

Poznań dnia, 31.07.2023

Dr hab. Karol Giejdasz
Katedra Zoologii, Pracownia Pszczelnictwa
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska polskiego 71C
60-625 Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Patrycji Skowronek

”Wpływ ekstraktu z konopi oraz oleju CBD na parametry fizjologiczno-biochemiczne związane z odpornością u robotnic pszczoł miodnych (*Apis mellifera*)”

wykonanej w Katedrze Ekofizjologii Bezkręgowców i Biologii Eksperymentalnej

Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

pod kierunkiem prof. dr hab. Anety Stracheckiej

Recenzję rozprawy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pisemną prośbę Pani profesor dr hab. Brygidy Ślaskiej, Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 05.07.2023 i na podstawie uzyskanego egzemplarza rozprawy autorstwa Pani mgr inż. Patrycji Skowronek.

1. Zarys problematyki badawczej

Pszczoła miodna jest użytkowym gatunkiem owada i formalnie zwierzęciem gospodarskim, jednak nadal pozostała naturalnym składnikiem środowiska i istotnym elementem fauny zapylającej, który ma duże znaczenie dla plonowania upraw roślin entomofilnych. Utrzymanie stabilnej populacji pszczoły miodnej jest ekonomicznie uzasadnione i szczególnie ważne dla zabezpieczenia usługi zapylania dla produkcji roślinnej. Pszczoły, ze względu na charakter związków troficznych, są silnie powiązane ze środowiskiem naturalnym. Niekorzystne zmiany warunków środowiskowych, w tym utrata siedlisk i utrata bioróżnorodności, zmiany fenologiczne, przekształcanie agrocenoz, chemizacja rolnictwa powodują niedożywienie pszczoł, obniżają ich odporności, zwiększają podatność na infekcje patogenami i pasożytami. Stres środowiskowy jest przyczyną obniżenia zdolności adaptacyjnych pszczoł, a synergiczne działanie niekorzystnych czynników w konsekwencji prowadzi do zwiększenia śmiertelności robotnic i giniecia rodzin pszczelich. Możliwości ochrony zdrowia pszczoł są ograniczone, ponieważ formalnie nie ma preparatów weterynaryjnych w naszym kraju dopuszczonych do stosowania w leczeniu pszczoł poza preparatami do zwalczania roztocza *Varroa destructor*, a zwalczanie chorób opiera się na profilaktyce nieswoistej i utrzymywaniu zdrowych i silnych rodzin. W tym kontekście stosowanie środków pochodzenia roślinnego o charakterze stymulatorów, które pozwalają na utrzymanie homeostazy w układzie odpornościowym, jest uzasadnioną strategią zapobiegania chorobom i stratom rodzin pszczelich.

Praca doktorska realizuje badania eksperymentalne i ocenia wpływ ekstraktu z konopi siewnej *Cannabis sativa*, którego głównym składnikiem jest kannabidiol (CBD), na odpowiedzi obronne robotnic pszczoły miodnej w różnym wieku. Ekstrakt z konopi rozpuszczony w glicerynie podawany była drogą pokarmową jako dodatek do syropu lub w formie nasączonych pasków materiałowych. Ocena skuteczności metody aplikacji preparatu była jednym z celów pracy. Analizy hemolimfy potwierdziły pozytywny wpływ ekstraktu z konopi na aktywności układu proteolitycznego i enzymów antyoksydacyjnych, a także na stężenie markerów enzymatycznych i nieenzymatycznych związanych z procesami odpornościowymi.

2. Opis i ocena rozprawy doktorskiej

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Skowronek zatytułowana “Wpływ ekstraktu z konopi oraz olejku CBD na parametry fizjologiczno-biochemiczne związane z odpornością u robotnic pszczoł miodnych (*Apis mellifera*)” stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych wymienionych poniżej, który opatrzone obszernym autoreferatem.

1. Skowronek, P., Wójcik, Ł., Strachecka, A. (2021). Cannabis extract has a positive-immunostimulating effect through proteolytic system and metabolic compounds of honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Animals*, 11(8), 2190.
2. Skowronek, P., Wójcik, Ł., Strachecka, A. (2022). Impressive Impact of Hemp Extract on Antioxidant System in Honey Bee (*Apis mellifera*) Organism. *Antioxidants*, 11(4), 707.
3. Skowronek, P., Wójcik, Ł., Strachecka, A. (2022). CBD Supplementation Has a Positive Effect on the Activity of the Proteolytic System and Biochemical Markers of Honey Bees (*Apis mellifera*) in the Apiary. *Animals*, 12(18), 2313.
4. Skowronek, P., Strachecka, A. (2023). Cannabidiol (CBD) Supports the Honeybee Worker Organism by Activating the Antioxidant System. *Antioxidants*, 12(2), 279.

Artykuły opublikowano w indeksowanych czasopismach naukowych o współczynniku oddziaływania (*IF*) wynoszącym według bazy Journal Citation Report w roku wydania publikacji 3,231 (1); 7,0 (2); 3,0 (3); 7,0 (4); (łącznie IF 20,231, wg MEiN 400 pkt.). Pani mgr inż. Patrycja Skowronek jest pierwszym i wiodącym autorem opublikowanych prac, a jej udział zgodnie z załączonymi oświadczeniami Doktorantki oraz Współautorów w każdej z pracy wynosi 85%. Warto zaznaczyć, że w powstaniu tych prac, poza Doktorantką ma udział dwóch współautorów, a w czwartej tylko Promotor. Oświadczenia o współautorstwie mgr inż. Patrycji Skowronek oraz Współautorów są zgodne i jednoznacznie wskazują na dominujący udział Doktorantki w powstaniu artykułów naukowych. Doktorantka odegrała bardzo znaczącą rolę na każdym etapie powstawania pracy, zaczynając od wykreowania pomysłu na badania, a kończąc na kierowaniu procesem wydawniczym. We wszystkich pracach Doktorantka jest autorem koncepcji badawczej oraz hipotez badawczych; zaprojektowała badania i je realizowała; pobierała materiał i samodzielnie wykonała analizy laboratoryjne; przeprowadziła analizę wyników; jest autorem wniosków i pierwszej wersji manuskryptu; pełniła funkcję autora korespondencyjnego. Autorka, bez wątpienia, wykazała się bardzo dużym zaangażowaniem i samodzielnością w prowadzeniu badań, oraz pracach

redakcyjnym. Jednoznacznym potwierdzeniem aktywności badawczej i wydawniczej są także oświadczenia o udziale w autorstwie załączone do artykułów przez redakcje czasopism, w których opublikowano prace. Rozprawa doktorska ma formę cyklu publikacji, które uzyskały pozytywne oceny i rekomendacje w procesie recenzowania prac naukowych, co niewątpliwie podkreśla jej duży walor naukowy.

2.1. Układ rozprawy doktorskiej

Zastosowany układ pracy jest odpowiednio dostosowany do przyjętej formy rozprawy doktorskiej – cyklu publikacji. Dysertacja składa się z czterdziestu dwóch stron maszynopisu oraz opublikowanych artykułów (załącznik 2). Należy zaznaczyć, że maszynopis rozprawy ma charakter autoreferatu i jest oceniany i analizowany w kontekście opublikowanych artykułów. Na ocenianą rozprawę doktorską składają się: strona tytułowa, oświadczenia promotora oraz autora rozprawy, wykaz prac naukowych składających się na cykl artykułów, poszerzony o dane bibliometryczne oraz indywidualny wkład pracy Doktorantki, spis treści maszynopisu rozprawy, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, kolejne rozdziały maszynopisu rozprawy, oświadczenia o współautorstwie, pełne teksty prac naukowych. Manuskrypt, poza załącznikiem 2. (opublikowane prace) został napisany w języku polski, z zastosowaniem słownictwa naukowego i z zachowaniem zasad pisania tekstu naukowego. Tradycyjny układ dysertacji został w dużej mierze zachowany, rozdział wyniki i dyskusja zostały połączone, co jest stosowane w pracach naukowych. Warto zaznaczyć, że oceniane opracowanie ma formę odpowiednią dla pracy o charakterze naukowo-badawczej i wyróżnia: wprowadzenie teoretyczne, hipotezy i cele badawcze, materiały i metody, omówienie wyników i dyskusja, wnioski, bibliografia.

Wprowadzenie teoretyczne obejmuje wstęp i przegląd literatury, którego podsumowanie prowadzi do zarysowania hipotez badawczych. W kolejnym rozdziale Autorka jasno formułuje główne hipotezy przyczynowo-skutkowe oraz cele rozprawy, wyróżnia także dodatkowy cel dotyczący określenia skuteczności stosowania różnych metod suplementacji.

W rozdziale manuskryptu *Materiał i metody* zamieszczono pełny opis zastosowanego układu doświadczeń, procedur przygotowania pszczoł i podawania suplementów zawierających aktywne substancje, metod pozyskiwania materiału biologicznego, metod analitycznych oraz metod statystycznej weryfikacji wyników. Rozdział ten bardzo wyraźnie pokazuje, że badania zostały zaplanowane kompleksowo i podporządkowane jednemu celowi naukowemu, a cztery przedstawione publikacje są formalną i naturalną konsekwencją realizacji doktoratu. Nie można mieć żadnych wątpliwości, że zbiór artykułów jest tematycznie spójny i tworzy kompletne opracowanie naukowe.

W rozdziale 6. manuskryptu *Omówienie wyników i dyskusja* Doktorantka w formie opisowej przedstawiła wyniki opublikowane w artykułach, umiejętnie dołączając swoje komentarze oraz cytowania innych autorów. Wyróżniono nie ponumerowane podrozdziały, w których omówiony został wpływ ekstraktu konopi na aktywność układ proteolityczny, stężenie markerów enzymatycznych i nieenzymatycznych oraz aktywność systemu antyoksydacyjnego. Podział ten jest konsekwencją przyjętych hipotez, i podobnie jak układ badań i metodyka podkreśla spójność i jednorodność cyklu publikacji. Zgadza się z Autorką, że powielanie w maszynopisie opublikowanych wyników jest zbędne, gdy prace stanowią załączniki do rozprawy doktorskiej przedkładanej do oceny jako cykl publikacji.

Pracę podsumowuje pięć, jasno sformułowanych wniosków, które wynikają z postawionych hipotez.

2.3. Cel pracy i hipotezy badawcze

Cele pracy oraz hipotezy badawcze zostały jasno sformułowane w rozdziale 4. Autorka zaplanowała zrealizować pięć celów badawczych, które zakładają określenie wartości parametrów biochemicznych w hemolimfie robotnic pszczoł miodnych suplementowanych ekstraktem z konopi lub olejkami CBD. Pierwszy cel polegał na określeniu aktywności proteaz i inhibitorów proteaz; drugi aktywności enzymów antyoksydacyjnych; trzeci aktywności biomarkerów enzymatycznych (ALT, AST, ALP); czwarty i piąty stężenia biomarkerów nieenzymatycznych (wymieniono ich 10). Efekty stosowania substancji aktywnych konopi w diecie pszczoł oceniano dla dwóch postaci suplementu, a ocenę ich skuteczności wyznaczono jako cel dodatkowy pracy doktorskiej. Brak wystandaryzowanych metod podawania pszczołom substancji o charakterze olejków uzasadnia realizację tego celu o znaczeniu także praktycznym.

Główna hipoteza badawcza została już sformułowana we wprowadzeniu i brzmi - "Ekstrakt z konopi i olejek CBD zwiększają odporność i witalność pszczoł poprzez zwiększenie aktywności systemu proteolitycznego, antyoksydacyjnego oraz markerów biochemicznych, zarówno enzymatycznych jak i nieenzymatycznych". W rozdziale 4. zasadnicza treść hipotezy nie zmieni się, natomiast Doktorantka wymienia ponadto wszystkie biochemiczne elementy, które badała w hemolimfie, zachowując podział na cztery kategorie parametrów biochemicznych oraz zakłada kierunek ich zmian pod wpływem ekstraktu z konopi.

Wyszczególnione enzymy i inne substancje, są biochemicznymi elementami układu odpornościowego zatem Autorka słusznie założyła, że wzrost ich aktywności wskutek działania ekstraktu z konopi może oznaczać pozytywny wpływ na odporność pszczoły miodnej. Analizy uzyskanych wyników w drodze eksperymentów dały podstawę do pozytywnej weryfikacji hipotez naukowych. Cel poznawczy pracy został zrealizowany w pełni, a efektem tego są wnioski zawarte w rozdziale 7.

2.2. Piśmiennictwo

Piśmiennictwo zostało wyselekcjonowane adekwatnie do problematyki badawczej rozprawy doktorskiej. Tematyka pracy jako i wielorakie cele pracy wymagały od Doktorantki dobrej znajomości artykułów publikowanych w czasopiśmie z kategorii entomologia, fizjologia i biochemia owadów, immunologia, enzymologia, bromatologia i toksykologia. Analityczny charakter badań sprawił, że często cytowana jest także literatura metodologiczna.

Zestawienie bibliograficzne dołączone jako ostatni rozdział manuskryptu łącznie zawiera 110 pozycji literaturowych. Natomiast w wykazie bibliografii publikowanych artykułów znalazło się kolejno 46, 42, 46, 47 prac. Liczba prac wykorzystanych do cytowania w przeglądzie oraz w dyskusji manuskryptu jest zbliżona i wynosi około 60. Autorka korzystała głównie z pierwotnych źródeł naukowych i czerpie przede wszystkim z wyników oryginalnych badań. Prawie wszystkie cytowania pochodzą z prac wydanych w czasopiśmie naukowych anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym. Zaczerpnięto także cytaty z siedmiu książek i dwóch rozpraw doktorskich. Doktorantka skorzystała przede wszystkim z literatury najnowszej. Wśród cytowanych publikacji są 64 prace wydane w ciągu ostatnich dziesięciu

lat w tym 43 w ostatnich pięciu latach. Natomiast pozostałe cytowane prace w zdecydowanej większości były publikowane po 2000 roku. W danych bibliograficznych znalazły się także starsze opracowania, natomiast ich cytowania są uzasadnione i dotyczą głównie metod badawczych.

W manuskrypcie zastosowano harwardzki system cytowań, natomiast w publikacjach, zgodnie z wymogami redakcyjnymi vancouverkim. Użyty styl bibliograficzny nie należy do powszechnie stosowanych, jednak jest przejrzysty, kompletny, zawiera pełne nazwy czasopism oraz dodatkowe numer DOI i adres źródła internetowego. Warto odnotować, że Autorka bardzo często korzysta z wersji elektronicznych książek i innych publikacji, bez wątplenia świadczy to o dobrej znajomości cyfrowych baz bibliograficznych i umiejętności korzystania z tych źródeł przy użyciu narzędzi internetowych. Wykaz cytowanej literatury w manuskrypcie ma kilka drobnych uchybień natury redakcyjnej. Te jak i drobne błędy związane z cytowaniem prac w tekście nie mają wpływu na wartość merytoryczną pracy. także nie mają znaczenia dla oceny pracy. Zasadniczo, spis literatury w maszynopisie rozprawy wykonano prawidłowo a przegląd literatury i dyskusja potwierdza umiejętność korzystania z naukowych źródeł wiedzy i dobrą znajomość literatury przedmiotu.

2.4. Metody badawcze

Dla realizacji celu pracy w pierwszym etapie badań zaprojektowano eksperyment żywieniowy, w którym pszczołom robotnicom podawano suplement zawierający ekstrakt z konopi siewnej oraz olejek CBD. Doświadczenie prowadzono w warunkach laboratoryjnych stosując testy klatkowe oraz w warunkach pasiecznych, w których pszczoły utrzymywano w ulikach weselnych. Liczebność klateczek i ulików oraz pszczoł przetrzymywanych w nich była wystarczająca do pozyskania dużej próby robotnic do badań i analiz. Z punktu widzenia wielkości próby powtórzenie stanowiła pszczoła (próba hemolimfy), nie ulik czy klateczka. Jednocześnie ograniczona liczba pszczoł w klateczkach oraz ulikach daje możliwość łatwej kontroli spożycia suplementu. Zgodnie ze standardem badań z wykorzystaniem pszczoły miodnej, zadbano o jednorodność rodzin pod względem genetycznym, robotnice pochodziły od jednej matki a w rodzinie doświadczalnych użyto matek-siostr.

Testowanie suplementów i badanie oddziaływania substancji aktywnych wymaga aplikowania pszczołom preparatu drogą pokarmową, które zwykle podaje się wraz z roztworem wodnym sacharozy. Lipofilny i hydrofobowy charakter ekstraktów z konopi (postać pasty i olejku) powodował ograniczenie techniczne, które Autorka skutecznie pokonała stosując jako rozpuszczalnik glicerynę - substancje słodką i atrakcyjną dla pszczoł.

W badaniach zastosowano własną metodę przygotowania i podania preparat w postaci syropu (roztworu sacharozy i gliceryny) oraz pasków materiałowych nasączonych rozpuszczonym w glicerynie ekstraktem z konopi. Postać pasków, z których pszczoły pobierają preparat ocierając się, ma uzasadnienie, gdyż kutikula owada składa się z substancji lipofilnych, dodatkowo zachowania socjalne pszczoły miodnej, głównie higieniczne sprawiają, że w ten sposób podany preparat zostanie pobrany z pancerza przez inne pszczoły.

Weryfikację hipotez przeprowadzono w oparciu o eksperyment żywieniowy oraz analizy biochemiczne hemolimfy pszczoł. Próby hemolimfy pobierano w tygodniowych odstępach, co pozwoliło na oznaczenie poziomu badanych substancji zależnie od wieku robotnic. Hemolimfa jest ważnym czynnościowym elementem hemocelu owada. Wybór tkanki do badań

jest słuszny, ponieważ hemolimfa jest u owadów głównym układem odpowiedzialnym za ochronę organizmu przed patogenami.

Do oznaczeń głównie stosowano analizę spektrofotometryczną, która jest metodą cechującą się dużą czułością, precyzją i selektywnością oznaczeń i pozwala na analizę bardzo małych próbek materiału biologicznego (hemolimfy). Analiza prób z zastosowaniem spektrofotometru jest procesem zautomatyzowanym. Warto jednak zauważyć, że pomiar absorbancji jest końcowym etapem oznaczania poziomu związku. Natomiast przygotowanie roztworów do pomiaru wymaga stosowania osobnych protokołów, które Doktorantka musiała opanować i przeprowadzić.

Doktorantka wykonała ogromną pracę analityczną. Analizy hemolimfy wykonywano dla 22 wskaźników w tym dla dwóch parametrów układu proteolitycznego, trzech biomarkerów enzymatycznych, 10 nieenzymatycznych i sześciu wskaźników układu antyoksydacyjnego. Każdą analizę powtarzano od 5 do 7 razy w przeciągu życia pszczoły, liczbę analiz należy podwoić, ponieważ prawie wszystkie parametry hemolimfy owada ocenianie były dla warunków laboratoryjnych i polowych. Warunki przetrzymywania jaski i metody analityczne pozwoliły na uzyskanie obiektywnych wyników.

2.5. Wyniki badań

W rozdziale 6. manuskryptu „Omówienie wyników i dyskusja” przedstawiono rezultaty badań, zinterpretowano je i porównano z wynikami innych autorów. W pierwszej pracy przeprowadzono test klatkowy do oceny wpływu ekstraktu z konopi na aktywność proteaz i ich inhibitorów, enzymów (ALP, ALT, AST) oraz poziom glukozy i mocznika. W testach pasiecznych badania nieenzymatyczne składników rozszerzono o triglicerydy, cholesterol, kwas moczowy i albuminy (praca 3.) oraz jony wapnia, magnezu i fosforu (praca 4.). Eksperymenty potwierdziły istotny wpływ badanego czynnika na aktywność systemu proteolitycznego, enzymów oraz na poziom nieenzymatycznych wskaźników biochemicznych hemolimfy. Wzrost białka ogólnego może sugerować wzmożoną syntezę polipeptydów i białek odpornościowych w ciele tłuszczowym, które wykazują różne spektrum aktywności przeciwbakteryjnej i są odpowiedzialne za odporność humoralną nabytą. W tego rodzaju odpowiedzi mają udział także enzymy proteolityczne, które odpowiadają m.in. za aktywację prekursora oksydazy polifenolowe, biorącego udział w wielu odczynach obronnych, także metamorfozie i ciemnieniu oskórka. Z kolei inhibitory proteaz nakierowane są na bezpośrednią obronę przed patogenami i pełnią istotną funkcję w utrzymaniu homeostazy. Natomiast aminotransferaza asparaginianowa i alaninowa u owadów są wskaźnikiem funkcjonowania ciała tłuszczowego i jak potwierdzono w pracy ich stężenie w hemolimfie wzrasta wraz z wiekiem. Spadek aktywności tych enzymów związany jest z upośledzeniem funkcjonowania różnych cykli metabolicznych (syntezę ATP, β -oksydację, cykl Krebsa, fosforylację oksydacyjną), a także z obniżeniem poziomu białek pokarmowych. To uzasadnia stosowanie tych markerów enzymatycznych do oceny stanu odporności. Biorąc pod uwagę jaką rolę, odgrywają w układzie odpornościowym wymieniane wskaźniki biochemiczne, słuszny jest wniosek, że ekstrakt z konopi może stymulować pewne elementy układu odpornościowego pszczoły.

W pozostałych dwóch pracach przeanalizowano aktywność systemu antyoksydacyjnego pszczoł robotnic przetrzymywanych w warunkach laboratoryjnych (praca 2.) i pasiecznych

(praca 4.). W obu pracach stwierdzono dodatni wpływ ekstraktu z konopi na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, S-transferaza glutationowa, katalaza), poziom glutationu oraz całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. Wykazano również, że wzrost aktywności enzymów postępuje wraz z wiekiem robotnic. Dla pszczoł pozostających w silnej interakcji ze środowiskiem bardzo ważne jest sprawne działanie systemu, który zabezpiecza je przed stresem oksydacyjnym, spowodowanym zanieczyszczeniami i niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Wyniki doświadczeń wskazują, że wybór ekstraktu z konopi jako substancji stymulującej aktywności enzymów antyoksydacyjnych jest trafny i uzasadniony. Ponadto, kannabidiol (CBD), który zawiera grupy fenolowe, może pełnić funkcje nieenzymatycznego antyoksydantu.

Podsumowując rezultaty wszystkich prac można stwierdzić, że oddziaływanie ekstraktu z konopi na układ odpornościowy jest wielokierunkowe, a efektem może być podniesienie odporności ogólnej. W pracy wskazano także, że ekstrakt z konopi wydłuża życie robotnic i jest to głównie efekt stymulowania systemu antyoksydacyjnego, który zabezpiecza komórki i tkanki przed negatywnym wpływem wolnych rodników. Należy podkreślić, że jest to wynik obserwacji, odnotowany w trakcie prowadzenia eksperymentów żywieniowych, a nie próby określającej przeżywalność robotnic. Wniosek Doktorantki został wyciągnięty jedynie na podstawie zaobserwowania szybszego zamierania pszczoł w grupie kontrolnej. Ze względu na to, że kontrolę prowadzono tylko co siedem dni, a pobieranie prób pszczoł zwiększało liczbę przypadków uciętych, wniosek ten może być obarczony błędem. Jednak, obserwowane w każdym eksperymencie szybsze zamieranie robotnic w grupie kontrolnej, można uznać za argument, który pośrednio potwierdza właściwości immunostymulujące i adaptogenne ekstraktu z konopi. Analizę wyników ułatwiłoby uwzględnienie wyników testów post hoc i zaznaczenie tych różnic na wykresach prezentujących wyniki.

Celem głównym, w całości zrealizowanym, była ocena wpływu ekstraktu z konopi na przemiany biochemiczne, które mają znaczenie dla kształtowania odporności owada. Ponadto, prace posiadają dodatkowy walor poznawczy. Wszystkie wskaźniki biochemiczne hemolimfy kontrolowane były w zależności od wieku robotnic. Tym samym w pracach tych stworzono modele przebiegu zmian poziomu szeregu parametrów biochemicznych w ciągu życia pszczoły.

W ramach celu dodatkowego pracy, oceniano skuteczność innowacyjnej metody podawania drogą pokarmową substancji lipofilnych, których nie można połączyć z pokarmami zastępczymi przeznaczonymi dla pszczoł. Potwierdzono, że zastosowanie glicerolu jako rozpuszczalnika ekstraktu z konopi jest skuteczną metodą aplikacji preparatu, natomiast postać syropu jest efektywniejsza niż postać materiałowych pasków nasączonych ekstraktem.

2.6. Uwagi

Zaznaczam, że nie znajduję uchybień w metodyce badań, jednak proszę o uszczegółowienie następujących kwestii:

1. Dlaczego zastosowano dwie postacie preparatu zawierającego CBD - pasty oraz oleju, oraz dlaczego w manuskrypcie rozróżniano i nazywano je odpowiednio ekstraktem konopnym i olejem CBD. W pracach opublikowanych w języku angielskim obydwie postacie nazywane są ekstraktem konopnym, co jest właściwym określeniem, biorąc pod uwagę sposób pozyskania preparatu CBD z konopi.

2. Nie znajduję także w pracach informacji o zawartości kannabidiolu w tych preparatach. Sugerować można się jedynie stwierdzeniem “komercyjny olejek CBD o stężeniu 30%”, jednak nie wiadomo czy chodzi o ilość rozpuszczonego ekstraktu w oleju, czy czystego kannabidiolu.
3. W metodyce pracy opisano dokładnie sposób przygotowania suplementu w zależności od jego postaci, natomiast brak jest informacji o dawce zaaplikowanego czystego ekstraktu lub CBD przypadającą na grupę pszczół.
4. Ponieważ trudno dotrzeć do norm branżowych dotyczących użytego roztworu wodno-glicerynowego, tym bardziej, że nie zamieszczono źródła tych danych w bibliografii, uzasadnione byłoby podanie stężenia preparatu.

Autor popełnił kilka redakcyjnych błędów podczas tworzenia zestawienia bibliografii oraz pisania odnośników w tekście manuskryptu.

Niewłaściwa forma cytowania (s. 9) jak i zapisu bibliografii, Kritsky 2015

Trudno znaleźć w spisie pracę Strachecka i in. 2008 (s. 13), ponieważ jest zamieszczona po literę “T”, podobnie Aebi H. 1983 jest pod literę “H”.

Brak w spisie literatury prac Strachecka i in. 2021 (s. 14), Majewski i in. 2021 (s. 17) oraz Lee i Lina 1995 (s. 24).

Boldaji i in. 2022 (s. 17) dotyczy prawdopodobnie pracy w wykazie bibliografii zapisanej jako Safian Boldaji i in. 2022,

W celu 5. (s. 19-20) wymieniono powtórnie wskaźniki glukoza, triacyloglicerol, cholesterol Zacytowano Schacterle i in. 1973 (s. 23), powinno być Schacterle i Pollack 1973.

Ponadto, nie rozróżniono cytowania w tekście dwóch prac Strachecka i in. 2014, podobnie jak w spisie literatury oraz nie zacytowano w tekście pracy Lin i in 1995 i Skowronek i in. 2021. Podkreślam, że uchybienia, na które wskazałem nie pomniejszają wartości merytorycznej rozprawy i w opublikowanych pracach zostały wyeliminowane.

3. Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Skowronek w formie zbioru artykułów naukowych stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, w obszarze badań substancji immunostymulujących i adaptogennych oraz odporności pszczół. Doktorantka przeanalizowała szereg parametrów biochemicznych związanych z układem immunologicznym pszczoły miodnej i udowodniła, że ekstrakt z konopi zawierający kannabidiol ma funkcję stymulującą ogólną odporność, która potencjalnie może zredukować immunosupresyjny wpływ skażeń środowiska, patogenów i pasożytów pszczoły miodnej. Ponadto, dysertacja prezentuje pogłębioną, ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w zakresie dyscypliny naukowej – zootechnika i rybactwo oraz poświadcza nabycie umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

Na podstawie oceny i analizy rozprawy doktorskiej pt. “Wpływ ekstraktu z konopi oraz olejku CBD na parametry fizjologiczno-biochemiczne związane z odpornością u robotnic pszczół miodnych (*Apis mellifera*)” stwierdzam, że praca ta spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Zootechnika

i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie Panią mgr inż. Patrycję Skowronek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Mając na uwadze wysoki poziom naukowy recenzowanej rozprawy, który został udokumentowany publikacjami, znaczenie i zakres przeprowadzonych badań oraz duży wkład pracy i zaangażowania Doktorantki, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Skowronek.

Poznań dnia, 31.07.2023

Giejała sz