



Prof. dr hab. Małgorzata Witeska
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Instytut Nauk Biologicznych, ul. Prusa 14, 08-110 Siedlce

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Piotra Seweryna Niewiadomskiego pt. „Wpływ skwalenu na wskaźniki hodowlane, stan zdrowotny oraz profil kwasów tłuszczowych w mięśniach i wątrobie wybranych gatunków ryb” wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Małgorzaty Woźniak (promotor) oraz dr. inż. Mariusza Szmyta (promotor pomocniczy)

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy wykorzystania skwalenu jako naturalnego przeciwutleniacza dodawanego do pasz i jego wpływu na efektywność podchowu, biochemiczne, hematologiczne i histologiczne wskaźniki stanu zdrowia oraz zawartość kwasów tłuszczowych w mięśniach i wątrobie jesiotra syberyjskiego *Acipenser baeri*, pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss* i okonia euroazjatyckiego *Perca fluviatilis*. Tematyka badań jest ciekawa pod względem poznawczym i ma walor aplikacyjny. Autor bardzo trafnie wybrał gatunki badanych ryb różniące się zawartością tłuszczu, jako czynnik doświadczalny zastosował dwa poziomy suplementacji skwalenem oraz w przemyślany sposób dobrał wskaźniki pozwalające na ocenę jej wpływu na stan fizjologiczny ryb oraz skład kwasów tłuszczowych w ich ciele.

Praca liczy 97 stron, jest prawidłowo podzielona na rozdziały i podrozdziały, zawiera 19 rysunków i 29 tabel, a spis piśmiennictwa składa się ze 135 pozycji.

We Wstępie Autor krótko omówił rozwój akwakultury na świecie, badane przez siebie gatunki ryb i problematykę tworzenia pasz, szczegółowo scharakteryzował wielonienasycone kwasy tłuszczowe i ich znaczenie w akwakulturze oraz obszerny podrozdział poświęcił budowie, pochodzeniu, syntezie i właściwościom skwalenu. Rozdział ten zawiera właściwie wszystko to, co powinien, w odpowiednich proporcjach i jest oparty w większości na pracach opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat, a ilustracje ułatwiają lekturę.

Cel badań został jasno sformułowany i wraz z dobrze postawionymi hipotezami roboczymi wyodrębniony jako osobny, krótki rozdział pracy.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorant opisał pochodzenie, liczebność i wielkość badanych ryb, przedstawił graficznie układ doświadczalny i omówił przebieg doświadczeń, szczegółowo scharakteryzował stosowane pasze, a także przedstawił badane parametry, metody ich oznaczania, liczbę ryb użytych do oznaczeń różnych wskaźników oraz zastosowane metody analizy statystycznej wraz ze schematem drzewa decyzyjnego wykorzystanego do ich wyboru. W rozdziale tym brakuje jednak informacji o uzyskaniu zgody odpowiedniej Lokalnej Komisji Etycznej na przeprowadzenie badań.

Otrzymane wyniki, osobno dla każdego gatunku ryb, zostały przedstawione w tabelach (średnie arytmetyczne wartości parametrów wraz z odchyleniem standardowym i w przypadku większości wyników - także zakresem min-max oraz zaznaczonymi wynikami istotności różnic między grupami doświadczalnymi), na wykresach słupkowych (procentowy udział kwasów tłuszczowych w mięśniach i wątrobie ryb) oraz na zdjęciach mikroskopowych (obraz histologiczny wątroby ryb). Tabele i wykresy wykonano starannie, dzięki czemu wyniki są uporządkowane i łatwo czytelne. Bardzo dobrym pomysłem (acz wymagającym dodatkowego wysiłku i czasu) było skonstruowanie słupków warstwowych, na których kolorem zielonym zaznaczono wzrost, a czerwonym spadek udziału poszczególnych kwasów tłuszczowych w grupach ryb, którym podawano skwalen w porównaniu z grupami kontrolnymi - ten zabieg wizualny bardzo ułatwia odbiór wyników. Innym pomysłem, na pozór drobnym, ale znacznie ułatwiającym czytelnikowi przedzieranie się przez gąszcz wyników było pogrubienie w tabelach wartości istotnie różniących się od kontroli. Przedstawione w formie tabelarycznej i graficznej wyniki zostały jasno i dokładnie omówione. W nagłówkach Tabel 6-8 przez pomyłkę dodano "min-max", choć tabele te nie zawierają zakresów wartości, a jedynie średnie i odchylenia standardowe. Moim zdaniem trochę szkoda, że wykonując analizę hematologiczną Autor nie policzył leukocytów (WBC) - można to łatwo zrobić w tych samych próbach, w których liczy się erytrocyty. Dodatkowo, można było wykonać rozmazy krwi, zabarwić i policzyć odsetek różnych typów leukocytów (*differential leukocyte count*). Parametry te są ważnymi wskaźnikami statusu odpornościowego ryb, które ulegają zmianom pod wpływem działania różnych czynników. Myślę, że Rys. 10 złożony z 9 fotografii mikroskopowych obrazu histologicznego wątroby badanych ryb warto byłoby wydrukować na całej stronie, w wysokiej rozdzielczości i na papierze fotograficznym. Dodatkowo, na rysunku powinien się znaleźć *scale bar* (odcinek o

określonej długości, np. 10 μm), pozwalający wizualnie ocenić wielkość przedstawionych na fotografiach struktur. Wyniki, które ten rysunek przedstawia są dość istotne i przypuszczam, że po przygotowaniu pracy do druku i wysłaniu jej do renomowanego czasopisma, redakcja upomni się o lepszą jakość tej ilustracji.

Rozdział Dyskusja jest dobrze napisany, został poświęcony konfrontacji otrzymanych wyników z literaturą, które zostały przedyskutowane w oparciu o dobrze dobraną literaturę w sposób zwięzły, ale kompletny.

Wykazano, że suplementacja pasz skwalenem nie wpłynęła istotnie na wskaźniki hodowlane, choć zanotowano nieistotne tendencje: obniżenie współczynnika pokarmowego i wzrost względnego przyrostu masy ciała. Wskazano także (podrozdział 5.2), na podstawie wartości wskaźników czerwonokrwinkowych, które u badanych ryb mieściły się w zakresie wartości referencyjnych dla tych gatunków, że "dodatek skwalenu nie wpłynął negatywnie na stan zdrowotny ryb". Wniosek ten, moim zdaniem nie jest do końca uprawniony, gdyż nie zbadano żadnych wskaźników odpornościowych. Ponadto, u żywionych paszą ze skwalenem jesiotrów syberyjskich zanotowano istotny wzrost objętości erytrocytów i masy hemoglobiny w krwince, u pstrągów tęczowych - wzrost liczebności erytrocytów, ich objętości oraz masy hemoglobiny w krwince, a jedynie u okoni nie obserwowano żadnych zmian hematologicznych. Także, w surowicy pstrągów tęczowych żywionych paszą ze skwalenem istotnie spadł poziom trójglicerydów, a u okoni wzrósł poziom cholesterolu. W dalszej części tego samego podrozdziału pojawia się zaskakujący wniosek, że "skwalen w różnym stopniu wpływa na gospodarkę lipidową ryb chrzęstno- i kostnoszkieletowych", choć żaden z badanych przez Doktoranta gatunków nie jest rybą chrzęstnoszkieletową, a także nie są omawiane wyniki badań innych autorów dotyczące tej grupy ryb. Jesiotry należą wprawdzie do podgromady ryb kostnochrzęstnych (Chondrostei), ale jest to część nadgromady ryb kostnoszkieletowych (Osteichthyes).

W tym samym podrozdziale znalazłam też skomplikowany i enigmatyczny wywód: "U człowieka jednym z czynników regulujących poziom cholesterolu jest aktywność monooksygenazy skwalenu (SMO), która bierze bezpośredni udział w tworzeniu skwalenu. Suplementacja pasz skwalenem powinna wpływać na aktywność tego enzymu, tym samym wpływając na poziom produkcji cholesterolu i jego obecności w surowicy ryb". Autor nie wskazuje jednak, jaki, według Niego, miałby być ten wpływ. Dalej pisze, że "u okonia euroazjatyckiego stwierdzono wzrost poziomu cholesterolu...wraz z dodatkiem skwalenu do paszy, co może sugerować zakłócenia w hamowaniu działania SMO", co nawiązuje do

informacji zawartej we Wstępie, "Wzrost poziomu cholesterolu we krwi powoduje hamowanie SMO". Chodzi jednak o hamowanie zwrotne przez produkt (cholesterol) i właściwie nie wiadomo, przy jakim poziomie cholesterolu ten mechanizm się uaktywnia i czy poziom skwalenu (prekursora) odgrywa jakąś rolę. W dalszej części rozdziału Autor wspomina, że "obserwowany we krwi okonia euroazjatyckiego wzrost poziomu cholesterolu...w porównaniu z grupą kontrolną jest trudny do oszacowania, ponieważ w literaturze brak jest danych referencyjnych". Ta informacja właściwie wystarcza i wobec niej rozważania na temat "zakłóceń hamowania aktywności SMO" są zbędne, ponieważ prawdopodobnie stężenia cholesterolu we wszystkich grupach okoni mieściły się w prawidłowych zakresach. Zamiast słowa "oszacowanie" należałoby użyć sformułowania "interpretacja", ponieważ wartości zostały nie tylko oszacowane, ale nawet precyzyjnie zmierzone, a wzrost skrupulatnie obliczony w procentach.

O wpływie skwalenu na stan fizjologiczny ryb wskazuje również fakt, że u wszystkich gatunków zmienił się obraz histologiczny wątroby, o którym Doktorant w podrozdziale 5.3. napisał, że "nie był prawidłowy" i zinterpretował obserwowane zmiany jako stan przedapoptotyczny hepatocytów, choć w innym miejscu tego samego podrozdziału stwierdził, że "obraz histologiczny wątroby nie wykazał żadnych zmian patologicznych w hepatocytach", co wydaje mi się pewną niekonsekwencją. Autor wskazał, że "nie zaobserwowano ognisk martwicy", jednak można przypuszczać, że duży udział komórek wchodzących na szlak apoptozy wynikał ze skrócenia czasu życia hepatocytów pod wpływem skwalenu, co spowodowało ich przyspieszoną wymianę. Być może nie jest to poważne zaburzenie stanu zdrowia, ale wskazuje, że suplementacja skwalenem mogła stanowić dla ryb pewne fizjologiczne obciążenie.

W dalszej części Dyskusji (5.4) wykazano, że skwalen nie miał istotnego wpływu na podstawowy skład chemiczny mięśni i wątroby ryb, ale spowodował zmianę profilu kwasów tłuszczowych, istotnie zwiększając udział kwasów wielonienasyconych, prawdopodobnie w wyniku zahamowania utleniania kwasów zawartych w paszy. Wzrost udziału tych kwasów nastąpił zarówno w mięśniach, jak i w wątrobie wszystkich badanych gatunków ryb (większy u ryb tłustszych), co można uznać za dobrą wiadomość dla hodowców i konsumentów, ponieważ ta grupa kwasów tłuszczowych stanowi o wysokiej wartości odżywczej tłuszczu rybiego.

Rozdział Dyskusja kończy się krótkimi konkluzjami, że wyniki badań potwierdziły hipotezy badawcze: skwalen zwiększył poziom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w

mięśniach i wątrobie wszystkich badanych gatunków ryb, a suplementacja pasz tym składnikiem nie wpłynęła negatywnie na ich stan fizjologiczny. Obszerniejsze podsumowanie przedstawiono w kolejnym krótkim rozdziale Wnioski, w którym Autor szczegółowo odniósł się do otrzymanych wyników. Pracę kończy dobrze napisane Streszczenie w dwóch wersjach językowych: polskiej i angielskiej.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Piotra Seweryna Niewiadomskiego dostarcza istotnych informacji na temat hodowlanych i fizjologicznych efektów suplementacji pasz skwalenem u trzech gatunków ryb, a także ma wartość aplikacyjną, wskazując że taka suplementacja jest raczej bezpieczna i celowa, ponieważ jej rezultatem jest korzystniejszy z punktu widzenia konsumentów profil kwasów tłuszczowych ciała ryb.

Praca jest dobrze napisana i starannie zredagowana (znalazłam tylko niewielkie błędy interpunkcyjne i literowe, właściwie nie do uniknięcia w tak obszernym tekście). Moim zdaniem, mocną stroną pracy są ilustracje - schematy i wykresy, które bardzo pomagają czytelnikowi śledzić tekst. Pozytywnie oceniam też prawidłowe opracowanie statystyczne wyników i dobre rozeznanie Autora w literaturze naukowej.

Reasumując, pomimo kilku uwag krytycznych (które są obowiązkiem recenzenta) wskazujących pewne usterki niewpływające istotnie na jakość pracy, uważam że Pan magister inżynier Piotr Seweryn Niewiadomski wykazał się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a Jego rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz 1789 ze zm.) w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz 1669 ze zm.).

Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Prof. dr hab. Małgorzata Witeska

Siedlce, 1 lutego 2022

