Dr hab. inż. Agata Anna Cejko prof. IRS-PIB

Instytut Rybactwa Śródlądowego

im Stanisława Sakowicza

Państwowy Instytut Badawczy

Olsztyn 07.01.2026

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Heleny Marii Bober**

pt. „Wpływ suplementacji pasz skwalenem na wzrost, wybrane elementy odporności oraz poziom cholesterolu w tkankach jesiotra syberyjskiego *Acipenser baerii* Brandt, 1869”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Piotra Gomułki prof. UWM (promotor)

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Rady Naukowej Zootechniki i Rybactwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dn. 13.11.2025 r. (WBZ-DZ.5201.4.2025.RD).

Przedstawiona wysokiej Radzie Naukowej praca doktorska dotyczy ważnych dla akwakultury zagadnień. Doktorantka w swojej dysertacji kontynuuje zainicjowany przed laty nurt badań Pana dr hab. Piotra Gomułki prof. UWM, skoncentorwany na analizie wpływu czynników środowiskowych, w tym pasz komponowanych na dobrostan ryb hodowlanych. W celu weryfikacji postawionych hipotez Doktorantka wykorzystuje dostępne i zaawansowane metody badawcze, wymagające posiadania wiedzy z zakresu biochemii, hematologii, immunologii, histologii.

Uzasadnienie - uwagi ogólne

Temat przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny zarówno dla nauki oraz praktyk stosowanych w akwakulturze. Jest on spójny z aktualnymi trendami dotyczącymi zachowania dobrostanu ryb i jakości odżywczej mięsa. Wykorzystanie substancji bioaktywnych w diecie ryb jest szeroko testowane i ma na celu podnoszenie statusu odpornościowego, co jest istotne w ograniczaniu antybiotykooporności. Badania na rybach hodowlanych, szczególnie jesiotrach wskazują na szczególne znaczenie zastosowania biomolekuł o działaniu hepatoprotekcyjnym w paszach funkcjonalnych. Z kolei modyfikowane diety oparte na różnych źródłach tłuszczu i białka wymagają substancji antyoksydacyjnych, immunostymulujących, stabilizujących cenne kwasy tłuszczowe w ich tkankach.

Skwalen to naturalny węglowodór występujący w organizmach roślinnych i zwierzęcych powstający w szlaku biosyntezy odpowiednio izoprenoidów i cholesterolu. Nie jest więc

docelowym metabolitem a produktem pośrednim szlaku syntezy steroli. Skwalen jest fizjologicznie akumulowany w dużych ilościach w wątrobie rekina. Źródłem jego suplementacji są też mikroalgi, olej z amarantusa czy oliwa z oliwek. Pełniąc rolę silnego antyoksydanta i immunostymulatora znalazł zastosowanie w badaniach żywieniowych u zwierząt hodowlanych. W akwakulturze zachowawczej i komercyjnej cennymi gatunkiami są jesiotry. Z ekonomicznego punktu widzenia gatunki te charakteryzują się wysoką wartością rynkową o perspektywicznym kierunku produkcji. Jednocześnie ich podchów ma znaczenie ekologiczne gdyż wspiera działania restytucyjne. W związku z powyższym z dużym uznaniem odnoszę się do pracy badawczej przeprowadzonej przez Panią mgr inż. Marię Bober.

Struktura rozprawy - ocena formalna

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska to jednolite opracowanie w formie manuskryptu obejmujące 136 stron maszynopisu podzielonego na rozdziały, poprzedzone streszczeniem w języku polskim i angielskim. Starannie opisane badania zostały przedstawione w 24 tabelach, 7 zdjęciach histologicznych, 24 czytelnych rycinach. Doktorantka cytuje 109 pozycji anglojęzycznych, w znacznej większości najnowszych publikacji poświęconych podjętej problematyce badawczej. Wykorzystanie materiałów źródłowych, w tym dobór cytowań renomowanych czasopism naukowych przez Doktorantkę stanowi trafną podbudowę merytoryczną wprowadzenia do tematu i części dyskusyjnej pracy. Manuskrypt jest przygotowany starannie, opatrzony nagłówkami w dwóch rozdziałach, co ułatwia zapoznawanie się z poszczególnymi zagadnieniami pracy.

Ocena merytoryczna rozprawy

Temat rozprawy uwzględnia zakres prowadzonych badań, choć warto byłoby go poszerzyć o obserwacje histologiczne, którym autorka poświęciła w swojej pracy dużą uwagę. Kolejność rozdziałów jest poprawna. W dziewięciostronicowym Wstępie Doktorantka w sposób szczegółowy definiuje skwalen, wskazuje jego pochodzenie, rolę w syntezie cholesterolu, właściwości antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe oraz podkreśla jego znaczenie w terapii chorób sercowo-naczyniowych i wykorzystanie w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym. Nie zabrakło także odniesienia do ryb, w tym gatunku który stanowi materiał badań Doktorantki. Autorka podejmuje zagadnienie żywności funkcjonalnej traktując skwalen jako substancję podnoszącą wartość odżywczą mięsa ryb. Jednocześnie uwzględnia jego funkcje w hamowaniu peroksydacji cennych kwasów tłuszczowych.

Do tej części mam małą uwagę. Autorka podaje zawartość skwalenu: w wątrobie rekina – w ujęciu procentowym, a w źródłach roślinnych – w mg na 100 g. W analizach porównawczych sugeruję ujednolicić sposób prezentowania zawartości skwalenu. Na stronie 12 Autorka pisze „Ta zdolność czyni SQ wysoko reaktywnym związkiem, który przede wszystkim zapobiega degradacji i apoptozie komórek (…).” Apoptoza to naturalna śmierć komórki, genetycznie zaprogramowana, która jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zahamowanie apoptozy prowadziłoby do zaburzenia równowagi między proliferacją a eliminacją komórek uszkodzonych, z mutacjami, zakażonych wirusem. Na stronie 16 Autorka podaje, „(…) że jesiotry są bardzo dobrym organizmem modelowym do badań nad

skwalenem.” W mojej ocenie stwierdzenie to jest nieuprawnione, ponieważ określenie gatunku jako organizmu modelowego wymaga spełnienia szeregu kryteriów (m.in. łatwości hodowli, dobrze poznanego genomu). Autorka odnosi się jedynie do metabolizmu skwalenu, porównanego zaledwie z dwoma innymi gatunkami ryb, co nie stanowi wystarczającej podstawy do takiej klasyfikacji. Doktoranka podaje też, że „(…) mięso jesiotra wzbogacone w skwalen można zakwalifikować jako tzw. żywność funkcjonalną (…)” (str. 17). Mięso ryb, w tym jesiotra, ze względu na bioaktywne peptydy, cenne kwasy tłuszczowe jest już zaliczane do żywności funkcjonalnej, a obecność skwalenu nie decyduje o jego przynależności do produktu o właściwościach prozdrowotnych.

Ta część manuskryptu zakończona jest celem i hipotezą badawczą ujętymi w kilku punktach. Biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych analiz za celowe uznano także określenie wpływu dawki SQ na odpowiedź immunologiczną, wskaźniki biochemiczne, skład kwasów tłuszczowych w tkankach. Założenia te Doktorantka słusznie ujęła w hipotezach badawczych, które nie znalazły odniesienia w trzech ogólnych celach badawczych. Doktorantka w swojej dysertacji bardzo dokładnie przedstawia kwasy tłuszczowe. Świadczy to o właściwym rozpoznaniu tematu przez Doktorantkę. Doktorantka umiejętnie uzasadnia wybór SQ do przeprowadzenia doświadczenia żywieniowego. Dlatego cel 3 w mojej ocenie niepoprawny, wynikał zapewne ze skoncentrowania uwagi na badanym suplemencie. Skwalen obecny w mięsie ryb stanowiłby jedynie wartość dodaną do żywności funkcjonalnej, jaką jest mięso jesiotra.

Rozdział „Materiał i metody” liczący 16 stron został poprawnie zredagowany i jest uporządkowanym opisem metod stosowanych przez Doktorantkę. W tym miejscu drobna uwaga, na początku rozdziału Autorka podaje wiek ryb, gdzie zasadnym jest podanie masy początkowej i długości ciała. Autorka używa sformułowania „niszczono ośrodkowy układ nerwowy”, podczas gdy dotyczyło to zapewne przerwania ciągłości rdzenia kręgowego; następnie podaje, że pobrane tkanki wykorzystano – „do wykonania chromatografii gazowej”, gdzie właściwym byłoby sprecyzowanie – „do analiz zawartości kwasów tłuszczowych, cholesterolu i skwalenu (str. 23). Wzory wskaźników podchowu, poza współczynnikiem pokarmowym pasz są precyzyjnie podane. Zabrakło jedynie wskazania relatywnego przyrostu masy ciała (RWG), który pojawia się w opisie wyników.

Doktorantka przeprowadziła doświadczenie według wymaganych procedur, z zachowaniem dobrostanu zwierząt i stosując odpowiednią anestezję. Doktorantka potrafiła przy tym użyć właściwą ilość osobników do analiz i opracowania statystycznego wyników. Budzi jednocześnie szacunek w aspekcie pracochłonności i bogatego warsztatu badawczego, jaki opanować musiała Autorka dysertacji. Należy podkreślić, że Doktorantka samodzielnie posługuje się procedurami badawczymi, wiarygodnymi i adekwatnymi do potrzeb wynikających z postawionych hipotez i zakresu badań. Na wstępie tego rozdziału czytelnik ma możliwość zapoznania się z pochodzeniem materiału i procedurą komponowania pasz, a następnie z metodologią podchowu i prowadzonych analiz. W tej części zabrakło danych z parametrów fizykochemicznych wody. Jakkolwiek pojawiają się one na początku omawiania wyników (str. 34-35), to są one nie wystarczające. Średnie wartości temperatury, zawartości

tlenu i odczynu wody powinny być określone dla każdej grupy żywieniowej, jako zmienne kontrolowane prowadzonego eksperymentu.

Dla oceny wpływu SQ w przeprowadzonych testach Doktorantka posłużyła się trafnie dobranymi wskaźnikami. W obszarze badań histologicznych skoncentrowała się nie tylko na pomiarach hepatocytów, wielkości jąder komórkowych, symptomach patologii wątroby. Autorka w swojej pracy posłużyła się ilościowym systemem oceny zmian w tkance wątrobowej. Wymagało to od Autorki sumiennej obserwacji dla przypisania punktów określonym cechom morfologicznym hepatocytów. Ponadto Doktorantka nie zapomniała o ważnych w badaniach wpływu suplementacji pasz, wskaźnikach aktywności enzymów prozapalnych. Swój warsztat badań poszerzyła o parametry biochemiczne i hematologiczne, które umiejętnie interpretuje nawiązując do odpowiedzi immunologicznej ryb.

Czytając tą część manuskryptu nasunęła mi się drobna uwaga dotycząca powielanej przez Autorkę nieścisłości w określaniu liczby n w grupach żywieniowych. I tak jeśli „(…) jesiotry podzielono na 5 grup w 2 powtórzeniach i do każdej grupy losowo przydzielono po 30 ryb to błędne jest określenie, że n=300 (str. 22). Jeśli ustalono, że pobór prób np. do analiz hematologicznych ma uwzględniać 4 osobniki z basenu (8 ryb na grupę) to n=8 a nie 24 (str. 24). Ten błąd dotyczył każdej opisanej analizy. Z kolei Doktorantka nie pominęła ważnych obserwacji dotyczących dobrostanu ryb (pobierania paszy modyfikowanej, zachowania ryb w basenach i ich przeżywalności) podczas prowadzenia eksperymentu.

Rozdział „Wyniki” obejmuje 58 stron manuskryptu, w którym Doktorantka zamieściła dobrze przemyślane, przejrzyste wykresy i czytelne zdjęcia histologiczne oraz tabele. Autorka mając zebrany duży materiał liczbowy potrafiła przedstawić wyniki analiz w formie skondensowanej. Szereg wyników prezentowanych jest po raz pierwszy i trudno przecenić ich aspekt poznawczy i aplikacyjny. Oceniając dysertację, w tym miejscu raz jeszcze chcę podkreślić szeroki zakres analiz i związaną z tym mnogość wyników. W tym rozdziale zauważyłam drobne nieścisłości. Autorka konsekwentnie stosuje oznaczenie „T12” dla grupy ryb (eksperyment II), podchowywanych w temperaturze wody 13°C. Jakkolwiek wynika to z założeń eksperymentu (str. 61), to w omawianych wynikach należałoby zastosować oznaczenie faktyczne dla badanej zmiennej niezależnej. W opisie tabeli 10 warto było także uwzględnić, które kwasy tłuszczowe Doktorantka zakwalifikowała do wyodrębnionych grup kwasów. Jest to istotne zwłaszcza w omawianej grupie kwasów BCFA, dla których starterem jest acetylo-CoA lub propionylo-CoA, co z kolei warunkuje odpowiednio parzystą lub nieparzystą ilość atomów węgla w łańcuchu. W kontekście problemu badawczego to pogrupowanie byłoby zasadne, z zaznaczeniem, że parzystość lub nieparzystość BCFA nie ma znaczenia dla szlaku syntezy cholesterolu ani dla powstawania skwalenu. Należy jednocześnie podkreślić, że Doktorantka poza analizą porównawczą kwasów tłuszczowych dokonała analizy ich rozkładu w poszczególnych tkankach co pozwoliło na precyzyjne wnioskowanie o wpływie badanego suplementu na skład chemiczny tkanek w powiązaniu z budowę histologiczną hepatocytów.

Drobne uwagi w tej części manuskryptu dotyczą precyzji opisu tabel i zdjęć histologicznych. Przy opisie tabel przedstawiających skład chemiczny tkanek sugerowałabym użyć terminu „skład chemiczny podstawowy mięśni jesiotrów” zamiast „skład ciała jesiotrów”

(tabela 5, 17), a przy fotografiach 6 i 7 wskazać wariant temperatury. Tabela 6 nie przedstawia też funkcjonowania wątroby, a jedynie parametry metryczne komórek.

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka weryfikuje założenia przyjęte w pracy. Wykazuje, że testowane dawki skwalenu nie wpływają na wskaźniki podchowu i skład chemiczny podstawowy mięsa. Stwierdza, że niska temperatura podchowu (13°C) powoduje wzrost zawartości tłuszczu w mięsie jesiotra oraz zwiększa masę wątroby. Autorka słusznie tłumaczy to obniżeniem metabolizmu. Do tej części mam drobną uwagę. Stwierdzenie, że „(…) w warunkach jesienno-zimowych (…) utrzymanie (…) dobrej jakości mięsa jest szczególnie trudne" (str. 94) wymagałoby szerszego wyjaśnienia. Większa ilość lipidów zwiększa jednocześnie podaż cennych kwasów tłuszczowych w 100 g tkanki, a w eksperymencie II jakość tłuszczu w mięsie jesiotrów nie była analizowana. Różnice w wartości wskaźnika DTC (stopień zmian histopatologicznych) Autorka tłumaczy dawką SQ (4%) co obrazuje na zdjęciach histologicznych oraz czytelnych wykresach. W parametrach biochemicznych stwierdza istotne różnice w stężeniu kreatyniny i amoniaku oraz aktywności enzymatycznej aminotransferaz pomiędzy grupami żywieniowymi. W tym miejscu pojawiła się pewna nieścisłość i błąd. Autorka pisze „(…) amoniak we krwi ryb pochodzi głównie z rozkładu aminokwasów w procesie glikoneogenezy". Amoniak powstaje głównie podczas deaminacji aminokwasów uwalnianych w wyniku rozpadu białek; glukoneogeneza jedynie pośrednio się do tego przyczynia, natomiast glikogenogeneza nie generuje amoniaku.

Szeroki zakres badań Doktorantki nasuwa pytania:

1. Czy różnice w ALT i AST w grupach SQ0.5, SQ0.1, SQ0.2 mogą stanowić marker stanów przedzapalnych w wątrobie? Choć przy wyższej dawce skwalenu wartości te były niższe to stwierdzono już nieodwracalne zmiany histolopatologiczne u ryb.

2. Czy zmiany w wątrobie, AST, ALT mogły bezpośrednio wpływać na niższe stężenie amoniaku we krwi? Amoniak powstaje w wątrobie, mięśniach i jelitach ryb. Czy też skwalen dodany do paszy usprawnił jego wydalanie z organizmu ryb? Jeśli tak to jak tłumaczyć ten mechanizm?

W dalszej części dyskusji Autorka wyjaśnia zależność wzrostu liczby leukocytów od dawki SQ odnosząc się do wysokiego wskaźnika DTC. Doktorantka z należytą uwagą analizuje immunostymulujący efekt SQ. Potrafi rekomendować dawkę SQ (1%) w paszy jesiotra syberyjskiego na podstawie uzyskanych wyników. Stwierdza, że „skwalen w umiarkowanej dawce zmniejsza intensywność wybuchu tlenowego bez osłabienia aktywności fagocytarnej komórek" (str. 103). Następnie nie zapomina o akumulacji skwalenu i cholestrolu w mięśniach czy wątrobie ryb. Powyższe, ważne aspekty trafnie potrafiła odnieść do absorpcji, dystrubucji i magazynowania lipidów (1), biosyntezy cholesterolu (2), obserwowanej wakuolozacji hepatocytów (3) oraz wpływu temperatury podchowu na metabolizm lipidów (4). Stwierdza, że „(…) w grupach T18 i T24 spadek zawartości skwalenu i cholesterolu (w mięśniach) można wytłumaczyć istotnym zmniejszeniem zawartości skwalenu w wątrobie o tyle w T13 jest to trudne do wytłumaczenia" (str. 105). Prawdopodobnie spadek aktywności enzymów w niskiej temperaturze mógł mieć wpływ na poziom cholesterolu w tkankach jesiotra, przy jednocześnie

niskiej zawartości skwalenu w wątrobie. W tym miejscu proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do takiej hipotezy.

W tej części dyskusji znalazło się stwierdzenie „Biorąc pod uwagę duże podobieństwo w trawieniu, przyswajaniu lipidów między ssakami i rybami (…)". Jakkolwiek ogólny mechanizm trawienia może być podobny to przy przyswajalności (absorpcji) nie można mówić o analogii. Wynika to m.in. z ewolucyjnej adaptacji do pokarmu naturalnego i w konsekwencji właściwości i aktywności lipaz (silnie zależnych od temperatury środowiska).
Podsumowując dysertację Autorka nie zapomina o prozdrowotnych właściwościach skwalenu, który obecny jest w mięsie ryb karmionych paszą z jego dodatkiem. Podkreśla jednocześnie, że skwalen w paszy (1%) podnosi DHA w mięsie jesiotra.

Dyskusja wyników badań z punktu merytorycznego jest prowadzona w sposób dojrzały naukowo i rzeczowy. Doktorantka nawiązuje w niej do wyników najnowszych prac prowadzonych przez innych badaczy, również na organizmach stałocieplnych. Jakkolwiek budzi to pewne zastrzeżenia, to Doktorantka przeprowadzając dyskusję wyników własnych z obszerną literaturą przedmiotu, radzi sobie z ograniczonymi doniesieniami dotyczącymi ryb żywionych paszą z dodatkiem skwalenu. Pozwala to Autorce na właściwą i obiektywną ocenę uzyskanych rezultatów z czego Doktorantka wywiązała się w dysertacji.

Uzyskane i przeanalizowane w dyskusji wyniki pozwoliły Doktorantce na sformułowanie 7 wniosków. Wnioski uważam za zasadne, odnoszące się do założeń przyjętych w pracy. Jedynie ostatni wskazujący na potrzebę prowadzenia dalszych badań to element dyskusji, który nie ma odniesienia do postawionych celów i hipotez. Doktorantka we wnioskach nie zweryfikowała dwóch hipotez dotyczących wpływu skwalenu na poziom cholesterolu i leukocytów. Cenne byłoby także wnioskowanie o wpływie skwalenu na tkankę wątrobową. Jakkolwiek element ten nie pojawia się w celach, hipotezach i tytule dysertacji to Doktorantka poświęciła temu zagadnieniu pracochłonne analizy i potrafiła umiejętnie je przedstawić w wynikach i dyskusji.

Przedstawiona do oceny praca doktorska posiada właściwą konstrukcję, przyjętą w tego typu opracowaniach. Metody zastosowane przez Doktorantkę dowodzą dobrego opanowania warsztatu badawczego. Uzyskane wyniki wnoszą istotne informacje, możliwe do wykorzystania w akwakulturze jesiotrów i innych ryb hodowlanych. Doktorantka wykazała umiejętność podejmowania i realizowania kolejnych etapów badań naukowych. Stąd też dysertację oceniam bardzo pozytywnie. Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Heleny Marii Bober pt. „Wpływ suplementacji pasz skwalenem na wzrost, wybrane elementy odporności oraz poziom cholesterolu w tkankach jesiotra syberyjskiego *Acipenser baerii* Brandt, 1869" stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 roku, poz. 1571 ze zm.). Przedkładam zatem Radzie Naukowej Zootechniki i Rybactwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pani

mgr inż. Heleny Marii Bober do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie biorąc pod uwagę kompleksowe podejście do rozwiązywanego problemu badawczego, duże zaangażowanie i nakład pracy Doktorantki, znajomość zróżnicowanych technik analitycznych oraz wartość aplikacyjną uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy przez Radę Naukową Zootechniki i Rybactwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie stosowną nagrodą.

Dr hab. inż. Agata Anna Cejko, prof. IRS-PIB

