

---

## **AUTOREFERAT**

---

**Dr inż. Dobrochna Adamek-Urbańska**

---

**Samodzielny Zakład Ichtiologii i Biotechnologii w Akwakulturze  
Instytut Nauk o Zwierzętach  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**

---

Ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa  
Tel. 225936643  
Email: dobrochna\_adamek@sggw.edu.pl

**Warszawa 2023**

**1. Imię i nazwisko**

Dobrochna Adamek-Urbańska

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

2015: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach, studia doktoranckie, ukończone 09.07.2015. Tytuł pracy doktorskiej: „Porównanie rozwoju mięśni i ekspresji genów odpowiedzialnych za tempo wzrostu szybko i wolno rosnących jesiotrów”.

2011: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach, kierunek zootechnika, studia II stopnia. Ukończone 11.07.2011. Tytuł pracy magisterskiej: „Obserwacje histologiczne i immunohistochemiczne rozwoju larwalnego jesiota ostronosego (*Acipenser oxyrhynchus oxyrhynchus*)”.

2010: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Nauk o Zwierzętach, kierunek zootechnika, studia I stopnia. Ukończone 2.02.2010. Tytuł pracy inżynierskiej: „Użytkowość rzeźna nutrii”.

**3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

Od 10.2015 – do chwili obecnej, adiunkt w Samodzielnym Zakładzie Ichtiologii i Biotechnologii Akwakultury, Instytut Nauk o Zwierzętach, SGGW w Warszawie

03.2015-09.2015 – asystent w Pracowni Ichtiobiologii i Rybactwa, Wydział Nauk o Zwierzętach, SGGW w Warszawie

- 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).** Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl czterech, powiązanych tematycznie publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych punktowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w których jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

#### **4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

**Ocena stanu homeostazy i adaptacji ryb do zmiennych warunków środowiska wodnego w warunkach akwakultury.**

##### **4.1.1 Wykaz publikacji potwierdzających osiągnięcie naukowe**

P1. **Adamek, D.**, Rzepkowska, M., Panagiotopoulou, H., Ostaszewska, T., Fajkowska, M., Kamaszewski, M., Kolman, R. (2017). Morphological differences of white muscle fibers and genetic diversity of fast and slow growing Atlantic sturgeons (*Acipenser oxyrinchus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 17(5), 959-966.DOI: 10.4194 /1303-2712-v17\_5\_11.

*Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, przygotowaniu preparatów histologicznych, ich barwieniu, wykonaniu pomiarów morfometrycznych, przeprowadzeniu analizy statystycznej, przygotowaniu prezentacji graficznej wyników, przygotowaniu tekstu publikacji oraz koordynacji procesu redakcyjnego jako autor korespondencyjny. Mój udział w publikacji oceniam na wiodący.*

P2. **Adamek-Urbańska, D.**, Jabłońska, K., Rzepkowska, M., Fajkowska, M., Śliwiński, J., Ostaszewska, T. (2020). Runt sturgeon—the case study of abnormal growth in *Acipenseridae* juveniles. *Fisheries & Aquatic Life*, 28(2). DOI: 10.2478/aopf-2020-0010.

*Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, pobraniu materiału badawczego, przygotowaniu preparatów histologicznych, dostosowaniu barwień histologicznych do typu materiału, ich przeprowadzanie, opis wyników, napisanie publikacji oraz przeprowadzenie procesu redakcyjnego jako autor korespondencyjny. Mój udział w publikacji oceniam na wiodący.*

P3. **Adamek, D.**, Śliwiński, J., Ostaszewska, T., Fajkowska, M., Rzepkowska M., Meguro, Y., Marzecki, K. (2018). Effect of copper and silver nanoparticles on trunk muscles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(6), 781-788. DOI: 10.4194/1303-2712-v18\_6\_04.

*Mój udział w publikacji polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, przygotowaniu preparatów histologicznych, ich zabarwieniu i dokonaniu pomiarów, przeprowadzenia analiz genetycznych, przeprowadzeniu analizy statystycznej, przygotowaniu prezentacji graficznej wyników, napisaniu publikacji oraz przeprowadzeniu procesu redakcyjnego jako autor korespondencyjny. Mój udział w publikacji oceniam na wiodący.*

P4. **Adamek-Urbańska, D.**, Błazewicz, E., Sobień, M., Kasprzak, R., Kamaszewski, M. (2021). Histological Study of Suprabranchial Chamber Membranes in Anabantoidei and Clariidae Fishes. *Animals*, 11(4), 1158. DOI: 10.3390/ani11041158

*Mój udział w publikacji polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, kolekcjonowaniu materiału do badań, jego pobraniu oraz współudział w dalszej obróbce, w tym krojeniu,*

*barwieniu i opisie, przeprowadzeniu analizy statystycznej, przygotowaniu prezentacji graficznej wyników, napisaniu treści publikacji oraz przeprowadzeniu procesu redakcyjnego jako autor korespondencyjny. Mój udział w publikacji oceniam na wiodący.*

Sumaryczny IF: 4,451 publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zgodnie z rokiem opublikowania. Liczba punktów MEIN w roku opublikowania: 230.

Stosowne zaświadczenia współautorów są dołączone do dokumentacji jako załącznik 6.

#### **4.2. Omówienie osiągnięcia naukowego**

##### **Uzasadnienie badań**

Zdolność zwierząt do przystosowania się do zmiennych warunków środowiskowych stanowi przedmiot badań ekologicznych, fizjologicznych, morfologicznych i behawioralnych. Parametry wody takie jak temperatura, zasolenie, ruch wody, zawartość tlenu, czy obecność zanieczyszczeń ulegają dynamicznym zmianom wymuszając dużą plastyczność organizmów na istniejące w danym środowisku zmiany. Szczególnie podatne na zmiany są wczesne stadia rozwojowe ryb - zarówno w trakcie embriogenezy jak i w stadium larwalnym. Zmiany powstałe w tym okresie wpływają na fizjologię i morfologię w późniejszych stadiach rozwojowych (Jonsson i Jonsson, 2019; Vagner i wsp., 2019). Podatność tą wykorzystuje się we wprowadzaniu nowych gatunków ryb do warunków akwakultury. Jak dotąd najdłużej udomowionymi gatunkami ryb są karpie (*Cyprinus carpio*) (Nakajima wsp., 2019), tilapia nilowa (*Oreochromis niloticus*) (Teletchea, 2019) i karaś złocisty (*Carassius auratus*), które są hodowane od setek lat. Wśród innych gatunków ryb, które były udomowione w XIX wieku znalazły się: dorsz (*Gadus morhua*), łosoś (*Salmo salar*), pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus*

*mykiss*), natomiast inne gatunki, jak np. ryby jesiotrowate są hodowane w akwakulturze dopiero od kilkadziesiąt lat (Duarte i wsp., 2007; Saraiva i wsp., 2018).

Plastyczność ryb w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe jest kluczowa dla przeżycia w środowisku naturalnym oraz istotna dla akwakultury. Akwakultura jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się gałęzi produkcji zwierzęcej w ostatnich latach, która w roku 2022 prawdopodobnie wzrosła o 2,9% osiągając 92,2mln ton (FAO). Wzrost ten możliwy był i jest dzięki wieloletnim badaniom nad chowem i hodowlą licznych gatunków ryb. Domestykacja ryb nie jest procesem łatwym, jest czasochłonna (Woods III, 2001), a przystosowanie do chowu w warunkach akwakultury nie zawsze kończy się sukcesem (Duarte i wsp., 2007). Kluczowymi czynnikami dla finalnego przystosowania danego gatunku do chowu i hodowli w akwakulturze jest dobór gatunku, który posiada pewną plastyczność w odpowiedzi na stresory środowiskowe takie jak odporność na tymczasowe warunki hipoksji (Milla i wsp., 2020), zagęszczenie (Huntingford, 2004), temperaturę wody oraz jej jakość, która może ulegać wahaniom (Milla i wsp., 2020).

Najsilniej oddziaływującymi bezpośrednio na ryby czynnikami są temperatura wody i związana z nią zawartość tlenu. Cechą specyficzną gatunkowo jest zakres tolerancji na temperaturę i ilość tlenu w wodzie, które są ze sobą ściśle powiązane. Wraz ze wzrostem temperatury wody spada ilość zawartego w niej tlenu co istotnie oddziałuje na tempo i przebieg rozwoju ikry (Burgerhout i wsp., 2017), wzrost larw i osobników młodocianych (Jonsson i Jonsson, 2019), a w późniejszych stadiach również na rozród (Wang i wsp., 2016), szczególnie u ryb zimnolubnych, których hodowla dominuje w Europie Środkowej i Wschodniej (Lehtonen, 1996). Gatunki te są bardziej podatne na sezonowy wzrost temperatury, co prowadzi do obserwowanej rokrocznie wysokiej śmiertelności zarówno

w zbiornikach naturalnych jak i sztucznych. Ponadto gatunki te posiadają niewystarczającą tolerancję na wahania temperatury oraz natlenienie wody. Szczególnie dotkliwe dla produkcji ryb mogą być zmiany powodowane przez wyżej wspomniane czynniki na miogenezę ryb produkcyjnych oraz późniejszy wzrost tkanki mięśniowej (Campos i wsp., 2013), które prowadzić będą do strat finansowych.

Innym wysoce istotnym czynnikiem wpływającym na ekonomię produkcji w akwakulturach jest jakość wód ją zasilających. Wraz ze wzrostem temperatury maleją również zasoby wodne, co związane jest z obniżeniem poziomu wód w zbiornikach naturalnych i ciekach wodnych. W trakcie długotrwałych upałów jakość i właściwości fizykochemiczne wody ulegają pogorszeniu, a w przypadku występowania w danym zbiorniku lub cieku ksenobiotyków, mogą nawet prowadzić do intensyfikacji ich oddziaływania na organizmy wodne (Patra i wsp., 2015). Szczególnie niebezpiecznymi wydają się być składniki powszechnie wykorzystywane w przemyśle, rolnictwie, kosmetyce, farmacji i medycynie w formie nano- i mikrocząstek np. metali oraz plastiku, które łatwiej, niż większe cząsteczki wnikają do organizmu (Marquez i wsp., 2018). Zanieczyszczenia te mogą oddziaływać na organizmy wodne w większym stopniu niż w przypadku zwierząt lądowych, poprzez wchłanianie toksyn całą powierzchnią ciała, skrzelami i przewodem pokarmowym. Z ostatnich badań wynika, że mikro- i nanoplastik oraz nanocząstki srebra przedostają się przez barierę łożyska (Campagnolo i wsp., 2017; Ragusa i wsp., 2021) oraz barierę-krew mózg u ssaków (Mattsson i wsp., 2017; Prüst i wsp., 2020; Grodzicki i wsp., 2021) co jest szczególnie niepokojące biorąc pod uwagę brak danych dotyczących długoterminowego wpływu na zdrowie i życie zwierząt.

Konieczność adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych wpływa na ryby modyfikując niekiedy wielopokoleniowo zmiany w podstawowych mechanizmach związanych z tempem wzrostu (Jonsson i Jonsson, 2019). Modyfikacja tych mechanizmów poprzez wspomniane wcześniej wahania parametrów środowiskowych są ściśle związane z masą tkanki mięśniowej, która jest głównym produktem akwakultury. Poznanie podstawowych mechanizmów, które modyfikują wzrost tej tkanki oraz umożliwiają adaptację ryb do warunków hipoksji i do zanieczyszczonych nowymi ksenobiotykami wód, otwierają nowe perspektywy w akwakulturze. Szczególnie obiecującym kierunkiem jest opracowanie warunków adaptacji do akwakultury gatunków ryb wcześniej w niej nie utrzymywanych, tak aby dostosować produkcję ryb do zmieniających się uwarunkowań środowiskowych.

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury, własnych obserwacji i badań realizowanych w trakcie pracy naukowej podjęłam się przeprowadzenia badań mających na celu:

- Ocenę stanu homeostazy kohort młodocianych ryb jesiotrowatych o zróżnicowanym tempie wzrostu w warunkach akwakultury.
- Zbadanie wpływu nanoksenobiotyków na homeostazę młodocianych ryb łososiowatych.
- Weryfikację adaptacji morfologicznych ryb oddychających powietrzem atmosferycznym, które wprowadzane są do obrotu handlowego w Polsce.

**Cel naukowy:**

Celem prac uznanych za szczególne osiągnięcie naukowe było zweryfikowanie plastyczności ekologicznej ryb jesiotrokształtnych, łososiokształtnych, sumokształtnych oraz



okoniokształtnych w warunkach nowoczesnej akwakultury dostosowującej się do zmieniającego się środowiska i klimatu.

#### **4.3. Omówienie metod badawczych i wyników prac wskazanych jako szczególne osiągnięcie naukowe.**

##### **Ocena stanu homeostazy kohort młodocianych ryb jesiotrowatych o zróżnicowanym tempie wzrostu w warunkach akwakultury.**

P1. **Adamek, D.**, Rzepkowska, M., Panagiotopoulou, H., Ostaszewska, T., Fajkowska, M., Kamaszewski, M., Kolman, R. (2017). Morphological differences of white muscle fibers and genetic diversity of fast and slow growing Atlantic sturgeons (*Acipenser oxyrinchus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 17(5), 959-966.DOI: 10.4194 /1303-2712-v17\_5\_11.

Pierwsza z prac była realizowana w ramach projektu „Analiza porównawcza mięśni dwóch morfotypów jesiotra ostronosego (*Acipenser oxyrhynchus oxyrhynchus*)” (2012) finansowanego przez Szkołę Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Występujące zróżnicowanie wzrostu u ryb jesiotrowatych już w fazie larwalnej i młodzieńczej jest powszechnie występującym zjawiskiem o nieznanym etiologii. W trakcie licznych badań nad stadiami larwalnymi i młodocianymi tych ryb wykazano, iż nie jest to skutek zróżnicowanej temperatury klucia lub inkubacji (Nathanailides i wsp., 2002), temperatury wody podczas odchowu narybku (Allen i wsp., 2006), ilości (De Riu i wsp., 2012) i rodzaju pokarmu (obserwacje własne). Dlatego też celem mojego doświadczenia była próba znalezienia przyczyny zaburzeń wzrostu jesiotrów w stadium młodocianym poprzez analizę tkanki mięśniowej oraz jej potencjału proliferacyjnego.

Materiał badawczy do niniejszej publikacji stanowiły młodociane jesiotry ostronose (*Acipenser oxyrinchus*) będące narybkiem po krzyżowaniu dwóch samic i trzech samców. Inkubacja ikry oraz późniejsza hodowla odbywała się w Instytucie Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie w standardowych warunkach odchowu jesiotrów ostronosych hodowanych w celach badawczych i zarybieniowych. Zagęszczenie wyjściowe obejmowało 2000 larw na m<sup>2</sup> dna zbiornika, a następnie wraz ze wzrostem ryb było redukowane do 1000 m<sup>2</sup>, 750 na m<sup>2</sup> oraz 400 sztuk na m<sup>2</sup>. Żywienie larw rozpoczęło się w 9 dniu po wykluciu (dpw) od podawania *Artemia salina* na poziomie 30% biomasy ryb dziennie. Następnie w 17 dpw stopniowo wprowadzano paszę komercyjną dedykowaną do odchowu młodych ryb Perla Larva Proactive 6.0 (Skretting, Norwegia). Po osiągnięciu 0,5 g średniej masy ciała w stadzie przeprowadzono stopniowe przejście na paszę Nutra (Skretting, Norwegia). Poziom procentowy żywienia oraz granulacji był dostosowywany do zaleceń opracowanych przez Profesora Kolmana, który był autorem programu reintrodukcji jesiotrów ostronosych w Polsce oraz licznych artykułów i opracowań dotyczących biologii i fizjologii tego gatunku.

Zaplanowałam dwa rodzaje analiz ze względu na postawioną hipotezę badawczą, która wskazywała wpływ pochodzenia osobniczego oraz zaburzenie prawidłowego wzrostu na poziomie tkanki mięśniowej młodocianych jesiotrów ostronosych. Pierwszym z nich było przeprowadzenie analiz histologicznych i immunohistochemicznych. W tym celu pobrano wycinki tkanki mięśniowej białej z grzbietowej części odcinka ogonowego zgodnie z metodyką Valente i wsp. (1999). Następnie poddano je standardowej procedurze histologicznej, a pozyskane w ten sposób preparaty barwiono za pomocą barwienia topograficznego HE oraz potrójnego barwienia wg Massona dedykowanego do różnicowania tkanki łącznej i tkanki mięśniowej. Ponadto w celu określenia tempa wzrostu włókien mięśniowych przeprowadzono

również reakcje immunohistochemiczne, w których wykorzystano przeciwciała przeciwko PCNA (jądrowemu antygenowi komórek proliferujących). Po przeprowadzeniu barwień przeprowadzono pomiary morfometryczne w których mierzono powierzchnię włókien mięśniowych białych, liczbę włókien mięśniowych na  $1 \text{ mm}^2$ , liczbę jąder komórkowych na  $1 \text{ mm}^2$  oraz ilość PCNA pozytywnych jąder komórkowych na  $1 \text{ mm}^2$ . Na podstawie wykonanych pomiarów przeprowadzono analizy statystyczne uzyskanych wyników dzieląc włókna mięśniowe na hipertroficzne i hiperplastyczne, wizualizując dokładny ich układ w histogramach.

Drugim rodzajem zaplanowanych analiz było przeprowadzenie analizy pokrewieństwa poprzez wykorzystanie markerów mikrosatelitarnych w analizie multiplex PCR wg metodyki opracowanej przez Panagiotopoulou i wsp. (2014). Długość alleli była określana z wykorzystaniem ABI PRISM3730 i PeakScanner Software v1.0 (Applied Biosystem). Polimorfizm szybko i wolnorosnących jesiotrów określano w programach: GenAlEx v6.501, Arlequin v3.5.1.2, GenePop v.4.0.10 i FSTAT v.2.9.3.2. Pokrewieństwo między badanymi osobnikami przypisywano ręcznie na podstawie profili allelicznych osobników rodzicielskich. Tylko osobniki, których genotypy dokładnie pasowały do profili genetycznych jesiotrów o zróżnicowanym tempie wzrostu były uznawane za rodzicielskie. Pozostałe dorosłe ryby wykorzystywane do wielokrotnych krzyżowań zostały dodatkowo sprawdzone i wykluczone jako potencjalni rodzice na podstawie niedopasowanych alleli. Odległości genetyczne między osobnikami były obliczane za pomocą oprogramowania Gen AlEx i wizualizowane za pomocą tego samego programu przy użyciu analizy głównych współrzędnych (PCoA).

Nie określono dotychczas w literaturze relacji pomiędzy charakterem tkanki mięśniowej (morfologia i morfometria włókien) w obrębie kohorty. Brakowało również danych

o wzroście tkanki mięśniowej młodocianych jesiotrów ostronosych. Dostępne dane opisywały badania skupiające się głównie na procesie miogenezy w stadiach embrionalnych i larwalnych jesiotrów (Daczewska i Saczko, 2005; Steinbacher i wsp., 2006). Uzyskane w badaniu wyniki analiz morfometrycznych wskazywały, że tkanka mięśniowa biała zbudowana była głównie z włókien o zróżnicowanej powierzchni wskazując na mozaikowy charakter tkanki mięśniowej. Taki sposób wzrostu tkanki mięśniowej wskazuje na intensywnie postępujący proces wzrostu włókien mięśniowych nie poprzez hipertrofię, której można byłoby spodziewać się u ryb w tym wieku, a proces hiperplazji. Obserwacje te potwierdzała również liczba jąder proliferujących, dominująca u wszystkich badanych ryb. Wyniki te wskazywały na podobieństwo w okresie intensywnej fazy wzrostu tkanki mięśniowej innych ryb w stadium młodocianym (dos Santos i wsp., 2013).

Natomiast przeprowadzone analizy genetyczne wykazały, że tempo wzrostu tkanki mięśniowej nie wynikało z pokrewieństwa poszczególnych osobników. Ze względu jednak na fakt, że ryby te znajdują się w Polsce pod ochroną i od wielu lat prowadzony jest program reintrodukcji tego gatunku do polskich wód, badania nie mogły być zrealizowane na większej populacji. W celu stwierdzenia uwarunkowania genetycznego występowania zróżnicowanego wzrostu jesiotrów ostronosych zalecane byłoby w przyszłości, kiedy będzie to możliwe, przeprowadzenie analiz na znacznie większej populacji tych ryb i porównanie z genotypami osobników rodzicielskich.

**P2. Adamek-Urbańska, D.,** Jabłońska, K., Rzepkowska, M., Fajkowska, M., Śliwiński, J., Ostaszewska, T. (2020). Runt sturgeon—the case study of abnormal growth in *Acipenseridae* juveniles. *Fisheries & Aquatic Life*, 28(2). DOI: 10.2478/aopf-2020-0010.

Wyniki poprzednich badań pozwoliły na podjęcie obserwacji zaburzeń wzrostu ryb jesiotrowatych, tym razem u larwalnych i młodocianych jesiotrów rosyjskich (*Acipenser gueldenstaedtii*). Badania były przeprowadzone w ramach projektu: „Analiza porównawcza dwóch morfotypów jesiotra rosyjskiego (*Acipenser gueldenstaedtii*)”, a finansowane przez Szkołę Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie w 2013 roku.

Badania te, w odróżnieniu od realizowanych na jesiotrach ostronosych opisanych w poprzedniej publikacji, prowadzone były na selektach charakteryzujących się opóźnionym wzrostem w porównaniu do pozostałych osobników w populacji. Celem naukowym przeprowadzonych badań było określenie potencjalnej przyczyny opóźnienia wzrostu u jesiotrów rosyjskich charakteryzujących się niewielkimi rozmiarami ciała podczas odchowu prowadzonego w warunkach akwakultury. W tym celu przeprowadzono analizy morfologiczne i histopatologiczne badanych osobników.

Odłowione ryby poddano eutanazji w MS222, następnie przeprowadzono analizę morfologiczną wraz z pobraniem do badań wycinków tkanek: skrzeli, przewodu pokarmowego, wątroby, trzustki, pęcherza pławnego, nerek oraz tkanki mięśniowej z odcinka ogonowego. Pobrane tkanki poddano standardowej procedurze histologicznej, a pozyskane skrawki poddano barwieniu topograficznemu hematoksyliną i eozyną. Na podstawie przeprowadzonej analizy mikroskopowej zaobserwowano liczne zwłóknienia oraz kacheksję tkanki mięśniowej, dlatego też badania uzupełniono o barwienie potrójne wg Verhoeffa van Giesona w celu różnicowania włókien sprężystych i kolagenowych, barwienie AZAN w celu zweryfikowania obserwowanej kacheksji i barwienie Perl w celu detekcji złogów żelaza towarzyszących stanom zapalnym.

W badanym materiale stwierdzono liczne zmiany anatomopatologiczne, w których poza wyraźnie widocznym wychudzeniem oraz kachekcją obserwowano makroskopowo przekrwienia w okolicach płytek kostnych i skóry, w szczególności w okolicach głowy. W jamie brzusznej najbardziej widoczne były zmiany morfologiczne na powierzchni pęcherzy pławnych, na których występowały wybroczyny oraz przekrwienia. Pozostałe narządy wewnętrzne charakteryzowały się zmienioną, wiotką i mazistą konsystencją w porównaniu do ryb zdrowych. Nie stwierdzono obecności pokarmu w przewodzie pokarmowym.

W obrazie mikroskopowym wykazano niewiele zmian histopatologicznych w mięśniach czerwonych w porównaniu do mięśni białych, które u jesiotrów stanowią większość masy mięśniowej. Te ostatnie charakteryzowały się licznymi, rozległymi zmianami degeneracyjnymi (atroficznymi, nekrotycznymi) oraz pyknozą, karioreksją i kariolizą jąder komórkowych. Podobne zmiany obserwowano także w tkance chrzęstnej i tkance mięśnia sercowego, natomiast w rdzeniu kręgowym stwierdzono znaczące obkurczenie dużych neuronów wraz z zanikiem wypustek nerwowych. W pęcherzu pławnym obserwowano miejscowo występujące rozległe ogniska martwicze.

W przewodzie pokarmowym występowały liczne nacieki komórek odpornościowych we wszystkich badanych odcinkach. W wątrobie nie stwierdzono wakuoli tłuszczowych, natomiast występowały liczne melanomakrofagi. Ponadto w wielu odcinkach jelit odnotowano znaczące skrócenie nabłonków oraz martwicę. Najbardziej zdegenerowanym narządem była trzustka, w której nie występowały żadne komórki pęcherzykowe, a jedynie komórki odpornościowe.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że tak rozległe zmiany w całym organizmie są spowodowane szeregiem czynników. Po pierwsze, w stadach jesiotrów występują interakcje międzyosobnicze, w wyniku których osobniki słabsze są traktowane z agresją przez pozostałe osobniki w stadzie (Domeneghini i wsp., 2002). Utrudnianie dostępu do paszy znacząco negatywnie wpływało na systematyczne przyrosty, prowadząc do pogłębiania się istniejących różnic we wzroście. W wyniku głodowania dochodziło do zmian degeneracyjnych w trzustce i śluzówce jelita, dodatkowo upośledzając wchłanianie nawet niewielkich ilości pokarmu. Obserwowana utrata śluzówki w przewodzie pokarmowym może mieć także inne podłoże niż samo głodowanie. Zmiany takie obserwowane są w trakcie przebiegu ostrego zapalenia przewodu pokarmowego o zróżnicowanej etiologii - przyczyną mogą być pasożyty (Esch i Huffines 1973), bakterie (Song i wsp., 2014) lub wirusy (Muroga, 2001).

Analiza danych literaturowych dotycząca rozległych i podobnych zmian w obrębie trzustki u ryb wskazała na kilka jednostek chorobowych, które towarzyszą konkretnym chorobom występującym u ryb. Znalezione kilka jednostek chorobowych, które dają podobny obraz makro i mikroskopowy. Jedną z nich jest choroba wirusowa trzustki ryb łososiowatych, której pojedyncze przypadki stwierdzono również u ryb innych gatunków. W przypadku jesiotrów istnieje jednak niewiele danych literaturowych opisujących dokładnie morfologię zainfekowanych ryb. Niemniej najistotniejszy wpływ na homeostazę organizmów mają infekcje wirusowe z wtórnym zakażeniem bakteryjnym co w sprzyjających warunkach (stres) pogłębia podatność na infekcje.

W badaniach Ciulli i wsp. (2016) prowadzonych na jesiotrach rosyjskich i syberyjskich obserwowano objawy, które były bardzo zbliżone do opisywanych w niniejszej pracy (pływanie

w pętle, uszkodzenia skóry, anoreksja, bladość) i występowały w przebiegu zakażeń wirusowych i bakteryjnych. Ze względu jednak na brak możliwości przeprowadzenia analiz mikrobiologicznych w niniejszej pracy za główną przyczynę zaburzeń wzrostu u młodocianych jesiotrów rosyjskich przyjęto silne niedożywienie powodujące dysfunkcję narządów wewnętrznych i rzutujące na pracę układu immunologicznego.

### **Określenie wpływu nowych ksenobiotyków na wzrost i ekspresję genów odpowiedzialnych za miogenezę u ryb łososiowatych**

P3. **Adamek, D.**, Śliwiński, J., Ostaszewska, T., Fajkowska, M., Rzepkowska M., Meguro, Y., Marzecki, K. (2018). Effect of copper and silver nanoparticles on trunk muscles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 18(6), 781-788. DOI: 10.4194/1303-2712-v18\_6\_04.

Trzecia publikacja stanowiąca osiągnięcie naukowe dotyczyła wzrostu młodocianych pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*) narażonych na działanie długotrwałe nanocząstek srebra i miedzi. Celem pracy było określenie stopnia adaptacji tkanki mięśniowej w warunkach chronicznego narażenia na subletalne stężenia nanocząstek srebra i miedzi.

Zdolność ryb do adaptacji do różnych warunków środowiskowych zapewnia im możliwość przetrwania w środowisku o dużej dynamice zmian (Nussey i wsp., 2007). Wpływ czynników środowiskowych często obejmuje zmiany adaptacyjne do przetrwania w nowych warunkach środowiskowych za pomocą zmian fenotypowych uwarunkowanych genetycznie (Jonsson i Jonsson, 2019). W przypadku akwakultury programy selekcyjne prowadzone w ramach prac hodowlanych na całym świecie były skupione głównie na parametrach hodowlanych, w celu zwiększenia zysków z produkcji (Valente i wsp., 1999;



Chevassus i wsp., 2004; Perera i wsp., 2019). W przypadku niektórych gatunków uzyskano linie o mniejszej plastyczności fenotypowej, w porównaniu do osobników dzikich (Palkovacs i wsp., 2011).

Plastyczność fenotypowa pozwala dostosować się do dynamicznie zmieniającego się środowiska, zwłaszcza takich parametrów jak temperatura, natlenienie, dostępność pokarmu, czy odporność na patogeny, ale również w pewnym stopniu umożliwia przeżycie i dalszy wzrost w wodach zanieczyszczonych ksenobiotykami. Substancje te są od dawna obecne w wodach morskich i słodkowodnych, jednakże w ostatnich dziesięcioleciach pomimo wielu badań udowadniających ich negatywny wpływ na środowisko wodne oraz zmian w ustawodawstwie (Štefanac i wsp., 2021) nadal występują ich znaczne ilości. Nieznany jest długoterminowy wpływ nanocząstek na organizmy wodne, co jest szczególnie istotne, kiedy ich wielkość determinuje tempo ich pochłaniania przez organizmy wodne. Od niedawna dopiero wiadomo, że nanocząstki niektórych metali oraz nanocząstki plastiku są w stanie przejść przez barierę łożyska i krew-mózg. Omawiany wcześniej potencjał do adaptacji i plastyczności w zmieniającym się środowisku prawdopodobnie wpływa również na zdolność przetrwania rybom narażonym na działanie nanocząstek. Z tego powodu prowadzenie badań nad długoterminowym wpływem tych substancji na ryby uważałam za szczególnie ważne. Do badań wybrałam nanocząstki srebra (AgNPs) i miedzi (CuNPs), których toksyczność na organizmy wodne jest intensywnie analizowana.

Ocena wpływu nanocząstek miedzi i srebra została przeprowadzona na podstawie analizy histologicznej tkanki mięśniowej jak i analizy ekspresji genów metodą RealTime PCR. Po przeprowadzeniu doświadczenia trwającego 28 dni w narażeniu na wodne roztwory nanocząstek srebra (1.5 mg/L) i miedzi (0.15 mg/L) pobrano materiał tkankowy (wycinki tkanki

mięśniowej) do badań histologicznych i genetycznych. W celu przeprowadzenia analizy histologicznej mięśni tkanka ta została poddana standardowej procedurze parafinowej, a uzyskane skrawki poddano topograficznemu barwieniu HE oraz immunohistochemicznej detekcji komórek proliferujących z użyciem przeciwciała anty PCNA. Wybarwiony materiał poddano analizom morfometrycznym, w których zliczano liczbę włókien białych i czerwonych wraz z ich powierzchnią oraz liczbę komórek proliferujących w obu typach tkanki. Natomiast oznaczenie aktywności genów *igf-1*, *igf-2*, *mstn1a* i *mstn1b* przeprowadzono po przepisaniu wyizolowanego RNA na cDNA i przeprowadzeniu reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Pozyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Przeprowadzone badania wykazały, że nanocząstki miedzi w porównaniu do nanocząstek srebra mają większy wpływ na funkcjonowanie tkanki mięśniowej badanych ryb. Pomimo występowania znacznej liczby włókien hiperplastycznych w obu badanych grupach, to w grupie narażonej na nanocząstki srebra stwierdzono znacznie wyższą zawartość procentową włókien hiperplastycznych. Wskazuje to na opóźnienie wzrostu tkanki mięśniowej w tej grupie w porównaniu do AgNPs i kontroli, gdzie stwierdzono występowanie licznych włókien hipertroficznym (>300  $\mu\text{m}^2$ ). Ponadto rozkład analizowanych włókien obserwowany w grupie narażonej na nanocząstki srebra był najbardziej zbliżony do rozkładu w grupie kontrolnej. Wyniki te można interpretować dwojako – z jednej strony nanocząstki srebra wpłynęły pozytywnie na tempo wzrostu włókien mięśniowych, z drugiej natomiast zapewniły mniejszy potencjał wzrostowy w porównaniu do grupy narażonej na nanocząstki miedzi. Niemniej pozostałe wyniki analiz tej tkanki, liczba komórek proliferujących oraz liczba włókien hipertroficznym, wskazywały jednoznacznie na zahamowanie wzrostu hipertroficznego tkanki mięśniowej w przeciwieństwie do osobników narażonych na nanocząstki srebra.

W niniejszych badaniach pstrągi tęczowe z grupy AgNPs charakteryzowały się wyższą ekspresją genów *igf1* i *igf2* w porównaniu do grupy CuNPs odpowiadających za wzrost tkanki mięśniowej. W szczególności interesująca była wyższa niż w grupie kontrolnej ekspresja *igf2* w grupie narażonej na AgNPs, pomimo stwierdzonej niższej niż w grupie kontrolnej masy ciała ryb. Wysoka liczba jąder komórkowych PCNA pozytywnych w tkance mięśniowej pstrągów poddanych wodnym roztworom nanocząstek srebra mogła być związana z wyższą niż w grupie narażonej na CuNPs ekspresją *igf1* i *igf2* u tych ryb. Uwzględniając wszystkie wyniki można wnioskować, że nanocząstki srebra w porównaniu do nanocząstek miedzi oddziałują korzystniej na tkankę mięśniową poprzez stymulację podziałów komórkowych, będących efektem działania genów osi somatotropowej (*igf1*, *igf2*).

**Adaptacje morfologiczne ryb oddychających powietrzem atmosferycznym, które wprowadzane są do obrotu handlowego w Polsce z rzędu okoniokształtnych i sumokształtnych.**

P4. **Adamek-Urbańska, D.**, Błażewicz, E., Sobień, M., Kasprzak, R., Kamaszewski, M. (2021). Histological Study of Suprabranchial Chamber Membranes in Anabantoidei and Clariidae Fishes. *Animals*, 11(4), 1158. DOI: 10.3390/ani11041158

Ostatnia publikacja dotyczyła plastyczności fenotypowej ryb do warunków środowiskowych, jednakże przedmiotem badań były dodatkowe narządy oddechowe ryb z rzędu okoniokształtnych (*Perciformes*) i sumokształtnych (*Siluriformes*). Omawiana publikacja stanowiła podstawę do przyznania środków finansowych w ramach programu Miniatura5 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki na dalsze badania wybranych gatunków ryb. Celem pracy było zbadanie i porównanie budowy dodatkowych narządów oddechowych

trzech gatunków ryb błędnikowców (*Anabantoidei*): gurami całującego (*Helostoma temminckii* Cuvier, 1829), buszowca ostropyskiego (*Ctenopoma acutirostre* Pellegrin, 1899) i bojownika wspaniałego (*Betta splendens*, Regan, 1910) z narządem nadskrzelowym dwóch sumokształtnych *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758) i *Clarias angolensis* (Steindachner, 1866), które posiadają specjalne przystosowania anatomiczne umożliwiające przetrwanie w wodach charakteryzujących się niską zawartością rozpuszczonego tlenu.

Wspomniane przy poprzednich publikacjach zmiany klimatu dla powszechnie hodowanych w naszym regionie gatunków ryb takich jak karp czy pstrąg tęczowy w ciągu kolejnych kilkunastu lat mogą doprowadzić nawet do znaczącego ograniczenia produkcji ze względu na wysokie temperatury i związaną z nimi niedostateczną ilość tlenu (FAO, Barange i wsp., 2018). Obecnie takie warunki środowiskowe występują w wodach Azji i Afryki, w wysychających sezonowo ciekach wodnych, mokradłach czy zalewanych okresowo polach ryżowych. W warunkach tych doskonale radzą sobie ryby posiadające dodatkowe narządy oddechowe (ARO – accessory respiratory organ), takie jak labirynt (LO) czy narząd nadskrzelowy (DO), które w trakcie okresowych niedoborów tlenu w wodzie pozwalają na wspomaganie organizmu poprzez oddychanie powietrzem atmosferycznym (Arratia, 2003; Abd-Elmaksoud i wsp., 2008). Dodatkowe narządy oddechowe u badanych gatunków występowały w jamie nadskrzelowej. Struktura morfologiczna zarówno LO jak i DO jest dość podobna – silnie unaczyniony nabłonek oddechowy pokrywa rdzeń łącznotkankowy. Jego forma może być mniej (LO) lub bardziej (DO) złożona w zależności od wieku i gatunku.

W celu porównania LO i DO przeprowadzono badania histologiczne na trzech gatunkach ryb błędnikowców i dwóch gatunkach ryb należących do Claridae. Materiał do badań stanowiły całe ryby w stadium postlarwalnym, które w całości poddano utrwalaniu

w 4% formalinie a następnie odwapniono i poddano dalszemu procesowaniu. Zatopiony materiał histologiczny był zatapiany w parafinie a następnie skrojony i poddany barwieniom. Wykonano podstawowe topograficzne barwienie hematoksyliną i eozyną (HE), potrójnym barwieniem wg Mallorego oraz opracowaną przeze mnie modyfikacją rutynowego barwienia błękitem alcjańskim i odczynnikiem Schiffa z kwasem nadjodowym (AB/PAS) w kombinacji z barwieniem Mallorego. Przeprowadzono analizę mikroskopową wraz z pomiarami wysokości nabłonka wyściełającego ściany jamy nadskrzelowej w czterech lokalizacjach u wszystkich badanych gatunków.

Przeprowadzone badania wykazały podobną budowę skrzeli i jamy skrzelowej. Jedyną różnicą jaką wykazano w budowie skrzeli była forma budowy wyrostków filtracyjnych, które charakteryzowały się różną wysokością i budową, jednakże w przypadku gurami całującego tworzyły złożoną strukturę filtracyjną, która zostanie opisana w następnej publikacji. Analiza struktury histologicznej LO i jamy nadskrzelowej wykazała, że jest ona zbliżona do budowy skrzeli. Podobnie jak w skrzelach występowały komórki śluzowe oraz silnie rozbudowana sieć naczyń krwionośnych. Labirynt buszowców ostropyskich i bojowników wspaniałych były do siebie zbliżone pod względem budowy opierając się na szkielecie chrzęstnym. W przypadku gurami całującego rdzeń ten był częściowo skostniały. Ponadto w ścianach jamy nadskrzelowej znaleziono kaweole (wgłębienia w jednolitej ścianie jamy skrzelowej przypominające odwróconą literę T), na dnie których znajdowały się licznie występujące komórki śluzowe. Budowa tych struktur była zależna gatunkowo i najbardziej złożoną obserwowano u bojowników wspaniałych. Dodatkowo wielkość i liczba tych jam była zależna również od regionu jamy nadskrzelowej, w którym były zlokalizowane. W części dogłowej i doogonowej była bardziej złożona niż w części grzbietowej jamy nadskrzelowej. W ścianach

jamy nadskrzelowej błędnikowców występowały również niewielkie, krótkie, silnie unaczynione wypustki pokryte nabłonkiem.

Narząd nadskrzelowy ryb z rodzaju *Clarias* znajdował się w dwóch lokalizacjach – niewielki fragment na dnie jamy skrzelowej, natomiast drugi, większy w jamie nadskrzelowej. Podobnie jak w przypadku labiryntu, DO zawierał rdzeń chrzęstny otoczony tkanką łączną luźną i pokryty silnie unaczynionym nabłonkiem oddechowym. Ściany jamy nadskrzelowej wyściełane były nabłonkiem oddechowym z licznymi podobnymi do wypustek naczyń włosowatymi oraz komórkami śluzowymi. W części dogrzebietowej i doogonowej nabłonek ten swoją budową bardziej przypominał ten wyściełający jamę ustną lub przełyk.

Ichtyofauna wód o niskiej zawartości tlenu charakteryzuje się szeregiem przystosowań do zwiększenia wydajności wymiany gazowej. Nabłonek oddechowy wspomagający proces wymiany gazowej u niektórych gatunków ryb może występować nie tylko w skrzelach, ale również w ARO wywodzących się ze skrzel, w pęcherzu pławnym (Phuong i wsp., 2018), czy też jelicie tylnym (Huang i wsp., 2020). Jak dotąd przypuszczano, że ściany jamy nadskrzelowej mogą także uczestniczyć w wymianie gazowej u ryb Anabantoidei (Munshi i wsp., 1986) i Claridae (Maina i Maloiy, 1986; El-Hady i wsp., 2019), a wyniki opisywanych powyżej badań potwierdzają tę hipotezę. Wspomniane wypustki znajdujące się w ścianie jamy nadskrzelowej zawierały nie tylko erytrocyty, ale również komórki przypominające komórki filarowe występujące w lamellach II skrzel, co wskazuje na możliwość uczestniczenia podobnie jak nabłonek oddechowy skrzel w wymianie gazowej. Ponadto kolejnym argumentem za tym przemawiającym są znajdujące się w ścianach jamy nadskrzelowej komórki śluzowe, które produkują surfaktanty powierzchniowe zapewniające ochronę przed mikroorganizmami,

redukcję adhezji zanieczyszczeń znajdujących się w wodzie i wspomagają wymianę gazową (Daniels i wsp., 1994, 2001, 2004).

Wszystkie opisywane cechy wraz z danymi literaturowymi wskazują, na istotne podobieństwo budowy histologicznej ścian jamy nadskrzelowej zarówno u ryb Anabantoidei jak i Claridae. Jest to cenna obserwacja dla hodowców, która nie tylko potwierdza wysoką plastyczność badanych gatunków w odpowiedzi na parametry wody takie jak temperatura i związane z nią natlenienie, ale również wskazuje, że ryby te są znacznie lepiej do nich przystosowane niż pierwotnie zakładano. Informacje pozyskane na podstawie przeprowadzonych obserwacji pomogą w dalszych badaniach nad plastycznością ryb oddychających powietrzem atmosferycznym. Akwakultura ryb sumokształtnych już w tej chwili stanowi duży udział w produkcji ryb konsumpcyjnych w Europie (7554 ton w 2019 roku, FAO), choć ich produkcja odbywa się wyłącznie w recyrkulacyjnych obiegach hodowlanych. Biorąc pod uwagę tendencje ogólnoświatowe we wzroście średnich temperatur, w szczególności w sezonie wiosennym i letnim, rozwój akwakultury takich ryb jest interesującą alternatywą dla ryb produkowanych w stawach ziemnych, których przeżywalność rokrocznie maleje.

### **Podsumowanie**

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że plastyczność ryb w zakresie adaptacji do zróżnicowanych warunków chowu i hodowli jest duża, jednakże ma swoje ograniczenia. W przypadku ryb jesiotrowatych wtórnym skutkiem prowadzonej pracy hodowlanej jest silne zróżnicowanie tempa wzrostu w pierwszych tygodniach po wykluciu. Tak zaburzona struktura populacji przynosi straty finansowe ze względu na konieczność

dwukrotnego sortowania ryb na masę ciała oraz problemy z utrzymaniem tych ryb w hodowli, takie jak straty paszy, pogorszenie jakości wody, zwiększenie podatności na choroby czy też zaostrezenie zmian behawioralnych nieobserwowanych w warunkach naturalnych. W przeciwieństwie do ryb jesiotrowatych, ryby łososiowate łatwiej adaptują się do trudnych warunków środowiskowych, w których są w stanie przetrwać nawet w narażeniu na ksenobiotyki metaliczne w formie nanocząstek. Ponadto nanocząstki mogą wpływać korzystnie na modyfikację ekspresji genów odpowiedzialnych za wzrost ryb co stanowi interesujące zagadnienie do dalszych prac badawczych. W przypadku ryb okoniokształtnych i sumokształtnych przeprowadzone badania wykazały większy niż pierwotnie zakładano potencjał adaptacyjnych do warunków akwakultury ze względu na rozbudowany nabłonek oddechowy znajdujący się nie tylko w skrzelach i dodatkowych narządach oddechowych, ale również w ścianach jamy nadskrzelowej. Gatunki poddane analizie w niniejszych badaniach są powszechnie hodowane na świecie w akwakulturze ryb konsumpcyjnych jak i ryb ozdobnych.

Wysoka adaptacyjność ryb do zmian środowiskowych, bez względu na to czy jest to naturalny habitat czy stworzone sztucznie warunki hodowli przez człowieka, jest kluczowa dla dalszego rozwoju akwakultury. Zarówno wzrost temperatur jak i zanieczyszczenie środowiska ksenobiotykami mogą negatywnie wpływać na homeostazę i dobrostan ryb. Nowymi wyzwaniami akwakultury w najbliższych latach będzie umiejętne wykorzystanie istniejącego potencjału, rozwiązywanie istniejących problemów hodowlanych oraz rozwój i wprowadzenie różnorodności w zakresie utrzymywanych gatunków ryb, aby dostosować bieżącą produkcję do zmieniających się warunków środowiskowych. Ostrożne predykcje w najbliższych latach (do 2050) w Europie wskazują na stopniowy spadek zainteresowania mięsem czerwonym, którego produkcja jest jednocześnie najsilniej oddziaływująca na środowisko i klimat, na rzecz



innych wysokojakościowych produktów o minimalnym wpływie na środowisko (śladzie węglowym) w zakresie jego zanieczyszczenia. W ramach takich działań wprowadzanie do obrotu mięsa ryb produkowanych i pozyskanych lokalnie z nowoczesnej, energo- i wodooszczędnej akwakultury w obiegach zamkniętych jest niezwykle ważne nie tylko ze względu na zmieniające się środowisko, ale i bezpieczeństwo żywnościowe.

#### Bibliografia:

1. Abd-Elmaksoud, A., Kassab, M., Sayed, A. A., Fayed, M. (2008). Anatomical, light, and scanning electron microscopic studies on the air breathing dendritic organ of the sharp tooth catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Veterinary Anatomy*, 1(1), 29-37.
2. Allen, P. J., Nicholl, M., Cole, S., Vlazny, A., Cech Jr, J. J. (2006). Growth of larval to juvenile green sturgeon in elevated temperature regimes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135(1), 89-96.
3. Arratia, G. (2003). Catfish head skeleton. An overview. *Catfishes*, 1, 3-46.
4. Barange, M., Bahri, T., Beveridge, M. C., Cochrane, K. L., Funge-Smith, S., Poulain, F. (2018). Impacts of climate change on fisheries and aquaculture: synthesis of current knowledge, adaptation, and mitigation options. FAO. <https://www.fao.org/3/i9705en/i9705en.pdf>
5. Burgerhout, E., Mommens, M., Johnsen, H., Aunsmo, A., Santi, N., Andersen, Ø. (2017). Genetic background and embryonic temperature affect DNA methylation and expression of myogenin and muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PloS one*, 12(6), e0179918. 10.1371/journal.pone.0179918
6. Campagnolo, L., Massimiani, M., Vecchione, L., Piccirilli, D., Toschi, N., Magrini, A., Bonanno, E., Scimeca, M., Castagnozzi, L., Buonanno, G., Stabile, L., Cubadda, F., Aureli, F., Fokkens, P., Kreyling, W., Cassee, F., Pietroiusti, A. (2017). Silver nanoparticles inhaled during pregnancy reach and affect the placenta and the foetus. *Nanotoxicology*, 11(5), 687-698.
7. Campos, C., Valente, L. M. P., Conceição, L. E. C., Engrola, S., Sousa, V., Rocha, E., Fernandes, J. M. O. (2013). Incubation temperature induces changes in muscle cellularity and gene expression in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Gene*, 516(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.074>

8. Chevassus, B., Quillet, E., Krieg, F., Hollebecq, M. G., Mambrini, M., Fauré, A., Labbe, L., Hiseux J. P., Vandeputte, M. (2004). Enhanced individual selection for selecting fast growing fish: the "PROSPER" method, with application on brown trout (*Salmo trutta fario*). *Genetics Selection Evolution*, 36(6), 1-19.
9. Ciulli, S., Volpe, E., Sirri R., Passalacqua, P. L., Bianchi, F. C., Serratore, P., Mandrioli, L. (2016) Outbreak of mortality in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeons associated with sturgeon nucleocytoplasmic large DNA virus. *Veterinary microbiology*, 191, 27-34
10. Daczewska, M., Saczko, J. (2005). Myotomal myogenesis of axial muscle in the sturgeon *Acipenser baeri* (*Chondrostei, Acipenseriformes*). *Folia biologica*, 53(1-2), 29-38.
11. Daniels, C. B., Orgeig, S. (2001). The comparative biology of pulmonary surfactant: past, present, and future. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 129(1), 9-36.
12. Daniels, C. B., Orgeig, S., Sullivan, L. C., Ling, N., Bennett, M. B., Schürch, S., Val, A. L., Brauner, C. J. (2004). The origin and evolution of the surfactant system in fish: insights into the evolution of lungs and swim bladders. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77(5), 732-749.
13. Daniels, C. B., Skinner, C. H. (1994). The composition and function of surface-active lipids in the goldfish swim bladder. *Physiological Zoology*, 67(5), 1230-1256.
14. De Riu, N., Zheng, K. K., Lee, J. W., Lee, S. H., Bai, S. C., Moniello, G., Hung, S. S. (2012). Effects of feeding rates on growth performances of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) fries. *Aquaculture Nutrition*, 18(3), 290-296.
15. Domeneghini, C., Radaelli G., Bosi, G., Arrighi, S., Di Giancamillo, A., Pazzaglia, M., Mascarello, F. (2002). Morphological and histochemical differences in the structure of the alimentary canal in feeding and runt (feed deprived) white sturgeons (*Acipenser transmontanus*). *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 341-346.
16. dos Santos, R., Aguiar, A. C. F., Boëchat, I. G., Gücker, B. (2013). Impacts of fish farm pollution on ecosystem structure and function of tropical headwater streams. *Environmental Pollution*, 174, 204-213.
17. Duarte, C. M., Marbá, N., Holmer, M. (2007). Rapid domestication of marine species. *Science*, 316(5823), 382-383.
18. El-Hady, E., El-Behery, E. I., Ebraheim, L. L. (2019). Morpho-histological approach of African catfish (*Clarias gariepinus*) respiratory system with mucocytes and arterial blood supply attribute. *International Journal of Fisheries And Aquatic Studies*, 7, 31-41.
19. Esch, G. W., Huffines, W. J. (1973). Histopathology associated with endoparasitic helminths in bass. *The Journal of Parasitology*, 306-313.

20. FAO. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019/FAO Annuaire. Statistiques des Pêches et de L'aquaculture 2019/FAO Anuario. Estadísticas de Pesca y Acuicultura 2019. Rome/Roma. 2021. Available online: [https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019\\_USBcard/navigation/index\\_intro\\_e.htm](https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019_USBcard/navigation/index_intro_e.htm)
21. Huang, L., Yang, L., Liu, J., Cao, X. (2020). Comparative histological analysis of intestines of loach, grass carp and catfish provide insights into adaptive characteristics in air-breathing fish. *Croatian Journal of Fisheries*, 78(2), 91-98.
22. Huntingford, F. A. (2004). Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *Journal of Fish Biology*, 65, 122-142.
23. Grodzicki, W., Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska, J., Kruszewski, M. (2021). Nanoplastic impact on the gut-brain axis: current knowledge and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12795.
24. Jonsson, B., Jonsson, N. (2019). Phenotypic plasticity and epigenetics of fish: embryo temperature affects later-developing life-history traits. *Aquatic Biology*, 28, 21-32.
25. Lehtonen, H. (1996). Potential effects of global warming on northern European freshwater fish and fisheries. *Fisheries Management and Ecology*, 3(1), 59-71.
26. Maina, J. N., Maloiy, G. M. O. (1986). The morphology of the respiratory organs of the African air-breathing catfish (*Clarias mossambicus*): A light, electron and scanning microscopic study, with morphometric observations. *Journal of Zoology*, 209(3), 421-445.
27. Mattsson, K., Johnson, E. V., Malmendal, A., Linse, S., Hansson, L. A., Cedervall, T. (2017). Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Scientific reports*, 7(1), 11452.
28. Márquez, J. C. M., Partida, A. H., del Carmen, M., Dosta, M., Mejía, J. C., & Martínez, J. A. B. (2018). Silver nanoparticles applications (AgNPS) in aquaculture. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 5-11.
29. Milla, S., Pasquet, A., El Mohajer, L., Fontaine, P. (2021). How domestication alters fish phenotypes. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 388-405.
30. Munshi, J. S. D., Olson, K. R., Ojha, J., Ghosh, T. K. (1986). Morphology and vascular anatomy of the accessory respiratory organs of the air-breathing climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch). *American journal of anatomy*, 176(3), 321-331.

31. Muroga, K. (2001). Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture*, 202(1-2), 23-44.
32. Nakajima, T., Hudson, M. J., Uchiyama, J., Makibayashi, K., Zhang, J. (2019). Common carp aquaculture in Neolithic China dates back 8,000 years. *Nature Ecology & Evolution*, 3(10), 1415-1418.
33. Nathanailides, C., Tsoumani, M., Papazogloy, A., Paschos, I. (2002). Hatching time and post-hatch growth in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(4-6), 651-654.
34. Nussey, D. H., Wilson, A. J., Brommer, J. (2007). The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *Journal of evolutionary biology*, 20(3), 831-844.
35. Palkovacs, E. P., Kinnison, M. T., Correa, C., Dalton, C. M., Hendry, A. P. (2011). Fates beyond traits: Ecological consequences of human-induced trait change. *Evolutionary Applications*, 5, 183–191.
36. Patra, R. W., Chapman, J. C., Lim, R. P., Gehrke, P. C., Sunderam, R. M. (2015). Interactions between water temperature and contaminant toxicity to freshwater fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(8), 1809-1817.
37. Perera, E., Simó-Mirabet, P., Shin, H. S., Rosell-Moll, E., Naya-Catalá, F., de las Heras, V., Martos-Sitcha, J. A., Karalazos V., Armero, E., Arizcun, M., Chaves, E., Berbel, C., Manchado. M., Afonso, J. M., Galcuch-Giner, J., Pérez-Sánchez, J. (2019). Selection for growth is associated in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with diet flexibility, changes in growth patterns and higher intestine plasticity. *Aquaculture*, 507, 349-360.
38. Phuong, L. M., Huong, D. T. T., Malte, H., Nyengaard, J. R., Bayley, M. (2018). Ontogeny and morphometrics of the gills and swim bladder of air-breathing striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Journal of Experimental Biology*, 221(3), jeb168658.
39. Potts, L. B., Mandrak, N. E., & Chapman, L. J. (2021). Coping with climate change.
40. Prüst, M., Meijer, J., & Westerink, R. H. (2020). The plastic brain: neurotoxicity of micro-and nanoplastics. *Particle and fibre toxicology*, 17(1), 1-16.
41. Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M., Biocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment international*, 146, 106274.
42. Saraiva, J. L., Castanheira, M. F., Arechavala-López, P., Volstorf, J., Studer, B. H. (2018). Domestication and welfare in farmed fish. In *Animal domestication*. IntechOpen.
43. Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., Ringø E (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology*, 40(1), 40-48.

44. Steinbacher, P., Haslett, J. R., Six, M., Gollmann, H. P., Sängner, A. M., & Stoiber, W. (2006). Phases of myogenic cell activation and possible role of dermomyotome cells in teleost muscle formation. *Developmental dynamics*, 235(11), 3132-3143.
45. Štefanac, T., Grgas, D., Landeka Dragičević, T. (2021). Xenobiotics—Division and Methods of Detection: A Review. *Journal of Xenobiotics*, 11(4), 130-141.
46. Teletchea, F. (2019). Animal domestication: A brief overview. IntechOpen.
47. Vagner, M., Zambonino-Infante, J. L., Mazurais, D. (2019). Fish facing global change: are early stages the lifeline?. *Marine environmental research*, 147, 159-178.
48. Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. A. F., Fauconneau, B. (1999). Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast-and slow-growing strains of rainbow trout. *Journal of fish biology*, 55(4), 675-691.
49. Wang, S. Y., Lau, K., Lai, K. P., Zhang, J. W., Tse, A. C. K., Li, J. W., Tong, Y., Chan, T., Kong-Chu Wong, C. K. C., Man-Ying Chiu J., Au D.W.T., Wong A. S. T., Richard Yuen-Chong Kong R. Y. C., Wu, R. S. S. (2016). Hypoxia causes transgenerational impairments in reproduction of fish. *Nature communications*, 7(1), 1-9.
50. Woods III, L. C. (2001). Domestication and strain evaluation of striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture*, 202(3-4), 343-350.

.....

(podpis wnioskodawcy)