*, *16*(14), R551-R560. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054
36. Miernik, A., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2024a). Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen? *The European Zoological Journal*, *91*(1), 631-648. https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2355313
37. Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., & Poprawa, I. (2024b). Investigation of potential effects of ibuprofen on the storage cells and anhydrobiosis capacity of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Diversity*, *16*(3), 132. https://doi.org/10.3390/d16030132
38. Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2026). How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*? *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlag098. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlag098
39. Møbjerg, N., Halberg, K. A., Jørgensen, A., Persson, D., Bjørn, M., Ramløv, H., & Kristensen, R. M. (2011). Survival in extreme environments - on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiologica*, *202*(3), 409-420. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02252.x
40. Mrowiec, B. (2015). Farmaceutyki - zagrożenie środowiska wodnego. *Edukacja Biologiczna i Środowiskowa*, (4), 25-33.
41. Nelson, D., Guidetti, R., & Rebecchi, L. (2015). Phylum Tardigrada. In J. H. Thorp & D. C. Rogers (Eds.), *Thorp and Covich's freshwater invertebrates: Ecology and general biology* (4th ed., pp. 347-380). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00017-6

35:3865596366

42. Nelson, D. R., Bartels, P. J., & Guil, N. (2018). Tardigrade ecology. In R. O. Schill (Ed.), *Water bears: The biology of tardigrades* (pp. 163-210). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_7
43. Ortúzar, M., Esterhuizen, M., Olicón-Hernández, D. R., González-López, J., & Aranda, E. (2022). Pharmaceutical pollution in aquatic environments: A concise review of environmental impacts and bioremediation systems. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 869332. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.869332
44. Parolini, M. (2020). Toxicity of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Science of the Total Environment*, *740*, 140043. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140043
45. Pascoe, D., Karntanut, W., & Müller, C. T. (2003). Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, *51*(6), 521-528. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00860-3
46. Picard, M., Shirihai, O. S., Gentil, B. J., & Burelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: Implications for retrograde signaling? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 304*(6), R393-R406. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00584.2012
47. Poprawa, I. (2005a). The ovary structure, previtellogenic and vitellogenic stages in parthenogenetic species *Dactylobiotus dispar* (Murray, 1907) (Tardigrada: Eutardigrada). *Tissue and Cell*, *37*(5), 385-392. https://doi.org/10.1016/j.tice.2005.06.003
48. Poprawa, I. (2005b). The structure and the formation of egg shells in the parthenogenetic species *Dactylobiotus dispar* Murray, 1907 (Tardigrada: Eutardigrada). *Folia Biologica (Kraków), 53*(3-4), 173-177. https://doi.org/10.3409/173491605775142828
49. Poprawa, I. (2006). Ultrastructural changes of the storage cells during oogenesis in *Dactylobiotus dispar* (Murray, 1907) (Tardigrada: Eutardigrada). *Zoologica Poloniae, 51*, 13-18
50. Poprawa, I. (2011). Ultrastructural studies of the formation of the egg capsule in the hermaphroditic species *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Eutardigrada: Hypsibiidae). *Zoological Science, 28*(1), 37-40. https://doi.org/10.2108/zsj.28.37
51. Poprawa, I., Hyra, M., Kszuk-Jendrysik, M., & Rost-Roszkowska, M. M. (2015a). Ultrastructural changes and programmed cell death of trophocytes in the gonad of *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Tardigrada, Eutardigrada, Isohypsibiidae). *Micron*, *70*, 26-33. https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.11.008
52. Poprawa, I., Hyra, M., & Rost-Roszkowska, M. M. (2015b). Germ cell cluster organization and oogenesis in the tardigrade *Dactylobiotus parthenogeneticus* Bertolani, 1982 (Eutardigrada, Murrayidae). *Protoplasma*, *252*(4), 1019-1029. https://doi.org/10.1007/s00709-014-0737-6
53. Poprawa, I., Schlechte-Wełnicz, W., & Hyra, M. (2015c). Ovary organization and oogenesis in the tardigrade *Macrobiotus polonicus* Pilato, Kaczmarek, Michalczyk, & Lisi, 2003 (Eutardigrada, Macrobiotidae): Ultrastructural and histochemical analysis. *Protoplasma, 252*(3), 857-865. https://doi.org/10.1007/s00709-014-0725-x

36:2098695241

54. Poprawa, I., & Janelt, K. (2019). Reproduction, gonad structure, and oogenesis in tardigrades. In W. Tworzydlo & S. Bilinski (Eds.), *Evo-Devo: Non-model species in cell and developmental biology* (pp. 495-513). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23459-1_20
55. Poprawa, I., Matsko, Y., Urbisz, A., Wieczorkiewicz, F., Krakowska, A., Miernik, A., Fiałkowska, E., & Małota, K. (2026). Germ cell cluster organization and oogenesis in *Milnesium inceptum* Morek, Suzuki, Schill, Georgiev, Yankova, Marley, & Michalczyk, 2019 (Eutardigrada: Apochela). *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlag039. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlag039
56. Rainsford, K. D. (2009). Ibuprofen: Pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology*, *17*(6), 275-342. https://doi.org/10.1007/s10787-009-0016-x
57. Rastogi, A., Tiwari, M. K., & Ghangrekar, M. M. (2021). A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Journal of Environmental Management*, *300*, 113694. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113694
58. Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2021). Interactions between reactive oxygen species and autophagy: special issue: Death mechanisms in cellular homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1868*(8), 119041. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119041
59. Rell, K. (2011). Wybrane aspekty bezpieczeństwa leczenia NLPZ. *Pediatria i Medycyna Rodzinna*, *7*(1), 41-48.
60. Reuner, A., Hengherr, S., Brümmer, F., & Schill, R. O. (2010). Comparative studies on storage cells in tardigrades during starvation and anhydrobiosis. *Current Zoology*, *56*(2), 259-263. https://doi.org/10.1093/czoolo/56.2.259
61. Richaud, M., Le Goff, E., Cazevielle, C., Ono, F., Mori, Y., Saini, N. L., Cuq, P., Baghdiguian, S., Godefroy, N., & Galas, S. (2020). Ultrastructural analysis of the dehydrated tardigrade *Hypsibius exemplaris* unveils an anhydrobiotic-specific architecture. *Scientific Reports, 10*(1), 4324. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61165-1
62. Rodrigues, F., Durães, L., Simões, N. E. C., Pereira, A. M. P. T., Silva, L. J. G., & Feio, M. J. (2025). Pharmaceuticals in urban streams: A review of their detection and effects in the ecosystem. *Water Research*, *268*, 122657. https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122657
63. Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8*(7), 519-529. https://doi.org/10.1038/nrm2199
64. 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. *Canadian Journal of Zoology, 86*(10), 1179-1188. https://doi.org/10.1139/Z08-096
65. Rost-Roszkowska, M. M., Poprawa, I., Wójtowicz, M., & Kaczmarek, Ł. (2011). Ultrastructural changes of the midgut epithelium in *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Tardigrada: Eutardigrada) during oogenesis. *Protoplasma*, *248*(2), 405-414. https://doi.org/10.1007/s00709-010-0186-9

37:9052782027

66. Rost-Roszkowska, M. M., Janelt, K., & Poprawa, I. (2018). The role of autophagy in the midgut epithelium of Parachela (Tardigrada). *Zoomorphology*, *137*(4), 501-509. https://doi.org/10.1007/s00435-018-0407-x
67. Rost-Roszkowska, M., Janelt, K., & Poprawa, I. (2019). Fine structure of the midgut epithelium of *Thulinius ruffoi* (Tardigrada, Eutardigrada, Parachela) in relation to oogenesis and simplex stage. *Arthropod Structure & Development*, *49*, 128-136. https://doi.org/10.1016/j.asd.2018.12.002
68. Rost-Roszkowska, M., Janelt, K., & Poprawa, I. (2020). Ultrastructure of the midgut epithelium in three species of Macrobiotidae (Tardigrada: Eutardigrada: Parachela). *Zoological Journal of the Linnean Society*, *188*(3), 788-796. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz052
69. Rost-Roszkowska, M., Poprawa, I., Chajec, Ł., Chachulska-Żymełka, A., Wilczek, G., Wilczek, P., Tarnawska, M., Student, S., & Leśniewska, M. (2021). 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. https://doi.org/10.1080/24750263.2021.1912199
70. Roszkowska, M., Gołdyn, B., Wojciechowska, D., Kosicki, J. Z., Fiałkowska, E., Kmita, H., & Kaczmarek, Ł. (2021). Tolerance to anhydrobiotic conditions among two coexisting tardigrade species differing in life strategies. *Zoological Studies, 60*, e74. https://doi.org/10.6620/ZS.2021.60-74
71. Roszkowska, M., Gołdyn, B., Wojciechowska, D., Książkiewicz, Z., Fiałkowska, E., Pluskota, M., Kmita, H., & Kaczmarek, Ł. (2023). How long can tardigrades survive in the anhydrobiotic state? A search for tardigrade anhydrobiosis patterns. *PLOS ONE, 18*(1), e0270386. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270386
72. Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 21*(7), 363-383. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3
73. Suzuki, A. C. (2006). Ovarian structure in *Milnesium tardigradum* (Tardigrada, Milnesiidae) during early vitellogenesis. *Hydrobiologia, 558*(1), 61-66. https://doi.org/10.1007/s10750-005-1416-6
74. Szymańska, B. (1994). Interdependence between storage bodies and egg developmental stages in *Macrobiotus richtersi* Murray, 1911 (Tardigrada). *Acta Biologica Cracoviensia, 36*, 41-50.
75. Treffkorn, S., Mayer, G., & Janssen, R. (2022). Review of extra-embryonic tissues in the closest arthropod relatives, onychophorans and tardigrades. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 377*(1865), 20210270. https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0270
76. Tsutsumi, S., Gotoh, T., Tomisato, W., Mima, S., Hoshino, T., Hwang, H.-J., Tsuchiya, T., Mori, M., & Mizushima, T. (2004). Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation, 11*(9), 1009-1016. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401436

38:9731571416

77. Wełnicz, W., Grohme, M. A., Kaczmarek, Ł., Schill, R. O., & Frohme, M. (2011). Anhydrobiosis in tardigrades—the last decade. *Journal of Insect Physiology*, *57*(5), 577-583. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.019
78. Xu, X., Pang, Y., & Fan, X. (2025). Mitochondria in oxidative stress, inflammation and aging: From mechanisms to therapeutic advances. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *10*, 190. https://doi.org/10.1038/s41392-025-02253-4
79. Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(1), 9-14. https://doi.org/10.1038/nrm3028

39:1138480362

V. PRACE NAUKOWE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU STANOWIACEGO PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Miernik, A., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2024a). Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?. *The European Zoological Journal, 91*(1), 631-648. https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2355313

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., & Poprawa, I. (2024b). Investigation of potential effects of ibuprofen on the storage cells and anhydrobiosis capacity of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Diversity, 16*(3), 132. https://doi.org/10.3390/d16030132

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2026). How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*? *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlag098. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlag098

40:2160445726



The European Zoological Journal

ISSN: 2475-0263 (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/tizo21

Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?

A. Miernik, S. Student, E. Fiałkowska & I. Poprawa

To cite this article: A. Miernik, S. Student, E. Fiałkowska & I. Poprawa (2024) Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?, The European Zoological Journal, 91:1, 631-648, DOI: 10.1080/24750263.2024.2355313

To link to this article: https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2355313

© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

Published online: 05 Jun 2024.

Submit your article to this journal

Article views: 1195

View related articles

View Crossmark data

Citing articles: 7 View citing articles

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tizo21

The European Zoological Journal, 2024, 631–648
Vol. 91, No. 1, https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2355313

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Check for updates

Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?

A. MIERNIK [1,2]*, S. STUDENT [3,4], E. FIAŁKOWSKA [5], & I. POPRAWA [1]**

[1]*Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland,* [2]*Doctoral School, University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland,* [3]*Institute of Automatic Control, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland,* [4]*Biotechnology Center, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland, and* [5]*Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University, Kraków, Poland*

(Received 14 July 2023; accepted 9 May 2024)

Abstract
In recent years, the pollution of aquatic environments with pharmaceuticals, including non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), has increased. This research investigated the effects of 7- and 28-day exposure to ibuprofen on the midgut ultrastructure of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. The conducted research will enrich the knowledge on the effect of ibuprofen with histological analyses. In addition, the effect of ibuprofen has not been studied on tardigrades so far. Specimens were incubated in three concentrations of this drug: 0.1 µg/L (concentration commonly found in surface waters worldwide), 16.8 µg/L (concentration found in the rivers of large cities), and 1 mg/L (experimental concentration). In addition, the lethal concentration 50 (LC50) after 24 h incubation in ibuprofen was determined. Ultrastructural analyses showed the presence of degenerated mitochondria and autophagic structures in midgut digestive cells after incubation in ibuprofen, which was confirmed by LysoTracker Red staining. TUNEL staining showed DNA fragmentation – a marker of cell apoptosis – in digestive cells treated with ibuprofen. Furthermore, dihydroethidium (DHE) revealed signals emitted by ROS+ positive cells in midgut digestive cells, indicating oxidative stress. Ultrastructural changes and the number of signals indicating damage in the cell were correlated with increases in concentration and time of exposure to the stressor. The lack of ultrastructural changes in regenerative cells supports the theory that digestive cells of the midgut are one of the first barriers protecting the body against stressors.

Keywords: *Non-steroidal anti-inflammatory drugs*, *ibuprofen*, *tardigrades*, *midgut ultrastructure*, , *LC50*

1. Introduction

With rapid economic development, including such branches as medicine and pharmacy, the consumption of drugs (especially over-the-counter) has increased in recent years. This issue is linked to the broader problem of inappropriate drug disposal and ineffective removal methods targeting specific groups of pollutants in wastewater treatment plants (Fent et al. 2006; Szymonik & Lach 2012; Marchlewicz et al. 2015). As a result, pharmaceuticals can enter the aquatic environment as metabolites or in unchanged form. Among medicines in aquatic environments are non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), antibiotics, hormonal drugs, drugs regulating lipid metabolism, antiepileptic medications, and β-blockers (Fent et al. 2006; Nikolaou et al. 2007; Szymonik & Lach 2012). NSAIDs such as ibuprofen, acetylsalicylic acid, diclofenac, and naproxen are reported to be among the main classes of molecules contaminating aquatic ecosystems worldwide. They are commonly used for their analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory properties in

*Correspondence: A. Miernik, Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Bankowa 9, 40-007 Katowice, Poland. Email: aleksandra.miernik@us.edu.pl
**I. Poprawa, Email: izabela.poprawa@us.edu.pl

© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

42:4900718707

human and veterinary therapy (Boxall et al. 2012; Parolini 2020). Many of these substances are characterised by low susceptibility to degradation and a tendency to bioaccumulate, which exposes the organisms to prolonged, sometimes lifelong exposure (Harshkova & Aksmann 2019). The accumulation of pharmaceuticals, including ibuprofen, in water bodies raises concerns about their ecological impact and potential disruption of aquatic ecosystems.

One of the most popular over-the-counter NSAIDs is ibuprofen. It is used to treat acute and chronic pain as well as rheumatic diseases (Karaźniewicz 2007; Bushra & Aslam 2010; Rainsford 2013). It inhibits two cyclooxygenase enzymes involved in the synthesis of prostaglandins. They are involved in invertebrate functioning, e.g., ion flux regulation, temperature control, reproduction, cell aggregation, and host-parasite interactions (Stanley-Samuelson 1987; Bushra & Aslam 2010; Batucan et al. 2022).

Tardigrades (water bears) are microscopic invertebrates known for their resistance to various factors, such as low and high temperatures, lack of water, and radiation. They owe it to the process of cryptobiosis and, in some cases, to diapause, which help them to survive periods of unfavorable environmental conditions (Nelson et al. 2015). In their living environment, they are exposed to many chemical factors.

Therefore, this research aimed to analyze and describe the effects of short- and long-term exposure to ibuprofen on the ultrastructure of the midgut of *Paramacrobiotus experimentalis* Kaczmarek et al. 2020 (Tardigrada, Eutardigrada). It should be emphasized that most studies on the effects of ibuprofen focus on vertebrates, moreover, there are no data in the literature on the effect of this pharmaceutical on tardigrades. Most studies also focus on survival and reproduction, in this work we will focus on the less described ultrastructure of cells treated with ibuprofen. The use of multiple methods is justified by the need to obtain a comprehensive and detailed understanding of the biological responses and effects of ibuprofen exposure on the specimens of *Pam. experimentalis*. Each biomarker targets specific aspects of cellular and subcellular changes, providing a multidimensional view of the potential impacts of ibuprofen. The midgut (that the study focuses on), is the region responsible for digestion, secretion, and absorption. In tardigrades, it is composed of two types of cells: digestive and regenerative cells. The midgut is the first barrier against various stressors taken with food (Rost-Roszkowska et al. 2008, 2018; Nelson et al. 2015). The expected results are changes in the structure of organelles in the cells of the animal's body, activation of autophagy, which acts as a protective mechanism, triggering cell death processes and increasing oxidative stress. In conclusion, investigating the effects of ibuprofen on *Pam. experimentalis* serves an ecologically significant purpose by addressing the potential consequences of pharmaceutical contamination in aquatic ecosystems. By providing insights into the effect of ibuprofen on *Pam. experimentalis*, the study aids in understanding the broader ecological implications.

2. Material and methods

2.1. Material

Paramacrobiotus experimentalis (Tardigrada, Eutardigrada, Macrobiotidae) is a predatory, gonochoric species that lays ornamented eggs freely into the environment. The animal's body is transparent/white (Kaczmarek et al. 2020). Specimens were collected in 2013 from moss samples in eastern Madagascar (Toamasina and Antananarivo Province). The specimens for our study were obtained from Professor Łukasz Kaczmarek (Adam Mickiewicz University in Poznań, Poland). Animals were cultured in plastic Petri dishes with a matted bottom in a mixture of Żywiec Zdrój mineral water and distilled water (1:3) at a temperature of 19°C in a 12 h light–12 h dark cycle. They were fed with rotifers (*Lecane inermis*) originating from the culture collection of Aquatic Ecosystems Team of The Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University. Algae (*Chlorella* sp. and *Chlorococcum* sp.) were also added to the culture. The experiments in this study did not require an approval by an ethical committee.

2.2. Methods

2.2.1. Determination of LC_{50} of ibuprofen. In toxicological studies, LC_{50} (lethal concentration 50) is the concentration of a substance at which 50% of the studied population will die after a certain period. Specimens were transferred to a 12-well plate (6 individuals per well). The wells contained 3 ml of gradually increasing concentrations of ibuprofen solution in a culture medium within the range of 100–950 mg/L. Incubation in ibuprofen solutions lasted for 24 hours at a temperature of 19°C. After that time, the numbers of living and dead specimens were checked. Data were evaluated using the probit analysis statistical method (Finney 1952), as the standard method to evaluate dose–response data.

2.2.2. Experiment. Specimens were divided into ten groups – four control groups and six experimental groups (Table I). Each group consisted of 50 animals

43:1143975513

Table I. Control and experimental groups.

PeC	specimens cultured in the culture medium
PeC0	specimens cultured in the culture medium with the addition of 1 ml of ethanol per litre of medium
PeC7	specimens cultured 7 days in the culture medium with the addition of 1 ml of ethanol per litre of medium
PeC28	specimens cultured 28 days in the culture medium with the addition of 1 ml of ethanol per litre of medium
Ib1a	specimens cultured in a concentration of ibuprofen 0.1 µg/L for 7 days
Ib1b	specimens cultured in a concentration of ibuprofen 16.8 µg/L for 7 days
Ib1c	specimens cultured in a concentration of ibuprofen 1 mg/L for 7 days
Ib2a	specimens cultured in a concentration of ibuprofen 0.1 µg/L for 28 days
Ib2b	specimens cultured in a concentration of ibuprofen 16.8 µg/L for 28 days
Ib2c	specimens cultured in a concentration of ibuprofen 1 mg/L for 28 days

cultured in 12-well plates with a matted bottom. The control group PeC was cultured in a culture medium (see 2.1). The control groups PeC0, PeC7 and PeC28 were cultured in culture medium with the addition of 1 ml of ethanol per liter of medium (Table I). This was because, in the experimental groups, ibuprofen was dissolved in 1 ml of ethanol before being added to the medium (ibuprofen is more soluble in ethanol than in water). Such selected control groups made it possible to avoid changes caused by the presence of ethanol in the culture medium and those caused by the aging of the animals. The experimental groups consisted of specimens bred in 12-well plates containing culture medium with the addition of ibuprofen. In our research, three concentrations of ibuprofen were used: two environmental concentrations of 0.1 µg/L (Aus der Beek et al. 2016) and 16.8 µg/L (Mrowiec 2015), and a higher concentration of 1 mg/L. For each concentration, the experiment was carried out in two exposure times − 7 days and 28 days (Table I).

2.2.3. Light and transmission electron microscopy. Specimens of *Pam. experimentalis* (Table II) were fixed in 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for seven days at 4°C, washed three times in the same buffer at room temperature (RT, 30 min each) and postfixed in 2% osmium tetroxide in a 0.1 M phosphate buffer for 2 hours (RT). The remaining steps of the procedure were carried out at room temperature. Then the material was washed again in a phosphate buffer three times, 10 minutes each, and dehydrated in a graded series of ethanol (30, 50, 70, 90, 96 and 100% for 10 min, 2 × 10 min, 15 min, 15 min, 15 min and 4 × 15 min, respectively). After dehydration, the material was incubated in a solution of 100% ethanol and acetone (1:1) for 15 minutes, washed twice in acetone (10 min each), and then incubated in a solution of acetone and epoxy resin (1:1) for 1.5 hours in closed Eppendorf tubes. After that time, the Eppendorf tubes were opened and left overnight for the acetone to evaporate. The next day, specimens were embedded in epoxy resin (Epoxy Embedding Medium Kit, Sigma). Semi-thin (800 nm) sections were cut on a Leica UCT25 ultramicrotome, stained with 1% methylene blue in 1% borax and analysed with an Olympus B×60 light microscope. Ultra-thin sections (70 nm) were cut on a Leica EM UC7 ultramicrotome, mounted on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and then analysed in the Hitachi H500 transmission electron microscope at 75 kV.

Table II. The number of adult specimens of *Pam. experimentalis* for each method.

	Light and transmission electron microscopy	Confocal microscopy		
		TUNEL	LysoTracker Red	DHE
PeC	20	10	10	10
PeC0	20	10	10	10
PeC7	20	10	10	10
PeC28	20	10	10	10
Ib1a	20	10	10	10
Ib1b	20	10	10	10
Ib1c	20	10	10	10
Ib2a	20	10	10	10
Ib2b	20	10	10	10
Ib2c	20	10	10	10

2.2.4. Confocal microscopy.

2.2.4.1. TUNEL – detection of DNA fragmentation during apoptosis. Non-fixed specimens (Table II) were incubated on ice in a 0.1% solution of freshly prepared sodium citrate for 2 minutes. After that, they were washed in TBS (3 × 5 min) and stained with a TUNEL reaction mixture (In situ Cell Death Detection Kit TMR red, Roche Applied Science) for 1 hour at 37°C in darkness. After that period, the material was washed in TBS (3 × 5 min), next stained with 1 µg/ml DAPI in TBS (15 min, RT) in darkness, again washed in TBS (3 × 5 min) and mounted in Vectashield medium on a microscopic

44:1710924212

slide. Specimens were analysed using an Olympus FluoView FV 1000 confocal microscope.

2.2.4.2. LysoTracker Red – detection of acidic organelles. Non-fixed specimens (Table II) were incubated for 15 min in the dark in 2.5 mM LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, L 7528, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in TBS (pH 7.4, RT). After that, the material was washed with TBS and stained with 1 µg/ml DAPI in TBS for 15 minutes. Next, the specimens were washed in TBS (3 × 5 min) and mounted in Vectashield medium on a microscopic slide. Specimens were analysed using an Olympus FluoView FV 1000 confocal microscope.

2.2.4.3. Dihydroethidium (DHE) analysing superoxide levels (differentiation of ROS+ and ROS− cells). Non-fixed specimens (Table II) were incubated TBS with 0.0025% Triton X100 (RT). Next they were stained with 30 µM DHE prepared from the 30 mM stock solution of DHE in DMSO (15 min, RT, in darkness). After that, the material was washed in TBS (3 × 5 min) and stained with 1 µg/ml DAPI in TBS (15 min, RT) in darkness. Next, the specimens were washed in TBS (3 × 5 min) and mounted in Vectashield medium on a microscopic slide. Specimens were analysed using an Olympus FluoView FV 1000 confocal microscope.

3. Results

3.1. LC_{50} of ibuprofen

The LC_{50} of ibuprofen for *Pam. experimentalis* was computed based on probit analysis for 24 h exposure, and is 281.6 mg/L. The LC values are derived from the curve drawn using working probits and log doses (Figure 1). The LC_{25}, LC_{70}, and LC_{95} values are collected in the table, as well as the 95% fiducial confidence interval (lower and upper limits), for all mentioned concentrations (Table III).

3.2. *Ultrastructural changes in the midgut of* Pam. experimentalis *exposed to ibuprofen*

3.2.1. Control groups (PeC, PeC0, PeC7, PeC28). Ultrastructural analysis of the control groups cultured in the medium containing ethanol (PeC0, PeC7, PeC28) and without ethanol (PeC) showed no differences. Differences due to ageing were also not observed in the control groups (PeC0, PeC7, PeC28). Therefore, all control groups will be described together. The digestive system of tardigrades was composed of three parts: foregut, midgut and hindgut (Figure 2a). The midgut of *Pam. experimentalis* had a tube-like shape and spread along the entire length of the middle region of the body (Figure 2a). Its surface was strongly folded. The midgut epithelium was composed of two types of cells – digestive and regenerative. Regenerative cells were gathered at the ends of the midgut and formed two epithelial rings – anterior and posterior (Figure 2a).

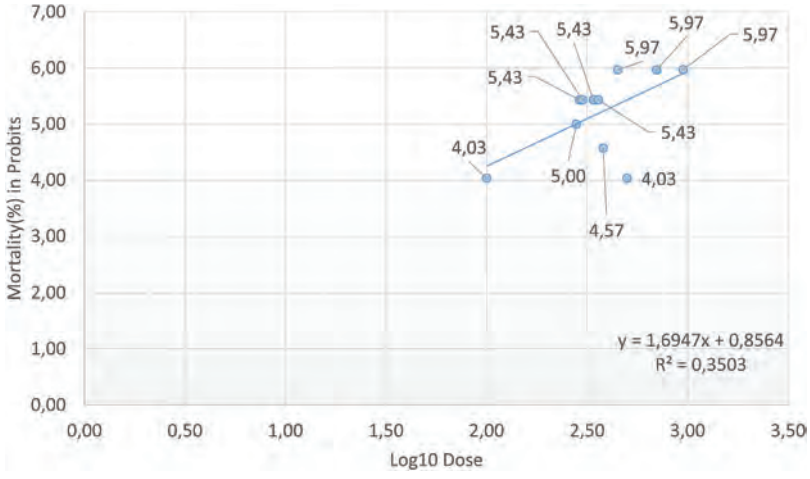


Figure 1. Calculation of LC_{50} of ibuprofen for *Pam. experimentalis* using Probit Analysis.

45:1027897802

Table III. Probit analysis of 95% confidence limits for effective concentrations of ibuprofen in *Pam. experimentalis*.

LC (%)	LC mg/L	95% fiducial confidence interval	
		Lower	Upper
LC_{25}	110,527	90,185	135,459
LC_{50}	281,607	229,776	345,128
LC_{75}	717,489	585,433	879,331
LC_{95}	2755,247	2248,138	3376,743

They had a crescent-like shape, and they lay on the thin non-cellular basal lamina. The apical parts of these cells did not reach the midgut lumen. The cytoplasm of these cells was poor in organelles. They had a large centrally located nucleus with a nucleolus, mitochondria with clearly visible cristae, short cisterns of rough endoplasmic reticulum and ribosomes (Figure 2b). Cubic-shaped digestive cells also lay on the thin non-cellular basal lamina (Figures 2c–e). The

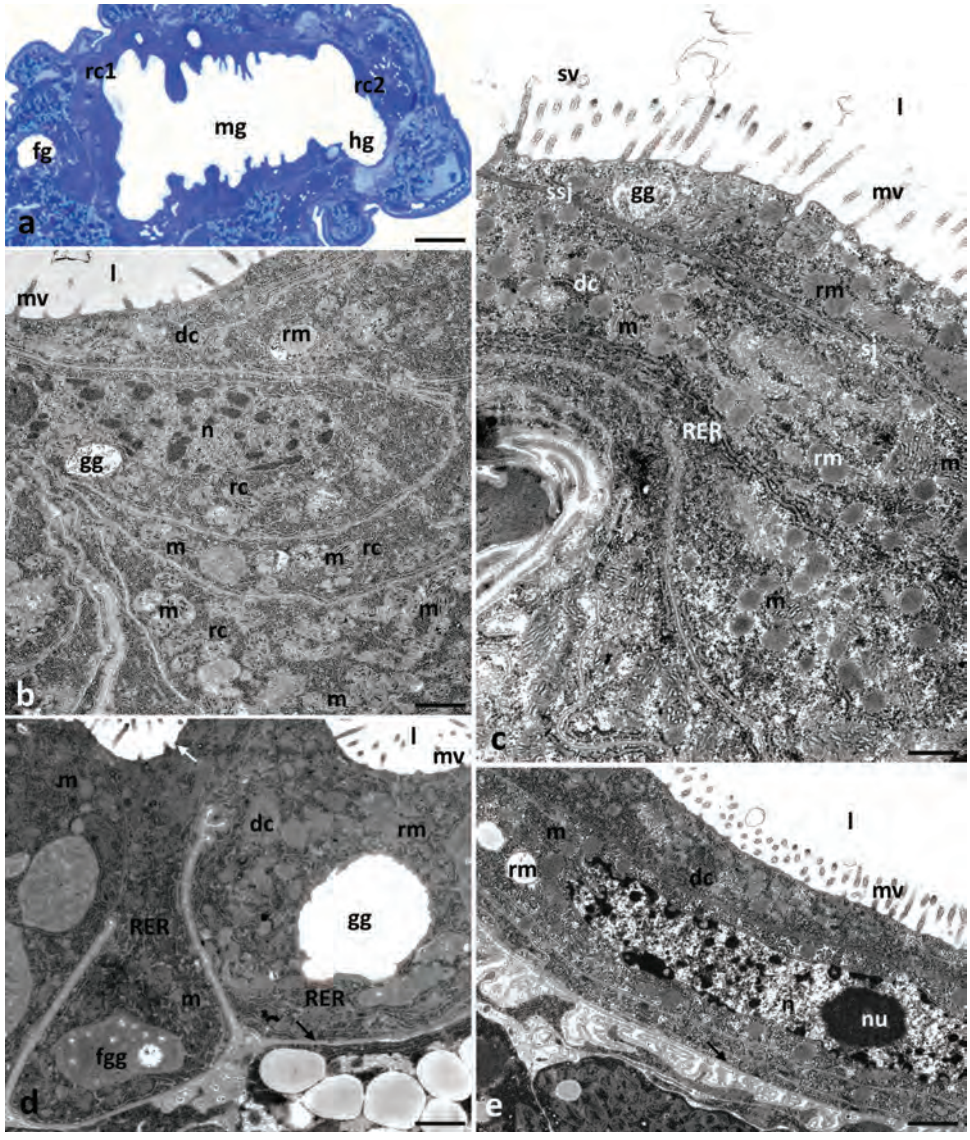


Figure 2. Midgut of *Pam. experimentalis* in control groups – PeC, PeC0. PeC7, PeC28. (a) Localization of the midgut in animal body, LM, bar = 14.29 μm. (b) the ultrastructure of the midgut regenerative cells in the control group TEM, bar = 0.24 μm. (c-e) the ultrastructure of the midgut digestive cells in the control groups TEM (c) bar = 0.52 μm. (d) bar = 0.10 μm. (e) bar = 0.43 μm. Abbreviations: foregut (fg), midgut (mg), hindgut (hg), anterior epithelial rings (rc1), posterior epithelial rings (rc2), regenerative cells (rc), digestive cells (dc), mitochondrion (m), nucleus (n), nucleolus (nu), rough endoplasmic reticulum (RER), reserve material (rm), midgut lumen (l), microvilli (mv), gut granule (gg), forming gut granule (fgg), basal lamina (black arrow), merocrine secretion (white arrow), microapocrine secretion - secretory vesicle; (sv) septate junctions (sj), smooth septate junctions (ssj).

46:1023170443

apical cell membrane of these cells formed microvilli and invaginations into the midgut lumen (Figures 2a–e). Secretory vesicles were observed near the apical membrane of the cells. Fusion of the vesicle membrane with the apical membrane of the digestive cell was observed, indicating merocrine secretion (Figures 2c,d). Moreover, small vesicles with an electron-lucent content were observed at the apical ends of the microvilli, indicating microapocrine secretion (Figure 2c). The nucleus of digestive cells was shifted near the basal membrane. Organelles and cell structures in digestive cells showed no regionalisation in distribution. Numerous mitochondria with distinct cristae, ribosomes, cisterns of rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes, spheres of medium electron density reserve material and granules with a crystalline structure were present in the cell cytoplasm (Figures 2c–e). Smooth septate junctions and septate junctions were distinguished between adjacent digestive cells (Figure 2c). The basal membrane of these cells was slightly folded (Figure 2d).

3.2.2. Experimental group Ib1a (concentration of ibuprofen 0.1 µg/L, 7 days). Digestive cells had a cubic shape, and their apical membrane formed microvilli (Figure 3a). As in the control groups, the cytoplasm of regenerative cells was poor in organelles (Figure 3b). Compared to the control groups, no changes were observed in the ultrastructure of cell organelles in both types of cells (Figures 3a–b).

3.2.3. Experimental group Ib1b (concentration of ibuprofen 16.8 µg/L, 7 days). Digestive cells had a cubic shape. The apical cell membrane of digestive cells formed microvilli (Figures 3c). The ultrastructure of the digestive cells did not differ from the cells of the control group (Figures 3c–d). Also, no changes in the ultrastructure of regenerative cells were observed (not shown).

3.2.4. Experimental group Ib1c (concentration of ibuprofen 1 mg/L, 7 days). The apical cell membrane of cubic digestive cells formed microvilli (Figures 4a–d). Few autophagic structures were observed in the cytoplasm of these cells (Figures 4b–d). Some mitochondria degenerated, losing cristae (Figures 4a,b). No changes were observed concerning the nucleus, nucleolus, or other cell organelles.

3.2.5. Experimental group Ib2a (concentration of ibuprofen 0.1 µg/L, 28 days). The shape of regenerative and digestive cells did not differ from those of the control group. The apical cell membrane of digestive cells formed microvilli, which in some parts of the midgut were slightly shorter and less numerous than in the control group (Figures 5a–c). Crescent-shaped cells were poor in organelles. No changes were observed in their ultrastructure (Figure 5c). Numerous autophagosomes and autolysosomes were observed in the cytoplasm of the digestive cells (Figures 5a,b). Changes in the ultrastructure in the form of the loss of the characteristic cristae were observed in the mitochondria (Figures 5a,c).

3.2.6. Experimental group Ib2b (concentration of ibuprofen 16.8 µg/L, 28 days). Microvilli were formed on cubic-shaped digestive cells, but in some parts of the midgut they were shorter and less numerous (Figures 6a–c). In addition, the apical membrane of the digestive cells formed large evaginations directed to the midgut's lumen, devoid of microvilli (Figure 6a). Numerous autophagic structures appeared in the cytoplasm of digestive cells (Figures 6a–c). Some mitochondria lost their cristae (Figures 6a–c). The remaining cell organelles showed no visible changes in their structure (Figures 6a–c).

3.2.7. Experimental group Ib2c (concentration of ibuprofen 1 mg/L, 28 days). The apical cell membrane of digestive cells formed microvilli (Figures 7a–c) and large evaginations directed to the midgut's lumen, which were devoid of microvilli (Figure 7a). Some mitochondria present in the cytoplasm degenerated, losing their cristae (Figures 7b,c). Numerous autophagic structures – autophagosomes and autolysosomes – were observed in the cytoplasm of the digestive cells (Figures 7a–c).

3.3. Confocal microscopy analysis

3.3.1. ROS+/ROS− cells in the midgut of Pam. experimentalis exposed to ibuprofen. The use of dihydroethidium (DHE) revealed weak signals in the midgut cells of control groups (Figures 8a,e). Seven-day-long incubation in ibuprofen with concentrations of 0.1 µg/L and 16.8 µg/L showed that signals emitted by ROS+ positive cells were not stronger than in control groups (Figures 8b,c). However, after 7 days of treating tardigrades with ibuprofen (concentration 1 mg/L), signals emitted by ROS+ positive cells were visibly stronger (Figure 8d). A strong signal emitted by ROS+ cells was also observed in all study groups in which animals were treated with ibuprofen for 28 days (Figures 8f–h).

3.3.2. Apoptosis in the midgut of Pam. experimentalis exposed to ibuprofen. Qualitative analysis using TUNEL showed no nuclear DNA fragmentation, a marker of cell apoptosis, in any of the control groups (Figures 9a,e), similar to cells treated with three different concentrations of ibuprofen over 7 days (Figures 9b–d). The midgut cells of specimens

47:8300961115

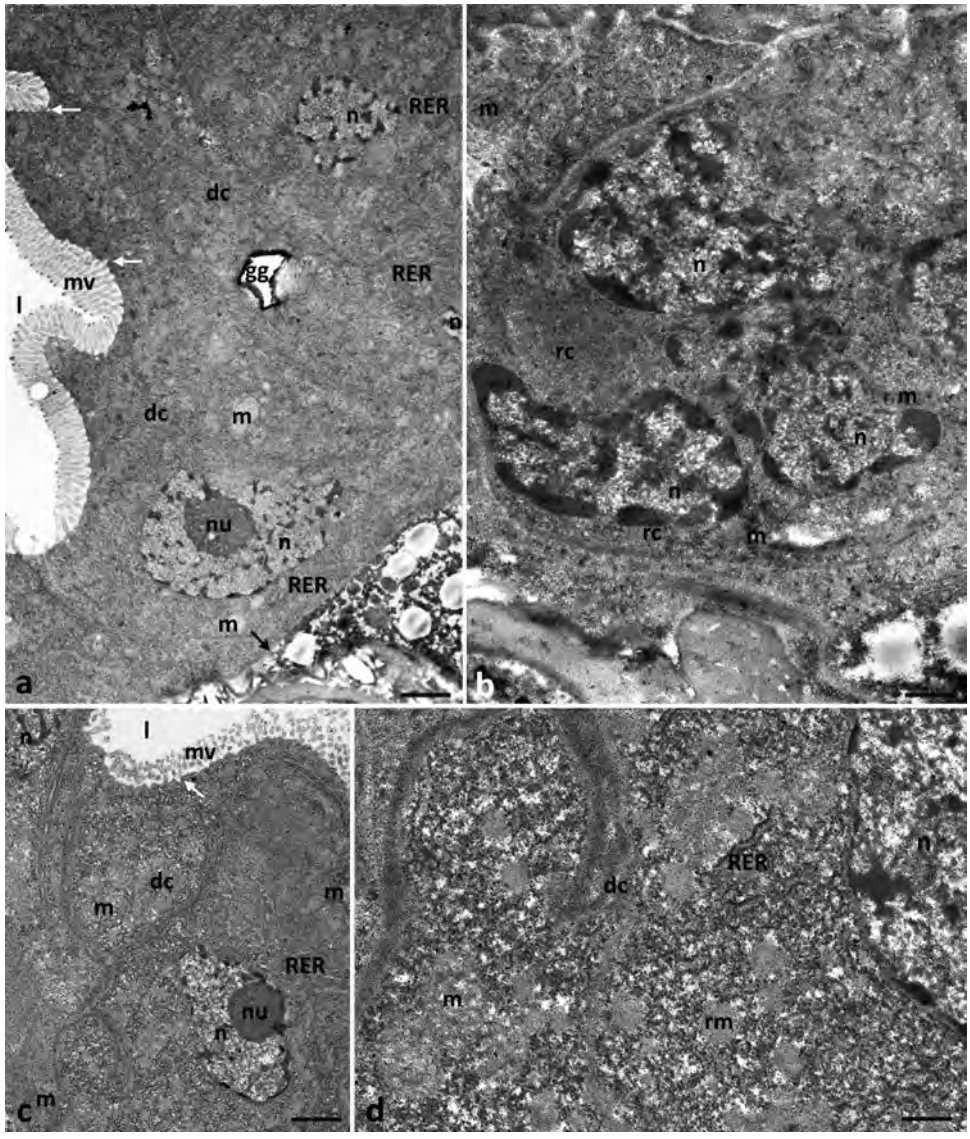


Figure 3. Midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L - Ib1a (a–b) and 16.8 µg/L - Ib1b (c–d), TEM. (a) the ultrastructure of the midgut digestive cells in the group Ib1a, bar = 0.20 µm. (b) the ultrastructure of the midgut regenerative cells in the group Ib1a, bar = 0.31 µm. (c;d) the ultrastructure of the midgut digestive cells in the group Ib1b, (c) bar = 0.36 µm, (d) bar = 0.32 µm. Abbreviations: digestive cell (dc), regenerative cell (rc), mitochondrion (m), nucleus (n), nucleolus (nu), rough endoplasmic reticulum (RER), reserve material (rm), gut granule (gg), microvilli (mv), midgut lumen (l), basal lamina (black arrow), merocrine secretion (white arrow).

treated with concentrations of 0.1 µg/L and 16.8 µg/L for 28 days showed stronger signals compared to the control groups (Figures 9f,g). The strongest signals were found in the midgut cells of the animals treated with a concentration of 1 mg/L for 28 days (Figure 9h).

3.3.3. Autophagy in midgut of Pam. experimentalis exposed to ibuprofen. Using LysoTracker Red, it was possible to determine that the control groups showed few signals emitted by acid organelles – autolysosomes and lysosomes (Figures 10a,e). Similar results were also obtained in groups where specimens were incubated for 7 days with ibuprofen at concentrations of 0.1 µg/L and 16.8 µg/L (Figures 10b,c). However, in midgut cells of animals treated with ibuprofen at a concentration of 1 mg/L for 7 days, signals emitted by acid organelles were visibly stronger (Figure 10d). An incubation period of 28 days caused signals emitted by autolysosomes and lysosomes to be stronger regardless of the used concentration of ibuprofen (Figures 10f–h).

48:5574038330

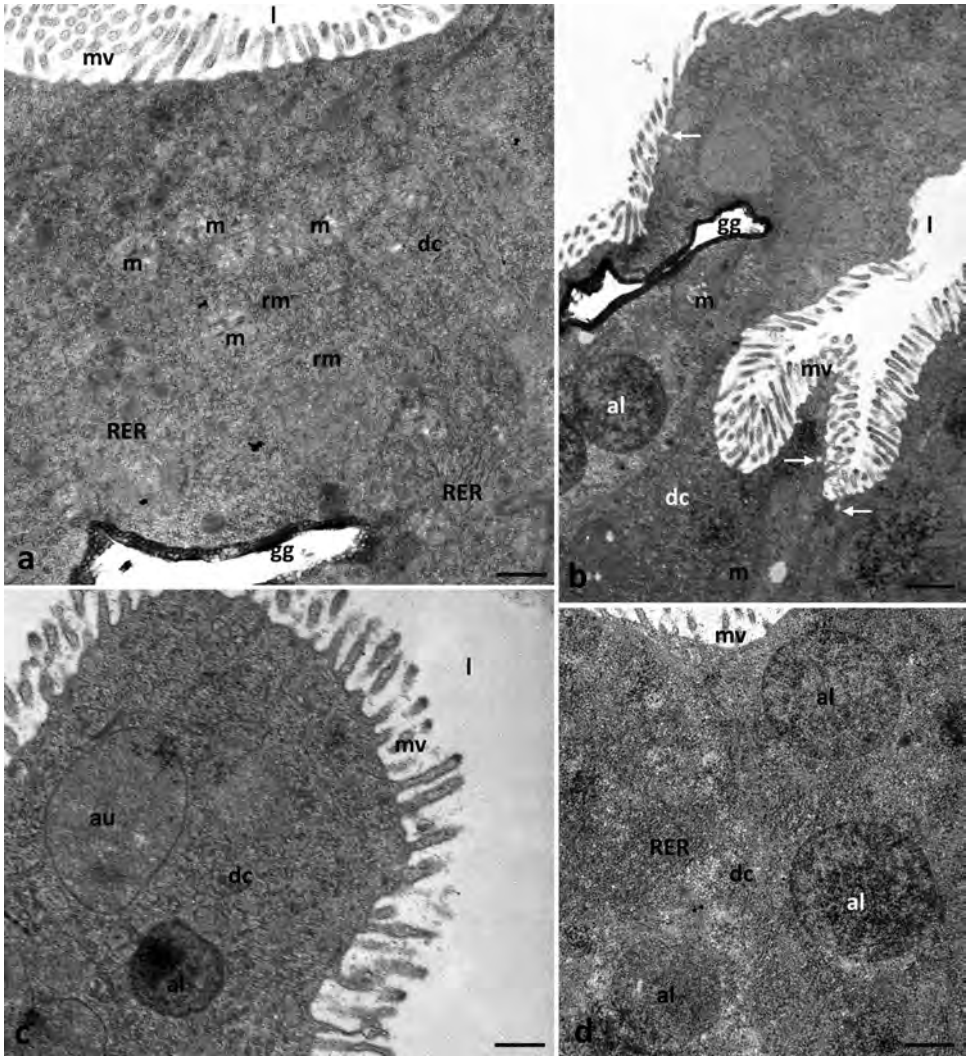


Figure 4. Midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L – Ib1c, TEM. (a–d) the ultrastructure of the midgut digestive cells in the group Ib1c, (a) bar = 0.29 µm, (b) bar = 0.32 µm, (c) bar = 0.39 µm, (d) bar = 0.33 µm. Abbreviations: autolysosome (al), autophagosome (au), digestive cell (dc), mitochondrion (m), rough endoplasmic reticulum (RER), reserve material (rm), gut granule (gg), microvilli (mv), midgut lumen (l), merocrine secretion (white arrow).

4. Discussion

By focusing on various concentrations of ibuprofen and employing a diverse of methods, this research contributes to a comprehensive assessment of the risks associated with ibuprofen contamination. In research, three concentrations of ibuprofen were employed: two representative of environmental levels, specifically 0.1 µg/L (Aus der Beek et al. 2016) and 16.8 µg/L (Mrowiec 2015), alongside a higher concentration of 1 mg/L. The environmental concentrations were chosen to reflect real-world exposure scenarios, ensuring relevance to ecological contexts. By incorporating concentrations observed in the environment, aim to simulate conditions that organisms, including tardigrades, may encounter in their natural habitats. The inclusion of a higher concentration allows us to assess potential effects under more extreme exposure scenarios, providing insights into the biological responses of tardigrades across a range of ibuprofen concentrations. The study's multi-faceted approach like LC50 determination, ultrastructural analysis, and confocal microscopy, provides a holistic view of the effects ranging from lethality to subcellular changes. These findings highlight the complexity of cellular responses to pharmaceutical contamination.

Harmful substances can enter a tardigrade's body not only through the body wall but also with nourishments. Those stressors can cause irreversible alterations to the digestive cells (Rost-Roszkowska

49:1539478097

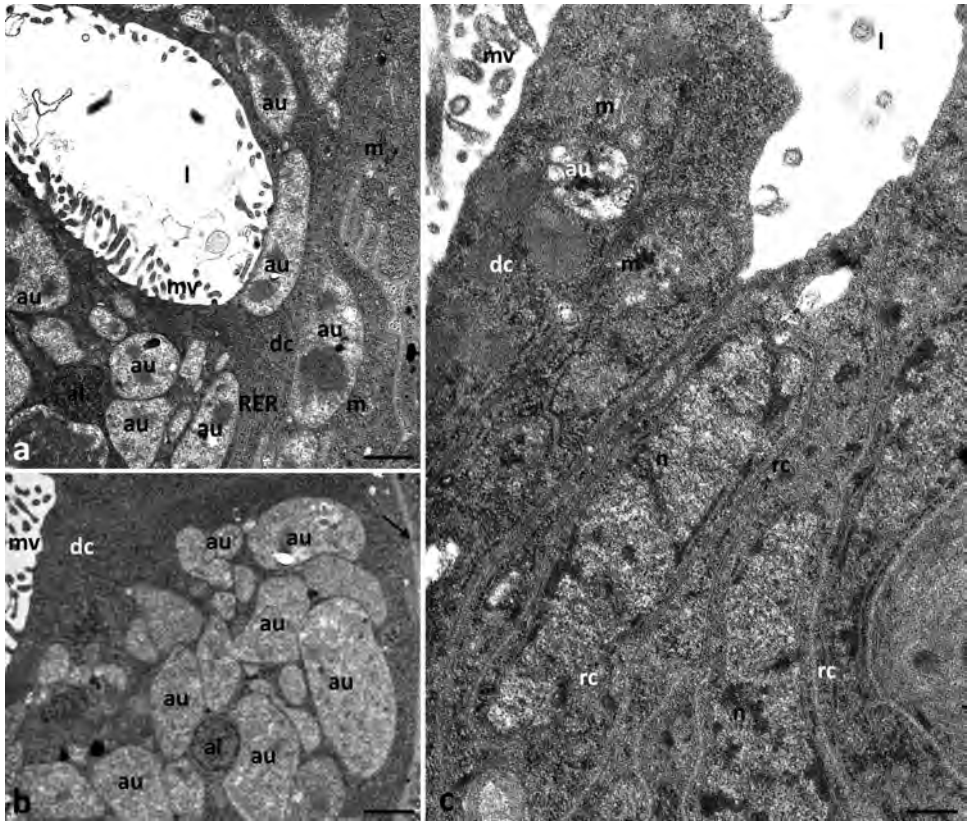


Figure 5. Midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L – Ib2a, TEM. (a–b) the ultrastructure of the midgut digestive cells in the group Ib2a, (a) bar = 0.15 µm, (b) bar = 0.30 µm. c) the ultrastructure of the midgut regenerative cells in the group Ib2a, bar = 0.28 µm. Abbreviations: autolysosome (al), autophagosome (au), digestive cell (dc), regenerative cell (rc), mitochondrion (m), nucleus (n), rough endoplasmic reticulum (RER), microvilli (mv), midgut lumen (l), basal lamina (black arrow).

et al. 2008, 2018). The body wall and the digestive system form a barrier protecting the animal's body against these stressors. The midgut is the most extensive part of the digestive system of tardigrades and is a place of digestion due to the lack of a cuticle (Nelson et al. 2015). Additionally, it is a region responsible for secretion and absorption (Rost-Roszkowska & Poprawa 2008; Rost-Roszkowska et al. 2011, 2019). It is formed by digestive cells as well as being detected in several species' "crescent-like cells" that have a regenerative function. Their role is to differentiate into digestive cells. Regenerative cells form two distinct "epithelial rings" – anterior and posterior (Greven 1976; Rost-Roszkowska et al. 2011; Rost-Roszkowska et al. 2013; Hyra et al. 2016; 2019).

The contamination of NSAIDs includes surface waters but also groundwater and rarely drinking water (Santos et al. 2010). It may result not only in consequences for aquatic organisms but also for the whole trophic chain (Parolini 2020). Ibuprofen has been detected worldwide in surface waters, groundwater, and tap water, with a maximum measured environmental concentration of 303 µg/L (Aus der Beek et al. 2016). The toxicity of ibuprofen towards water organisms has been investigated in aquatic invertebrates such as *Daphnia magna* (Heckmann et al. 2006, 2007; Hayashi et al. 2008; Gómez-Oliván et al. 2014), *Hydra vulgaris* (Pascoe et al. 2003), *Planorbis carinatus* (Pounds et al. 2008), *Dreissena polymorpha* (Parolini et al. 2011), and *Corbicula fluminea* (Aguirre-Martínez et al. 2015). The toxicity of ibuprofen has also been studied in vertebrates such as the fishes *Rhamdia quelen* (Mathias et al. 2018), *Oryzias latipes* (Flippin et al. 2007) as well as tadpoles of *Bufo bufo* (Aliko et al. 2021). Most of these studies investigated ibuprofen's effects on mortality, growth, reproduction of animals, or expression of genes. There is no data on ultrastructural changes in invertebrate cells treated with ibuprofen.

The LC_{50} of the tested species for 24 h exposure is 282 mg/L. However, *Pam. experimentalis* is a gonochoric species with morphological differences

50:3840957257

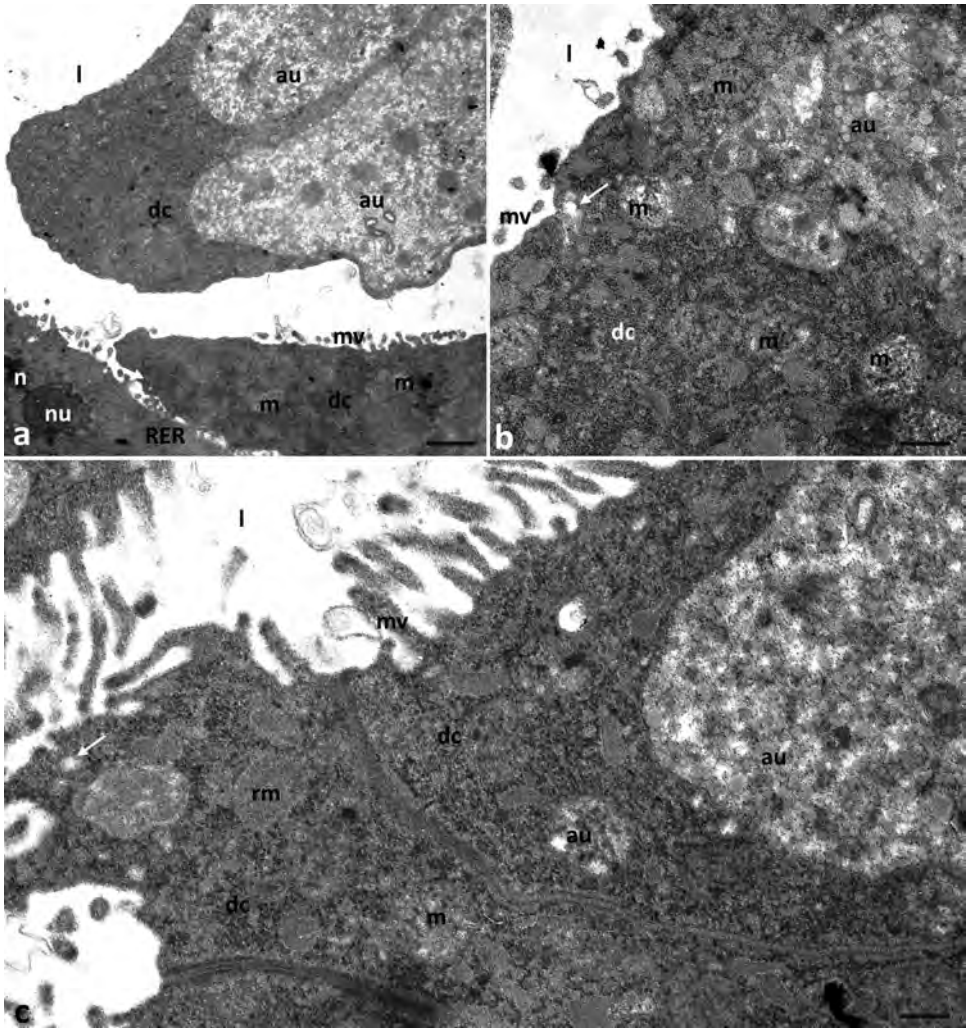


Figure 6. Midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 16.8 µg/L – Ib2b, TEM. (a–c) the ultrastructure of the midgut digestive cells in the group Ib2b, (a) bar = 0.14 µm, (b) bar = 0.19 µm, (c) bar = 0.14 µm. Abbreviations: autophagosome (au), digestive cell (dc), mitochondrion (m), nucleus (n), nucleolus (nu), rough endoplasmic reticulum (RER), reserve material (rm), microvilli (mv), midgut lumen (l), merocrine secretion (white arrow).

between males and females, such as size differences (Kaczmarek et al. 2020). The experiment was conducted without dividing the individuals by sex. Recent research on the anhydrobiosis of this species has suggested that males may be less able to return to activity after rehydration than females (Nagwani et al. 2023). There was some evidence for the effect of sex on such resistance – a factor that should be analyzed in further research. Exposure to ibuprofen (200 mg/L) caused the death of all tested specimens of *Daphnia magna* after 24 hours (Du et al. 2016), and the 48-hour LC_{50} value for this species is reported to be 132.6 mg/L (Han et al. 2006). The LC_{50} test result for the green neon shrimp *Neocaridina denticulata* after 96-hour exposure to ibuprofen was 6.60 mg/L (Sung et al. 2014); in the freshwater keeled ramshorn snail *Planorbis carinatus* the 48- and 72-hour LC_{50} values were both 17.1 mg/L (Pounds et al. 2008); while the 72-hour LC_{50} value for the cnidarian *Hydra attenuata* was 22.3 mg/L (Quinn et al. 2008). For comparison, the 96-hour LC_{50} value of ibuprofen for African catfish *Clarias gariepinus* juveniles was determined to be 0.38 mg/L (Ogueji et al. 2018). However, the 96-hour LC_{50} value for the bluegill sunfish *Lepomis macrochirus* was 173 mg/L (Halling-Sørensen et al. 1998), and 142 mg/L for the fish *Cirrhinus mrigala* after 24-hour exposure (Saravanan et al. 2011). Studies conducted over the years have shown that ibuprofen toxicity varies from one species to another. Concentrations used in the experiment would most likely be of minor importance for survival. However,

51:3164344174

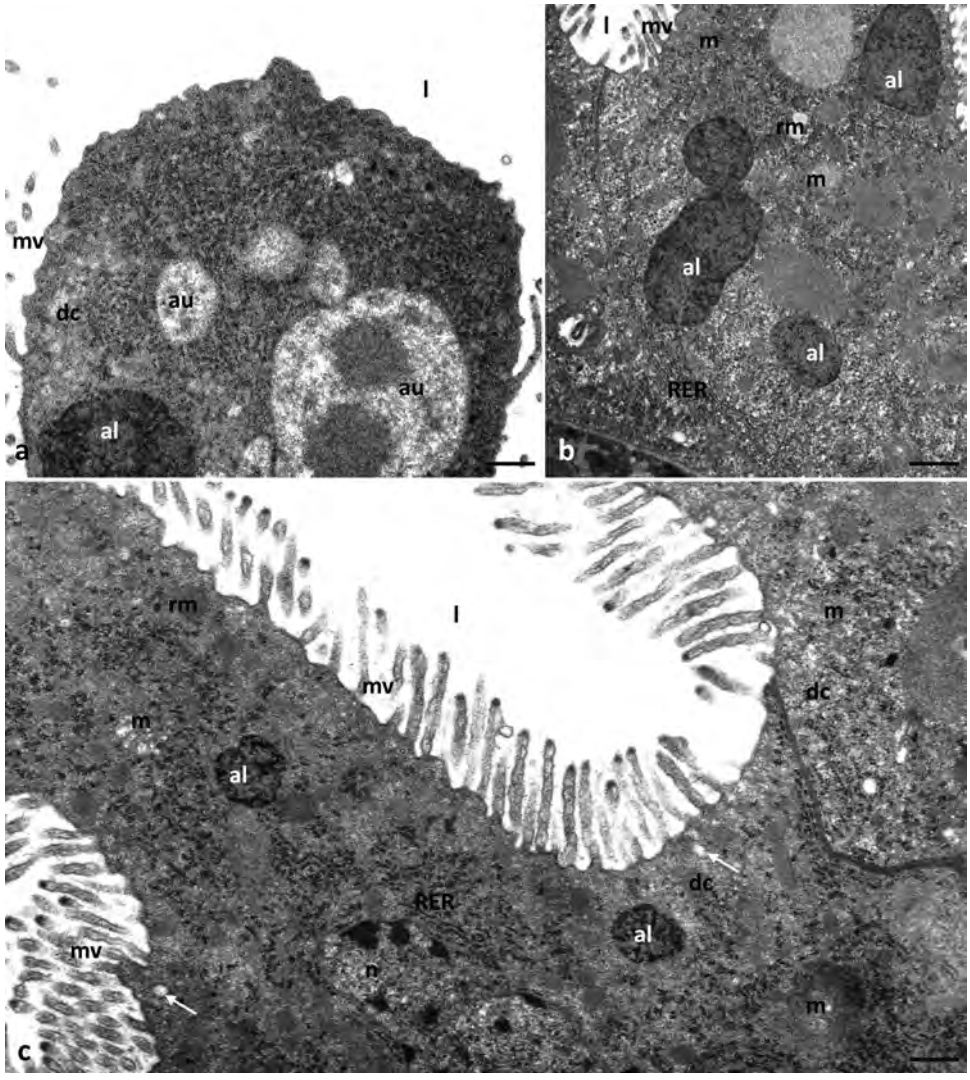


Figure 7. Midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L – Ib2c, TEM. (a–c) the ultrastructure of the midgut digestive cells in the group Ib2c, (a) bar = 0.29 μm, (b) bar = 0.32 μm, (c) bar = 0.21 μm. Abbreviations: autolysosome (al), autophagosome (au), digestive cell (dc), mitochondrion (m), nucleus (n), rough endoplasmic reticulum (RER), reserve material (rm), microvilli (mv), midgut lumen (l), merocrine secretion (white arrow).

in a natural ecosystem, animals are exposed to ibuprofen concentrations for their whole lifespan. Other factors that need to be considered are the high biological activity of NSAIDs and the cumulative effects of drug mixtures (Parolini 2020).

Our study showed that ibuprofen causes changes at the ultrastructural level in the digestive cells of the midgut of *Pam. experimentalis*. After 7-day exposure to ibuprofen at concentrations of 0.1 μg/L and 16.8 μg/L, digestive cells showed no significant changes compared to the cells of animals from the control groups. However, exposure to this pharmaceutical for the same amount of time at a concentration of 1 mg/L showed the presence of autophagosomes in cells and changes in the ultrastructure of the mitochondria. Long-term, 28-day exposure at all three tested concentrations (0.1 μg/L, 16.8 μg/L, 1 mg/L) caused changes such as degenerated mitochondria and the presence of autophagosomes and autolysosomes in the cytoplasm of digestive cells. Evaginations directed to the midgut's lumen, devoid of microvilli, are places where acidic organelles accumulate. This may indicate the possibility of later detachment of part of the cell with numerous autophagosomes and autolysosomes or the opening of autophagic structures into the midgut lumen to restore cell homeostasis. Autophagosomes are vesicles that containing cellular components, such as damaged organelles for degradation. Autolysosomes emerge as a consequence of the fusion between autophagosomes and lysosomes. This leads to the degradation material

52:8314702011

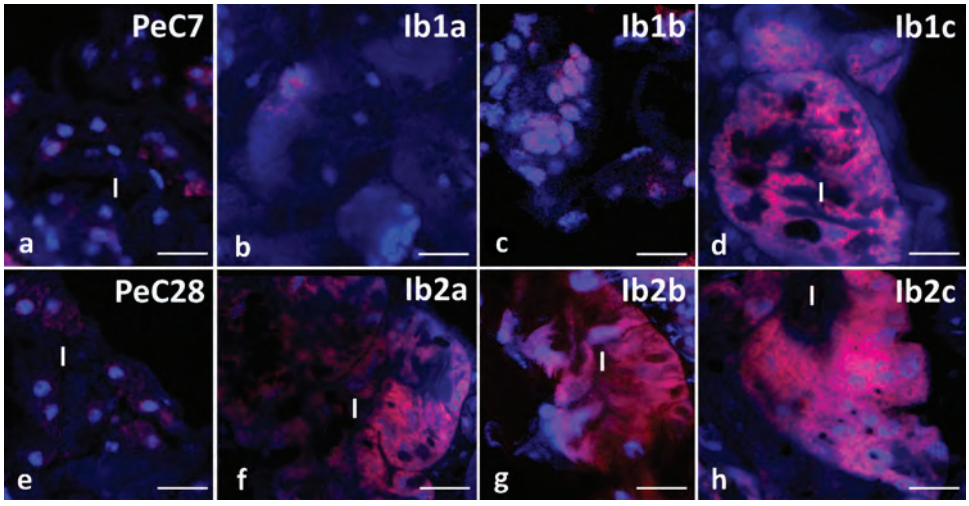


Figure 8. Midgut of *Pam. experimentalis* stained with Dihydroethidium (DHE) and DAPI, confocal microscopy. ROS-positive cells (red signals), nuclei (blue signals). (a;e) the midgut of *Pam. experimentalis* in control groups, (a) bar = 10.53 μm, (e) bar = 10 μm. (b) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 0.1 μg/L – Ib1a, bar = 9.38 μm. (c) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 16.8 μg/L – Ib1b, bar = 6.67 μm. (d) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L – Ib1c, bar = 8.89 μm. (f) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 0.1 μg/L – Ib2a, bar = 14.29 μm. (g) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 16.8 μg/L – Ib2b, bar = 11.11 μm. (h) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L – Ib2c, bar = 11.77 μm.

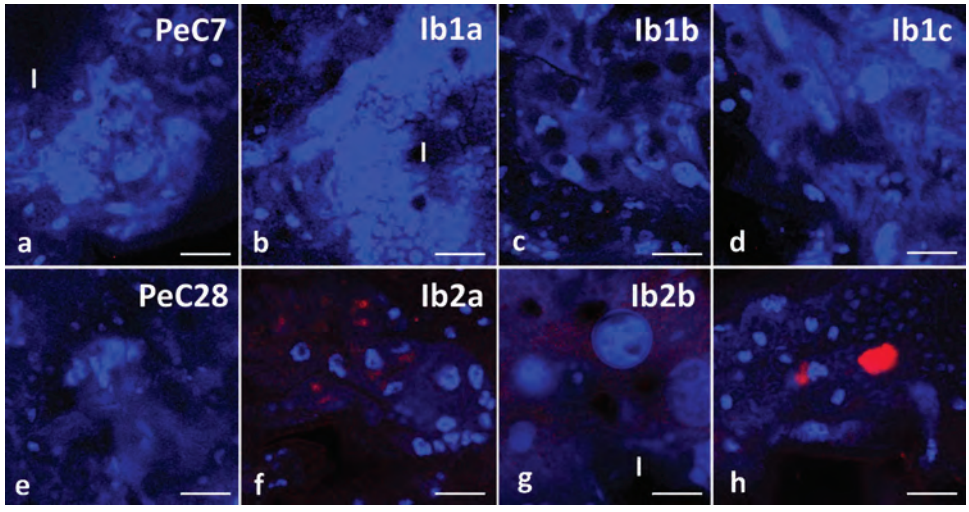


Figure 9. Midgut of *Pam. experimentalis* stained with TUNEL assay and DAPI, confocal microscopy. Nuclei (blue signals), DNA fragmentation (red signals). (a;e) the midgut of *Pam. experimentalis* in control groups, (A) bar = 10 μm, (E) bar = 10.71 μm. (b) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 0.1 μg/L – Ib1a, bar = 11.77 μm. (c) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 16.8 μg/L – Ib1b, bar = 10.53 μm. (d) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L – Ib1c, bar = 8.33 μm. (f) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 0.1 μg/L – Ib2a, bar = 11.11 μm. (g) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 16.8 μg/L – Ib2b, bar = 8.33 μm. (h) the midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L – Ib2c, bar = 9.10 μm.

within autophagosomes by the enzymes present in lysosomes (Wang et al. 2022). The intensified autophagy observed in response to ibuprofen raises the possibility that the organism may be attempting to preserve the functionality of the tissue by removing damaged organelles. Regenerative cells showed no changes at the ultrastructural level at any concentrations tested, either in the short- or long-term incubation. The lack of changes in the crescent-like cells may be due to the lack of direct connection with the pharmaceutical

53:8168644870

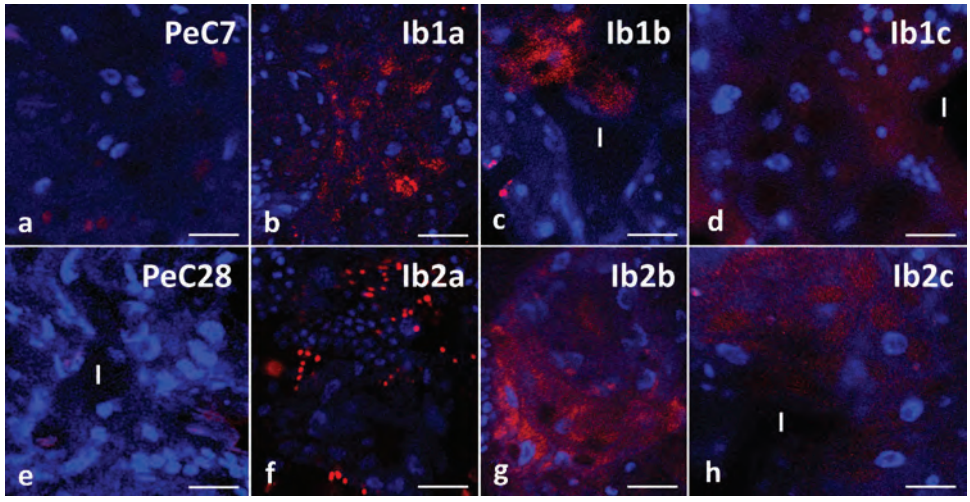


Figure 10. Midgut of *Pam. experimentalis* stained with LysoTracker Red and DAPI, confocal microscopy. Nuclei (blue signals), acidic organelles (red signals). (a;e) Autophagy in midgut of *Pam. experimentalis* in control groups, (a) bar = 12.93 µm, (e) bar = 10.53 µm. (b) Autophagy in midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L – Ib1a, bar = 14.29 µm. (c) Autophagy in midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 16.8 µg/L – Ib1b, bar = 11.11 µm. (d) Autophagy in midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L – Ib1c, bar = 10 µm. (f) Autophagy in midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L – Ib2a, bar = 8.33 µm. (g) Autophagy in midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 16.8 µg/L – Ib2b, bar = 12.5 µm. (h) Autophagy in midgut of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L – Ib2c, bar = 10 µm.

(regenerative cells do not contact the midgut lumen). Ibuprofen caused changes in digestive cells by having direct contact with them, passing into the midgut along with the nourishments. This also confirms the role of digestive cells as the first barrier against stressors.

It is commonly known that mitochondria are one of the most important organelles ensuring the proper functioning of cells. Their crucial role in cell biology is to be the source of ATP, NADH, and GTP and participate in the biosynthesis of reactive oxygen species (Picard et al. 2013; Włodarczyk et al. 2019). Because of that, they are usually the first to respond to stressors. Changes in these organelles may disrupt the functioning of cells and cause irreversible damage (Rost-Roszkowska et al. 2021). Degeneration of mitochondria (loss of cristae) in *Pam. experimentalis* digestive cells was observed after 7-day incubation in ibuprofen (concentration 1 mg/L) and prolonged exposure time caused the same ultrastructural changes in all tested concentrations. No changes were observed in regenerative cells. Observed mitochondrial changes, have the potential to disrupt ATP production and, consequently, overall cell function. This may suggest a possible relationship between the observed ultrastructural changes and the animals response to ibuprofen. Also potentially affecting cellular functions, such as metabolism and growth. Treatment of storage cells of *Hypsibius exemplaris* for 7 days with paracetamol (at concentrations of 230 µg/L and 1 mg/L) caused mitochondria to degenerate, losing their cristae. The same study showed similar changes in these organelles after 28 days of incubation with ibuprofen, not only at concentrations of 230 µg/L and 1 mg/L but also at the much lower 0.2 µg/L (Wieczorkiewicz et al. 2024). As in the treatment with ibuprofen, specimens after long-term intubation in paracetamol showed changes at the ultrastructural level (degenerated mitochondria) with much lower concentrations that can be found in the environment. This indicates that prolonged exposure to this pharmaceutical can impact these animals. Similar changes were caused by other factors. Cadmium caused changes in mitochondria in germline cells of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Siekierska & Urbańska-Jasik 2002) and both somatic and germline cells of *Lithobius forficatus* (Rost-Roszkowska et al. 2020a, 2020b, 2021, 2022; Poprawa et al. 2022), as well as combined cadmium and selenium in germline cells of the leech *Erpobdella octoculata* (Siekierska & Urbanska-Jasik 1998) and cadmium and copper in hemocytes of *Steatoda grossa* (Wilczek et al. 2018). Mitochondrial dysfunction may also be caused by nanodiamonds, as found in the gut epithelium in *Acheta domesticus* (Karpeta-Kaczmarek et al. 2016). The absence of cristae in the mitochondria of midgut epithelium cells of the freshwater shrimp

54:3380570244

Neocaridina davidi was also noted after treating the animals with insecticides (Ostróżka et al. 2022).

Confocal microscopy analysis showed a visible increase in DNA fragmentation, reactive oxygen species, and the presence of acidic organelles (autolysosomes, lysosomes) in midgut cells of specimens of *Pam. experimentalis* in most of the groups incubated in ibuprofen. Increasing concentrations of this drug caused the detection of more signals suggesting abnormalities in tardigrade cells. This in response to ibuprofen exposure suggests a multifaceted response of *Pam. experimentalis* to pharmaceutical stress. This complexity underscores the organisms ability to range of strategies as a response to stressors. They are observed even at lower concentrations after 28-day incubation. Increased intensity of autophagy in the cells of the studied tardigrade correlated with ibuprofen concentrations and length of incubation. Autophagy is an important process of growth regulation. Breakdown products are input to cellular metabolism. Energy generated in this way is used to build new proteins and membranes, which ultimately helps maintain the homeostasis of cells (Rabinowitz & White 2010). It is also a response to various types of stimuli, including nutrient deprivation, oxidative stress, chemical factors, or pathogens such as bacteria or microsporidia, helping to protect cells by eliminating damaged organelles or pathogens (Kelekar 2006; Glick et al. 2010; Rost-Roszkowska et al. 2011, 2013, 2018, 2020a, 2020b, 2022; Poprawa et al. 2022). During starvation-induced autophagy, reserve material accumulated in the cytoplasm of the digestive cells of animals can be exploited. This process can be caused by a lack of food in the environment, moulting, or hibernation (Hyra et al. 2016; Rost-Roszkowska et al. 2018). The 7-day treatment with a pharmaceutical concentration of 1 mg/L resulted in the appearance of acidic structures in cells responsible for removing damaged organelles, among others. Organelle damage is most likely related to the toxic effects of ibuprofen. Longer, 28-day incubation increased autophagy at all tested concentrations, which may indicate that even small amounts of this pharmaceutical, when exposure periods are long, can cause damage to organelles or proteins. The appearance of autophagic structures and, thus, the intensification of autophagy induced by pharmaceuticals have been described in storage cells of the tardigrade *Hys. exemplaris* incubated in paracetamol solution. In this species, the increase in autophagy was correlated with increased drug concentration and incubation time (Wieczorkiewicz et al. 2024). Autophagy in the digestive cells of *Grevenius granulifer* (formerly *Isohypsibius granulifer granulifer* – see Gąsiorek et al. 2019) infected with microsporidia was more intensive than in noninfected specimens; the purpose of this was to remove pathogens and damage organelles. This process has also been described in the cytoplasm of trophocytes of the same species as they are separated from the oocyte during late choriogenesis (Rost-Roszkowska et al. 2013). In this case, the intensification of autophagy directed the cell onto the path of apoptosis (Poprawa et al. 2015). In addition, a correlation between the intensity of autophagy and cell apoptosis or necrosis has been described in the midgut cells of tardigrades (Rost-Roszkowska et al. 2018). When too many autophagosomes, autolysosomes, and residual bodies appeared in the digestive cells, the cells began to die by apoptosis or necrosis (Rost-Roszkowska et al. 2018). Apoptosis of senescent cells may help maintain homeostasis in multicellular organisms when correlated with the proliferation of new cells (Hetts 1998). This process can be detected using markers such as TUNEL staining to detect DNA fragmentation. During apoptosis, the cell shrinks, and structural changes occur in organelles such as endoplasmic reticulum, Golgi complexes, and mitochondria. Then, "apoptotic bodies" are formed (Lee & Baehrecke 2001; Poprawa et al. 2015). This process can also be induced by many factors, such as cadmium, chromium, and nickel (Rana 2008). After the incubation of *Pam. experimentalis* with ibuprofen for 28 days, increased intensity of DNA fragmentation, a factor indicating that the cell has entered the path of apoptosis, was detected. The highest intensity of signals indicating DNA fragmentation was observed at a 1 mg/L concentration. Therefore, we propose that apoptosis is responsible for removing damaged cells to help maintain homeostasis in the animal organism. Cooperation of these processes was also described in the germarium *Diatraea saccharalis* (dos Santos et al. 2007), ovarian nurse cells of *Drosophila virilis* (Velentzas et al. 2007), and *Adalia bipunctata* (Mpakou et al. 2011) and in the midgut epithelium, salivary glands and gonads of *Lithobius forficatus* (Rost-Roszkowska et al. 2020a, 2020b; Poprawa et al. 2022).

Factors influencing apoptosis are reactive oxygen species (ROS), which are cytotoxic agents. They affect this process in pathological and physiological conditions (due to their antimicrobial properties). They have a destructive effect on both DNA and proteins (Simon et al. 2000; Zhang et al. 2020). Oxidative stress was observed in the midgut cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28

55:9001397938

days, regardless of the concentration of ibuprofen used, and after 7 days of incubation in this drug at a concentration of 1 mg/L. ROS levels in ibuprofen-treated cells introduces the potential for oxidative damage to cellular components this may contribute to the disruption of cell function and play a role in the observed ultrastructural changes and cellular responses. The significant accumulation of ROS induced by ibuprofen may have led to digestive cell death by apoptosis in this species. Increased oxidative damage to RNA and DNA has been described in coelomocytes and body wall tissue of the polychaete *Glycera dibranchiata* exposed to sulfide (Joyner-Matos et al. 2010). It has been shown that organophosphates and various classes of pyrethroids can also cause oxidative stress. The antimicrobial properties of ROS can be supported by their increased production in the midgut of *Drosophila melanogaster* upon bacterial challenge (Chaitanya et al. 2016). Studies on *Neocaridina davidi* shrimp have shown that long-term starvation increases the concentration of ROS in the intestine and liver while re-feeding reduces their concentration (Włodarczyk et al. 2019).

Conclusions

Our study showed that: (1) ultrastructural changes of digestive cells of *Pam. experimentalis* are positively correlated with the concentration and the time of exposure to the stressor; (2) the lack of ultrastructural changes in regenerative cells may be due to the lack of direct contact with the ibuprofen; (3) digestive cells are one of the first barriers against harmful substances; (4) mitochondria are the organelles most sensitive to the stressor; (5) with higher concentrations of ibuprofen and longer exposure time, in midgut cells activation and intensification of autophagy, DNA fragmentation and oxidative stress occur. (6) in future studies, a broader picture of the changes caused by ibuprofen in tardigrades may be obtained by flow cytometry, as well as studies on other organs such as gonads and storage bodies. By researching the effects of ibuprofen exposure on organisms like tardigrades, we provide insights into potential ecological risks of pharmaceuticals in the environment.

Analysis of the effect of ibuprofen on tardigrades requires further research. It seems particularly interesting to estimate the impact of this pharmaceutical on the ultrastructure and functioning of the gonads and to determine whether both sexes are equally sensitive to this stressor.

Acknowledgments

We are very grateful to Dr Danuta Urbańska-Jasik, Dr Łukasz Chajec and MSc Kamil Janelt (University of Silesia in Katowice, Poland) for their technical assistance. We would like to thank Professor Agnieszka Babczyńska (University of Silesia in Katowice, Poland) for the substantive consultation. The authors are deeply indebted to Richard Ashcroft, biomedical editor (http://www.anglopolonia.com/home.html), for improving the English style.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Author contributions

AM: Methodology, Validation, Investigation, Visualization, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing,
IP: Conceptualization, Supervision, Methodology, Investigation, Validation, Data Curation, Visualization, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing,
SS: Methodology, Visualization
EF: Methodology, Resources

Data availability statement

All relevant data are within the paper.

ORCID

A. Miernik http://orcid.org/0000-0001-8977-3365
S. Student http://orcid.org/0000-0003-1812-5496
E. Fiałkowska http://orcid.org/0000-0002-6330-4787
I. Poprawa http://orcid.org/0000-0002-8930-1592

References

Aguirre-Martínez GV, DelValls AT, Martín-Díaz ML. 2015. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). Ecotoxicology and Environmental Safety 120:142–154. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.05.036

Aliko V, Korriku RS, Pagano M, Faggio C. 2021. Double-edged sword: Fluoxetine and ibuprofen as development jeopardizers and apoptosis' inducers in common toad, *Bufo bufo*, tadpoles. Science of the Total Environment 776:145945. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145945

Aus der Beek T, Weber FA, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, Küster A. 2016. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. Environmental Toxicology and Chemistry 35(4):823–835. DOI: 10.1002/etc.3339

56:7569392694

Batucan NSP, Tremblay LA, Northcott GL, Matthaei CD. 2022. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. Environmental Advances 7:100164. DOI: 10.1016/j.envadv.2021.100164

Boxall ABA, Rudd MA, Brooks BW, Caldwell DJ, Choi K, Hickmann S, Innes E, Ostapyk K, Staveley JP, Verslycke T, Ankley GT, Beazley KF, Belanger SE, Berninger JP, Carriquiriborde P, Coors A, DeLeo PC, Dyer SD, Ericson JF, Gagné F, Giesy JP, Gouin T, Hallstrom L, Karlsson MV, Joakim Larsson DG, Lazorchak JM, Mastrocco F, McLaughlin A, McMaster ME, Meyerhoff RD, Moore R, Parrott JL, Snape JR, Murray-Smith R, Servos MR, Sibley PK, Straub JO, Szabo ND, Topp E, Tetreault GR, Trudeau VL, Van Der Kraak G. 2012. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: What are the big questions? Environmental Health Perspectives 120(9):1221–1229. DOI: 10.1289/ehp.1104477

Bushra R, Aslam N. 2010. An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. Oman Medical Journal 25(3):155. DOI: 10.5001/omj.2010.49

Chaitanya RK, Shashank K, Sridevi P. 2016. Oxidative stress in invertebrate systems. Free Radicals and Diseases 19:51–68.

dos Santos DC, Gregório EA, Moreli Silva de Moraes RL. 2007. Programmed cell death during early oogenesis in the *Diatraea saccharalis* germarium. Acta Microscopy 16:311–312.

Du J, Mei CF, Ying GG, Xu MY. 2016. Toxicity thresholds for diclofenac, acetaminophen and ibuprofen in the water flea *Daphnia magna*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 97(1):84–90. DOI: 10.1007/s00128-016-1806-7

Fent K, Weston AA, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands) 76(2):122–159. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009

Finney DJ. 1952. Probit Analysis. By D. J. Finney, M.A. Sc.D. [2nd ed. Pp. xiv + 318. Cambridge University Press, 1952. 35 s.]. Journal of the Institute of Actuaries 78(3):388–390. DOI: 10.1017/S0020268100052938

Flippin JL, Huggett D, Foran CM. 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands) 81(1):73–78. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.11.002

Gąsiorek P, Stec D, Morek W, Michalczyk Ł. 2019. Deceptive conservatism of claws: Distinct phyletic lineages concealed within *Isohypsibioidea* (Eutardigrada) revealed by molecular and morphological evidence. Contributions to Zoology 88 (1):78–132. DOI: 10.1163/18759866-20191350

Glick D, Barth S, Macleod KF. 2010. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. The Journal of Pathology 221 (1):3–12. DOI: 10.1002/path.2697

Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, García-Medina S, Valdés-Alanís A, Islas-Flores H, Neri-Cruz N. 2014. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. Drug and Chemical Toxicology 37(4):391–399. DOI: 10.3109/01480545.2013.870191

Greven H. 1976. Some ultrastructural observations on the midgut epithelium of *Isohypsibius augusti (Murray, 1907) (Eutardigrada)*. Cell and Tissue Research 166(3):339–351. DOI: 10.1007/BF00220130

Halling-Sørensen BNNS, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Lützhøft HH, Jørgensen SE. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. Chemosphere 36(2):357–393. DOI: 10.1016/S0045-6535(97)00354-8

Han GH, Hur HG, Kim SD. 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: Occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal 25(1):265–271. DOI: 10.1897/05-193R.1

Harshkova D, Aksmann A. 2019. Zanieczyszczenie środowiska niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi na przykładzie diklofenaku – przyczyny, skutki, bioindykacja. Kosmos 68 (1):185–194. DOI: 10.36921/kos.2019_2487

Hayashi Y, Heckmann LH, Callaghan A, Sibly RM. 2008. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. Ecotoxicology 17 (4):246–251. DOI: 10.1007/s10646-008-0191-3

Heckmann LH, Callaghan A, Hooper HL, Connon R, Hutchinson TH, Maund SJ, Sibly RM. 2007. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. Toxicology Letters 172 (3):137–145. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.06.001

Heckmann LH, Connon R, Hutchinson TH, Maund SJ, Sibly RM, Callaghan A. 2006. Expression of target and reference genes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. BMC Genomics 7(1):1–8. DOI: 10.1186/1471-2164-7-175

Hetts SW. 1998. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. Jama 279(4):300–307. DOI: 10.1001/jama.279.4.300

Hyra M, Poprawa I, Włodarczyk A, Student S, Sonakowska L, Kszuk-Jendrysik M, Rost-Roszkowska MM. 2016. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840)(Tardigrada, Eutardigrada, Hypsibiidae) in relation to oogenesis. Zoological Journal of the Linnean Society 178(4):897–906. DOI: 10.1111/zoj.12467

Joyner-Matos J, Predmore BL, Stein JR, Leeuwenburgh C, Julian D. 2010. Hydrogen sulfide induces oxidative damage to RNA and DNA in a sulfide-tolerant marine invertebrate. Physiological and Biochemical Zoology 83(2):356–365. DOI: 10.1086/597529

Kaczmarek Ł, Roszkowska M, Poprawa I, Janelt K, Kmita H, Gawlak M, Fiałkowska E, Mioduchowska M. 2020. Integrative description of bisexual *paramacrobiotus experimentalis* sp. nov. (Macrobiotidae) from republic of Madagascar (Africa) with microbiome analysis. Molecular Phylogenetics and Evolution 145:106730. DOI: 10.1016/j.ympev.2019.106730

Karaźniewicz M. 2007. Czterdzieści lat doświadczeń stosowania ibuprofenu w lecznictwie. Nowiny Lekarskie 76:195–197.

Karpeta-Kaczmarek J, Augustyniak M, Rost-Roszkowska M. 2016. Ultrastructure of the gut epithelium in *Acheta domesticus* after long-term exposure to nanodiamonds supplied with food. Arthropod Structure & Development 45(3):253–264. DOI: 10.1016/j.asd.2016.02.002

Kelekar A. 2006. Autophagy. Annals of the New York Academy of Sciences 1066(1):259–271. DOI: 10.1196/annals.1363.015

Lee CY, Baehrecke EH. 2001. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. Development 128(8):1443–1455. DOI: 10.1242/dev.128.8.1443

Marchlewicz A, Guzik U, Wojcieszyńska D. 2015. Właściwości, występowanie i biodegradacja ibuprofenu w środowisku wodnym. Ochrona środowiska 37(1):65–70.

Mathias FT, Fockink DH, Disner GR, Prodocimo V, Ribas JLC, Ramos LP, Cestari MM, de Assis HCS. 2018. Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia*

57:6891135946

quelen. Environmental Toxicology and Pharmacology 59:105–113. DOI: 10.1016/j.etap.2018.03.008

Mpakou VE, Velentzas AD, Velentzas PD, Margaritis LH, Stravopodis DJ, Papassideri IS. 2011. Programmed cell death of the ovarian nurse cells during oogenesis of the ladybird beetle *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Development, Growth & Differentiation 53(6):804–815. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2011.01288.x

Mrowiec B. 2015. Farmaceutyki–zagrożenie środowiska wodnego. Edukacja Biologiczna i Środowiskowa 4:25–33.

Nagwani AK, Melosik I, Kaczmarek L, Kmita H. 2023. Recovery from anhydrobiosis in the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*: Better to be young than old and in a group than alone. bioRxiv 2023–2025 D oi: 10.1101/2023.05.22.541721.

Nelson DR, Guidetti R, Rebecchi L. 2015. Phylum tardigrada. In: Thorp and Covich's freshwater invertebrates. London, Elsevier: Academic Press. pp. 347–380.

Nikolaou A, Meric S, Fatta D. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387(4):1225–1234. DOI: 10.1007/s00216-006-1035-8

Ogueji EO, Nwani CD, Iheanacho SC, Mbah CE, Okeke CO, Yaji A. 2018. Acute toxicity effects of ibuprofen on behaviour and haematological parameters of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). African Journal of Aquatic Science 43(3):293–303. DOI: 10.2989/16085914.2018.1465393

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. DOI: 10.1016/j.micron.2021.103162

Parolini M. 2020. Toxicity of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. Science of the Total Environment 740:140043. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140043

Parolini M, Binelli A, Provini A. 2011. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicology and Environmental Safety 74(6):1586–1594. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.04.025

Pascoe D, Karntanut W, Müller CT. 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. Chemosphere 51(6):521–528. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00860-3

Picard M, Shirihai OS, Gentil BJ, Burelle Y. 2013. Mitochondrial morphology transitions and functions: Implications for retrograde signaling? American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative & Comparative Physiology 304(6):R393–R406. DOI: 10.1152/ajpregu.00584.2012

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. DOI: 10.1038/s41598-022-10664-4

Poprawa I, Hyra M, Kszuk-Jendrysik M, Rost-Roszkowska MM. 2015. Ultrastructural changes and programmed cell death of trophocytes in the gonad of *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Tardigrada, Eutardigrada, Isohypsibiidae). Micron 70:26–33. DOI: 10.1016/j.micron.2014.11.008

Pounds N, Maclean S, Webley M, Pascoe D, Hutchinson T. 2008. Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). Ecotoxicology and Environmental Safety 70(1):47–52. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.07.003

Quinn B, Gagné F, Blaise C. 2008. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian. Hydra Attenuata Science of the Total Environment 389(2–3):306–314. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2007.08.038

Rabinowitz JD, White E. 2010. Autophagy and metabolism. Science 330(6009):1344–1348. DOI: 10.1126/science.1193497

Rainsford KD. 2013. Ibuprofen: Pharmacology, therapeutics and side effects. Basel & Heidelberg: Springer Science & Business Media.

Rana SVS. 2008. Metals and apoptosis: Recent developments. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 22(4):262–284. DOI: 10.1016/j.jtemb.2008.08.002

Rost-Roszkowska MM, Poprawa I, Kaczmarek Ł. 2013. Autophagy as the cell survival in response to a microsporidian infection of the midgut epithelium of *Isohypsibius granulifer granulifer* (Eutardigrada: Hypsibiidae). Acta Zoologica 94(3):273–279. DOI: 10.1111/j.1463-6395.2011.00552.x

Rost-Roszkowska M, Janelt K, Poprawa I. 2019. Fine structure of the midgut epithelium of *thulinius ruffoi* (Tardigrada, Eutardigrada, Parachela) in relation to oogenesis and simplex stage. Arthropod Structure & Development 49:128–136. DOI: 10.1016/j.asd.2018.12.002

Rost-Roszkowska MM, Janelt K, Poprawa I. 2018. The role of autophagy in the midgut epithelium of Parachela (Tardigrada). Zoomorphology 137(4):501–509. DOI: 10.1007/s00435-018-0407-x

Rost-Roszkowska M, Poprawa I. 2008. Ultrastructure of the midgut epithelium in *Dactylobiotus dispar* (Tardigrada: Eutardigrada) during encystation. Zoologica Poloniae 53(1–4):19. DOI: 10.2478/v10049-008-0002-7

Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Leśniewska M, Student S. 2020b. Effects of short-and long-term exposure to cadmium on salivary glands and fat body of soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda): Histology and ultrastructure. Micron 137:102915. DOI: 10.1016/j.micron.2020.102915

Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Wilczek G, Skowronek M, Student S, 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. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157298

Rost-Roszkowska 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). The European Zoological Journal 87(1):242–262. DOI: 10.1080/24750263.2020.1757168

Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Wilczek G, Wilczek P, Tarnawska M, Student S, Leśniewska M. 2021. 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. DOI: 10.1080/24750263.2021.1912199

Rost-Roszkowska MM, 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. Canadian Journal of Zoology 86(10):1179–1188. DOI: 10.1139/Z08-096

58:6445245476

Rost-Roszkowska MM, Poprawa I, Wójtowicz M, Kaczmarek Ł. 2011. Ultrastructural changes of the midgut epithelium in *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Tardigrada: Eutardigrada) during oogenesis. Protoplasma 248(2):405–414. DOI: 10.1007/s00709-010-0186-9

Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MCBSM. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 175(1–3):45–95. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.100

Saravanan M, Karthika S, Malarvizhi A, Ramesh M. 2011. Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: Hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. Journal of Hazardous Materials 195:188–194. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.029

Siekierska E, Urbanska-Jasik D. 1998. The effect of cadmium and selenium ions on the ovary structure in leech *Herpobdella octooculata* [L.]. Folia Morphologica 57(1).

Siekierska E, Urbańska-Jasik D. 2002. Cadmium effect on the ovarian structure in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa). Environmental Pollution 120(2):289–297. DOI: 10.1016/S0269-7491(02)00152-5

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 5 (5):415–418. DOI: 10.1023/A:1009616228304

Stanley-Samuelson DW. 1987. Physiological roles of prostaglandins and other eicosanoids in invertebrates. The Biological Bulletin 173(1):92–109. DOI: 10.2307/1541865

Sung HH, Chiu YW, Wang SY, Chen CM, Huang DJ. 2014. Acute toxicity of mixture of acetaminophen and ibuprofen to Green Neon Shrimp, *Neocaridina denticulate*. Environmental Toxicology and Pharmacology 38(1):8–13. DOI: 10.1016/j.etap.2014.04.014

Szymonik A, Lach J. 2012. Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych. Inżynieria i Ochrona Środowiska 15:249–263.

Velentzas AD, Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri IS, Margaritis LH. 2007. Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell death during *Drosophila virilis* oogenesis. Autophagy 3(2):130–132. DOI: 10.4161/auto.3582

Wang Y, Que H, Rong Y. 2022. Autophagosomal components recycling on autolysosomes. Trends in Cell Biology 32:897–899.

Wieczorkiewicz F, Sojka J, Poprawa I. 2024. Effect of paracetamol on the storage cells of *Hypsibius exemplaris* —ultrastructural analysis. Zoological Journal of the Linnean Society 200(1):258–268. DOI: 10.1093/zoolinnean/zlad051

Wilczek G, Wiśniewska K, Kozina B, Wilczek P, Rost-Roszkowska M, Stalmach M, Skowronek M, Kaszuba F. 2018. Effects of food contaminated with cadmium and copper on hemocytes of *steatoda grossa* (Araneae: Theridiidae). Ecotoxicology and Environmental Safety 149:267–274. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.007

Włodarczyk A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Ostróżka A, Tarnawska M, Rost-Roszkowska M. 2019. Relationship between ROS production, MnSOD activation and periods of fasting and re-feeding in freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). PeerJ 7:e7399. DOI: 10.7717/peerj.7399

Zhang T, Yan Z, Zheng X, Wang S, Fan J, Liu Z. 2020. Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, DNA damage and apoptosis in digestive gland and gill of Asian clam (*corbicula fluminea*). Fish & Shellfish Immunology 99:514–525. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.02.046

59:1103580858

diversity

MDPI

Article

Investigation of Potential Effects of Ibuprofen on the Storage Cells and Anhydrobiosis Capacity of the Tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*

Aleksandra Miernik [1,2,*], Filip Wieczorkiewicz [1], Sebastian Student [3,4] and Izabela Poprawa [1,*]

[1] Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Bankowa 9, 40-007 Katowice, Poland; f.wieczorkiewicz@vp.pl
[2] Doctoral School, University of Silesia in Katowice, Bankowa 14, 40-007 Katowice, Poland
[3] Institute of Automatic Control, Silesian University of Technology, Akademicka 16, 44-100 Gliwice, Poland; sebastian.student@polsl.pl
[4] Biotechnology Center, Silesian University of Technology, Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice, Poland
* Correspondence: aleksandra.miernik@us.edu.pl (A.M.); izabela.poprawa@us.edu.pl (I.P.)

Abstract: The surge in pharmaceutical consumption, particularly non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as ibuprofen, has raised concerns about their presence in aquatic ecosystems. This study investigated the potential ecological impact of ibuprofen, focusing on the ultrastructure of storage cells in the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*, renowned for its resilience to environmental stressors. Individuals were exposed to three ibuprofen concentrations (0.1 µg/L, 16.8 µg/L, and 1 mg/L) over 7 and 28 days. Storage cells were examined using light microscopy, transmission electron microscopy, and confocal microscopy. This study also explored ibuprofen's impact on the process of anhydrobiosis. In the short-term experiment, no ultrastructural changes in tardigrade storage cells were observed across ibuprofen concentrations. However, in the long-term incubation, autophagic structures in storage cell cytoplasm were identified, indicating potential adaptive responses. Individual mitochondria exhibited degeneration, and the rough endoplasmic reticulum displayed slight swelling. No evidence of increased oxidative stress or nuclear DNA fragmentation was observed in any research group. This study elucidates the complex responses of tardigrade storage cells to ibuprofen exposure. The findings emphasize the importance of understanding pharmaceutical impacts on aquatic organisms, highlighting the resilience of tardigrades to specific environmental stressors.

Keywords: tardigrades; anhydrobiosis; ibuprofen

check for updates

Citation: Miernik, A.; Wieczorkiewicz, F.; Student, S.; Poprawa, I. Investigation of Potential Effects of Ibuprofen on the Storage Cells and Anhydrobiosis Capacity of the Tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Diversity* **2024**, *16*, 132. https://doi.org/10.3390/d16030132

Academic Editor: Daniel Stec

Received: 18 December 2023
Revised: 12 February 2024
Accepted: 19 February 2024
Published: 20 February 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Consumption of pharmaceuticals increases every year as they are widely used to prevent or treat human and animal diseases [1]. They can enter the aquatic environment as metabolites or in unchanged form. As these compounds contaminate aquatic habitats (through improper disposal or ineffective methods in wastewater treatment plants), they can have devastating effects on the environment and aquatic life [2,3]. One of the main groups of substances that pose a threat to aquatic environments is non-steroidal anti-inflammatory drugs [2,4]. Ibuprofen, acetylsalicylic acid (aspirin), diclofenac, and naproxen are reported to be contaminants in aquatic ecosystems. These drugs are widely used for their analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory properties in both human and veterinary medicine. The presence of these substances in aquatic environments can have significant ecological and environmental implications. They can persist in aquatic systems for extended periods. Additionally, some of these compounds can bioaccumulate in the tissues of aquatic organisms. Bioaccumulation occurs when organisms at lower trophic levels consume contaminated water or food, and the accumulated substances become more concentrated

60:5230087036

as they move up the food chain [1,5,6]. One of the most widely used NSAIDs is ibuprofen, with a history dating back to its synthesis in the 1960s. It was developed as a response to the need for an analgesic and anti-inflammatory medication that could be as effective as aspirin but with fewer intense side effects. Ibuprofen is commonly used for the treatment of acute and chronic pain, as well as various rheumatic diseases. It is effective in reducing pain, inflammation, and fever [7,8]. Ibuprofen exerts its anti-inflammatory and analgesic effects by inhibiting cyclooxygenase (COX) enzymes. Specifically, it inhibits both COX-1 and COX-2, which are involved in the synthesis of prostaglandins. Prostaglandins play a crucial role in inflammation, pain, and fever. By inhibiting their production, ibuprofen reduces these symptoms [8–10]. Tardigrades, commonly known as water bears, are small invertebrates known for their exceptional resilience to a wide range of environmental stressors, including extreme temperatures, lack of water, and radiation. Their ability to withstand these harsh conditions is attributed to a process called cryptobiosis [11]. The field of tardigrade research has gained increasing attention due to their remarkable survival mechanisms and their potential applications in various scientific and industrial fields. Studying the ultrastructure of tardigrades when exposed to pharmaceuticals or other stressors can provide insights into the mechanisms by which these organisms cope with adverse conditions. This study investigated the effect of short- and long-term exposure to ibuprofen on the ultrastructure of the storage cells of *Paramacrobiotus experimentalis* Kaczmarek, Mioduchowska, Poprawa, Roszkowska 2020 (Tardigrada, Eutardigrada). Storage cells are found either free floating in the body cavity fluid or attached to the basement membranes of internal organs. Their primary function is to accumulate reserve materials, which can be used during times of stress or unfavorable environmental conditions [11–15].

We also investigated the effect of ibuprofen on the process of anhydrobiosis of *Pam. experimentalis*. This adaptation allows certain organisms, such as tardigrades and nematodes, to survive near-complete dehydration by suspending their metabolic processes. During anhydrobiosis, these organisms lose most of their body water. When conditions become favorable again, these organisms can rehydrate and resume their normal life processes [16–20].

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Research was conducted using *Paramacrobiotus experimentalis* (Tardigrada, Eutardigrada, Macrobiotidae), a predatory and gonochoric species. They lay ornamented eggs freely in their environment. The bodies of these animals are transparent or white [21]. They were collected in 2013 from moss samples in eastern Madagascar, specifically in the Toamasina and Antananarivo provinces. The specimens were generously provided by Professor Łukasz Kaczmarek from Adam Mickiewicz University in Poznań, Poland. To create suitable conditions, the animals were cultured in plastic Petri dishes with a textured bottom. They were placed in a mixture of Żywiec Zdrój mineral water and distilled water in a 1:3 ratio. The temperature was maintained at 19 °C, and they were subjected to a 12 h light and 12 h dark cycle. As for their diet, they were nourished with rotifers (*Lecane inermis*), with the addition of algae (*Chlorella* sp. and *Chlorococcum* sp.) to their culture.

2.2. Methods

2.2.1. Experiment

The specimens were divided into ten groups, consisting of four control groups and six experimental groups (see Table 1). Each group of 50 animals was cultured in 12-well plates with a textured bottom. The total amount of solution added to one well was 3000 µL. The PeC control group was cultured in the culture medium, as previously described in Section 2.1. The control groups PeC0, PeC7, and PeC28 were also cultured in the culture medium, but with the addition of 1 mL of ethanol per liter of the medium. This step was necessary because, in the experimental groups, ibuprofen was dissolved in 1 mL of ethanol before being introduced to the medium. It is worth noting that ibuprofen is more soluble in ethanol than in water. These control groups were instrumental in eliminating any varia-

61:6239636304

tions caused by the presence of ethanol in the culture medium and those triggered by the aging of the animals. The experimental groups consisted of specimens cultured in 12-well plates with a culture medium enriched with ibuprofen. Three concentrations of ibuprofen were utilized in our research: two environmental concentrations, i.e., 0.1 µg/L [22] and 16.8 µg/L [23], and a higher concentration (1 mg/L). For each concentration, the experiments were conducted at two different exposure times: 7 days and 28 days (see Table 1). Importantly, neither the ibuprofen concentrations nor the exposure durations increased the mortality of the animals.

Table 1. Control and experimental groups.

PeC	specimens cultured in the culture medium
PeC0	specimens cultured in the culture medium with the addition of 1 mL of ethanol per liter of medium
PeC7	specimens cultured 7 days in the culture medium with the addition of 1 mL of ethanol per liter of medium
PeC28	specimens cultured 28 days in the culture medium with the addition of 1 mL of ethanol per liter of medium
Ib1a	specimens cultured in ibuprofen at a concentration of 0.1 µg/L for 7 days
Ib1b	specimens cultured in ibuprofen at a concentration of 16.8 µg/L for 7 days
Ib1c	specimens cultured in ibuprofen at a concentration of 1 mg/L for 7 days
Ib2a	specimens cultured in ibuprofen at a concentration of 0.1 µg/L for 28 days
Ib2b	specimens cultured in ibuprofen at a concentration of 16.8 µg/L for 28 days
Ib2c	specimens cultured in ibuprofen at a concentration of 1 mg/L for 28 days

2.2.2. Light and Transmission Electron Microscopy

The animals (Table 2) were fixed in 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for a period of seven days at 4 °C. Following this, they were rinsed three times, each time for 30 min in a 0.1 M phosphate buffer at room temperature (RT) and postfixed in 2% osmium tetroxide in a 0.1 M phosphate buffer for 2 h. The specimens were then rinsed again in a 0.1 M phosphate buffer three times, 10 min each. Next, they underwent dehydration in a graded series of ethanol (30, 50, 70, 90, 96, and 100% for 10 min, 2 × 10 min, 15 min, 15 min, 15 min, and 4 × 15 min, respectively). After dehydration, the material was incubated in a solution of 100% ethanol and acetone (1:1) for 15 min and washed twice in acetone, 10 min each. After that, the material was embedded in epoxy resin (Poly/Bed 812 Embedding Media/DMP-30 Kit, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA). Semi-thin sections (800 nm) were cut on a Leica UCT25 ultramicrotome, stained with 1% methylene blue in 1% borax, and analyzed using a light microscope, while ultra-thin sections (70 nm) were cut on a Leica EM UC7 ultramicrotome, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a transmission electron microscope (Hitachi H500 at 75 kV).

Table 2. The number of adult specimens of *Pam. experimentalis* for each method.

	Light and Transmission Electron Microscopy	**Confocal Microscopy**			**Induction and Recovery from Anhydrobiosis**
		TUNEL	**LysoTracker Red**	**DHE**	
PeC	20	10	10	10	24
PeC0	20	10	10	10	24
PeC7	20	10	10	10	24
PeC28	20	10	10	10	24
Ib1a	20	10	10	10	24
Ib1b	20	10	10	10	24
Ib1c	20	10	10	10	24
Ib2a	20	10	10	10	24
Ib2b	20	10	10	10	24
Ib2c	20	10	10	10	24

62:9627549451

2.2.3. Confocal Microscopy

TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase)—Detection of DNA Fragmentation during Apoptosis

The non-fixed specimens (Table 2) were submerged in a 0.1% sodium citrate solution that had been freshly prepared for a duration of 2 min while placed on ice. After the sodium citrate incubation, the specimens were carefully washed three times for 5 min each with TBS (Tris-buffered saline). Following the TBS washing steps, the specimens were subjected to a staining process using a TUNEL reaction mixture. Specifically, the In situ Cell Death Detection Kit TMR red from Roche Applied Science was utilized for this purpose. The staining occurred in darkness at 37 °C for 1 h. After this hour of staining, the specimens were once again washed with TBS, the three washes being repeated for 5 min each. Subsequently, the specimens were stained with a solution containing 1 µg/mL of DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole) (Invitrogen) in TBS. This staining lasted for 15 min at RT and was conducted in darkness. The DAPI-stained specimens were washed with TBS three more times, for 5 min each. To prepare them for microscopy, the specimens were mounted on microscopic slides and enclosed in a Vectashield medium. The final step involved the analysis of the specimens using an Olympus FluoView FV 1000 confocal microscope with a 60 x UPLSAPO lens. Excitation at 405 nm for DAPI dye and 570 nm for TMR red dye was provided by a diode laser 3000.

LysoTracker Red—Detection of Acidic Organelles

The non-fixed specimens (Table 2) were placed in a dark environment and immersed in a solution of 2.5 mM LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, L 7528, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 15 min. This incubation took place in TBS at a pH of 7.4 and RT. After the LysoTracker Red incubation, the specimens were rinsed with TBS, the three washes being repeated for 5 min each. Then, the material was stained with a solution containing 1 µg/mL of DAPI in TBS. This staining process was carried out for 15 min. Following the DAPI staining, the specimens were washed in TBS, the process being repeated three times for 5 min each. To prepare them for microscopy, the specimens were mounted on microscopic slides and enclosed in a Vectashield medium. The final step involved analysis of the specimens using an Olympus FluoView FV 1000 confocal microscope with a 60 UPLSAPO lens. Excitation at 405 nm (DAPI) and 570 nm (LysoTracker Red) was provided by a diode laser 3000.

Dihydroethidium (DHE) Analyzing Superoxide Levels (Differentiation of ROS+ and ROS− Cells)

The non-fixed specimens (Table 2) were treated with TBS containing 0.0025% Triton X100 at RT. Following this, the specimens were stained with a solution of 30 µM DHE (Chemodex), which was prepared from a 30 mM stock solution of DHE in DMSO. The staining process lasted for 15 min at RT in darkness. After the DHE staining, the specimens were washed with TBS, this step being repeated three times for 5 min each. Subsequently, the specimens were stained with a solution containing 1 µg/mL of DAPI in TBS. This staining procedure also took 15 min at RT in darkness. Following the DAPI staining, the specimens were washed with TBS, this step being repeated three times for 5 min each. To prepare them for microscopy, the specimens were mounted on microscopic slides and enclosed in a Vectashield medium. The final step involved the analysis of the specimens using an Olympus FluoView FV 1000 confocal microscope with a 60× UPLSAPO lens. Excitation at 405 nm (DAPI) and 561 nm (DHE) was provided by a diode laser 3000.

Induction and Recovery from Anhydrobiosis

Specimens of *Pam. experimentalis* (Table 2) were transferred with a small amount of medium (450 µL; a mixture of Żywiec Zdrój mineral water and distilled water; ratio 1:3) to plastic Petri dishes lined with laboratory filter paper. They were stored for 3 days at 19 °C in a 12 h light–12 h dark cycle as the individuals were allowed to dry slowly. Next, 3 mL

63:1028901308

of the culture medium was added to each Petri dish. Samples were transferred using an automatic pipette to a 24-well plate. The individuals were rehydrated, and their return to activity was observed after 24 h, 48 h, and 72 h. They were incubated for 3 days at 19 °C in a 12 h light–12 h dark cycle.

Statistical Analysis

The assessment of active individuals after rehydration at the 72 h mark was conducted using the ANOVA test. All statistical analyses were performed using Statistica version 13.0.

3. Results

3.1. Ultrastructural Changes in Storage Cells of Pam. experimentalis Exposed to Ibuprofen

3.1.1. Control Groups (PeC, PeC0, PeC7, PeC28)

Ultrastructural analysis of the control groups cultured in the medium containing ethanol (PeC0, PeC7, PeC28) and without ethanol (PeC) showed no differences. No differences due to aging were observed in the control groups (PeC0, PeC7, PeC28). Therefore, all control groups will be described together. The body cavity of tardigrades was filled with numerous storage cells (Figure 1A). The storage cells of tardigrades from control groups had an amoeboid shape (Figure 1B–D). These cells had a large, centrally located nucleus containing a heterogeneous nucleolus with a spongy structure (Figure 1B,D). Heterochromatin clumps surrounded the nucleolus. Numerous ribosomes and cell organelles including mitochondria with distinct cristae, cisterns of rough endoplasmic reticulum, and Golgi complexes were present in the cell cytoplasm (Figure 1B–D). Large numbers of spheres of reserve material were present in storage cells (Figure 1B–D). These spheres had various sizes and electron densities, which may reflect the different types of content.

3.1.2. Experimental Groups after 7 Days of Exposure to Ibuprofen: Ib1a (Ibuprofen Concentration 0.1 µg/L), Ib1b (Ibuprofen Concentration 16.8 µg/L), Ib1c (Ibuprofen Concentration 1 mg/L)

The shape of the storage cells of experimental group Ib1a (Figure 2A), Ib1b (Figure 2B), and Ib1c (Figure 2C,D) did not differ from the shape of cells in the control groups. The cell nuclei (Figure 2A,C,D) with heterogeneous nucleoli (Figure 2A,D) were positioned centrally within the cell. Compared to the control groups, no changes were observed in the ultrastructure of cell organelles (Figure 2A–D).

3.1.3. Experimental Group Ib2a (Ibuprofen Concentration 0.1 µg/L, 28 Days)

The storage cells had an amoeboid shape. The cell nucleus with nucleolus was observed in the central part of the cell (Figure 3A,B). Mitochondria, cisterns of rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes, and spheres of reserve material were present in the cell cytoplasm. An accumulation of electron-dense material was observed in the mitochondrial matrix of some mitochondria (Figure 3A,B). A few autophagic structures appeared in the cytoplasm (Figure 3B).

3.1.4. Experimental Group Ib2b (Ibuprofen Concentration 16.8 µg/L, 28 Days)

The shape of the storage cells did not differ from the shape of cells in the control groups. Storage cells showed a similar ultrastructure to cells from the Ib2a experimental group. The only difference was the increased number of autophagic structures in the cell cytoplasm (Figure 3C,D).

3.1.5. Experimental Group Ib2c (Ibuprofen Concentration 1 mg/L, 28 Days)

As in the control animals, the storage cells had an amoeboid shape. The cell nucleus was observed in the central part of the cell (Figure 3E,F). Some of the mitochondria had degenerated. The degenerated mitochondria were bloated, had lost their cristae, and their matrix had become electron-lucent (Figure 3E). The cisternae of the rough endoplasmic reticulum were also slightly bloated. Autophagic structures were observed in the cytoplasm

64:1629241043

of cells (Figure 3E,F). Moreover, the cytoplasm itself showed a heterogeneous structure, with some electron-lucent regions (Figure 3E,F).

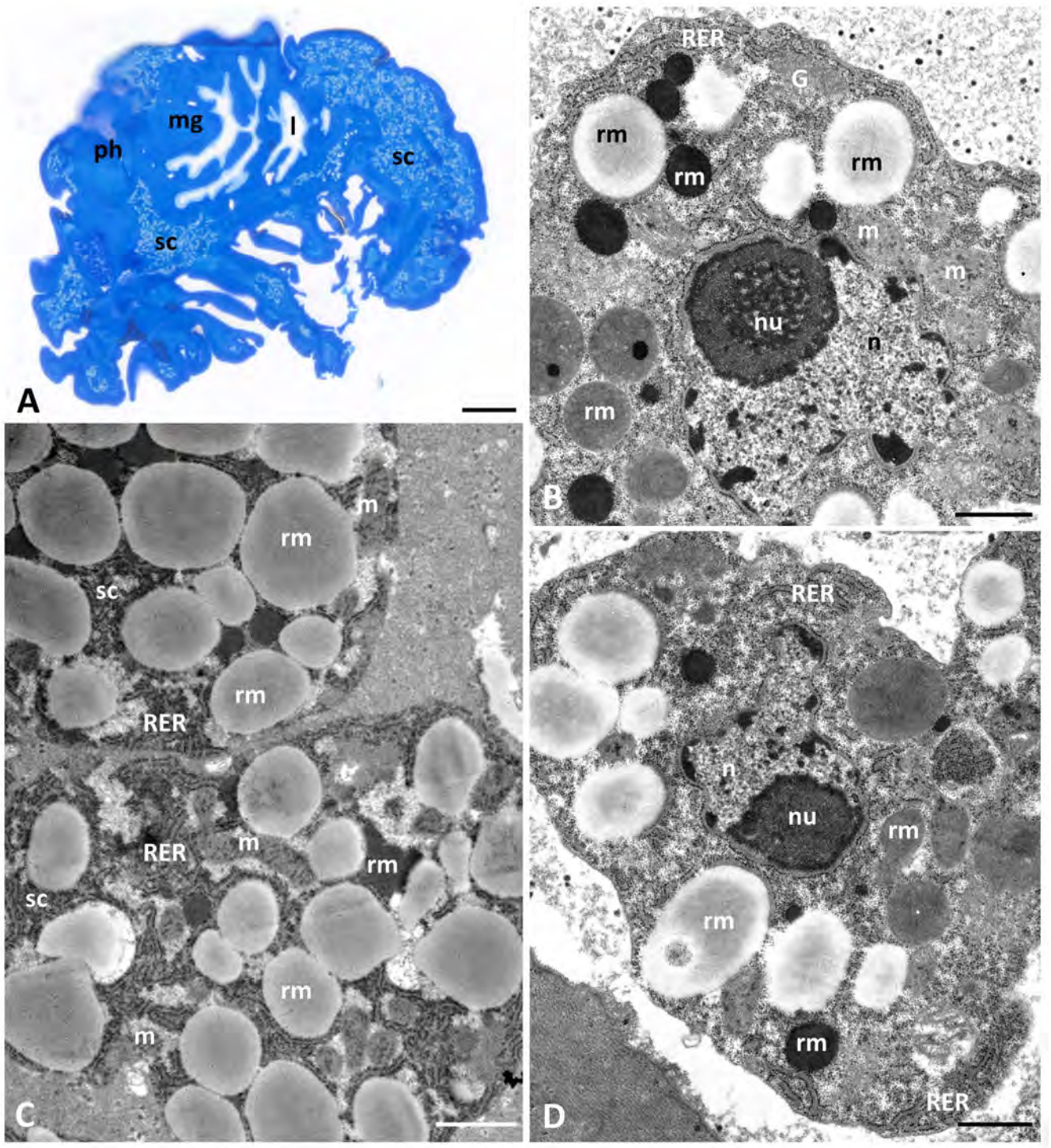


Figure 1. Storage cells of *Pam. experimentalis* in control groups—PeC, PeC0. PeC7, PeC28. (**A**) Localization of storage cells in the animal body, methylene blue staining, LM, scale = 20 μm; (**B**–**D**) Ultrastructure of storage cells in the control groups, TEM, scale = 1 μm. Abbreviations: storage cells (sc), Golgi complexes (G), midgut lumen (l), midgut (mg), mitochondrion (m), nucleus (n), nucleolus (nu), pharynx (ph), rough endoplasmic reticulum (RER), spheres of reserve material (rm).

65:4717401160

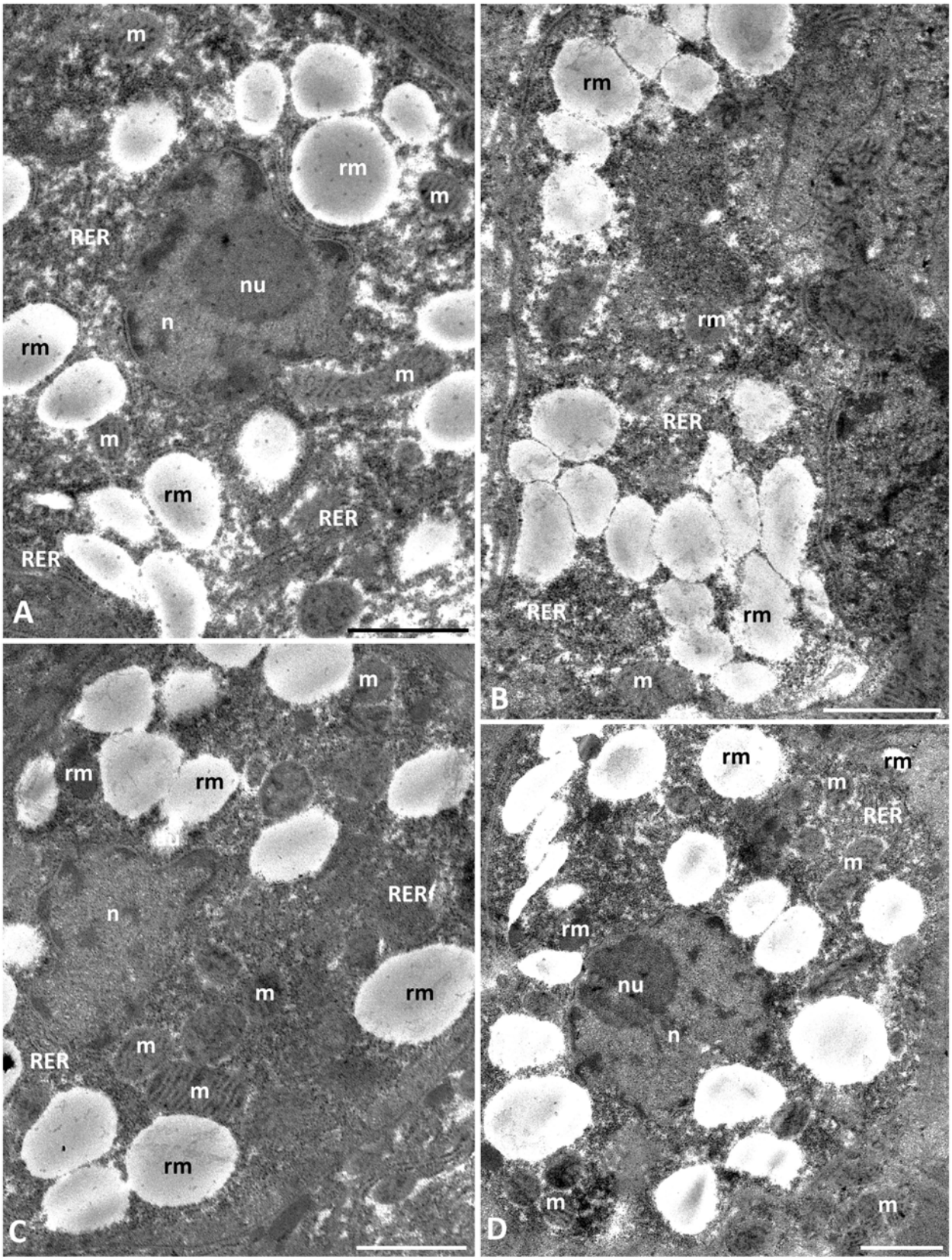


Figure 2. Ultrastructure of storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; (**A**) concentration of ibuprofen 0.1 µg/L—Ib1a, (**B**) 16.8 µg/L—Ib1b, and (**C**,**D**) 1 mg/L—Ib1c, TEM. (**A**) scale = 1 µm. Abbreviations: mitochondrion (m), nucleus (n), nucleolus (nu), rough endoplasmic reticulum (RER), spheres of reserve material (rm).

66:1081980092

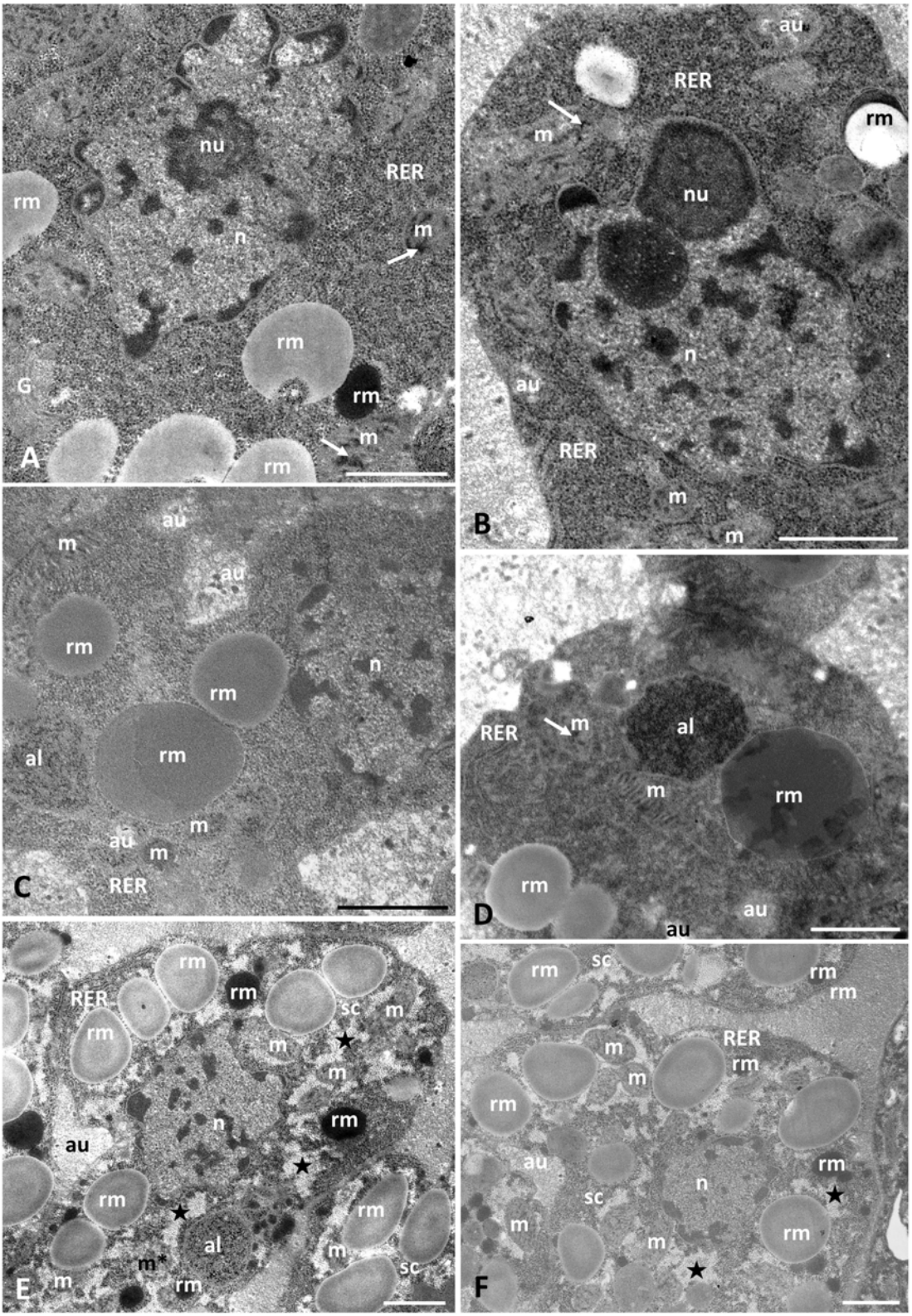


Figure 3. Ultrastructure of storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; (**A**,**B**) concentration of ibuprofen 0.1 µg/L—Ib1a, (**C**,**D**) 16.8 µg/L—Ib1b, and (**E**,**F**) 1 mg/L—Ib1c, TEM, scale = 1 µm. Abbreviations: storage cells (sc), mitochondrion (m), degenerating mitochondrion (m*), nucleus (n), nucleolus (nu), rough endoplasmic reticulum (RER), spheres of reserve material (rm), Golgi apparatus (G), autolysosome (al), autophagosome (au), accumulation of electron-dense material (arrow), electron-lucent regions of cytoplasm (star).

67:1210968754

3.2. Confocal Microscopy Analysis

3.2.1. ROS+/ROS− Cells in Storage Cells of *Pam. experimentalis* Exposed to Ibuprofen

The use of dihydroethidium (DHE) revealed weak signals in storage cells of the control groups (Figure 4A,E), as well as in experimental groups Ib1a, Ib1b (low concentrations of ibuprofen, incubation 7 days) (Figure 4B,C), and Ib2a (Figure 4F). Slightly stronger signals were observed in storage cells from the experimental groups Ib1c (Figure 4D), Ib2b, and Ib2c (Figure 4G–H).

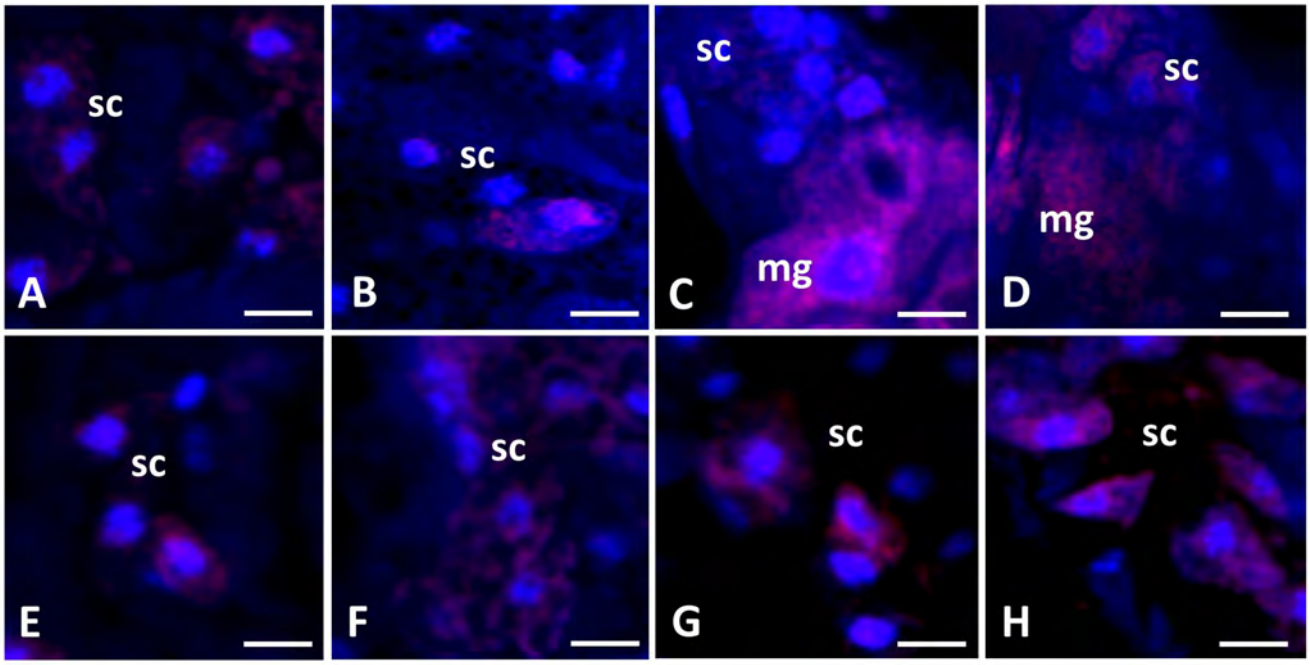


Figure 4. Storage cells of *Pam. experimentalis* stained with dihydroethidium (DHE) and DAPI, confocal microscopy. ROS-positive cells (red signals), nuclei (blue signals). (**A**,**E**) Storage cells of *Pam. experimentalis* in control groups; (**A**) PeC7 group; (**E**) PeC28 group; (**B**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L—Ib1a; (**C**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 16.8 µg/L—Ib1b; (**D**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L—Ib1c; (**F**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L—Ib2a; (**G**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 16.8 µg/L—Ib2b; (**H**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L—Ib2c, (**A**–**H**) scale = 4.71 µm. Abbreviations: midgut (mg), storage cells (sc).

3.2.2. Apoptosis in Storage Cells of *Pam. experimentalis* Exposed to Ibuprofen

Analysis using TUNEL showed no nuclear DNA fragmentation, which is a marker of cell apoptosis, in any of the control groups (Figure 5A,E). Also, no signals of DNA fragmentation were found in storage cells from the experimental groups (Figure 5B,C,F–H).

3.2.3. Autophagy in Storage Cells of *Pam. experimentalis* Exposed to Ibuprofen

Qualitative analysis using LysoTracker Red showed that signals from acidic organelles (autolysosomes, lysosomes) were comparable in control groups (Figure 6A,E) and in experimental groups (Ib1a, Ib1b, Ib1c) (Figure 6B–D) in which animals were treated with ibuprofen for seven days. After 28 days of treatment with ibuprofen (Ib2a, Ib2b, Ib2c), the emitted signals were much stronger (Figure 6F–H).

68:5856489799

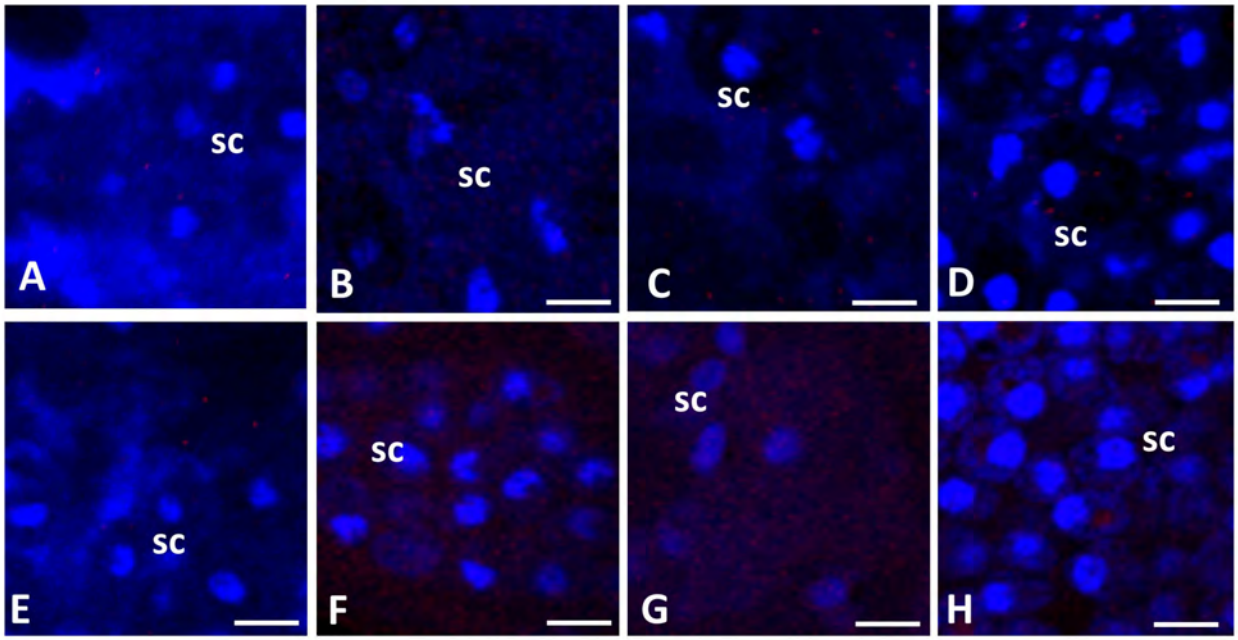


Figure 5. Storage cells of *Pam. experimentalis* stained with TUNEL assay and DAPI, confocal microscopy. Nuclei (blue signals), DNA fragmentation (red signals). (**A**,**E**) Storage cells of *Pam. experimentalis* in control groups; (**A**) PeC7 group; (**E**) PeC28 group; (**B**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L—Ib1a; (**C**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 16.8 µg/L—Ib1b; (**D**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L—Ib1c; (**F**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L—Ib2a; (**G**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 16.8 µg/L—Ib2b; (**H**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L—Ib2c, (**A**–**H**) scale = 4.71 µm. Abbreviations: storage cells (sc).

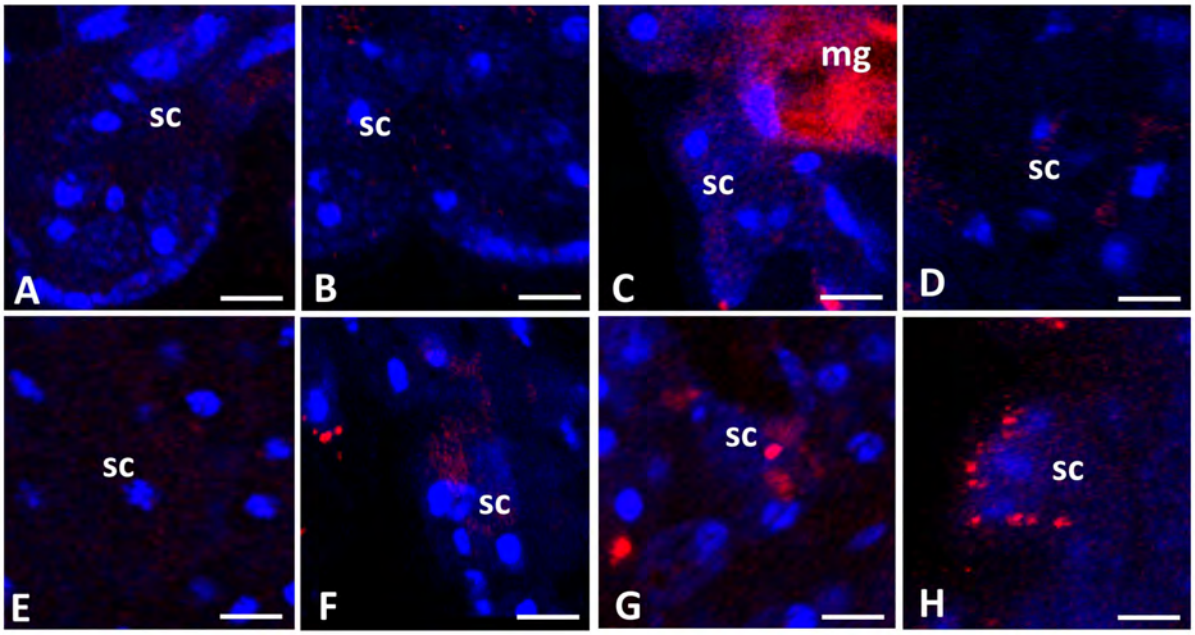


Figure 6. Storage cells of *Pam. experimentalis* stained with LysoTracker Red and DAPI, confocal microscopy. Nuclei (blue signals), acidic organelles (red signals). (**A**,**E**) Storage cells of *Pam. experimentalis* in control groups; (**A**) PeC7 group; (**E**) PeC28 group; (**B**) storage cells of *Pam. experimentalis*

69:2857614164

treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L—Ib1a; (**C**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 16.8 µg/L—Ib1b; (**D**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 7 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L—Ib1c; (**F**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 0.1 µg/L—Ib2a; (**G**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 16.8 µg/L—Ib2b; (**H**) storage cells of *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen for 28 days; concentration of ibuprofen 1 mg/L—Ib2c, (**A**–**H**) scale = 4.71 µm. Abbreviations: storage cells (sc), midgut (mg).

3.3. Recovery from Anhydrobiosis Analysis

The analysis of the ability of individuals to recover from anhydrobiosis to have an active life did not show any significant difference between the experimental and control groups (Figure 7).

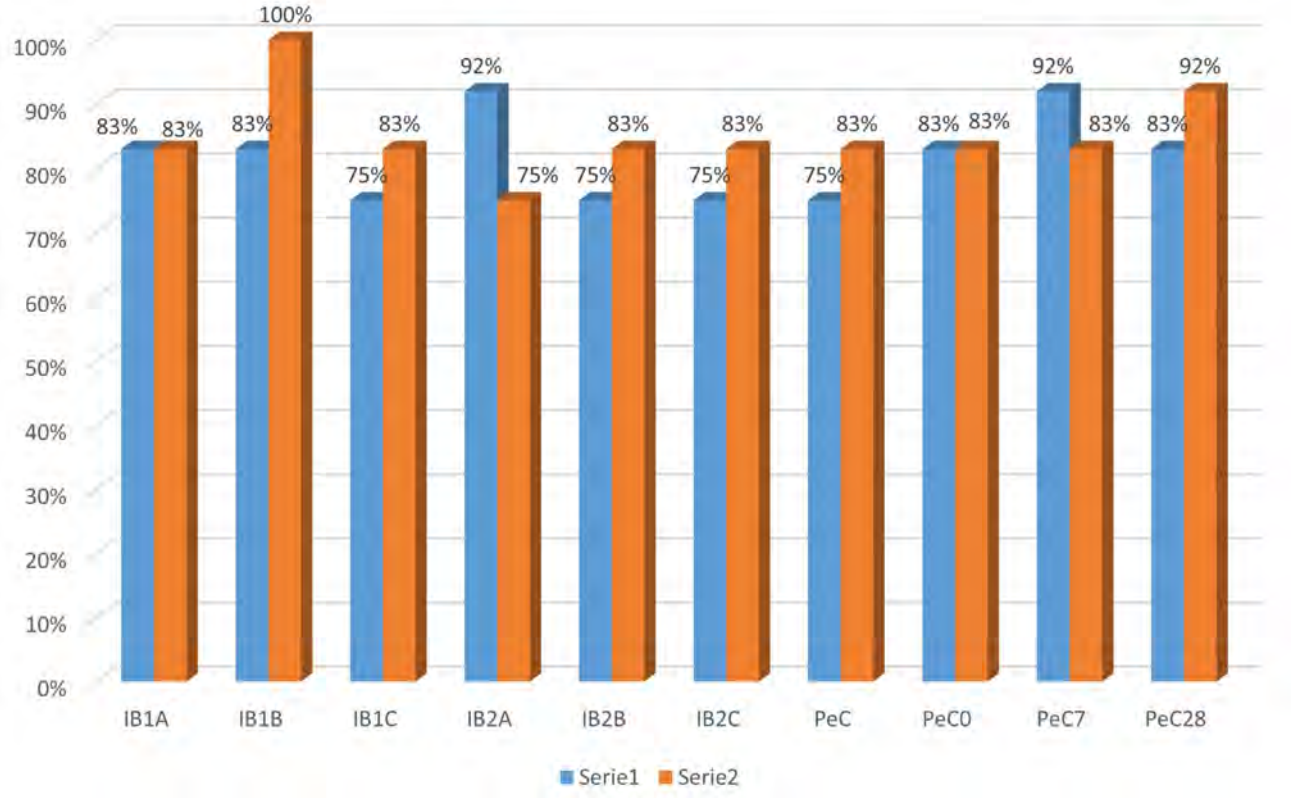


Figure 7. Graphical representation of anhydrobiosis survival rate of *Paramacrobiotus experimentalis* 72 h after rehydration in experimental control groups.

4. Discussion

The contamination of NSAIDs extends beyond surface waters to include groundwater and, infrequently, drinking water [6]. Ibuprofen has been identified in surface waters, groundwater, and tap water on a global scale, with a maximum measured environmental concentration of 303 µg/L [22].

Studies on the toxicity of ibuprofen towards water organisms have been conducted on various aquatic invertebrates, including *Daphnia magna* [24–27], *Hydra vulgaris* [28], and *Dreissena polymorpha* [29]. Additionally, the toxicity of ibuprofen has been explored in vertebrates such as the fishes *Rhamdia quelen* [30] and *Oryzias latipes* [31]. These investigations have mainly focused on the effects of ibuprofen on parameters such as mortality, growth, or reproduction. Notably, the existing literature lacks data on ultrastructural changes in invertebrate cells treated with ibuprofen. Interestingly, there are no data on the effect of

70:7266297142

ibuprofen on tardigrades, organisms that are famous for their resistance to environmental stressors. The only data that can be found concern the effect of paracetamol on the storage cells of *Hypsibius exemplaris* [32].

Tardigrades are tiny invertebrate animals that need at least a thin layer of water to live actively [11]. They lack a conventionally structured respiratory system, leading to gas exchange happening through their body wall. The circulatory system's function is assumed by the fluid that fills the body cavity, accompanied by storage cells submerged within it, moving freely. The animal's motions induce the fluid and storage cells to move unrestrictedly, resulting in the occupation of available spaces around internal organs. Additionally, storage cells have the ability to affix themselves to the basement membranes of internal organs and the epidermis. Storage cells serve the role of gathering reserve materials, including lipids, peptides, and polysaccharides. These cells act as an energy reservoir essential for the animals to enter the state of cryptobiosis (also known as latent or hidden life) [13,14,33,34]. Another function is that in certain species, storage cells have the ability to synthesize vitellogenin precursors. These precursors are then conveyed to the ovary, where they accumulate in the oocyte [13,35]. In the context of the accumulation of reserve materials and the synthesis of vitellogenin precursors, storage cells perform a function similar to that of the fat body cells in arthropods. This comparison suggests that, similarly to the role of fat body cells in arthropods, storage cells contribute to the storage and synthesis of essential materials, playing a crucial part in the reproductive and physiological processes of the organism [36].

The present research findings indicated that ibuprofen induced alterations in the ultrastructure of storage cells in *Pam. experimentalis*. The extent of these changes varied and was influenced by both the concentration of ibuprofen and the duration of exposure to the stressor. This suggests a concentration- and time-dependent relationship between ibuprofen exposure and the observed ultrastructural modifications in the storage cells of *Pam. experimentalis*.

The short-term experiment (7 days) showed that the storage cells of tardigrades treated with ibuprofen at all studied concentrations showed no ultrastructural changes compared to the storage cells of animals from the control groups. However, long-term incubation with this pharmaceutical lasting 28 days showed the appearance of autophagic structures in the cytoplasm of storage cells. This was also confirmed by the experiment using LysoTracker Red. However, there was no increased level of oxidative stress or nuclear DNA fragmentation (which is a marker of cell apoptosis) in any of the research groups. Additionally, single mitochondria degenerated and the cisternae of the rough endoplasmic reticulum exhibited slight swelling.

The median lethal concentration (LC_{50}) of the tested species for 24 h exposure is 282 mg/L. Our previous study on *Pam. experimentalis* revealed that ibuprofen induced changes at the ultrastructural level in the digestive cells of the midgut [37]. The studies were conducted at identical concentrations and incubation times. Similarly to the storage cells of this species, short-term exposure of digestive cells to concentrations of 0.1 µg/L and 16.8 µg/L did not show significant changes in digestive cells compared to control groups. However, exposure to a concentration of 1 mg/L for the same duration revealed alterations in the mitochondria's ultrastructure and autophagy intensification, while no changes were observed in storage cells. Moreover, at all three tested concentrations (0.1 µg/L, 16.8 µg/L, 1 mg/L) during long-term incubation, similar changes to those presented in storage cells were observed, including degenerated mitochondria and the presence of autophagosomes and autolysosomes in the cytoplasm of digestive cells [37]. Interestingly, regenerative cells that have no contact with the midgut lumen did not show any changes regardless of the concentration of ibuprofen and the length of incubation. The lack of changes in regenerative cells and storage bodies after short-term exposure to ibuprofen and slight changes in storage bodies after long-term exposure to the stressor may indicate a protective role of the midgut. It probably acts as a barrier against the stressor, protecting its regenerative and body cavity cells (storage cells).

The presence of autophagosomes and autolysosomes serves as evidence for the heightened activity of autophagy. Autophagy is now recognized as a mechanism that safeguards cells from dying. This process is prevalent in eukaryotic cells and is employed to break down damaged or unnecessary intracellular proteins and organelles. It can also be triggered in response to various adverse factors, such as pathogen infection, oxidative stress, or exposure to toxins [20,32,38–42]. In instances of autophagy induced by starvation, reserve materials amass in the cytoplasm of the cells of the animal. This phenomenon can be triggered by environmental factors such as a scarcity of food, molting, or hibernation [34,43]. During these conditions, the autophagic process allows the organism to utilize accumulated reserve materials as a source of energy or essential nutrients, facilitating survival in the face of limited external resources. *Pam. experimentalis* treated with ibuprofen intensified the process of autophagy. It is suggested that autophagy plays a role in mitigating the toxic effects of this substance by eliminating damaged cell organelles. Similar observations of autophagy have been reported in the digestive cells of the midgut of *Grevenius granulifer* (formerly *Isohypsibius granulifer granulifer*—see Gąsiorek et al., 2019) infected with microsporidia [44]. In that instance, both pathogens and damaged organelles were effectively removed from the cell [38]. The appearance of autophagic structures and the consequent escalation of autophagy triggered by pharmaceuticals have been documented in the storage cells of the tardigrade *Hys. exemplaris* when exposed to paracetamol. The autophagic activity was found to be correlated with both the concentration of the drug and the duration of incubation [32]. The same process has been observed in the cytoplasm of trophocytes in *Grevenius granulifer*, specifically during late choriogenesis when they are being detached from the oocyte. In this scenario, the augmentation of autophagy has been noted to guide the cell toward the pathway of apoptosis [45].

The presence of excessive autophagosomes and autolysosomes in cells has been associated with the initiation of cell death through apoptosis [38,43]. This suggests that an accumulation of these autophagic structures can lead to the demise of the cells. Apoptosis may serve as a mechanism to maintain homeostasis in multicellular organisms, particularly when it is coordinated with the proliferation of new cells [46]. In this way, the removal of aged or damaged cells through apoptosis contributes to the overall balance and functionality of the organism. In the process of apoptosis, the cell shrinks, and structural alterations occur in organelles such as the endoplasmic reticulum, Golgi complexes, and mitochondria. Subsequently, apoptotic bodies are formed [45]. Typically, they contain cellular fragments and organelles. The coordination of processes of autophagy and apoptosis has been documented in various organisms, including ovarian nurse cells of *Drosophila virilis* [47] and the midgut epithelium, salivary glands, and gonads of *Lithobius forficatus* [20,40,41]. These studies highlight the widespread occurrence of interactions between autophagy and apoptosis in various tissues and organisms, underscoring the importance of these processes in cellular homeostasis and development.

These processes are influenced by various factors, including the presence of reactive oxygen species (ROS). They can affect apoptosis in both pathological and physiological conditions. Reactive oxygen species exert a damaging effect on cellular components, including DNA and proteins [48]. The role of ROS in apoptosis highlights their dual nature, acting as essential signaling molecules in physiological processes while also contributing to cellular damage under certain conditions. Our study showed that in *Pam. experimentalis*, the level of free radicals increased in storage cells treated with various concentrations of ibuprofen for 28 days and in cells treated with ibuprofen at a concentration of 1 mg/L for seven days. A similar situation was observed in the digestive cells of this species [37]. Research on *Neocaridina davidi* shrimp indicated that long-term starvation led to an increase in ROS concentration in both the intestine and liver. When re-feeding occurred, there was a reduction in ROS concentration [49]. The antimicrobial properties of reactive oxygen species find support in their production in the midgut of *Drosophila melanogaster* when the organism faces a bacterial challenge [50].

72:1066296939

Cryptobiosis (also known as latent or hidden life) is a state of life entered by an organism in response to adverse environmental conditions [51]. Anhydrobiosis is a form of cryptobiosis induced by desiccation. In this state, organisms undergo extreme dehydration, exhibiting almost no signs of metabolic activity. However, they retain the capacity to revive and resume life once rehydration occurs [18,52]. Regarding tardigrades, their anhydrobiotic capabilities show considerable diversity among different species. A study showed that the carnivorous *Milnesium inceptum* has greater survivability in anhydrobiosis compared to the herbivorous *Ramazzottius subanomalus*. Interestingly, despite this difference in anhydrobiotic abilities, both species are frequently found coexisting in the same habitat [53]. *Pam. experimentalis* also has the ability to undergo anhydrobiosis [54].

Storage cells play a crucial role in anhydrobiosis. These cells are instrumental in accumulating and storing substances that support the survival of an organism during the extreme conditions of dehydration. The stored materials provide essential resources for the organism to maintain metabolic functions and facilitate recovery upon rehydration, contributing to the overall success of anhydrobiosis. It was demonstrated that the DNA in the storage cells of the tardigrade *Milnesium tardigradum* was effectively protected during the transition from the active to the anhydrobiotic state. However, as the anhydrobiotic phase extended, an increase in DNA damage within these cells was observed [55]. In several species of tardigrades, a reduction in storage cell size after anhydrobiosis was found, suggesting that the energy demands of entering and exiting the dehydrated state utilized the stored material [14].

Research on the species *Pam. experimentalis* revealed that the recovery from anhydrobiosis is influenced by several factors. These include age, the combination of the number and duration of anhydrobiosis episodes, and the presence of other individuals [56]. The current study demonstrated that none of the tested concentrations of ibuprofen had a significant impact on the recovery from anhydrobiosis of *Pam. experimentalis*. This lack of impact was observed across both short and long incubation periods. The absence of changes in the ultrastructure of storage cells in short-term incubation, as well as slight changes in the long-term experiment, suggests a lack of significant damage leading to cell death. This observation hints at the potential protective role of structures such as the midgut and body wall, which may act as barriers against the stressor, in this case, ibuprofen.

Our research has raised further questions: (1) Are there ultrastructural changes in epidermal cells, or does the cuticle provide protection against the impact of ibuprofen? (2) Do gonadal somatic cells exhibit a similar response to ibuprofen as storage cells? Addressing these questions will contribute to a more comprehensive understanding of how ibuprofen affects the biology of *Pam. experimentalis*, shedding light on the different impacts on various cell types and the potential protective mechanisms in place.

Author Contributions: Conceptualization, I.P. and A.M.; Methodology, A.M. and I.P.; Validation, I.P. and S.S.; Investigation, A.M., F.W. and I.P.; Resources, A.M.; Data Curation, A.M. and I.P.; Writing—Original Draft Preparation, A.M., F.W. and I.P.; Writing—Review and Editing, A.M. and I.P.; Visualization, A.M., F.W. and S.S.; Supervision, I.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are presented within the paper.

Acknowledgments: We are very grateful to Danuta Urbańska-Jasik, Łukasz Chajec and Kamil Janelt (University of Silesia in Katowice, Poland) for their technical assistance. We would like to thank Edyta Fiałkowska (Jagiellonian University in Kraków, Poland) for providing rotifers for tardigrade culture.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Boxall, A.B.; Rudd, M.A.; Brooks, B.W.; Caldwell, D.J.; Choi, K.; Hickmann, S.; Innes, E.; Ostapyk, K.; Staveley, J.P.; Verslycke, T.; et al. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: What are the big questions? *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, 1221–1229. [CrossRef]
2. Fent, K.; Weston, A.A.; Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76*, 122–159. [CrossRef] [PubMed]
3. Szymonik, A.; Lach, J. Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych. *Inżynieria i Ochrona Środowiska* **2012**, *15*, 249–263.
4. Nikolaou, A.; Meric, S.; Fatta, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1225–1234. [CrossRef] [PubMed]
5. Harshkova, D.; Aksmann, A. Zanieczyszczenie środowiska niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi na przykładzie diklofenaku? Przyczyny, skutki, bioindykacja. *Kosmos* **2019**, *68*, 185–194. [CrossRef]
6. Parolini, M. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Sci. Total Environ.* **2020**, *740*, 140043. [CrossRef]
7. Karaźniewicz, M. Czterdzieści lat doświadczeń stosowania ibuprofenu w lecznictwie. *Nowiny Lekarskie* **2007**, *76*, 195–197.
8. Bushra, R.; Aslam, N. An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. *Oman Med. J.* **2010**, *25*, 155. [CrossRef]
9. Stanley-Samuelson, D.W. Physiological roles of prostaglandins and other eicosanoids in invertebrates. *Biol. Bull.* **1987**, *173*, 92–109. [CrossRef]
10. Batucan, N.S.P.; Tremblay, L.A.; Northcott, G.L.; Matthaei, C.D. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environ. Adv.* **2022**, *7*, 100164. [CrossRef]
11. Nelson, D.R.; Guidetti, R.; Rebecchi, L. Phylum Tardigrada. In *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*, 4th ed.; Thorp, J.H., Rogers, D.C., Eds.; Elsevier: London, UK, 2015; Volume 1, pp. 347–380.
12. Węglarska, B. Studies on the morphology of *Macrobiotus richtersi* Murray, 1911. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* **1975**, *32*, 445–464.
13. Poprawa, I. Ultrastructural changes of the storage cells during oogenesis in *Dactylobiotus dispar* (Murray, 1907) (Tardigrada: Eutardigrada). *Zool. Pol.* **2006**, *51*, 13–18.
14. Reuner, A.; Hengherr, S.; Brümmer, F.; Schill, R.O. Comparative studies on storage cells in tardigrades during starvation and anhydrobiosis. *Curr. Zool.* **2010**, *56*, 259–263. [CrossRef]
15. Czerneková, M.; Janelt, K.; Student, S.; Jönsson, K.I.; Poprawa, I. A comparative ultrastructure study of storage cells in the eutardigrade *Richtersius coronifer* in the hydrated state and after desiccation and heating stress. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0201430. [CrossRef]
16. Crowe, J.H.; Madin, K.A. Anhydrobiosis in tardigrades and nematodes. *Trans. Am. Micros. Soc.* **1974**, *93*, 513–524. [CrossRef]
17. Hengherr, S.; Brümmer, F.; Schill, R.O. Anhydrobiosis in tardigrades and its effects on longevity traits. *J. Zool.* **2008**, *275*, 216–220. [CrossRef]
18. Wełnicz, W.; Grohme, M.A.; Kaczmarek, Ł.; Schill, R.O.; Frohme, M. Anhydrobiosis in tardigrades—The last decade. *J. Insect Physiol.* **2011**, *57*, 577–583. [CrossRef]
19. Kaczmarek, Ł.; Roszkowska, M.; Fontaneto, D.; Jezierska, M.; Pietrzak, B.; Wieczorek, R.; Poprawa, I.; Kosicki, J.Z.; Karachitos, A.; Kmita, H. Staying young and fit? Ontogenetic and phylogenetic consequences of animal anhydrobiosis. *J. Zool.* **2019**, *309*, 1–11. [CrossRef]
20. Poprawa, I.; Chajec, Ł.; Chachulska-Żymełka, A.; Wilczek, G.; Student, S.; Leśniewska, M.; Rost-Roszkowska, M. Ovaries and testes of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda) react differently to the presence of cadmium in the environment. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 6705. [CrossRef]
21. Kaczmarek, Ł.; Roszkowska, M.; Poprawa, I.; Janelt, K.; Kmita, H.; Gawlak, M.; Fiałkowska, E.; Mioduchowska, M. Integrative description of bisexual *Paramacrobiotus experimentalis* sp. nov. (Macrobiotidae) from republic of Madagascar (Africa) with microbiome analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2020**, *145*, 106730. [CrossRef]
22. aus der Beek, T.; Weber, F.A.; Bergmann, A.; Hickmann, S.; Ebert, I.; Hein, A.; Küster, A. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, *35*, 823–835. [CrossRef]
23. Mrowiec, B. Farmaceutyki–zagrożenie środowiska wodnego. *Edukacja Biologiczna i Środowiskowa* **2015**, *4*, 25–33.
24. Heckmann, L.H.; Connon, R.; Hutchinson, T.H.; Maund, S.J.; Sibly, R.M.; Callaghan, A. Expression of target and reference genes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *BMC Genom.* **2006**, *7*, 175. [CrossRef]
25. Heckmann, L.H.; Callaghan, A.; Hooper, H.L.; Connon, R.; Hutchinson, T.H.; Maund, S.J.; Sibly, R.M. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicol. Lett.* **2007**, *172*, 137–145. [CrossRef]
26. Hayashi, Y.; Heckmann, L.H.; Callaghan, A.; Sibly, R.M. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 246–251. [CrossRef]
27. Gómez-Oliván, L.M.; Galar-Martínez, M.; García-Medina, S.; Valdés-Alanís, A.; Islas-Flores, H.; Neri-Cruz, N. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.* **2014**, *37*, 391–399. [CrossRef]

74:9958871907

28. Pascoe, D.; Karntanut, W.; Müller, C.T. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* **2003**, *51*, 521–528. [CrossRef]
29. Parolini, M.; Binelli, A.; Provini, A. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2011**, *74*, 1586–1594. [CrossRef]
30. Mathias, F.T.; Fockink, D.H.; Disner, G.R.; Prodocimo, V.; Ribas, J.L.C.; Ramos, L.P.; Cestari, M.M.; de Assis, H.C.S. Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *59*, 105–113. [CrossRef]
31. Flippin, J.L.; Huggett, D.; Foran, C.M. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* **2007**, *81*, 73–78. [CrossRef]
32. Wieczorkiewicz, F.; Sojka, J.; Poprawa, I. Effect of paracetamol on the storage cells of *Hypsibius exemplaris*—Ultrastructural analysis. *Zool. J. Linn. Soc.* **2024**, *200*, 258–268. [CrossRef]
33. Jönsson, K.I.; Rebecchi, L. Experimentally induced anhydrobiosis in the tardigrade *Richtersius coronifer: Phenotypic* factors affecting survival. *J. Exp. Zool.* **2002**, *293*, 578–584. [CrossRef]
34. Hyra, M.; Rost-Roszkowska, M.M.; Student, S.; Włodarczyk, A.; Deperas, M.; Janelt, K.; Poprawa, I. Body cavity cells of Parachela during their active life. *Zool. J. Linn. Soc.* **2016**, *178*, 878–887. [CrossRef]
35. Hyra, M.; Poprawa, I.; Włodarczyk, A.; Student, S.; Sonakowska, L.; Kszuk-Jendrysik, M.; Rost-Roszkowska, M.M. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840) (Tardigrada, Eutardigrada, Hypsibiidae) in relation to oogenesis. *Zool. J. Linn. Soc.* **2016**, *178*, 897–906. [CrossRef]
36. Kamińska, K.; Lipovšek, S.; Kaszuba, F.; Rost-Roszkowska, M. Ultrastructure of the fat body in the soil centipedes *Lithobius forficatus* (Lithobiidae) and Geophilus flavus (Geophilidae) according to their seasonal rhythms. *Zool. Anz.* **2019**, *279*, 82–93. [CrossRef]
37. Miernik, A.; Student, S.; Fiałkowska, E.; Poprawa, I. Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* responds to the effects of ibuprofen. *Eur. Zool. J.* 2023, *under review*.
38. Rost-Roszkowska, M.M.; Poprawa, I.; Kaczmarek, Ł. Autophagy as the cell survival in response to a microsporidian infection of the midgut epithelium of *Isohypsibius granulifer granulifer* (Eutardigrada: Hypsibiidae). *Acta Zool.* **2013**, *94*, 273–279. [CrossRef]
39. Yin, Z.; Pascual, C.; Klionsky, D.J. Autophagy: Machinery and regulation. *Microbial Cell.* **2016**, *3*, 588. [CrossRef]
40. Rost-Roszkowska, M.M.; Vilimova, J.; Sosinka, A.; Skudlik, J.; Franzetti, E. The role of autophagy in the midgut epithelium of *Eubranchipus grubii* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). *Arthropod Struct. Dev.* **2012**, *41*, 271–279. [CrossRef]
41. Włodarczyk, A.; Student, S.; Rost-Roszkowska, M. Autophagy and apoptosis in starved and refed *Neocaridina davidi* (Crustacea Malacostraca) midgut. *Can. J. Zool.* **2019**, *97*, 294–303. [CrossRef]
42. Ostróżka, A.; Tiffert, Z.; Wilczek, G.; Rost-Roszkowska, M. Can insecticide-free clean water regenerate the midgut epithelium of the freshwater shrimp after dimethoate treatment? *Micron* **2022**, *155*, 103162. [CrossRef]
43. Rost-Roszkowska, M.M.; Janelt, K.; Poprawa, I. The role of autophagy in the midgut epithelium of Parachela (Tardigrada). *Zoomorphology* **2018**, *137*, 501–509. [CrossRef]
44. Gąsiorek, P.; Stec, D.; Morek, W.; Michalczyk, Ł. An integrative redescription of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840), the nominal taxon for Hypsibioidea (Tardigrada: Eutardigrada). *Zootaxa* **2018**, *4415*, 45–75. [CrossRef]
45. Poprawa, I.; Hyra, M.; Kszuk-Jendrysik, M.; Rost-Roszkowska, M.M. Ultrastructural changes and programmed cell death of trophocytes in the gonad of *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Tardigrada, Eutardigrada, Isohypsibiidae). *Micron* **2015**, *70*, 26–33. [CrossRef]
46. Hetts, S.W. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *Jama* **1998**, *279*, 300–307. [CrossRef]
47. Velentzas, A.D.; Nezis, I.P.; Stravopodis, D.J.; Papassideri, I.S.; Margaritis, L.H. Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell death during *Drosophila virilis* oogenesis. *Autophagy* **2007**, *3*, 130–132. [CrossRef]
48. Simon, H.U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **2000**, *5*, 415–418. [CrossRef]
49. Włodarczyk, A.; Wilczek, G.; Wilczek, P.; Student, S.; Ostróżka, A.; Tarnawska, M.; Rost-Roszkowska, M. Relationship between ROS production, MnSOD activation and periods of fasting and re-feeding in freshwater shrimp Neocaridina davidi (Crustacea, Malacostraca). *PeerJ* **2019**, *7*, e7399. [CrossRef]
50. Chaitanya, R.K.; Shashank, K.; Sridevi, P. Oxidative stress in invertebrate systems. In *Free Radicals and Diseases*; Intech: Manchester, UK, 2016; Volume 19.
51. Keilin, D. The Leeuwenhoek Lecture-the problem of anabiosis or latent life: History and current concept. *Proc. Royal Soc.* **1959**, *150*, 149–191.
52. Alpert, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr. Comp. Biol.* **2005**, *45*, 685–695. [CrossRef]
53. Roszkowska, M.; Gołdyn, B.; Wojciechowska, D.; Kosicki, J.Z.; Fiałkowska, E.; Kmita, H.; Kaczmarek, Ł. Tolerance to anhydrobiotic conditions among two coexisting tardigrade species differing in life strategies. *Zool. Stud.* **2021**, *60*, e74. [PubMed]
54. Roszkowska, M.; Gołdyn, B.; Wojciechowska, D.; Księżkiewicz, Z.; Fiałkowska, E.; Pluskota, M.; Kmita, H.; Kaczmarek, Ł. How long can tardigrades survive in the anhydrobiotic state? A search for tardigrade anhydrobiosis patterns. *PLoS ONE* **2023**, *18*, e0270386. [CrossRef] [PubMed]

55. Neumann, S.; Reuner, A.; Brümmer, F.; Schill, R.O. DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2009**, *153*, 425–429. [CrossRef]
56. Nagwani, A.K.; Melosik, I.; Kaczmarek, Ł.; Kmita, H. Recovery from anhydrobiosis in the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*: Better to be young than old and in a group than alone. *bioRxiv* **2023**. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Zoological Journal of the Linnean Society, 2026, **00**(00), zlag098
https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlag098
Original Article

OXFORD

How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis?*

Aleksandra Miernik[1,2,*], Filip Wieczorkiewicz[1,2], Sebastian Student[3,4], Edyta Fiałkowska[5], Izabela Poprawa[1,*]

[1]Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Katowice 40-007, Poland
[2]Doctoral School, University of Silesia in Katowice, Katowice 40-007, Poland
[3]Department of Systems Biology and Engineering, Silesian University of Technology, Gliwice 44-100, Poland
[4]Biotechnology Center, Silesian University of Technology, Gliwice 44-100, Poland
[5]Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University, Kraków 30-387, Poland

*Corresponding authors. Aleksandra Miernik, Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Bankowa 9, Katowice 40-007, Poland. E-mail: aleksandra.miernik@us.edu.pl, Izabela Poprawa, Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Bankowa 9, Katowice 40-007, Poland. E-mail: izabela.poprawa@us.edu.pl

Abstract

***Paramacrobiotus experimentalis* is a gonochoric tardigrade species from Madagascar. The aim of this study was to investigate the effects of ibuprofen on the ovaries, survival, and reproduction of this species. Experimental material was analysed using light, confocal, and transmission electron microscopy. Three ibuprofen concentrations were tested: 0.1 µg/L (a level commonly detected in surface waters worldwide), 16.8 µg/L (typical for rivers in large urban areas), and 1 mg/L (an experimental concentration). The experiment included two exposure periods: short term (7 days) and long term (28 days). Our results showed that none of the tested concentrations affected survival or reproduction at either time point. However, increased oxidative stress was observed after long-term exposure to ibuprofen and after 1 week of incubation at the highest concentration. Ultrastructural analysis revealed endoplasmic reticulum swelling (at the highest concentration during both short- and long-term exposure) and mitochondrial degeneration (at the highest concentration after 28 days). Autophagy and apoptosis were not detected. The cells of the ovary wall were found to be most susceptible to the effects of ibuprofen. The ovary wall plays the role of a barrier protecting germline cells from the effects of stressors.**

Keywords non-steroidal anti-inflammatory drugs, oocyte, ovary wall, oxidative stress, trophocyte

Introduction

Many factors have contributed in recent years to the rapid increase in environmental pollution of various types by pharmaceuticals. Among others, these include widespread unregulated use of over-the-counter drugs, improper disposal practices by consumers and healthcare facilities, or ineffective removal of pharmaceutical residues by wastewater treatment plants (Fent *et al.* 2006, Larsson 2014, Ågerstrand *et al.* 2015, Ortúzar *et al.* 2022). A significant outcome of this issue is its negative influence on living organisms. Many different aspects of organisms' lives can be disrupted by pharmaceuticals, e.g. development, reproduction, fertility, or behaviour (Pascoe *et al.* 2003, Pomati *et al.* 2004, Heckmann *et al.* 2007, Hayashi *et al.* 2008, Hong *et al.* 2021, Medkova *et al.* 2022, Punginelli *et al.* 2024). The presence of pharmaceuticals and their metabolites can impact not only aquatic organisms but also disrupt the entire trophic chain (Parolini 2020).

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a significant group of pharmaceuticals found among environmental pollutants. Examples of these substances include ibuprofen, acetylsalicylic acid, diclofenac, and naproxen. These pharmaceuticals are frequently used as painkillers or to treat inflammatory disorders in both human and veterinary healthcare (Parolini 2020, Murali 2024, Drosopoulou *et al.* 2025,

Received: 24 October 2025. **Revised:** 27 April 2026. **Accepted:** 13 May 2026
© The Author(s) 2026. Published by Oxford University Press on behalf of The Linnean Society of London.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

77:1044336799

Perrone *et al.* 2025, Roberts *et al.* 2025). Many of these substances contain aromatic rings, which are resistant to degradation and therefore significantly extend the environmental half-life of NSAIDs, contributing to the problem of environmental pollution (Szymonik and Lach 2012). In recent years, there has been a search for new methods to remove such substances from the environment (Marchlewicz *et al.* 2016, 2017, 2023, Dzionek *et al.* 2018, 2024, Górny *et al.* 2019).

Ibuprofen is one of the most widely used drugs in this group due to its low cost and wide availability, as well as rapid effectiveness. The primary mechanism of this drug involves non-selective, reversible inhibition of the cyclooxygenase enzymes COX-1 and COX-2, which are responsible for the synthesis of prostaglandins (Moore 2003, 2007, Bushra and Aslam 2010, Rainsford 2013, Mazaleuskaya *et al.* 2015). Although this drug has been in use for decades, ongoing reports have highlighted its negative effects on various organisms (Heckmann *et al.* 2006, 2007, Flippin *et al.* 2007, Pounds *et al.* 2008, Parolini *et al.* 2011, Mathias *et al.* 2018). However, there are few studies on ultrastructural changes in invertebrate cells treated with ibuprofen.

Eicosanoids, including prostaglandins, are oxygenated metabolites of C20 polyunsaturated fatty acids in invertebrates and play an important role in immunity and host–parasite interactions. Cyclooxygenase inhibitors such as ibuprofen can impair insect reproduction and immune function by blocking prostaglandin synthesis (Rowley *et al.* 2005).

Tardigrades (commonly known also as water bears or moss piglets) are microscopic invertebrates that require a small amount of water for an active life. They are closely related to Onychophora and Arthropoda (Mayer *et al.* 2013). These animals inhabit a wide range of environments, including marine, freshwater, and terrestrial ecosystems. They are particularly common in mosses, lichens, and soil (Nelson *et al.* 2019). But they can also survive in extreme conditions such as deep oceans, polar regions, or deserts. They are capable of this due to cryptobiosis, a state in which an organism's metabolic activity drops to undetectable levels under unfavourable conditions as a survival mechanism. Depending on the type of stress, different forms of cryptobiosis can be distinguished: anhydrobiosis, triggered by lack of water; cryobiosis, induced by freezing; and anoxybiosis, caused by the lack of oxygen (Møbjerg *et al.* 2011, Carrero *et al.* 2019). The female reproductive system of Eutardigrada consists of a single ovary and one oviduct, which opens into the cloaca. The ovary is a sack-shaped structure located on the dorsal side of the body, attached to the body wall by two ligaments. It has two zones: the germarium and the vitellarium. The ovary contains oocytes, trophocytes (nurse cells), and ovary wall cells (Poprawa 2005, Poprawa *et al.* 2015a, b, Janelt *et al.* 2019, Poprawa and Janelt 2019, Jezierska *et al.* 2021, Poprawa *et al.* 2026). The ovary of *Paramacrobiotus experimentalis* Kaczmarek, Mioduchowska, Poprawa & Roszkowska, 2020 (Tardigrada, Eutardigrada) is typical for this class.

This study is focused on how short- and long-term exposure to ibuprofen affects the structure of the ovaries in *Pam. experimentalis*. Focusing on the ultrastructure of the ovary, we used light, confocal, and transmission electron microscopy, concentrating on aspects such as apoptosis, the presence of acidic organelles, and oxidative stress. In addition, *in vivo* studies were performed. In conclusion, this study highlights the ecological relevance of ibuprofen's effects on *Pam. experimentalis* and contributes to understanding the broader impact of pharmaceutical pollution in aquatic environments.

Materials and methods

Material

The species *Paramacrobiotus experimentalis* (Tardigrada, Eutardigrada, Macrobiotidae) used in this study is a gonochoric tardigrade that lays ornamented eggs directly into the environment. It is characterized by morphological dimorphism, particularly in body size differences between males and females. The original samples were collected in 2013 from mosses found in the eastern regions of Madagascar, specifically in the Toamasina and Antananarivo provinces. The animals were supplied by Professor Łukasz Kaczmarek of Adam Mickiewicz University in Poznań, Poland. They were maintained in plastic Petri dishes with a matted bottom, kept in a 1:3 mixture of Żywiec Zdrój mineral water and distilled water, and incubated at 19°C with a 12-hour light and 12-hour dark photoperiod. The specimens were fed rotifers (*Lecane inermis*) obtained from the culture collection of the Aquatic Ecosystems Team at the Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University in Kraków. Algae (*Chlorella* sp. and *Chlorococcum* sp.) were also added to the culture. Since the research was conducted exclusively on invertebrates, ethical committee approval was not required.

Methods

Experiments

The experiments included four control groups and six experimental groups (Table 1). The control group PeC was cultured in standard culture medium (see section Material). The rest of the control groups (PeC0, PeC7, PeC28) were cultured in medium supplemented with 1 mL of ethanol per litre, reflecting the preparation method used in the experimental groups, where ibuprofen was first dissolved in ethanol due to its higher solubility in ethanol compared to water. Six experimental groups were incubated under two different time periods (7 and 28 days) and exposed to three different concentrations of

Table 1 Control and experimental groups.

Sample name	Incubation time (days)	Ibuprofen concentration	Ethanol (1 ml/L)
PeC	–	–	–
PeC0	–	–	+
PeC7	7	–	+
PeC28	28	–	+
Ib1a	7	0.1 µg/L	+
Ib1b	7	16.8 µg/L	+
Ib1c	7	1 mg/L	+
Ib2a	28	0.1 µg/L	+
Ib2b	28	16.8 µg/L	+
Ib2c	28	1 mg/L	+

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

78:2481717336

ibuprofen: two environmental concentrations: 0.1 µg/L (Aus der Beek *et al.* 2016) and 16.8 µg/L (Mrowiec 2015), as well as a higher experimental concentration of 1 mg/L. For each group, 20 specimens were used for light and transmission electron microscopy, and 10 specimens per group were used for each confocal microscopy staining TUNEL, LysoTracker Red, and dihydroethidium (DHE).

Survival and reproduction

Control groups: PeC (specimens cultured in the culture medium), and PeC0 (specimens cultured in the culture medium with the addition of 1 mL of ethanol per litre of medium), as well as specimens of all experimental groups were cultured in 12-well plates with a matted bottom. Each group consisted of 10 adults: five females and five males (identified by physical characteristics). Groups were conducted in five independent experiments. The number of living individuals and those with visible oocytes in the gonad was monitored daily. Fresh medium containing dissolved ibuprofen was added to the experiment once a week, along with a portion of food (rotifers). Additionally, eggs laid by the individuals were regularly removed from the wells. In the experimental groups, solutions containing the appropriate ibuprofen concentration were added to ensure consistent exposure levels. Control groups were monitored daily for 7 and 28 days to match the incubation time of the experimental groups. Statistical analyses were performed using the Kruskal–Wallis test comparing each experimental group and the control group cultured in the culture medium with the addition of 1 mL of ethanol per litre of medium (PeC0) to the control group cultured in the culture medium (PeC).

Light and transmission electron microscopy

Specimens of *Pam. experimentalis* were fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution prepared in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for a period of 7 days at 4°C. The remaining steps of the procedure were carried out at room temperature. After that, the samples were rinsed three times with the same buffer, for 30 minutes each time, and postfixed in 2% osmium tetroxide in a 0.1 M phosphate buffer for 2 hours. Next, material underwent a second series of washes in phosphate buffer (three times, 10 minutes each), followed by dehydration through a graded ethanol series: 30% for 10 minutes, 50% for 2 × 10 minutes, 70% for 15 minutes, 90% for 15 minutes, 96% for 15 minutes, and 100% for 4 × 15 minutes. The material was then incubated in a solution of 100% ethanol and acetone (1:1) for 15 minutes, washed twice in acetone (10 minutes each). Next material was placed in a 1:1 mixture of acetone and epoxy resin and left to sit for 1.5 hours in closed Eppendorf tubes. After incubation, the Eppendorf tubes were opened and kept overnight so the acetone could evaporate. Specimens were embedded in epoxy resin the next day using an Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma). Sections, 800 nm thick, were sliced on a Leica UCT25 ultramicrotome, stained with 1% methylene blue in 1% borax, and analysed with an Olympus BX60 light microscope. Ultra-thin sections (70 nm) were cut using a Leica EM UC7 ultramicrotome, mounted on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Hitachi H500 transmission electron microscope at 75 kV.

Confocal microscopy

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)—detection of DNA fragmentation associated with apoptosis

Non-fixed specimens were incubated on ice in 0.1% freshly prepared sodium citrate for 2 minutes, followed by three washes in Tris-buffered saline (TBS) (3 × 5 minutes). Then, the samples were stained with TUNEL reaction mixture (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red; Roche Applied Science) for 1 hour at 37°C in the dark. TBS washes (3 × 5 minutes) were followed by 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (1 µg/mL in TBS, 15 minutes, room temperature, in darkness), and then a second set of TBS washes (3 × 5 minutes) was performed. After that, the material was mounted in Vectashield on microscope slides and examined with an Olympus FluoView FV 3000 confocal microscope. Excitation at 405 nm for the DAPI dye and 570 nm for the TMR red dye was provided by a diode laser.

For a positive control, non-fixed specimens were treated with RNase-free deoxyribonuclease I (DNase I, EURx Sp., Gdańsk, Poland). For that, 2 µL of DNase I (5 U/µL) was diluted in 18 µL of reaction buffer II containing Mn^{2+} ions (on ice). The specimens were then incubated in this solution for 1 hour at 37°C. Next, the samples were treated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 5 minutes and then washed twice with TBS (2 × 5 minutes). After washing, standard TUNEL staining was performed.

LysoTracker Red-labelling of acidic organelles

Non-fixed specimens were treated for 15 minutes in the dark at room temperature with 2.5 mM LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, L7528, Thermo Fisher Scientific) in TBS (pH 7.4). Following TBS washing (3 × 5 minutes), the material was incubated for 15 minutes in TBS containing 1 µg/mL DAPI. The specimens were then washed once more in Tris-buffered saline (TBS) (3 × 5 minutes). After that, the material was mounted in Vectashield on microscope slides and examined with an Olympus FluoView FV 3000 confocal microscope. Excitation at 405 nm (DAPI) and 570 nm (LysoTracker Red) was provided by a diode laser.

For the positive control, midgut cells of *Pam. experimentalis* were exposed to ibuprofen (16.8 µg/L) for 7 days, followed by standard LysoTracker Red staining (for details, see Miernik *et al.* 2024b).

Dihydroethidium (DHE) - analysing superoxide levels (differentiation of ROS+ and ROS− cells)

Non-fixed specimens were incubated in TBS containing 0.0025% Triton X-100 at room temperature, followed by staining with 30 µM dihydroethidium (DHE) from a 30 mM stock solution of DHE in dimethyl sulfoxide (DMSO), 15 minutes, room temperature, in darkness. Material was next washed in TBS (3 × 5 minutes), stained with 1 µg/mL DAPI in TBS for 15 minutes at room temperature in the dark, and then washed again in TBS (3 × 5 minutes). After that, the material was mounted in Vectashield on microscope slides and examined with an Olympus FluoView FV 3000 confocal microscope.

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

79:8031749303

Excitation at 405 nm (DAPI) and 561 nm (DHE) was provided by a diode laser.

Signals detected in ROS + cells were quantified using Imaris (Bitplane) software. The Imaris spot detection algorithm was used to identify ROS + signals, and the total number of spots per cell (averaged) was quantified. Fold change was calculated as the ratio of measurements between experimental and control groups, with Ib1a—Ib1c compared to PeC7 and Ib2a—Ib2c compared to PeC28.

Results

Survival and reproduction

Group PeC0 did not show any statistical differences regarding any of the studied parameters (p value > 0.05); therefore, ethanol did not have a significant impact on the study. The studied groups did not differ in terms of mortality, oogenesis, or oviposition (Supplementary Table S1).

Light and transmission electron microscopy—ultrastructural changes in the ovary of *Pam. experimentalis* exposed to ibuprofen

Control groups (PeC, PeC0, PeC7, PeC28)

Ultrastructural analysis of the control groups cultured in medium with ethanol (PeC0, PeC7, PeC28) and without ethanol (PeC) revealed no visible differences. Additionally, no time-related changes were detected among the control groups (PeC0, PeC7, PeC28). Therefore, all control groups are described together.

The ovary of the tardigrade *Pam. experimentalis* was a sac-like structure located above the midgut on the dorsal part of the body (Fig. 1A). The front of the gonad was held to the body wall by two ligaments.

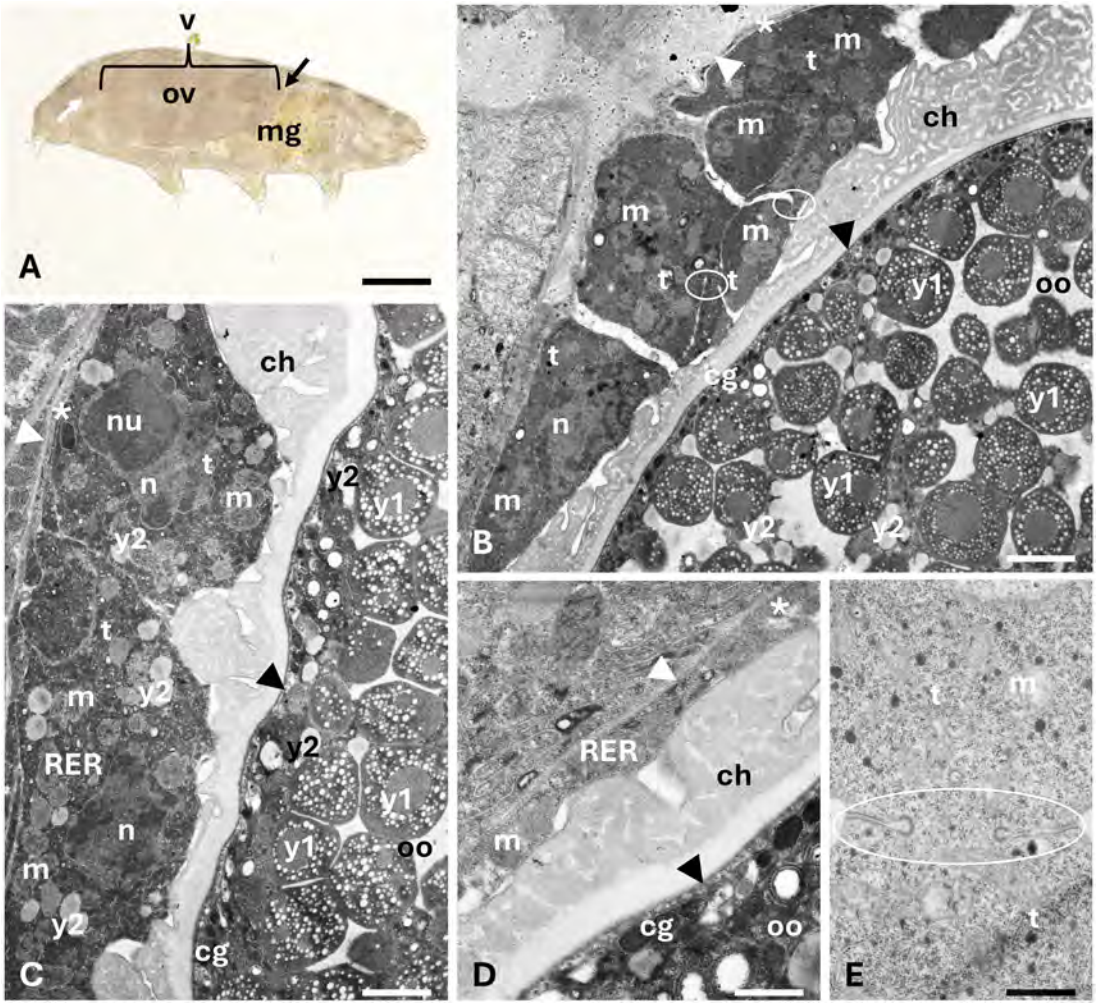


Figure 1 Ultrastructure of *Pam. experimentalis* ovary in control groups (PeC, PeC0, PeC7, PeC28). A, localization of the ovary in animal body, light microscopy: bar = 117.64 µm. B–E, ultrastructure of *Pam. experimentalis*, transmission electron microscopy: (B) bar = 0.17 µm, (C) bar = 0.19 µm, (D) bar = 0.6 µm, (E) bar = 0.61 µm. (black arrow) germarium, (black arrowhead) vitelline envelope, (ch) chorion, (cg) cortical granules, (ellipse) cytoplasmic bridge, (m) mitochondrion, (mg) midgut, (n) nucleus, (nu) nucleolus, (oo) oocyte, (ov) ovary, (asterisk) ovary wall, (RER) rough endoplasmic reticulum, (t) trophocyte, (v) vitellarium, (white arrow) oviduct, (white arrowhead) basal lamina, (y1;y2) yolk.

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

80:4675570275

The ovary of *Pam. experimentalis* was composed of a germarium, which contained oogonia undergoing mitotic divisions, and a vitellarium, where the oocytes grow and mature (Fig. 1A). The female reproductive system also included a single oviduct that opened into the cloaca (Fig. 1A). In the vitellarium, there were groups (clusters) of germline cells connected by cytoplasmic bridges, with one cell differentiating into oocytes and the other into trophocytes. The female gonad of these animals consisted of several types of cells, including cells of the ovary wall (Fig. 1B–D), oocytes (Fig. 1A–D), and trophocytes, also known as nurse cells (Fig. 1B, C, E).

The ovary wall consisted of a single layer of somatic cells. They had a flattened shape and lay on the basal lamina. These cells had cytoplasm rich in mitochondria and cisternae of rough endoplasmic reticulum (Fig. 1B–D).

Oocytes were visually larger than trophocytes. Younger oocytes were usually more spherical. As they mature, they became slightly irregular in shape, mainly due to the accumulation of large amounts of reserve material (yolk) in the cytoplasm, especially in the later stages of oogenesis. The spheres of reserve material had different electron densities. Some of them were small with medium electron density, while others were large with a heterogeneous structure (Fig. 1B–D). These cells had a nucleus with a nucleolus. Other organelles occurred here between the spheres of reserve material (Fig. 1B–D). Next to the oocyte's cell membrane, small electron-dense cortical granules were located (Fig. 1B–D). The surface of the mature oocyte was covered by an egg capsule, which consisted of a thin vitelline envelope and a thick chorion. The vitelline envelope was more electron dense than the chorion (Fig. 1B–D).

Trophocytes, also called nurse cells, were smaller cells with irregular shapes. They were connected to the oocyte by cytoplasmic bridges, similar connections also occurred between the trophocytes themselves (Fig. 1B, E). Nurse cells often surrounded the oocytes and were located close to the gonad wall. Trophocytes had a nucleus with a heterogeneous nucleolus and were also rich in ribosomes and organelles such as mitochondria or rough endoplasmic reticulum (Fig. 1B, C, E).

Experimental group Ib1a (concentration of ibuprofen 0.1 µg/L, 7 days) and experimental group Ib1b (concentration of ibuprofen 16.8 µg/L, 7 days)

The shape of ovary wall cells, as well as the germline cells of experimental group Ib1a and Ib1b, did not differ from the shape of the cells of the control groups, and no ultrastructural changes were observed in their organelles (Fig. 2A–D; Supplementary Fig. S1A–D).

Experimental group Ib1c (concentration of ibuprofen 1 mg/L, 7 days)

The shape of ovary wall cells did not differ from the shape of the cells of the control groups. In the cytoplasm of these cells, notable swelling of the rough endoplasmic reticulum cisternae was observed compared to those in the control group (Fig. 2E, F; Supplementary Fig. S1E, F). However, no evidence of mitochondrial degeneration was observed. There were no changes in cell shape or organelle ultrastructure of germline cells compared to those in the control groups (Fig. 2E, F; Supplementary Fig. S1E, F).

Experimental group Ib2a (concentration of ibuprofen 0.1 µg/L, 28 days) and experimental group Ib2b (concentration of ibuprofen 16.8 µg/L, 28 days)

The analysis of ovary cells in this group did not show differences compared to cells of the control groups. There were no changes in cell shape or organelle ultrastructure of ovary wall cells and germline cells compared to those in the control groups (Fig. 3A–D; Supplementary Fig. S2A–D).

Experimental group Ib2c (concentration of ibuprofen 1 mg/L, 28 days)

Noticeable changes in the examined cells in the form of endoplasmic reticulum swelling and ultrastructure of mitochondria in ovary wall cells were observed (Fig. 3E). The degenerated mitochondria were swollen, had lost their cristae, and their matrix had become electron lucent (Fig. 3E). Similar ultrastructural changes occurred in germline cells. Here, again, mitochondrial degeneration and swelling were observed, as well as swelling of the endoplasmic reticulum (Fig. 3E, F; Supplementary Fig. S2E, F).

Confocal microscopy

Qualitative analysis using TUNEL showed no evidence of increased nuclear DNA fragmentation in any of the experimental groups treated with three different concentrations of ibuprofen over 7 or 28 days (Fig. 4B–D, F–H), similar to the cells in the control groups (Fig. 4A, E). A positive control for the TUNEL assay was performed to confirm the method's effectiveness in this species. Specimens treated with deoxyribonuclease I showed TUNEL-positive signals, indicating increased nuclear DNA fragmentation (Supplementary Fig. S3). Qualitative analysis using LysoTracker Red showed that signals from acidic organelles (autolysosomes, lysosomes) in all experimental groups (Fig. 4J–L, N–P) were comparable to the level of signals in control groups (Fig. 4I, M). This finding was confirmed by ultrastructural analyses. However, dye exclusion by the tissue cannot be ruled out. As a positive control for LysoTracker Red staining, the midgut of *Pam. experimentalis* exposed to ibuprofen (16.8 µg/L; 7 days) was used (Miernik *et al.* 2024b). The samples showed LysoTracker Red-positive signals, indicating an increased presence of acidic organelles (Supplementary Fig. S4). The use of DHE showed that signals detected in ROS+ cells exposed to ibuprofen for 7 days at concentrations of 0.1 µg/L and 16.8 µg/L (Fig. 4R, S) were not stronger than in control groups (Fig. 4Q, U). However, after 7 days of treatment with ibuprofen at a concentration of 1 mg/L, the signals detected in ROS+ cells were visibly stronger in the cells of the ovary wall of tardigrades (Fig. 4T). As in all groups treated with ibuprofen for 28 days, stronger ROS+ signals were also observed in the ovary wall (Fig. 4V–X). The qualitative analysis was supported by the quantitative results (Supplementary Table S2). Fold change analysis of ROS+ signals in the ovary wall cells was performed

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

81:7884756963

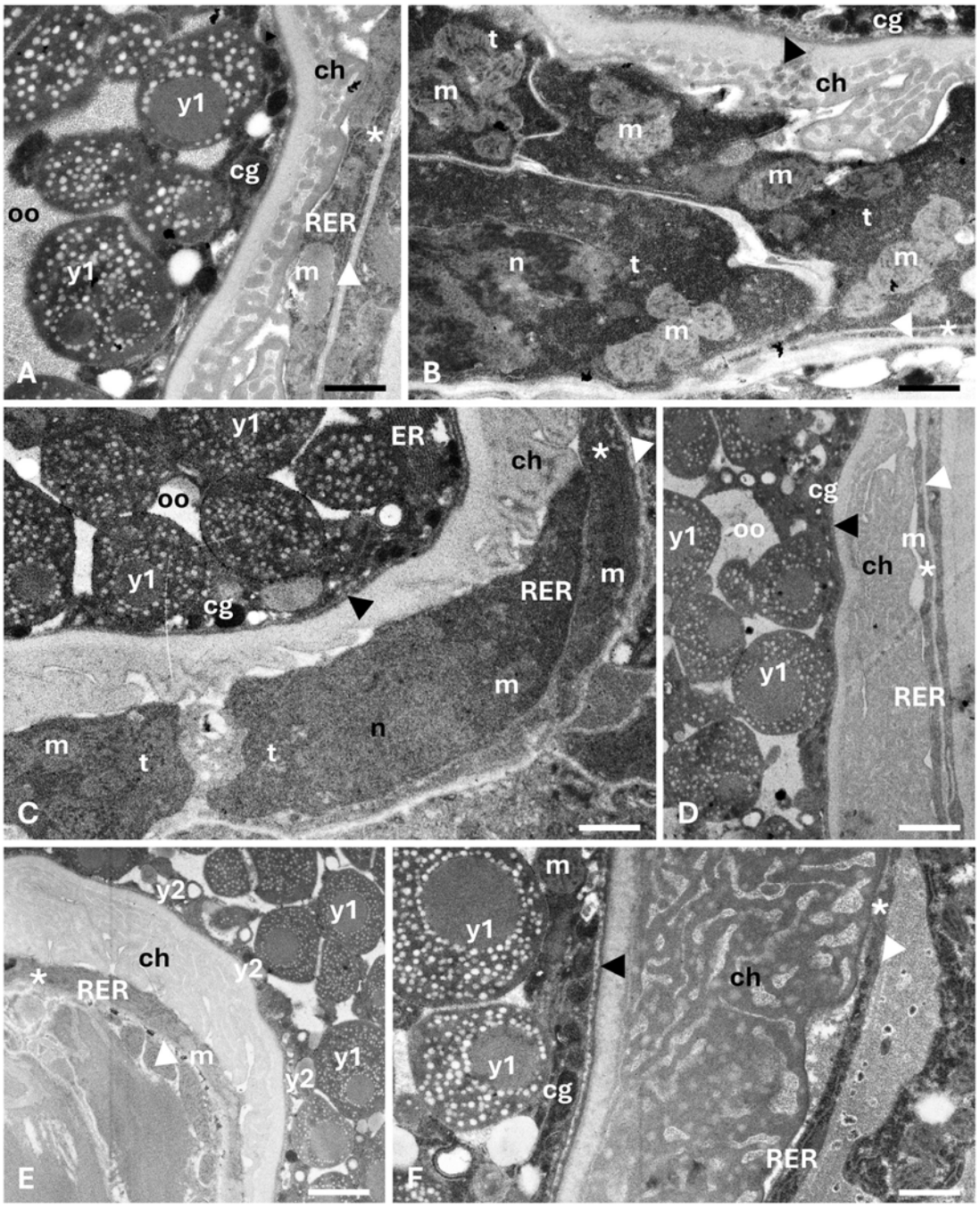


Figure 2 Ultrastructure of *Pam. experimentalis* ovary after 7 days of ibuprofen exposure, transmission electron microscopy. A, B, 0.1 µg/L (Ib1a): (A) bar = 0.39 µm, (B) bar = 0.45 µm. C, D, 16.8 µg/L (Ib1b): (C) bar = 0.32 µm, (D) bar = 0.11 µm. E, F, 1 mg/L (Ib1c): (E) bar = 0.36 µm, (F) bar = 0.45 µm. (black arrowhead) vitelline envelope, (cg) cortical granules, (ch) chorion, (ER) endoplasmic reticulum, (m) mitochondrion, (n) nucleus, (oo) oocyte, (asterisk) ovary wall, (RER) rough endoplasmic reticulum, (t) trophocyte, (white arrowhead) basal lamina, (y1;y2) yolk.

(Supplementary Fig. S5). This analysis confirmed observations from confocal microscopy (DHE staining).

Discussion

Many factors can cause the presence of NSAIDs in aquatic environments (Lin *et al.* 2023). Even with natural degradation processes operating in aquatic environments (photolysis, hydrolysis, and microbial activity), the strong resistance of many NSAIDs to degradation allows them to accumulate over time (Murali 2024). Samples collected from rivers, groundwater, drinking water, wastewater treatment plants, and hospital effluents reveal the presence of NSAIDs. Its presence in the environment can lead to negative effects on aquatic organisms. Another important issue related to this problem is the effects of pharmaceutical mixtures and their accumulation in trophic chains (Parolini 2020, Rastogi *et al.* 2021, Rodrigues *et al.* 2025).

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

82:3114572676

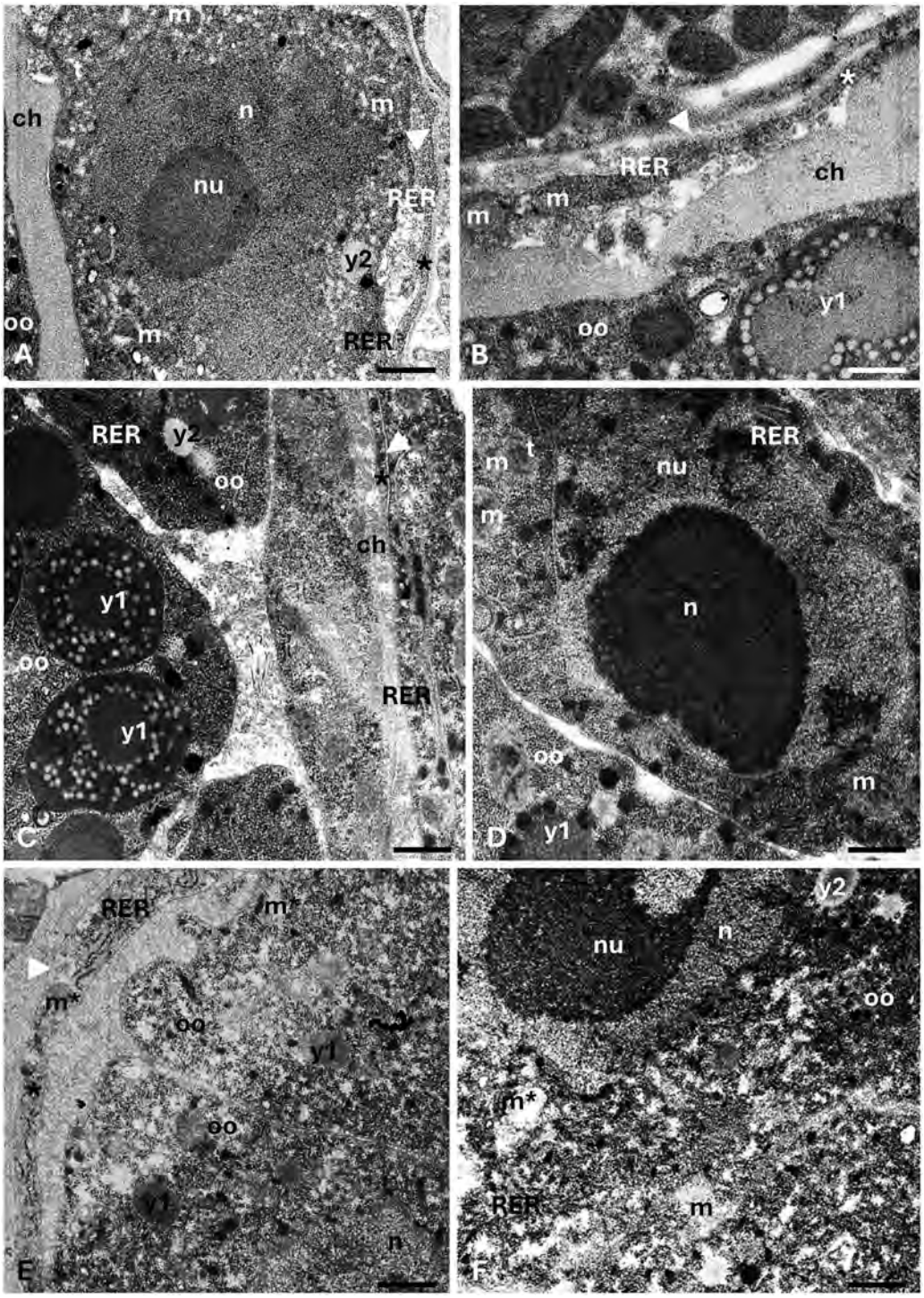


Figure 3 Ultrastructure of *Pam. experimentalis* ovary after 28 days of ibuprofen exposure, TEM. A, B, 0.1 µg/L (Ib2a): (A) bar = 0.34 µm, (B) bar = 0.72 µm. C, D, 16.8 µg/L (Ib2b): (C) bar = 0.31 µm, (D) bar = 0.55 µm. E, F, 1 mg/L (Ib2c): (E) bar = 0.48 µm, (F) bar = 0.57 µm. (arrowhead) basal lamina, (ch) chorion, (m) mitochondrion, (m*) degenerated mitochondrion, (n) nucleus, (nu) nucleolus, (oo) oocyte, (asterisk) ovary wall, (RER) rough endoplasmic reticulum, (t) trophocyte, (y1;y2) yolk.

Ibuprofen, one of the most commonly used NSAIDs, reached an estimated global consumption of around 46000 tonnes in 2023 (Ge *et al.* 2025). It was first synthesized in the 1960s, introduced as a safer alternative to aspirin, and is commonly applied in the treatment of various conditions. This drug is commonly used to ease pain, reduce fever, and inflammation (Moore 2003, 2007, Bushra and Aslam 2010, Rainsford 2013). Every year, ibuprofen levels are detected worldwide. Not only in raw and treated sewage, but also in groundwater, surface water, or even in drinking water. Concentrations detected in samples collected in Poland in surface water, groundwater, and drinking water were respectively 3.7301 µg/L,

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

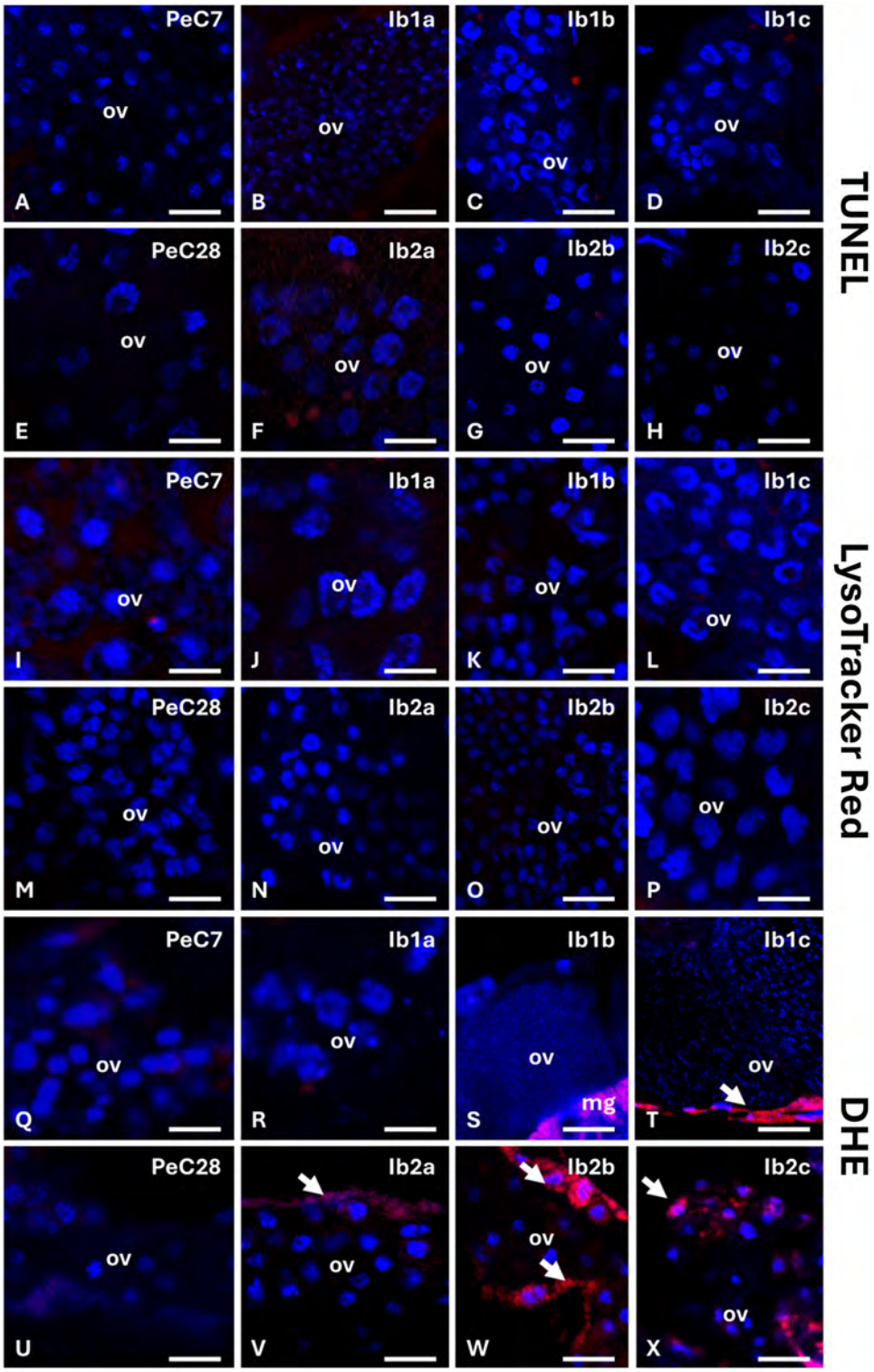


Figure 4 Ovary of *Pam. experimentalis*, confocal microscopy. A–H, TUNEL assay and DAPI (A, E), Control groups: (A) bar = 8.75 μm, (E) bar = 4 μm. B, Ib1a, bar = 5.33 μm. C, Ib1b, bar = 8.33 μm. D, Ib1c, bar = 10.77 μm. F, Ib2a, bar = 6.15 μm. G, Ib2b, bar = 9.10 μm. H, Ib2c, bar = 4.71 μm. Nuclei - blue signals, DNA fragmentation - red signals, ovary (ov). I–P, LysoTracker Red and DAPI (I, M) Control groups: (I) bar = 5 μm, (M) bar = 4.4 μm. J, Ib1a, bar = 4.55 μm. K, Ib1b, bar = 4 μm. L, Ib1c, bar = 4.45 μm. N, Ib2a, bar = 6.67 μm. O, Ib2b, bar = 6.67 μm. P, Ib2c, bar = 4.29 μm. Nuclei - blue signals, acidic organelles - red signals, ovary (ov). Q–X, dihydroethidium (DHE) and DAPI (Q, U) Control groups: (Q) bar = 1.74 μm, (U) bar = 5.56 μm. R, Ib1a, bar = 3 μm. S, Ib1b, bar = 12.5 μm. T, Ib1c, bar = 11.11 μm. V, Ib2a, bar = 5.71 μm. W, Ib2b, bar = 7.14 μm. X, Ib2c, bar = 10.53 μm. ROS+ cells - red signals (white arrows), nuclei - blue signals, ovary (ov), midgut (mg).

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

0.599 µg/L, and 0.2236 µg/L (Ślósarczyk *et al.* 2021). The average concentration of ibuprofen globally is 0.108 µg/L, while the maximum recorded values reach as much as 303 µg/L (Aus der Beek *et al.* 2016).

The ovary of Eutardigrada is attached to the body wall by a terminal filament that consists of two ligaments and transitions into a single oviduct that opens into the cloaca (Poprawa 2005, Poprawa *et al.* 2015a, b, c, Janelt *et al.* 2019, Jezierska *et al.* 2021). In species of Heterotardigrada, the terminal filament is a single structure, and the openings of the digestive and reproductive systems are separate, resulting in the presence of two distinct openings: the anus and the gonopore (Nelson *et al.* 2020). Tardigrades have a meroistic ovary. This means that one or more cells per germ-cell cluster differentiate into the oocyte, while the remaining cells develop into trophocytes. In *Pam. experimentalis*, one cell per germ-cell cluster differentiates into an oocyte. This is a characteristic feature of species belonging to Parachela (Poprawa and Janelt 2019).

In this study, three concentrations of ibuprofen were used: two reflecting environmentally relevant levels—0.1 µg/L (Aus der Beek *et al.* 2016) and 16.8 µg/L (Mrowiec 2015)—as well as a higher concentration of 1 mg/L. This lattermost concentration may occur after accidental release of active pharmaceutical ingredients into the environment. Unfavourable substances can enter the bodies of tardigrades through the body wall or by being ingested with food.

This study showed that specimens of *Pam. experimentalis* did not exhibit significant changes in survival, egg-laying, or oocyte production at any ibuprofen concentration or incubation time compared to the control group. In comparison, long-term effects on growth, reproduction, and survival were observed in *Daphnia magna* following 14 days of exposure to 20, 40, and 80 mg/L. The population growth rate was reduced at all ibuprofen concentrations; however, reproduction was already impaired at lower concentrations. Additionally, the highest tested concentration caused a decrease in the survival of the individuals (Heckmann *et al.* 2007). It should be noted that the changes in *D. magna* were induced by concentrations much higher than those used in our experiment.

Changes in the structure of the rough endoplasmic reticulum were observed in two groups of *Pam. experimentalis* specimens incubated at the highest tested ibuprofen concentration (1 mg/L) for both short and long incubation periods (groups Ib1c and Ib2c). These changes were observed both in oocytes (only in the long incubation period) and in the cells of the ovary wall. Previous studies on this species showed the same changes in the ultrastructure of the rough endoplasmic reticulum in storage cells. These changes were also observed after 28 days of exposure to ibuprofen at a concentration of 1 mg/L (Miernik *et al.* 2024a). Changes in these organelles within the midgut and storage cells were observed when *Pam. experimentalis* was exposed to potassium cyanide (KCN). Analysis of individuals 30 days after 120 minutes exposure to 100 mM KCN showed that the cisternae of the endoplasmic reticulum were fragmented (Bartylak *et al.* 2025). The endoplasmic reticulum is an essential organelle that maintains homeostasis and participates in many important cellular processes, such as lipid regulation and detoxification. Changes at the ultrastructural level of endoplasmic reticulum may indicate damage to this structure or intensive production of protective proteins (Chen *et al.* 2013, Arruda and Parlakgül 2023).

Another ultrastructural change in the ovary cells was mitochondrial degeneration in *Pam. experimentalis* specimens treated with 1 mg/L ibuprofen for 28 days (group Ib2c). These mitochondria have an electron-dense matrix and lost their cristae. Similar changes were observed in the digestive cells of *Pam. experimentalis*. Mitochondrial degeneration appeared after 7 days of exposure to ibuprofen at 1 mg/L. A longer incubation (28 days) had the same effect at all tested concentrations (0.1 µg/L, 16.8 µg/L, and 1 mg/L). No changes were observed in the regenerative cells that did not have access to the midgut lumen (Miernik *et al.* 2024b). Furthermore, investigations of storage cells in the same species exposed to ibuprofen (at identical concentrations and incubation periods) revealed comparable ultrastructural alterations in mitochondria across all groups after 28 days of incubation. The mitochondria appeared swollen, with a loss of cristae, and their matrix became electron lucent (Miernik *et al.* 2024a). The same species of tardigrade (*Pam. experimentalis*) subjected to only 120 minutes of exposure to 100 mM KCN showed ultrastructural changes in the mitochondria of both midgut cells and storage cells (Bartylak *et al.* 2025). Studies conducted on another tardigrade species, *Hypsibius exemplaris*, showed changes in the ultrastructure of mitochondria in storage cells treated with paracetamol for 7 days (concentrations of 230 µg/L and 1 mg/L), and 28 days (concentrations of 0.2 µg/L, 230 µg/L, and 1 mg/L) (Wieczorkiewicz *et al.* 2024). Studies on the same species, using the same incubation time and paracetamol concentration, showed that changes inside the digestive and regenerative midgut cells increased with higher paracetamol concentration and longer exposure time. The mitochondria were the most sensitive organelles to the stressor (Wieczorkiewicz *et al.* 2025). Mitochondria, as very important cellular organelles, play a role in many processes occurring in the cell, such as ATP production, detoxification of various substances, synthesis of reactive oxygen species, antioxidant enzymes, activation of cell death, etc. (Martin 2010, Włodarczyk *et al.* 2019). Given their key role in cell homeostasis, they are usually the first to respond to stress factors (Rost-Roszkowska *et al.* 2021).

No increase in signal levels from acidic organelles was observed, indicating that autophagy levels in the ovaries of *Pam. experimentalis* remained unchanged across all experimental groups. This finding was further confirmed by ultrastructural analyses. This may be due to several factors: the cells could possess protective mechanisms that prevent the induction of autophagy, or the ibuprofen concentration and incubation time may not have been enough to trigger autophagy in these cells. However, in other structures of individuals of the same species, such as storage cells, after 28 days of treatment with ibuprofen (0.1 µg/L, 16.8 µg/, and 1 mg/L), an increased level of autophagy was observed (Miernik *et al.* 2024a). Similarly, individuals treated with the same concentrations of ibuprofen for the same period

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

85:1145899709

of time showed signals from acid organelles (autolysosomes and lysosomes) in each of the research groups (Miernik *et al.* 2024b). In the storage cells and midgut cells of *Hys. exemplaris*, the appearance of autophagic structures and the intensification of autophagy were observed following paracetamol treatment (Wieczorkiewicz *et al.* 2024, 2025). The increased autophagy triggered by those drugs suggests that the organisms might be working to maintain tissue functionality by eliminating damaged organelles. Autophagy is viewed as a system for protecting cells from degeneration and death. This process is common in eukaryotic cells and serves to degrade damaged or unnecessary proteins and organelles. Autophagosomes are vesicles that contain cellular components, such as damaged organelles, for degradation. Autophagy, although a naturally occurring process in the cell that helps maintain homeostasis, is also triggered and intensified under stressful conditions, such as starvation, infections, or exposure to toxins. Clearly, an increased number of autophagosomes and autolysosomes may be associated with the initiation of cell death through apoptosis (Rost-Roszkowska *et al.* 2013, Yin *et al.* 2016, Włodarczyk *et al.* 2019, Ostróżka *et al.* 2022).

No increase in signal levels associated with DNA fragmentation linked to apoptosis was observed in the ovaries of *Pam. experimentalis*, including both ovary wall and germline cells, in any of the experimental groups, regardless of ibuprofen concentration or incubation time. Research on storage cells of the same species treated with ibuprofen also did not detect nuclear DNA fragmentation, which is a marker of cell apoptosis (Miernik *et al.* 2024a). However, midgut cells from specimens of this species treated with concentrations of 0.1 µg/L, 16.8 µg/L, and 1 mg/L for 28 days showed an increased level of signals indicating apoptosis (Miernik *et al.* 2024b). Apoptosis can function as a mechanism for preserving homeostasis in multicellular organisms, and it supports the homeostatic balance between cell formation and cell loss. It is a crucial process involved in regular cell turnover, embryogenesis, immune responses, metamorphosis, or chemically induced cell death (Cohen 1997, Reed 2000, Obeng 2021, Moyer *et al.* 2025).

Our study showed that in *Pam. experimentalis*, the level of free radicals increased in ovary cells treated with various concentrations of ibuprofen for 28 days and in cells treated with ibuprofen at a concentration of 1 mg/L for 7 days. A similar situation was observed in the digestive cells and storage cells of this species (Miernik *et al.* 2024a, b). Studies on *Neocaridina davidi* shrimp showed that prolonged starvation resulted in elevated ROS + levels in the hepatopancreas (Włodarczyk *et al.* 2019). Another example could be the exposure of earthworms (*Eisenia fetida*) to thallium, which also caused oxidative stress (Li *et al.* 2025). Similar effects were observed in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) treated with polycyclic aromatic hydrocarbons (Xu *et al.* 2025). Despite the fact that ROS + participate in processes to maintain redox homeostasis, oxidative stress, which can be caused by many different factors, leads to many unfavourable changes in cells, such as DNA damage, protein damage, lipid peroxidation, and disturbances in cellular signalling (Bardaweel *et al.* 2018, Simon *et al.* 2000, Shields *et al.* 2021, Reddy 2023, Hong *et al.* 2024).

Different structures in the studied individuals of the same species showed different effects on exposure to ibuprofen (the same concentrations and incubation times). For example, the digestive cells of the studied species, as one of the first lines of defence of the organism, were significantly altered ultrastructurally in comparison with more protected regenerative cells of the midgut, ovary cells, or storage cells (Miernik *et al.* 2024a, b). It seems that ovary wall cells are the most susceptible (in the ovary) to changes influenced by the chemical factor of ibuprofen, which may be related to the fact that these cells serve as a barrier and protect the germline cells. Alternatively, the observed pattern may reflect the differential sensitivity of distinct ovary cell types to ibuprofen exposure. At the late stage of choriogenesis, oocytes may exhibit lower vulnerability to stressors, potentially due to the chorion acting as a protective barrier.

Our study showed that: (i) ultrastructural changes in the ovary cells of *Pam. experimentalis* are positively correlated with both the concentration of the stressor and the duration of exposure; (ii) mitochondria and rough endoplasmic reticulum are the organelles most sensitive to the stressor, showing the earliest signs of response; (iii) higher concentrations of ibuprofen and longer exposure times lead to intensified oxidative stress in female gonad; (iv) the ovary wall cells are the most susceptible to these changes; (v) the ovary wall acts as a barrier protecting germline cells from the effects of ibuprofen; (vi) different cell types of *Pam. experimentalis* respond variably to the same ibuprofen exposure under identical conditions.

Our findings also raise further questions, such as whether similar ultrastructural changes occur in male gonads following ibuprofen treatment. The impact of NSAIDs on tardigrades is poorly studied and requires further research, focusing on different species and combinations of these drugs.

Acknowledgements

We are very grateful to Dr Danuta Urbańska-Jasik, Dr Łukasz Gajda, and Dr Łukasz Chajec (University of Silesia in Katowice, Poland) for their technical assistance.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Zoological Journal of the Linnean Society* online.

Conflicts of interest

None declared.

Funding

None declared.

Data availability

The data supporting the findings of this article are available within the article and its online Supplementary material.

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

References

Ågerstrand M, Berg C, Björlenius B *et al.* Improving environmental risk assessment of human pharmaceuticals. *Environmental Science & Technology* 2015;**49**:5336–45. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00302

Arruda AP, Parlakgül G. Endoplasmic reticulum architecture and inter-organelle communication in metabolic health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2023;**15**:a041261. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041261

Aus der Beek T, Weber FA, Bergmann A *et al.* Pharmaceuticals in the environment—global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2016;**35**:823–35. https://doi.org/10.1002/etc.3339

Bardaweel SK, Gul M, Alzweiri M *et al.* Reactive oxygen species: the dual role in physiological and pathological conditions of the human body. *The Eurasian Journal of Medicine* 2018;**50**:193–201. https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.17397

Bartylak T, Kayastha P, Wieczorkiewicz F *et al.* The effects of potassium cyanide on tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Scientific Reports* 2025;**15**:26334. https://doi.org/10.1038/s41598-025-05927-9

Bushra R, Aslam N. An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medical Journal* 2010;**25**:155–1661. https://doi.org/10.5001/omj.2010.49

Carrero D, Pérez-Silva JG, Quesada V *et al.* Differential mechanisms of tolerance to extreme environmental conditions in tardigrades. *Scientific Reports* 2019;**9**:14938. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51471-8

Chen S, Novick P, Ferro-Novick S. ER structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* 2013;**25**:428–33. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.02.006

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal* 1997;**326(Pt 1)**:1–16. https://doi.org/10.1042/bj3260001

Drosopoulou K, Kosheleva RI, Ofrydopoulou A *et al.* Topical and transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for inflammation and pain: current trends and future directions in delivery systems. *Processes* 2025;**13**:907. https://doi.org/10.3390/pr13030907

Dzionek A, Wojcieszyńska D, Hupert-Kocurek K *et al.* Immobilization of *Planococcus* sp. S5 strain on the loofah sponge and its application in naproxen removal. *Catalysts* 2018;**8**:176. https://doi.org/10.3390/catal8050176

Dzionek A, Nowak A, Wojcieszyńska D *et al.* Decomposition of non-steroidal anti-inflammatory drugs by activated sludge supported by biopreparation in sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* 2024;**395**:130328. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130328

Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 2006;**76**:122–59. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009

Flippin JL, Huggett D, Foran CM. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology* 2007;**81**:73–8. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.002

Ge P, Liu N, Wang Y *et al.* Isomer-specific ecotoxicity and occurrence of ibuprofen: underestimated risks in aquatic ecosystems. *Journal of Hazardous Materials* 2025;**496**:139430. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.139430

Górny D, Guzik U, Hupert-Kocurek K *et al.* Naproxen ecotoxicity and biodegradation by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) strain. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2019;**167**:505–12. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.067

Hayashi Y, Heckmann LH, Callaghan A *et al.* Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology* 2008;**17**:246–51. https://doi.org/10.1007/s10646-008-0191-3

Heckmann LH, Connon R, Hutchinson TH *et al.* Expression of target and reference genes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *BMC Genomics* 2006;**7**:175. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-175

Heckmann LH, Callaghan A, Hooper HL *et al.* Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters* 2007;**172**:137–45. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.06.001

Hong X, Zhao G, Zhou Y *et al.* Risks to aquatic environments posed by 14 pharmaceuticals as illustrated by their effects on zebrafish behaviour. *The Science of the Total Environment* 2021;**771**:145450. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145450

Hong Y, Boiti A, Vallone D *et al.* Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: transcriptional regulation and evolution. *Antioxidants* 2024;**13**:312. https://doi.org/10.3390/antiox13030312

Janelt K, Jezierska M, Poprawa I. The female reproductive system and oogenesis in *Thulinius ruffoi* (Tardigrada, Eutardigrada, Isohypsibiidae). *Arthropod Structure & Development* 2019;**50**:53–63. https://doi.org/10.1016/j.asd.2019.04.003

Jezierska M, Miernik A, Sojka J *et al.* Oogenesis in the tardigrade *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk, 2018 (Eutardigrada, Hypsibiidae). *Micron* 2021;**150**:103126. https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103126

Kaczmarek Ł, Roszkowska M, Poprawa I *et al.* Integrative description of bisexual *Paramacrobiotus experimentalis* sp. nov. (Macrobiotidae) from Republic of Madagascar (Africa) with microbiome analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2020;**145**:106730. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106730

Larsson DJ. Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2014;**369**:20130571. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0571

Li S, Xue W, Gao N *et al.* A multi-biomarker approach to study the toxic effects of thallium on earthworms (*Eisenia fetida*) fed with different food sources. *Applied Soil Ecology* 2025;**213**:106246. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2025.106246

Lin JY, Zhang Y, Bian Y *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the environment: recent updates on the occurrence, fate, hazards and removal technologies. *The Science of the Total Environment* 2023;**904**:166897. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166897

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

87:5858837960

Marchlewicz A, Domaradzka D, Guzik U *et al. Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a Gram-positive bacteria able to degrade naproxen and ibuprofen. *Water, Air, and Soil Pollution* 2016;**227**:197. doi.org/10.1007/s11270-016-2893-0

Marchlewicz A, Guzik U, Wojcieszyńska D. Dynamics of ibuprofen biodegradation by *Bacillus* sp. B1(2015b). *Archives of Environmental Protection* 2017;**43**:60–4. https://doi.org/10.1515/aep-2017-0020

Marchlewicz A, Guzik U, Hupert-Kocurek K *et al.* Evaluation of the defined bacterial consortium efficacy in the biodegradation of NSAIDs. *Molecules* 2023;**28**:2185. https://doi.org/10.3390/molecules28052185

Martin LJ. Mitochondrial and cell death mechanisms in neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals* 2010;**3**:839–915. https://doi.org/10.3390/ph3040839

Mathias FT, Fockink DH, Disner GR *et al.* Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2018;**59**:105–13. https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.008

Mayer G, Martin C, Rüdiger J *et al.* Selective neuronal staining in tardigrades and onychophorans provides insights into the evolution of segmental ganglia in panarthropods. *BMC Evolutionary Biology* 2013;**13**:230. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-230

Mazaleuskaya LL, Theken KN, Gong L *et al.* PharmGKB summary: ibuprofen pathways. *Pharmacogenetics and Genomics* 2015;**25**:96–106. https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000113

Medkova D, Lakdawala P, Hodkovicova N *et al.* Effects of different pharmaceutical residues on embryos of fish species native to Central Europe. *Chemosphere* 2022;**291**:132915. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132915

Miernik A, Wieczorkiewicz F, Student S *et al.* Investigation of potential effects of Ibuprofen on the storage cells and anhydrobiosis capacity of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Diversity* 2024a;**16**:132. https://doi.org/10.3390/d16030132

Miernik A, Student S, Fiałkowska E *et al.* Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen? *The European Zoological Journal* 2024b;**91**:631–48. https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2355313

Møbjerg N, Halberg KA, Jørgensen A *et al.* Survival in extreme environments – on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiologica* 2011;**202**:409–20. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02252.x

Moore N. Forty years of ibuprofen use. *International Journal of Clinical Practice. Supplement* 2003;**135**:28–31.

Moore N. Ibuprofen: a journey from prescription to over-the-counter use. *Journal of the Royal Society of Medicine* 2007;**100(Suppl. 48)**:2–6. https://doi.org/10.1177/01410768071000480 1s01

Moyer A, Tanaka K, Cheng EH. Apoptosis in cancer biology and therapy. *Annual Review of Pathology* 2025;**20**:303–28. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051222-115023

Mrowiec B. Farmaceutyki–zagrożenie środowiska wodnego. *Edukacja Biologiczna i Środowiskowa* 2015;**4**:25–33.

Murali V. From prescription to pollution: the ecological consequences of NSAIDs in aquatic ecosystems. *Toxicology Reports* 2024;**13**:101775. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101775

Nelson DR, Bartels PJ, Guil N. Tardigrade ecology. In: Schill RO (ed), *Water Bears: The Biology of Tardigrades*. Cham: Springer International Publishing, 2019, 163–210.

Nelson DR, Guidetti R, Rebecchi L *et al.* Phylum Tardigrada. In: Rogers DC, Damborenea C, Thorp J (eds), *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*. London, UK: Academic Press, 2020, 505–22. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00017-6

Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian Journal of Biology = Revista brasleira de biologia* 2021;**81**:1133–43. https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437

Ortúzar M, Esterhuizen M, Olicón-Hernández DR *et al.* Pharmaceutical pollution in aquatic environments: a concise review of environmental impacts and bioremediation systems. *Frontiers in Microbiology* 2022;**13**:869332. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.869332

Ostróżka A, Tiffert Z, Wilczek G *et al.* Can insecticide-free clean water regenerate the midgut epithelium of the freshwater shrimp after dimethoate treatment? *Micron* 2022;**155**:103162. https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103162

Parolini M, Binelli A, Provini A. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2011;**74**:1586–94. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.025

Parolini M. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: a review. *The Science of the Total Environment* 2020;**740**:140043. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140043

Pascoe D, Karntanut W, Müller CT. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* 2003;**51**:521–8. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00860-3

Perrone V, Veronesi C, Ciappetta M *et al.* An up-to-date description of the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Italy: evidence from real clinical practice. *Advances in Therapy* 2025;**42**:2354–68. https://doi.org/10.1007/s12325-025-03153-3

Pomati F, Netting AG, Calamari D *et al.* Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 2004;**67**:387–96. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.02.001

Poprawa I. The ovary structure, previtellogenic and vitellogenic stages in parthenogenetic species *Dactylobiotus dispar* (Murray, 1907)(Tardigrada: Eutardigrada). *Tissue & Cell* 2005;**37**:385–92. https://doi.org/10.1016/j.tice.2005.06.003

Poprawa I, Hyra M, Kszuk-Jendrysik M *et al.* Ultrastructural changes and programmed cell death of trophocytes in the gonad of *Isohypsibius granulifer granulifer* Thulin, 1928 (Tardigrada, Eutardigrada, Isohypsibiidae). *Micron* 2015a;**70**:26–33. https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.11.008

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

88:9645828720

Poprawa I, Hyra M, Rost-Roszkowska MM. Germ cell cluster organization and oogenesis in the tardigrade *Dactylobiotus parthenogeneticus* Bertolani, 1982 (Eutardigrada, Murrayidae). *Protoplasma* 2015b;**252**:1019–29. https://doi.org/10.1007/s00709-014-0737-6

Poprawa I, Schlechte-Wełnicz W, Hyra M. Ovary organization and oogenesis in the tardigrade *Macrobiotus polonicus* Pilato, Kaczmarek, Michalczyk & Lisi, 2003 (Eutardigrada, Macrobiotidae): ultrastructural and histochemical analysis. *Protoplasma* 2015c;**252**:857–65. https://doi.org/10.1007/s00709-014-0725-x

Poprawa I, Janelt K, Reproduction, gonad structure, and oogenesis in tardigrades. In: Tworzydło W, Bilinski S (eds), *Evo-Devo: Non-model Species in Cell and Developmental Biology. Results and Problems in Cell Differentiation,* Vol. 68. Cham: Springer, 2019, 495–513. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23459-1_20

Poprawa I, Matsko Y, Urbisz A *et al.* Germ cell cluster organization and oogenesis in *Milnesium inceptum* Morek, Suzuki, Schill, Georgiev, Yankova, Marley & Michalczyk. *Zoological Journal of the Linnean Society* 2026;**2026**:zlag039. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlag039

Pounds N, Maclean S, Webley M *et al.* Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2008;**70**:47–52. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.07.003

Punginelli D, Maccotta A, Savoca D. Biological and environmental impact of pharmaceuticals on marine fishes: a review. *Journal of Marine Science and Engineering* 2024;**12**:1133. https://doi.org/10.3390/jmse12071133

Rainsford KD. *Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and Side Effects*. New York: Springer Science & Business Media, 2013.

Rastogi A, Tiwari MK, Ghangrekar MM. A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *Journal of Environmental Management* 2021;**300**:113694. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113694

Reddy VP. Oxidative stress in health and disease. *Biomedicines* 2023;**11**:2925. https://doi.org/10.3390/biomedicines11112925

Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology* 2000;**157**:1415–30. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64779-7

Roberts BM, Geddis AV, Ciuciu A *et al.* Ibuprofen, flurbiprofen or naproxen sodium minimally influences musculoskeletal adaptations to treadmill exercise in rats. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2025;**16**:e13798. https://doi.org/10.1002/jcsm.13798

Rodrigues F, Durães L, Simões NE *et al.* Pharmaceuticals in urban streams: a review of their detection and effects in the ecosystem. *Water Research* 2025;**268**:122657. https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122657

Rost-Roszkowska MM, Poprawa I, Kaczmarek Ł. Autophagy as the cell survival in response to a microsporidian infection of the midgut epithelium of *Isohypsibius granulifer granulifer* (Eutardigrada: Hypsibiidae). *Acta Zoologica* 2013;**94**:273–9. https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00552.x

Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł *et al.* Effects of cadmium on mitochondrial structure and function in different organs: studies on the soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). *The European Zoological Journal* 2021;**88**:632–48. https://doi.org/10.1080/24750263.2021.1912199

Rowley AF, Vogan CL, Taylor GW *et al.* Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *The Journal of Experimental Biology* 2005;**208**:3–14. https://doi.org/10.1242/jeb.01275

Shields HJ, Traa A, Van Raamsdonk JM. Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: a comprehensive review of comparative and experimental studies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021;**9**:628157. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 2000;**5**:415–8. https://doi.org/10.1023/A : 1009616228304

Szymonik A, Lach J. Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych. *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 2012;**15**:249–63.

Ślósarczyk K, Jakóbczyk-Karpierz S, Różkowski J *et al.* Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in the water environment of Poland: a review. *Water* 2021;**13**:2283. https://doi.org/10.3390/w13162283

Wieczorkiewicz F, Sojka J, Poprawa I. Effect of paracetamol on the storage cells of *Hypsibius exemplaris*—ultrastructural analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society* 2024;**200**:258–68. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad051

Wieczorkiewicz F, Sojka J, Arslan A *et al.* Hazards related to the presence of paracetamol in the environment – ultrastructural analysis of the midgut epithelium of tardigrade *Hypsibius exemplaris* (Eutardigrada, Hypsibiidae). *Aquatic Toxicology* 2025;**289**:107597. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107597

Włodarczyk A, Wilczek G, Wilczek P *et al.* Relationship between ROS production, MnSOD activation and periods of fasting and re-feeding in freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). *PeerJ* 2019;**7**:e7399. https://doi.org/10.7717/peerj.7399

Xu Q, He Z, Li P *et al.* Toxicity mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbons to Manila clam *Ruditapes philippinarum*: oxidative stress and oxidative damage. *Marine Pollution Bulletin* 2025;**218**:118177. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.118177

Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microbial Cell* 2016;**3**:588–96. https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546

© The Author(s) 2026. Published by Oxford University Press on behalf of The Linnean Society of London.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Zoological Journal of the Linnean Society 2026 00(00) 1–13
https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlag098
Original Article 16th Tardigrade Symposium Proceedings

Downloaded from academic.oup.com/zoolinnean/advance-article/doi/10.1093/zoolinnean/zlag098/8725013 by guest on 30 August 2026

89:5409453292

VI. OŚWIADCZENIA AUTORÓW PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

90:1095006008

Załącznik nr 9
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

Katowice 18.06.2026r.
miejscowość, data

Aleksandra Miernik

imię i nazwisko kandydata

Michniów 69, 26-130 Suchedniów

adres do korespondencji

514 565 696
nr telefonu

ola.miernik.6@gmail.com, aleksandra.miernik@us.edu.pl
adres e-mail

OŚWIADCZENIE OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Oświadczam, że w pracy:

Miernik, A., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2024). Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?. *The European Zoological Journal*, 91(1), 631-648.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: opracowanie koncepcji badań, prowadzenie stałej hodowli niesporczaków, prowadzenie eksperymentu (traktowanie zwierząt ibuprofenem), wyznaczenie wartości LC50 dla ibuprofenu, wykonanie analiz z zastosowaniem mikroskopii świetlnej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej i mikroskopii konfokalnej, wykonanie dokumentacji fotograficznej, analizę oraz interpretację wyników, przygotowanie wersji roboczej manuskryptu, a także przygotowanie i redakcję ostatecznego tekstu manuskryptu oraz odpowiedzi dla recenzentów w procesie publikacyjnym (główny autor korespondencyjny).

opisać szczegółowo swój własny – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką ....., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. ...., przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale....., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).

Aleksandra Miernik

91:1465582186

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Gliwice, dnia 03.07.2026

Sebastian Student
Imię i nazwisko współautora publikacji

Institute of Automatic Control, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland,
Biotechnology Center, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:
Miernik, A., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2024). Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?. The European Zoological Journal, 91(1), 631-648.
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: dobranie parametrów do analizy w mikroskopie konfokalnym, przygotowanie dokumentacji fotograficznej oraz udział w redakcji ostatecznej wersji tekstu manuskryptu.

opisać szczegółowo swój własny – (a nie osoby ubiegającej się*) – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką …., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. …, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale…., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).



.....

Podpis współautora publikacji

92:7919337005

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Kraków, dnia 18.06.2026

Edyta Fiałkowska

Imię i nazwisko współautora publikacji

Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University, Kraków, Poland
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:
Miernik, A., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2024). Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?. *The European Zoological Journal*, 91(1), 631-648.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował hodowlę wrotków niezbędnych do prowadzonych badań oraz udział w redakcji ostatecznej wersji tekstu manuskryptu.

opisać szczegółowo swój własny – (a nie osoby ubiegającej się) – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką ....., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. ...., przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale....., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).*

Podpisuję z Cencert

Podpisany elektronicznie przez:
Edyta Elżbieta Fiałkowska
18.06.2026
16:21:47 +02'00'

Podpis współautora publikacji

93:9261110992

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Katowice, dnia 28.07.2026 r.

Izabela Poprawa

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,
Wydział Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytet Śląski w Katowicach,
Ul. Bankowa 9, 40-007 Katowice, Polska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Miernik, A., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2024). Does the midgut of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis* respond to the effects of ibuprofen?. *The European Zoological Journal*, 91(1), 631-648.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: opracowanie koncepcji badań, wykonanie części analiz z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej i mikroskopii konfokalnej, analizę, współudział w interpretacji uzyskanych wyników, przygotowanie i redakcję ostatecznej wersji tekstu manuskryptu, a także opiekę merytoryczną nad przebiegiem badań i procesem publikacyjnym (drugi autor korespondencyjny).

I. Poprawa

.....

Podpis współautora publikacji

94:1766201752

Załącznik nr 9
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

Katowice 18.06.2026r.
miejscowość, data

Aleksandra Miernik

imię i nazwisko kandydata

Michniów 69, 26-130 Suchedniów

adres do korespondencji

514 565 696
nr telefonu

ola.miernik.6@gmail.com, aleksandra.miernik@us.edu.pl
adres e-mail

OŚWIADCZENIE OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Oświadczam, że w pracy:

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., & Poprawa, I. (2024). Investigation of potential effects of ibuprofen on the storage cells and anhydrobiosis capacity of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Diversity*, 16(3), 132.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: opracowanie koncepcji badań, prowadzenie stałej hodowli niesporczaków, prowadzenie eksperymentu (traktowanie zwierząt ibuprofenem) oraz eksperymentów dotyczących indukcji i wychodzenia z anhydrobiozy, wykonanie analiz z zastosowaniem mikroskopii świetlnej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej i mikroskopii konfokalnej, wykonanie dokumentacji fotograficznej, analizę oraz interpretację wyników, przygotowanie wersji roboczej manuskryptu, a także przygotowanie i redakcję ostatecznego tekstu manuskryptu oraz odpowiedzi dla recenzentów w procesie publikacyjnym (główny autor korespondencyjny).

opisać szczegółowo swój własny – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką ....., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. ...., przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale....., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).

Aleksandra Miernik

95:5710544908

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Ilsti nad Labem, dnia 19.06.2026

Filip Wieczorkiewicz
Imię i nazwisko współautora publikacji

Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Bankowa 9, 40-007 Katowice, Poland
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:
Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., & Poprawa, I. (2024). Investigation of potential effects of ibuprofen on the storage cells and anhydrobiosis capacity of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. Diversity, 16(3), 132.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował wykonanie części analiz z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej oraz udział w redakcji ostatecznej wersji tekstu manuskryptu.

opisać szczegółowo swój własny – (a nie osoby ubiegającej się) – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką ....., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. ...., przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale....., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).*

Wieczorkiewicz

Podpis współautora publikacji

96:5831353836

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Gliwice, dnia 03.07.20206

Sebastian Student
Imię i nazwisko współautora publikacji

Institute of Automatic Control, Silesian University of Technology, Akademicka 16, 44-100 Gliwice, Poland
Biotechnology Center, Silesian University of Technology, Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice, Poland
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., & Poprawa, I. (2024). Investigation of potential effects of ibuprofen on the storage cells and anhydrobiosis capacity of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. Diversity, 16(3), 132.
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: dobranie parametrów do analizy w mikroskopie konfokalnym, przygotowanie dokumentacji fotograficznej oraz udział w redakcji ostatecznej wersji tekstu manuskryptu.

opisać szczegółowo swój własny – (a nie osoby ubiegającej się*) – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką …., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. …, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale…., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).



.....

Podpis współautora publikacji

97:8187706999

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Katowice, dnia 28.07.2026 r.

Izabela Poprawa

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,
Wydział Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytet Śląski w Katowicach,
Ul. Bankowa 9, 40-007 Katowice, Polska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., & Poprawa, I. (2024). Investigation of potential effects of ibuprofen on the storage cells and anhydrobiosis capacity of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Diversity*, 16(3), 132.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: opracowanie koncepcji badań, wykonanie części analiz z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej i mikroskopii konfokalnej, analizę, współudział w interpretacji uzyskanych wyników, przygotowanie i redakcję ostatecznej wersji tekstu manuskryptu, a także opiekę merytoryczną nad przebiegiem badań i procesem publikacyjnym (drugi autor korespondencyjny).

I. Poprawa

.....

Podpis współautora publikacji

98:6355845915

Załącznik nr 9
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

Katowice 18.06.2026r.
miejscowość, data

Aleksandra Miernik

imię i nazwisko kandydata

Michniów 69, 26-130 Suchedniów

adres do korespondencji

514 565 696
nr telefonu

ola.miernik.6@gmail.com, aleksandra.miernik@us.edu.pl
adres e-mail

OŚWIADCZENIE OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Oświadczam, że w pracy:

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2026). How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, DOI Number: 10.1093/zoolinnean/zlag098

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: opracowanie koncepcji badań, prowadzenie stałej hodowli niesporczaków, prowadzenie eksperymentu (traktowanie zwierząt ibuprofenem) oraz przeprowadzenie badań dotyczących przeżywalności i rozrodczości niesporczaków, wykonanie analiz z zastosowaniem mikroskopii świetlnej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej i mikroskopii konfokalnej, wykonanie dokumentacji fotograficznej, analizę oraz interpretację wyników, przygotowanie wersji roboczej manuskryptu, a także przygotowanie i redakcję ostatecznego tekstu manuskryptu oraz odpowiedzi dla recenzentów w procesie publikacyjnym (główny autor korespondencyjny).

opisać szczegółowo swój własny – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką ....., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. ...., przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale....., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).

Aleksandra Miernik

99:8380967353

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Ústí nad Labem, dnia 19.06.2026 r.

Filip Wieczorkiewicz
Imię i nazwisko współautora publikacji

Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Katowice 40-007, Poland
Doctoral School, University of Silesia in Katowice, Katowice 40-007, Poland
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2026). How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, DOI Number: 10.1093/zoolinnean/zlag098
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował wykonanie analiz z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej oraz udział w redakcji ostatecznej wersji tekstu manuskryptu.

opisać szczegółowo swój własny – (a nie osoby ubiegającej się) – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką ....., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. ...., przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale....., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).*

Wieczorkiewicz
.....

Podpis współautora publikacji

100:1024379872

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Gliwice, dnia 03.07.2026

Sebastian Student
Imię i nazwisko współautora publikacji

Department of Systems Biology and Engineering, Silesian University of Technology, Gliwice 44-100, Poland
Biotechnology Center, Silesian University of Technology, Gliwice 44-100, Poland
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:
Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2026). How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. Zoological Journal of the Linnean Society, DOI Number: 10.1093/ zoolinnean/ zlag098
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: dobranie parametrów do analizy w mikroskopie konfokalnym, przygotowanie dokumentacji fotograficznej oraz udział w redakcji ostatecznej wersji tekstu manuskryptu.

opisać szczegółowo swój własny – (a nie osoby ubiegającej się*) – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką …., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. …, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale…., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).



.....

Podpis współautora publikacji

101:3210453425

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Kraków, dnia 18.06.2026

Edyta Fiałkowska
Imię i nazwisko współautora publikacji

Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University, Kraków 30-387, Poland
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2026). How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, DOI Number: 10.1093/zoolinnean/zlag098
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował hodowlę wrotków niezbędnych do prowadzonych badań oraz udział w redakcji ostatecznej wersji tekstu manuskryptu.

opisać szczegółowo swój własny – (a nie osoby ubiegającej się) – udział w powstaniu pracy, (np. mój udział w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu doświadczeń techniką ....., analizie statystycznej wyników eksperymentów zilustrowanych na ryc. ...., przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale....., kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.).*

... Podpisuję z Cencert

Podpisany elektronicznie przez
Edyta Elżbieta Fiałkowska
18.06.2026
16:26:26 +02'00'

Podpis współautora publikacji

102:9942012956

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Katowice, dnia 28.07.2026 r.

Izabela Poprawa
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,
Wydział Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytet Śląski w Katowicach,
Ul. Bankowa 9, 40-007 Katowice, Polska

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:
Miernik, A., Wieczorkiewicz, F., Student, S., Fiałkowska, E., & Poprawa, I. (2026). How does ibuprofen affect the ovaries of the tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, DOI Number: 10.1093/zoolinnean/zlag098
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: opracowanie koncepcji badań, wykonanie części analiz z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej i mikroskopii konfokalnej, analizę, współudział w interpretacji uzyskanych wyników, przygotowanie i redakcję ostatecznej wersji tekstu manuskryptu, a także opiekę merytoryczną nad przebiegiem badań i procesem publikacyjnym (drugi autor korespondencyjny).

I. Poprawa

.....

Podpis współautora publikacji

103:8329310368

VII. DODATKOWE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

- Mordarska M., Śmiech A., **Miernik A.,** Piotrowska P., Gorol H., Francikowski J., Urbisz A., Chajec Ł. ,,Analiza potencjału rozrodczego samców mutanta świerszcza domowego (*Acheta domesticus*), z linii white'" VII Ogólnopolska Konferencja Arthropod, 09.06.2018 r., Katowice, sesja posterowa.
- **Miernik A.,** Śrutek P., Janelt K., Poprawa I. ,,Analysis of the life history of *Paramacrobiotus* sp. (Tardigrada: Eutardigrada)'' Seeing is Believing Imaging the Molecular Process of Life, 9-12.10.2019r., Heidelberg, Niemcy, sesja posterowa.
- **Miernik A.,** Poprawa I., Fiałkowska E. ,,Effect of ibuprofen on the midgut of tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*'' 15th International Symposium on Tardigrada, 22-26.08.2022r., Kraków, sesja posterowa.
- **Miernik A.,** Poprawa I., „Wpływ ibuprofenu na przeżywalność i rozmnażanie u *Paramacrobiotus experimentalis* (Tardigrada: Eutardigrada)" XXXV Konferencja Embriologiczna, 20-23.05.2024r., Katowice, prezentacja ustna.
- **Miernik A.,** Wieczorkiewicz F., Student S., Fiałkowska E., Poprawa I. ,,How does ibuprofen affect the ovaries of tardigrade *Paramacrobiotus experimentalis*?'' 16th International Symposium on Tardigrada, 23-27.06.2025r., Tsuruoka, Japonia, prezentacja ustna.
- Członek komitetu organizacyjnego, XXXV Konferencja Embriologiczna, 20-23.05.2024r., Katowice.
- Wolontariat, 15th International Symposium on Tardigrada, 22-26.08.2022r., Kraków.
- Współautorstwo publikacji naukowych niewchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej:
    - Jezierska, M., **Miernik, A.,** Sojka, J., Student, S., Śliwińska, M. A., Gross, V., & Poprawa, I. (2021). Oogenesis in the tardigrade *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek, & Michalczyk, 2018 (Eutardigrada, Hypsibiidae). *Micron*, *150*, 103126. https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103126
    - Poprawa, I., Matsko, Y., Urbisz, A., Wieczorkiewicz, F., Krakowska, A., **Miernik, A.,** Fiałkowska, E., & Małota, K. (2026). Germ cell cluster organization and oogenesis in *Milnesium inceptum* Morek, Suzuki, Schill, Georgiev, Yankova, Marley, & Michalczyk, 2019 (Eutardigrada: Apochela). *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlag039. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlag039
- Grant Rektora UŚ dla najlepszych studentów na realizację projektu „Analiza historii życia wybranego gatunku niesporczaka z rodzaju *Macrobiotus* (Tardigrada: Eutardigrada)'', 20.02.2019r.
- Tutoring dla najlepszych studentów Uniwersytetu Śląskiego w roku akademickim 2018/2019r., Temat cyklu: „Wybrane zagadnienia z biologii niesporczaków (Tardigrada)".
- Udział w projekcie „Innovative Start. Podniesienie kompetencji zawodowych studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w odpowiedzi na oczekiwania przyszłych pracodawców''.

104:2980021489

- Udział w projekcie „NEW. Zwiększenie konkurencyjności studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego na rynku pracy przez rozwój ich kompetencji zawodowych".
- Udział w licznych szkoleniach m.in. ,,Mikroskopia elektronowa jako narzędzie rekonstrukcji 3D komórek i ich ultrastruktury od teorii do praktyki'', ,,Nadzór nad wyposażeniem kontrolno-pomiarowym w laboratorium badawczym'', ,,Warsztaty aparaturowe z zakresu spektrometrii absorpcji atomowej AAS'', ,,Warsztaty aparaturowe z zakresu chromatografii'' ,,Audytor Wewnętrzny Systemu Zarządzania Jakością w Laboratoriach Badawczych i Wzorujących PN-EN ISO/IEC 17025:2018''.
- Wolontariat 14th Conference of Youth – Szczyt Klimatyczny Młodych, 29.11-01.12.2018r.
- Wolontariat oraz czynny udział w kilku edycjach Ogólnopolskiej Nocy Biologów organizowanej przez Uniwersytet Śląski w Katowicach.
- Wolontariat oraz czynny udział w edycjach Śląskiego Festiwalu Nauki w Katowicach.
- Uczestnictwo w warsztatach „Historia i teraźniejszość przetwarzania surowców mineralnych i ich wykorzystanie w krajach CR i PL'', Katowice, 20.11.2018r.

105:2030490346