

Olsztyn, 08.09.2023 r.

Prof. dr hab. Cezary Purwin

Katedra Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła

Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Elizy Piksy pt.: „Wpływ dodatku β -karotenu do dawek pokarmowych dla krów w okresie okołoporodowym na jakość siary, wybrane parametry biochemiczne krwi oraz wyniki odchowu cieląt” wykonanej pod kierunkiem dr. hab. inż. Andrzeja Wiliczkiwicza, prof. uczelni oraz promotora pomocniczego dr. Kamila Sierżanta w Katedrze Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Poprawa wydajności, wydłużenie czasu życia przy zachowaniu zdrowia, w tym, ograniczenie występowania chorób metabolicznych i brakowania krów wymaga stosowania zbilansowanej dawki pokarmowej, zasobnej także w związku biologicznie czynne o aktywności antyoksydacyjnej, zwłaszcza w okresie okołoporodowym. Wiąże się to z zapewnieniem prawidłowego wychowu cieląt, rozpoczynającego się od pobrania przez nie siary, źródła immunoglobulin wpływających na siłę odporności biernej. Właściwości antyoksydacyjne β -karotenu, chroniące przed działaniem i skutkami stresu oksydacyjnego są silniejsze niż w szeregu związków należących do licznej grupy karotenoidów. W dwunastnicy i jelicie czczym w wyniku reakcji enzymatycznej β -karoten ulega konwersji do witaminy A znaczącej dla szeregu procesów fizjologicznych (także związanych z rozrodem). Ograniczenie tworzenia reaktywnych form tlenu, właściwości przeciwutleniające, możliwość przemiany w witaminę A stanowią cenne atuty β -karotenu jako naturalnego składnika pasz pochodzenia roślinnego (świeżych, przetworzonych, konserwowanych) lub zastosowanego w formie określonego ilościowo syntetycznego dodatku (np. mieszanki paszowej uzupełniającej).

Tlen to pierwiastek niezbędny do życia i jednocześnie główny czynnik destrukcyjny, zarówno w układach biologicznych, jak i niebiologicznych. W łańcuchu oddechowym organizmów żywych, w szeregu przemian wykorzystujących tlen, naturalnie powstają wolne rodniki pozostające w stanie równowagi wobec systemu antyoksydacyjnego organizmu, co jest warunkowane fizjologicznie. Krytycznym okresem cyklu fizjologicznego (produkcyjnego) krów jest okres okołoporodowy, którego dynamika zmian (fizjologicznych) i potrzeb żywieniowych może przyczynić się do nadmiernej kumulacji reaktywnych form tlenu, wystąpienia stresu oksydacyjnego, osłabienia odporności organizmu, skutkujących chorobami, obniżeniem jakości siary i kondycji nowonarodzonych cieląt.

W ocenie stanu zdrowia krów w okresie okołoporodowym, jak i nowonarodzonych cieląt

przydatne mogą być wyniki badań laboratoryjnych krwi charakteryzujące chociażby całkowity status antyoksydacyjny organizmu. Niemniej należy zaznaczyć, że organizmy zwierząt (także krowy, cielęta) posiadają systemy enzymatyczne, nieenzymatyczne, przeciwutleniacze fazy hydrofilnej i lipofilnej oraz przeciwutleniacze niskocząsteczkowe stanowiące bariery ochronne przed nadmiarem wolnych rodników.

Ograniczenie negatywnych skutków działania czynników stymulujących stres oksydacyjny, powstawanie i gromadzenie reaktywnych form tlenu może być efektem uzupełnienia dawek pokarmowych krów w antyoksydanty, które hamują powstawanie wolnych rodników i zapobiegają peroksydacji lipidów. Do najsilniejszych zaliczany jest β -karoten.

W tym kontekście, podjęcie badań przez Panią mgr inż. Elżę Pikę dotyczących wpływu dodatku β -karotenu do dawek pokarmowych dla krów w okresie okołoporodowym na jakość siary, wybrane parametry biochemiczne krwi oraz wyniki odchowu cieląt uważam za zasadne i aktualne, a wybór tematu za trafny i celowy. Wybrane dodatki (mieszanka paszowa uzupełniająca, zawierająca 200 mg β -karotenu w 1 kg zastosowana w doświadczeniu pierwszym oraz mieszanka uzupełniająca zawierająca 300 mg krystalicznego ekwiwalentu β -karotenu w doświadczeniu drugim) do oceny skuteczności ich działania w okresie okołoporodowym należy uznać za uzasadnione, gdyż β -karoten cechuje potencjał korzystnego wpływu, zarówno na zdrowie krów, jakość siary, jak i zdrowie cieląt. Autorka dobrze uzasadnia potrzebę ich zastosowania wykorzystując najnowsze piśmiennictwo krajowe i zagraniczne.

Przedstawiona do recenzji dysertacja posiada typowy dla prac naukowych układ, w tym przyjęty dla prac doktorskich. Praca wraz z 12 tabelami, 5 figurami (schematami graficznymi), wykazem piśmiennictwa streszczeniem w języku polskim i abstraktem w języku angielskim oraz spisem tabel i figur liczy 88 stron wydruku komputerowego, z których 1 strona to Spis treści, 2 strony to Wykaz skrótów stosowanych w pracy, 4 strony Streszczenie w języku polskim i języku angielskim (Abstract), 2 strony to Wstęp, 15 stron to Przegląd literatury, 1 strona to Cel pracy 1 strona Hipotezy badawcze, 11 stron to Materiał i metody, 19 stron to Wyniki i dyskusja, 1 strona to Podsumowanie, 25 stron to Piśmiennictwo. Poszczególne rozdziały pracy Doktorantka podzieliła dodatkowo na podrozdziały pierwszego rzędu, co czyni tekst bardziej przejrzystym i ułatwia jego analizę. Taki podział treści pracy, a także objętość poszczególnych rozdziałów świadczy o prawidłowym rozłożeniu akcentów.

Autorka przedstawiła Wykaz skrótów wraz z przetłumaczeniem tych anglojęzycznych na język polski, co ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z omawianymi w pracy zagadnieniami, ale powtórzenie takiego układu (skrót i jego wyjaśnienie) w treści pracy jest zbędne. Rozdział **Wstęp** dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie. W rozdziale **Przegląd literatury** Doktorantka omówiła następujące zagadnienia: żywienie krów w okresie okołoporodowym, stres oksydacyjny i przeciwutleniacze, β -karoten jako dodatek paszowy o działaniu przeciwutleniającym oraz siara i odchów cieląt. Bardzo dokładnie Doktorantka scharakteryzowała proces fizjologicznych uwarunkowań, potrzeb i wykorzystania składników pokarmowych pasz i źródeł energii. Przedstawiła zalecenia żywieniowe w oparciu o normy (DLG, INRA), ocenę efektów żywienia na podstawie skali BCS, w

podsumowaniu wskazała na wpływ sposobu żywienia krów w okresie okołoporodowym na jakość siary i zdrowie nowonarodzonych cieląt. Podane informacje uzasadniają co prawda podjęte badania, ale w znacznym stopniu dotyczą ogólnodostępnej wiedzy podręcznikowej. Także dużo uwagi Autorka poświęciła uzasadnieniu przydatności laboratoryjnych badań krwi w profilaktyce zaburzeń metabolicznych krów, szczególnie w okresie okołoporodowym oraz zaznaczyła, że mogą być pomocne w ocenie efektów żywienia. Cytowane przez Doktorantkę dane piśmiennictwa wskazują, że przemiany chemiczne i energetyczne zachodzące w organizmie mogą skutkować nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu prowadząc do stresu oksydacyjnego oraz podają aktywne i skuteczne mechanizmy obronne i szlaki ich działania w organizmie krowy. Bardzo dobrze został scharakteryzowany, na podstawie danych piśmiennictwa, β -karoten jako skuteczny przeciwutleniacz naturalnego pochodzenia, obecny w paszach pochodzenia roślinnego jak i dostarczany w formie dodatku paszowego (mieszanki uzupełniające) w dawkach pokarmowych zwierząt gospodarskich. Autorka podkreśla, że nieliczne i niejednoznaczne są dane piśmiennictwa charakteryzujące jakość siary, w tym koncentrację immunoglobulin (mając na uwadze także podstawowy skład chemiczny) wynikającą z zastosowania dodatku β -karotenu do pasz krów w okresie zasuszenia.

Uważam, że przegląd piśmiennictwa właściwie uzasadnia tezy badawcze pracy. Został opracowany kompleksowo, dobrze wprowadza czytelnika w opisywane zagadnienia, co wskazuje na dobrą znajomość tematyki, którą Autorka zajęła się w pracy. Drobna uwaga do tego rozdziału dotyczy małej liczby odniesień do efektów działania β -karotenu, co prawdopodobnie wynika z niewielu badań i publikacji ich wyników. Podsumowując przegląd piśmiennictwa oceniam jako kompletny pod względem zakresu analizowanych zagadnień i merytorycznie spójny, umożliwiający trafny wybór kierunku, zakresu i metod badań.

Hipotezy badawcze sformułowane zostały bez zastrzeżeń, natomiast cel badań w drugim etapie wymaga doprecyzowania. Autorka w drugim doświadczeniu określa wpływ dodatku (...) do dawek krów mlecznych na parametry (...)” natomiast w rozdziale **Materiał i metody** dowiadujemy się, że część materiału zwierzęcego otrzymującego dodatek stanowiły jałówki cielne. Ta nieścisłość przenosi się także na tytuł dysertacji. Proponuję także w drugim celu zmienić kolejność „(...) wpływu na właściwości fizykochemiczne siary i stężenie immunoglobulin (...)” z „(...) transferem odporności.”, co będzie zgodne z logiką biologiczną.

W rozdziale **Materiał i metody** Autorka czytelnie przedstawiła badania własne i ich poszczególne etapy. Doktorantka przeprowadziła dwa doświadczenia. Doświadczenie pierwsze wykonano w towarowym stadzie bydła mlecznego, do badań wybrano 20 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, w wieku od 3 do 9 lat, które wycieliły się od października 2017 roku do lutego 2018 roku. Krowy podzielono na dwie grupy (po 10 sztuk) tj. grupę kontrolną i grupę eksperymentalną. W dawce pokarmowej krów grupy eksperymentalnej zastosowano dodatek mieszanki paszowej uzupełniającej zawierającej β -karoten w ilości 100g/krowę/dzień, co odpowiada 200 mg krystalicznego β -karotenu. Dodatek podawano krowom indywidualnie rano z niewielką ilością TMR-u.

Krowy żywiono dwiema różnymi dawkami : dla krów w ostatniej fazie zasuszenia oraz w początkowej fazie laktacji. Skład komponentowy i chemiczny obu zestawów pasz (TMR) oraz skład mieszanki paszowej uzupełniającej zawierającej β -karoten przedstawiono w tabelach oraz opisano pod tabelami. Próbkę krwi krów pobrano trzykrotnie, kolejno 21 dni przed spodziewanym porodem, następnie 24 godziny po wcieleniu i 14 dni po porodzie. Próbkę siary pobrano z każdej ćwiartki, z pierwszego doju po porodzie. Skład chemiczny oraz zawartość β -karotenu w paszach (TMR) oznaczono zgodnie z metodami przedstawionymi w niniejszym rozdziale. W surowicy krwi krów oznaczono parametry biochemiczne oraz całkowity status antyoksydacyjny przy użyciu analizatora biochemicznego oraz zestawu odczynników. Niezwykle dokładnie używając graficznych schematów reakcji chemicznych Doktorantka opisała metodę oraz przebieg procesu oznaczania całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS), z uwzględnieniem stężenia odczynników, temperatury i czasu inkubacji. **Pytanie: jak bardzo taki opis jest przydatny w ocenie efektywności dodania β -karotenu do skarmianych pasz?** Podstawowy skład chemiczny, liczbę komórek somatycznych, ogólną liczbę drobnoustrojów w siarce oznaczono wykorzystując specjalistyczne zestawy aparatury laboratoryjnej, skład kwasów tłuszczowych oznaczono metodą chromatografii gazowej. Doświadczenie drugie wykonano także w towarowym stadzie bydła mlecznego, do badań wybrano 40 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, które wycieliły się od października 2019 roku do lutego 2020 roku. Krowy podzielono na dwie grupy (po 20 sztuk) tj. grupę kontrolną i grupę doświadczalną. W każdej grupie utworzono dwie podgrupy po 10 sztuk krów wieloródek i 10 sztuk krów pierwiastek. W dawce pokarmowej krów grupy doświadczalnej zastosowano dodatek mieszanki paszowej uzupełniającej zawierającej β -karoten w ilości 150g/krowę/dzień, co odpowiada 300 mg krystalicznego β -karotenu. Dodatek podawano krowom indywidualnie rano z niewielką ilością TMR-u. Krowy żywiono trzema różnymi dawkami (TMR): pierwszą skarmiano trzy, drugą dwa tygodnie przed porodem, trzecią w początkowej fazie laktacji. Skład komponentowy i chemiczny trzech zestawów pasz (TMR) przedstawiono w tabelach oraz opisano pod tabelami. Pobranie krwi, pozyskanie surowicy, pobranie siary wykonano tak jak w doświadczeniu pierwszym, dodatkowo oddzielono erytrocyty z krwi krów oraz w trzeciej dobie życia cieląt pobrano krew i pozyskano surowicę. W doświadczeniu drugim parametry biochemiczne i przeciwutleniające, zawartość β -karotenu we krwi zwierząt oraz skład chemiczny siary oznaczono według metod zastosowanych w doświadczeniu pierwszym, przy użyciu specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego oraz zestawów odczynników. Immunoglobuliny w surowicy krwi cieląt i w siarce oznaczono immunoenzymatycznym testem ELISA. Uważam, że układ doświadczeń, stosowane metody badawcze i analizowane parametry doświadczalne oraz metody analizy statystycznej zostały dobrze dobrane do postawionego celu badań. Jednak po lekturze tego rozdziału nasuwa się kilka uwag:

- co służyło za podstawę do ustalenia dawki suplementu karotenowego ?
- w publikacjach wyników w badaniach żywieniowych i paszoznawczych prowadzonych na przeżuwaczach dobrą praktyką jest podawanie poza składem komponentowym i chemicznym diety, składu chemicznego zastosowanych pasz, szczególnie objętościowych, które charakteryzują się dużą

zmiennością jakościową,

- w tabelach dotyczących zawartości składników pokarmowych dawek nie zamieszczono ich wartości pokarmowej, co umożliwiłoby ocenę prawidłowości żywienia w konfrontacji z normami,
- brakuje danych dotyczących dziennego pobrania suchej masy dawki domyślam się, że z powodu wolnego utrzymania zwierząt. Można oszacować średnie indywidualne pobranie w grupie co ułatwiłoby bardzo interpretację wyników i dyskusję,
- w tabelach 3 i 4 brakuje informacji czy jest to skład TMR w naturalnej wilgotności, czy jego suchej masy,
- zastrzeżenia budzą wartości w tab3 dotyczące zawartości włókna w TMR, zawartość białka wskazuje na suchą masę natomiast włókna są bardzo zaniżone
- określenie „efekt pobrania” kojarzy się z pobraniem paszy i nie oddaje faktycznego czynnika doświadczalnego chyba bardziej czytelne byłoby określenie „ efektu fazy fizjologicznej lub okresu fizjologicznego”.

Odniesienia się do powyższych uwag spodziewam się podczas obrony pracy doktorskiej.

Rozdział **Wyniki i dyskusja** został podzielony przez Autorkę na dwa podrozdziały z uwagi na dwa doświadczenia. Doktorantka omówiła wyniki uzyskane w poszczególnych doświadczeniach i zamieszczone w 8 tabelach. Autorka omawia rezultaty swojej pracy z obu doświadczeń w sposób systematyczny, zaczynając od wybranych parametrów biochemicznych krwi, następnie omawia koncentrację β -karotenu w surowicy krwi krów, skład fizykochemiczny siary, zawartość w niej β -karotenu oraz profil kwasów tłuszczowych siary. Prezentacja wyników doświadczenia drugiego rozszerzona jest o ocenę zawartości immunoglobulin (IgG) w surowicy krwi krów oraz koncentrację immunoglobulin (IgG), parametrów biochemicznych i β -karotenu w surowicy krwi cieląt.

Autorka umiejętnie skonfrontowała rezultaty badań własnych z danymi z piśmiennictwa. Prezentacja i ocena uzyskanych wyników badań wykonana przez Doktorantkę w niniejszym rozdziale dysertacji skłania do stwierdzenia, iż określenie wpływu czynnika doświadczalnego na zróżnicowanie stężenia biochemicznych i antyoksydacyjnych parametrów krwi zwierząt oraz siary oznaczanych w niezwykle dynamicznym okresie okołoporodowym jest bardzo trudne. Co znalazło potwierdzenie zarówno w wynikach badań Doktorantki, jak i w cytowanych licznych danych piśmiennictwa. W niektórych fragmentach Doktorantka dokonała zbyt skrótowo opisu wyników badań własnych: cytuję: „Między pobraniem I a III nie zaobserwowano istotnych różnic (...)”. Stosowanie skrótu myślowego „numer pobrania”, a nie terminy pobrania krwi ściśle uwarunkowane fizjologią i przyjętym układem utrudniają odbiór i analizę uzyskanych wyników czytelnikowi. Pozostałe rozdziały dyskusji są dowodem bardzo dobrej orientacji w piśmiennictwie oraz wnikliwej analizy wyników własnych oraz innych autorów. Podkreślić należy, że dyskusja została przeprowadzona w sposób jasny i zrozumiały. Autorka zgromadziła liczną literaturę zagraniczną i krajową (308 pozycji), z tego 14% stanowią pozycje polskojęzyczne. Przedstawiona literatura jest aktualna i właściwie dobrana do tematyki badawczej, tylko

nieliczne prace pochodzą z poprzedniego stulecia.

Pracę kończy rozdział **Podsumowanie**, który zawiera poprawnie sformułowane stwierdzenia w oparciu o uzyskane wyniki badań. Wskazują one, że postawione cele badawcze Doktorantka zrealizowała. Brakuje jednak wniosku, który odpowiadałby postawionym celom stawianym w pracy. Wynika to prawdopodobnie ze zróżnicowania uzyskanych wyników. Stwierdzenie przedstawione w punkcie 5 nie odpowiada temu wymogowi i uważam za zbędne. Problemy we wnioskowaniu wynikają z tego, że Autorka podjęła się zadania tylko z pozoru łatwego. Badania nad suplementacją substancji biologicznie aktywnych, które są obecne w różnych paszach i komponentach dawki, w różnej koncentracji i w różnym stopniu przyswajalności, co powoduje to wiele interakcji i bardzo komplikuje interpretację wyników.

Ocena końcowa

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. inż. Elizy Piksy pt.: „Wpływ dodatku β -karotenu do dawek pokarmowych dla krów w okresie okołoporodowym na jakość siary, wybrane parametry biochemiczne krwi oraz wyniki odchowu cieląt” poszerza zakres wiedzy na temat uzupełniania β -karotenu w dawkach pokarmowych krów. Rozprawa jest podsumowaniem studiów eksperymentalnych, podporządkowanych ważnym celom poznawczym i praktycznym. W pracy wykorzystano właściwe metody badawcze, pozwalające na uzyskanie wiarygodnych wyników. Zamieszczone w tekście recenzji uwagi nie umniejszają wartości pracy, ale stanowią element naukowej dyskusji w ramach podjętych problemów badawczych. Drobne uchybienia, takie jak, powszechne wśród młodego pokolenia nadużywanie przyimka „dla” zamiast formy celownika liczby pojedynczej lub mnogiej wymaga poprawy.

Podsumowując należy stwierdzić, że obszerne badania podjęte przez Doktorantkę są ważne zarówno z poznawczego, jak i użytecznego punktu widzenia. Biorąc pod uwagę liczbę czynników oraz liczbę i charakter cech, których ocena wymagała bardzo dużego nakładu pracy, należy stwierdzić, że Autorka wykazała się dużą pracowitością i sumiennością oraz dobrze poradziła sobie z zaprezentowaniem uzyskanych wyników. Należy także podkreślić, że realizacja tak dużego przedsięwzięcia logistycznego i analitycznego wymagała bardzo dużego zaangażowania organizacyjnego Doktorantki. Praca w znaczny sposób poszerza dotychczasową wiedzę na temat stosowania nasion lnu w żywieniu przeżuwaczy.

Uwzględniając wartość merytoryczną ocenianej pracy uważam, że stanowi ona osiągnięcie naukowe spełniające wymagania stawiane pracom naukowym, zarówno w zakresie dziedziny i dyscypliny, w której wszczęto przewód doktorski, jak również dyscypliny i dziedziny wg nowej kwalifikacji, co upoważnia mnie do przedłożenia Radzie Dyscypliny

Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosku o dopuszczenie mgr. inż. Elizy Piksy do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Rozprawa doktorska mgr inż. Elizy Piksy spełnia wymogi określone w art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ustawy z dn. 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 ze zm.)

Prof. dr hab. Cezary Purwin