UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w Lublinie
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

KATEDRA PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ
ul. GŁĘBOKA 30, 20-612 LUBLIN
tel.: 081-445-61-61 do 66
fax.: 081-445-61-66

Lublin, 02.09.2021 r.

dr hab. Wojciech Łopuszyński, prof. uczelni
Katedra Patomorfologii i Weterynarii Sądowej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. inż. Karoliny Naumowicz pod tytułem „Wpływ kąpieli profilaktycznych na obraz patomorfologiczny wybranych narządów pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)"
wykonanej w Katedrze Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod kierunkiem
promotora prof. dr. hab. Józefa Szarka, prof. zw.
i promotora pomocniczego dr inż. Anny Wiśniewskiej

Prezentowaną ocenę dysertacji doktorskiej lek. wet. inż. Karoliny Naumowicz pt.: „Wpływ kąpieli profilaktycznych na obraz patomorfologiczny wybranych narządów pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)" wydaję w związku z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie podjętą w dniu 28 czerwca 2021 r.

Ryby i produkty akwakultury są obecnie uznawane za jedne z najzdrowszych pokarmów na naszej planecie, a ich pozyskanie zarówno w formie odłowów ze zbiorników naturalnych jaki i w warunkach chowu są uznawane za najmniej szkodliwe dla środowiska naturalnego. Światowe spożycie ryb i produktów akwakultury wciąż rośnie, co wynika zarówno ze zwiększającej się liczby ludności na świecie jak i prozdrowotnych właściwości mięsa rybiego, a także preferencji konsumentów. Jednym z najbardziej udomowionych gatunków ryb przez człowieka jest pstrąg tęczowy *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), który, dzięki swojej wytrzymałości i szybkiemu

wzrostowi, okazał się szczególnie dobrze dostosowany do celów akwakultury. Ryba ta jest obecnie jednym z wiodących gatunków akwakultury w Polsce, a wśród państw członkowskich Unii Europejskiej Polska, Dania i Szwecja są głównymi jej eksporterami. Podstawowym wymogiem produkcji pstrąga tęczowego jest silny przepływ chłodnej, dobrze natlenionej i czystej wody, co sprawia, że gospodarstwa rybackie produkujące pstrągi zachowują charakter środowiska rzecznego, a co za tym idzie mogą oddziaływać na środowisko naturalne.

Jednym z czynników najbardziej ograniczających rozwój akwakultury jest zdrowotność hodowanych zwierząt, co nakłada na hodowców i lekarzy weterynarii konieczność zapewnienia nie tylko dobrego stanu zdrowotnego zwierząt ale też utrzymanie odpowiednich warunków higienicznych na wszystkich etapach produkcji przy jednoczesnej dbałości o stan środowiska naturalnego. Aby ograniczyć do minimum ryzyko wystąpienia chorób i konieczność leczenia ryb, istotnym jest podejmowanie działań bioasekuracyjnych i profilaktycznych, do których zaliczane są m.in. kąpiele antyseptyczne. Podczas przeprowadzania profilaktycznych i leczniczych kąpieli antyseptycznych należy przestrzegać ściśle określonych zasady wynikających z wymagań gatunkowych jak również uwzględniać uwarunkowania prawne wynikające z dbałości o środowisko naturalne odnośnie stosowanych do kąpieli substancji. Doniesienia literaturowe dotyczące skutków oddziaływania na organizm pstrąga dawek antyseptyków, stosowanych w lekarsko-weterynaryjnej praktyce ichtiopatologicznej są skąpe. Brakuje również wystandaryzowanych badań porównawczych, które pozwoliłyby na właściwe oszacowanie stosunku ryzyka do zysków w zakresie zdrowia w sytuacjach wymagających użyciu poszczególnych substancji do kąpieli w chowie i hodowli pstrąga.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. wet. inż. Karoliny Naumowicz obejmuje przeprowadzone przez Nią badania doświadczalne, zmierzające do wyjaśnienia rodzaju i mechanizmu uszkodzeń skóry i skrzeli pstrąga tęczowego powstających po przeprowadzeniu kąpieli profilaktycznych z zastosowaniem roztworów formaldehydu, chlorku sodu i siarczanu miedzi.

Wybór tematu pracy doktorskiej należy, uznać za trafny i zasadny naukowo szczególnie w aspekcie dynamicznie rozwijającej się hodowli pstrąga tęczowego. Uwzględniając fakt, że największym zagrożeniem dla rozwoju produkcji ryb są choroby, a nasilające się zmiany klimatyczne i środowiskowe zwiększają ryzyko ich pojawiania się

i rozprzestrzeniania, wiedza na temat właściwego przeprowadzania kąpieli profilaktycznych i leczniczych i ich wpływu na stan zdrowia poddawanych tym zabiegom ryb jest wysoce pożądana. Dodatkowym argumentem przemawiającym za słusznością podjętych badań jest ich aspekt praktyczny i fakt, że obok podania doustnego podanie substancji do wody jest podstawowym sposobem aplikacji substancji leczniczych u ryb. Ponadto, skóra i skrzela ryb z uwagi na liczne specyficzne funkcje odgrywają istotną rolę ochronną jak również uczestniczą we wchłanianiu tych substancji do organizmu.

Dysertacja doktorska lek. wet. inż. Karoliny Naumowicz ma klasyczny układ. Rozpoczyna się ona spisem treści oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim. Kolejnymi rozdziałem jest „Wprowadzenie i przegląd piśmiennictwa", który to rozdział został podzielony na podrozdziały. „Uzasadnienie i cele pracy" zostały ujęte w osobnych rozdziałach, a dalej następują po sobie „Materiał i metody", „Wyniki", „Dyskusja", „Wnioski" i „Piśmiennictwo". Dodatkowo w rozprawie umieszczono „Spis aktów normatywnych" oraz „Spisy tabel, rycin i równań" oraz „Wykaz symboli, oznaczeń i skrótów". Cała praca obejmuje 236 stron tekstu, 69 tabel, 87 rycin i 273 pozycje piśmiennictwa. Wydzielone w rozprawie rozdziały są dobrze dobrane i podzielone na podrozdziały, co stanowi o przejrzystości pracy. Streszczenia w języku polskim i angielskim są napisane przejrzyście i jednocześnie zasadnie wprowadzają czytającego w problematykę badawczą.

We obszernym wprowadzeniu lek. wet. inż. Karoliny Naumowicz prezentując wiedzę nt. pstrąga tęczowego ukazała min. in. kilka istotnych faktów związanych ze zmiennością wewnątrzgatunkową, występowaniem, biologią, warunkami hodowli oraz znaczeniem gospodarczym tego gatunku ryb. Znaczna część wstępu poświęcona jest zagadnieniu kąpieli profilaktycznych i leczniczych, a w szczególności regulacjom prawnym odnośnie ich stosowania oraz metodyce przeprowadzania zabiegów z uwzględnieniem charakterystyki używanych w tym celu substancji. We wprowadzeniu przedstawiono również budowę morfologiczną skóry i skrzeli pstrąga tęczowego ilustrując omawiane zagadnienie kolorowymi mikrofotografiami przedstawiającymi szczegóły prawidłowego wyglądu mikroskopowego tych narządów. Doktorantka nakreśliła również najważniejsze funkcje tych narządów w aspekcie przeprowadzonych badań. Nawiązała m. in. do faktu, że stanowią one narzędzie wczesnego ostrzegania o zmianach środowiskowych i biorą udział inicjacji odpowiedzi immunologicznej

organizmu. Ukazała korelacje dotychczas przeprowadzonych badań z użyciem tych narządów w stosunku do czynników środowiskowych i jednocześnie przedstawiła możliwości oceny morfologii skóry i skrzeli w aspekcie uzyskania informacji zarówno o stanie zdrowia ryb jak i statusie ekosystemu, w którym przebywają. Lektura wprowadzenia wskazuje, że Doktorantka przystępując do realizacji badań przygotowała się bardzo starannie i wnikliwie. Skrupulatnie zebrała i naukowo opracowała dane literaturowe w tym zakresie dokonując jednocześnie wnikliwego i selektywnego ich przeglądu, który uzasadnia cel i założenia badań. Zaproponowana forma jest poprawna i wyczerpująca, dzięki czemu czytelnik zostaje zaznajomiony z zagadnieniami związanymi z problematyką badawczą.

Ta obszerna wiedza znalazła również odzwierciedlenie w dalszych rozdziałach ocenianej rozprawy doktorskiej, szczególnie w dyskusji, w której Doktorantka porusza się bardzo swobodnie z doskonałą znajomością tematyki. Ponadto wspomniany fakt wskazuje, że podjęcie badań w obszarze nakreślonej problematyki należy przyjąć z uznaniem biorąc pod uwagę ich aktualność, znaczenie tematu i także możliwość przeniesienia uzyskanych wyników do praktyki.

Rozdział „Materiał i metody" w sposób szczegółowy opisuje wszystkie procedury badawcze, które zostały przeprowadzone na 360 pstrągach tęczowych w wieku 0+ o średniej masie 88,87g i średniej całkowitej długości ciała 20,35 cm. Zwierzęta podzielono na 12 grup z uwzględnieniem grupy kontrolnej. Doświadczenie przeprowadzono wg wystandaryzowanej procedury uwzględniającej zamknięcie przepływu wody na 30 minut i włączenie napowietrzania, dodanie badanego środka i wymieszania wody i włączenie przepływu na 30 minut. W doświadczeniu zastosowano dawki formaldehydu, chlorku sodu i siarczanu miedzi stosowane standardowo w praktyce rybackiej do przeprowadzania kąpieli profilaktycznych. W trakcie trwania kąpieli, w piętnastominutowych odstępach, monitorowano podstawowe parametry wody tj.: temperaturę, pH, zawartość tlenu, saturację tlenu, zasolenie całkowite i przewodność. Po zakończeniu procedury kąpieli, ryby odławiano i poddawano humanitarnej eutanazji. Następnie dokonywano ważenia ryb i ważenia poszczególnych narządów oraz pobierano wycinki skóry i skrzeli do badań histopatologicznych. Z wycinków tych po ich utrwaleniu przez 24 godziny w roztworze Davidsona wykonywano skrawki histologiczne, które barwiono hematoksyliną i eozyną, a skrawki skóry dodatkowo błękitem alcjańskim

z kwasem nadjodowym i odczynnikiem Schiffa. Gotowe preparaty analizowano i oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego według metody półilościowej wg Berneta i wsp., 1999. Zastosowana metoda polegająca na przypisaniu każdej z obserwowanych zmian mikroskopowych do odpowiedniego wzorca reakcji, uwzględniającego charakter patologii, a następnie określenie wskaźnika ich istotności oraz stopnia nasilenia i rozmieszczenia w preparacie umożliwiła Doktorantce daleko idącą obiektywizację uzyskanych wyników uwzględniając liczbę przebadanych preparatów. Uzyskane wyniki badań zostały poddane wnikliwej analizie statystycznej i przedstawione w formie opisowej, tabelarycznej i graficznej oraz udokumentowane mikrofotografiami z mikroskopu świetlnego. Należy zauważyć, że badania zostały bardzo dobrze zaplanowane, zastosowano właściwe metody badawcze i statystyczne, a w ich trakcie wykonano szereg różnorodnych analiz pozwalających na kompleksową ocenę morfologii skóry i skrzeli ryb. Upoważnia mnie to stwierdzenia, że zaproponowany tytuł rozprawy odpowiada jej merytorycznej treści.

Przeprowadzone badania mikroskopowe wykazały obecność zmian wstecznych, zaburzeń w krążeniu, oraz zmian o charakterze zapalnym i postępowym w skórze i skrzelach ryb o zmiennym nasileniu, zależnym od rodzaju środka zastosowanego do kąpieli i czasu ich trwania.

Uzyskane wyniki, zarówno liczbowe jak i natury strukturalnej, odnośnie morfologii skóry i skrzeli poddano dyskusji tematycznej stanowiącej zwartą całość. Omawiany rozdział w sposób wyróżniający konfrontuje wyniki własnych obserwacji z rezultatami uzyskiwanymi w różnych okolicznościach przez innych autorów. W przeprowadzonej dyskusji autorka przedstawiła wyniki badań własnych w kontekście właściwie dobranych i cytowanych rezultatów uzyskanych przez innych autorów. Zaletą jej jest wnikliwa analiza zmienności poszczególnych parametrów morfologicznych w zależności od rodzaju zastosowanej w badaniach doświadczalnych substancji oraz odniesienie do ich właściwości farmakokinetycznych i praktycznego użycia w kąpielach profilaktycznych i leczniczych u ryb. Charakter przeprowadzonej dyskusji wskazuje na bardzo dobrą znajomość problematyki będącej przedmiotem dysertacji doktorskiej.

Rozważna interpretacja poczynionych obserwacji oparta na uzyskanych wynikach oraz skonfrontowanie ich z cytowanymi wynikami innych autorów upoważniły

Doktorantkę do wysunięcia czterech rozbudowanych, prawidłowo sformułowanych wniosków obejmujących całokształt analizowanych badań.

Z obowiązku recenzenta, jako patomorfolog, chciałbym zwrócić uwagę Doktorantki na pewne niewielkie niedociągnięcia o charakterze redakcyjnym. W rozdziale „Wyniki" patologiczne zmiany mikroskopowe opisywane są bezpośrednio pod mikrofotografiami je ilustrującymi. Natomiast w tekście pracy Doktorantka ogranicza się jedynie do podsumowań w postaci stwierdzeń jakie grupy zmian patologicznych występowały w omawianych grupach i jakie było ich nasilenie, np. str. 114: „Najintensywniejsze są zmiany związane z zaburzeniami krążenia, zmiany zapalne oraz zmiany postępowe w obrębie nabłonka i tkanek podporowych". Jest to jak najbardziej akceptowalne jednak brakuje mi w tekście opisu przedstawiającego szczegółowo nieprawidłowości w obrębie poszczególnych badanych tkanek. Jednocześnie niektóre opisy pod rycinami brzmią ogólnikowo. Np. Ryc. 69.: „Skrzela, grupa z trzykrotną kąpielą z chlorkiem sodu. Rozrost komórek nabłonka (białe główki strzałek), zmiany wsteczne w cytoplazmie bazalnych komórek niezróżnicowanych (oznaczone strzałkami) oraz naciek zapalny komórek limfoidalnych i neutrofilów (czarne główki strzałek). Barwienie HE." Powstaje pytania, jaki rodzaj zmian wstecznych obecny jest w komórkach bazalnych? Częściowo uszczegółowione jest to w tabelach sumujących zmiany histopatologiczne, jednak podobnie jak w przypadku podpisu pod rycinami można zadać pytanie o rodzaj zmian w cytoplazmie i jądrze komórkowym lub rodzaj gromadzonej substancji. Opis umieszczony w tekście umożliwiłby czytelnikowi pełne zrozumienie zagadnienia. Spodziewałbym się również mikrofotografii ilustrujących zmiany w skórze ryb grup doświadczalnych po zabarwieniu skrawków błękitem alcjańskim. Przedstawione uwagi w najmniejszym stopniu nie umniejszają wartości merytorycznej pracy i mojej ogólnej bardzo pozytywnej oceny dysertacji. Dodam natomiast, że przeglądając tabele i ryciny oraz mikrofotografie zwraca uwagę fakt ich starannego wykonania i zarazem wyróżniająca przejrzystość, pomimo zgromadzenia w nich olbrzymiej liczby danych.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja doktorska jest oryginalnym i bardzo wartościowym dorobkiem naukowym lek. wet. inż. Karoliny Naumowicz o wyróżniających walorach poznawczych i aplikacyjnych. Odpowiada ona w pełni wszystkim wymogom i warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w Lublinie

i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.), oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261) w związku z art.179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz.1669).

W związku z powyższym zgłaszam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie lek. wet. inż. Karoliny Naumowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, doceniając nakład pracy poniesiony przy realizacji pracy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie jej stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
Katedry Patomorfologii i Weterynarii Sądowej
dr hab. Wojciech Łapuszyński, prof. uczelni