

## Recenzja

rozprawy doktorskiej pt.: „**Wpływ wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na wskaźniki fizjologiczne i efektywność odchowu cieląt**” wykonanej przez mgr inż. Kingę Śpitalniak, w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt, Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, pod kierunkiem dr hab. inż. Roberta Kupczyńskiego, profesora UP we Wrocławiu.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przygotowano ją według klasycznego układu maszynopisu. Składa się z następujących rozdziałów: Wstęp, Przegląd piśmiennictwa, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki badań, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo i Streszczenie. Praca liczy 158 stron. Zamieszczono w niej 20 tabel i 29 rycin. Spis literatury obejmuje aż 369 pozycji. Zebrana tak obszerna literatura świadczy o bardzo dobrym śledzeniu piśmiennictwa, jednak część publikacji jest w tym spisie niepotrzebna, bo nie odnosi się do tematyki pracy. Spis literatury jest niestaranny. W niektórych pozycjach brakuje tytułów publikacji (np. 339) czy stron końcowych. Niektóre nazwy czasopism podane są skrótowo, z lub bez znaków interpunkcyjnych. Niektóre nazwy czasopism podano w wersji pełnej, bez skrótów, a inne w wersji skrótowej. Pracę poprzedzają objaśnienia skrótów, niestety z licznymi błędami.

### Uwagi ogólne

Odchów cieląt pozostaje ciągle jednym z najłabszych ogniw w produkcji mleka i mięsa wołowego. Udział kosztów remontu stada w kosztach ogółem produkcji mleka stanowi 18-20%, a upadki cieląt, a także konieczność prowadzenia drogiego leczenia istotnie ten udział zwiększają. Przyczyną śmiertelności cieląt i problemów z ich zdrowiem, nie jest, jak sądzą niektórzy (a ich poglądy powtarza Doktorantka na str. 8), wysoka wydajność stada, bo w najlepszych polskich gospodarstwach notuje się znacznie mniej problemów z odchowem cieląt niż w gospodarstwach charakteryzujących się niską wydajnością mleka. To złe warunki chowu i tak zwany czynnik ludzki są ciągle główną przyczyną martwych porodów, upadków i chorób cieląt.

Miarą sukcesu w odchowcie cieląt nie jest dzisiaj tylko liczba odchowanych cieląt. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach wskazują również na istotny wpływ odchowu cieląt na przyszłą użytkowość mleczną. Przyszła wydajność mleka zależy od rozwoju narządów (gruczołu mlekowego, serca, nerek, układu pokarmowego), który odbywa się w pierwszych 3-4 tygodniach życia. Według Soberon i Van Amburgh (2013) wpływ tego rozwoju na przyszłą użytkowość mleczną jest większy niż wpływ buhaja.

Możliwości poprawy zdrowia oraz wzrostu i rozwoju cieląt upatruje się w poprawie dobrostanu i żywienia. Dotyczy to między innymi efektywniejszych metodach odpajania cieląt, ale także w stosowaniu dodatków paszowych, które mogłyby nie tylko pokrywać zapotrzebowanie na składniki pokarmowe, ale powodować poprawę funkcjonowania organizmu cielęcia. Do takich składników zalicza się wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), zwłaszcza z grupy omega-3, które uważa się jako składniki funkcjonalne, także dla cieląt. Ich znaczenie w odchowcie cieląt nie jest jednak ciągle dostatecznie poznane. Pewną trudnością w podawaniu cielętom dodatków paszowych zawierających PUFA jest podatność nienasyconych kwasów tłuszczowych (KT) na procesy utleniania. Jeżeli dodatek paszowy ma być funkcjonalny, nie może dostarczać cielęciu szkodliwych produktów utleniania KT.

W powyższym kontekście badania podjęte przez mgr inż. Kingę Śpitalniak uważam za aktualne i uzasadnione, tak z naukowego, jak i z praktycznego punktu widzenia. Szczególną uwagę zwraca fakt, że przedmiotem badań były samodzielnie otrzymane dodatki jabłkowo-tłuszczowe, składające się z liofilizowanych owoców jabłoni (jabłek) oraz oleju lnianego lub estrów etylowych KT otrzymanych z przerobu oleju lnianego. Wybór oleju lnianego lub estrów etylowych, pochodzących z oleju lnianego jako źródeł PUFA jest z jednej strony nowatorski, a z drugiej uzasadniony ze względu na profil KT tych dodatków, a także na fakt, że uprawa lnu jest popularna w naszym kraju. Bardzo ciekawe i nowatorskie jest również zastosowanie liofilizowanych jabłek jako źródła polifenoli, a więc składników, które miałyby chronić PUFA dodatków tłuszczowych przed utlenianiem. Wysoko oceniam zwłaszcza etap 1 badań, nie tylko z powodu „autorstwa” dodatków, ale także z powodu przeprowadzenia tzw. testów przechowalniczych. Szkoda, że tego aspektu nie podkreślono w sposób szczególny w założeniach (hipoteza i cele) pracy. W etapie 2 wykonano badania na zwierzętach, którym podawano dodatki jabłkowo-tłuszczowe w preparatach mlekozastępczych.

### Uwagi szczegółowe

Dla ułatwienia odpowiedzi Doktorantki na niektóre pytania i wątpliwości, zaznaczyłem je w recenzji kolorem czerwonym.

**Tytuł pracy** w aktualnej wersji jest zbyt ogólny. Powinien wskazywać, że wielonienasycone KT podawano cielętom w preparacie mlekozastępczym, a także to, że były one stabilizowane polifenolami pochodzącymi z jabłek.

**Wstęp pracy** wprowadza w jej tematykę. Jest jednak zbyt obszerny, bo znaczną część informacji powtórzono w **Przeglądzie piśmiennictwa**, który jest najslabszą częścią ocenianej rozprawy doktorskiej. Jest to przegląd „przegadany”, w którym Autorka omawia wiele zagadnień niezwiązanych z tematem pracy. Całkowicie zbędne są informacje na temat znaczenia tłuszczu w żywieniu krów i ludzi, w tym znaczenia KT dla rozrodu krów czy wpływu ich pobrania na skład mleka czy wołowiny. Z kolei podrozdział, który dotyczy stosowania tłuszczu w żywieniu cieląt jest skrótowy, napisany chaotycznie. Nie wynika z niego jasno, czego brakuje w aktualnym stanie wiedzy na temat stosowania PUFA w żywieniu cieląt. W całym przeglądzie piśmiennictwa nie wskazano w sposób jednoznaczny dlaczego podjęto badania będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Całkowicie pominięto uzasadnienie podjęcia stosowania polifenoli, w tym pochodzących z owoców jabłoni. Z przeglądu piśmiennictwa nie można dowiedzieć się czy taki pomysł był już sprawdzany w jakimś doświadczeniu prowadzonym na cielętach. O wiele więcej ciekawych informacji na ten temat podano w dyskusji, ale są one również niezbędne w opisie założeń pracy.

Przegląd piśmiennictwa jest pełen skrótów myślowych, błędów stylistycznych, a nawet ortograficznych. Najważniejszym zastrzeżeniem jest jednak fakt, że nie prowadzi do hipotezy badawczej i celu badań. Autorka nie wskazuje w nim nowatorskiego charakteru badań. A mają one taki charakter, bez żadnego wątpliwości.

**Niestety Cel badań nie jest poprzedzony jasno sprecyzowaną hipotezą badań.** Jestem przekonany, że gdyby taką hipotezę przedstawiono, to w przeglądzie literatury podano by, że skoro nienasycone KT są podatne na utlenianie, to ich stosowanie w preparatach mlekozastępczych wymagałoby stabilizacji, na przykład przez zastosowanie dodatków zawierających naturalne antyoksydanty. Tym samym w przeglądzie literatury znalazłyby się informacje na temat przeciwutleniaczy stosowanych w stabilizacji dodatków tłuszczowych, zwłaszcza gdy te stosowane są w żywieniu cieląt.

**Rozdział Materiał i metody** Autorka rozpoczęła od bardzo czytelnej ryciny przedstawiającej etapy badań oraz sposoby ich realizacji. Termin „Opracowanie dodatków tłuszczowych” proponuję zamienić na „Przygotowanie dodatków jabłkowo-tłuszczowych”, skoro udział liofilizowanych jabłek jest większy niż oleju lnianego czy estrów etylowych KT. Z opisu produkcji estrów etylowych trudno zorientować się czy były one wytworzone w laboratorium UP we Wrocławiu czy w FLC Pharma sp. z o.o. **Bardzo zdawkowo potraktowano kryterium wyboru proporcji oleju lub estrów do liofilizowanych jabłek. Czy jedynym kryterium była wygoda mieszania i przechowywania? Czy były jakieś „biologiczne” powody przyjętych proporcji? Czy badania poprzedzono próbami różnych proporcji?**

Uzyskane dodatki poddano tzw. próbom przechowalniczym. Opis warunków przechowywania potraktowano jednak bardzo skrótowo – **czy próbki przechowywano pod przykryciem (w ciemności) i w jakiej temperaturze?**

Próbki przed i po okresie przechowywania poddano specjalistycznym analizom chemicznym, które miały wykazać pozytywny wpływ dodatku liofilizowanych jabłek na stabilność KT oleju lnianego oraz estrów etylowych. Jak wspomniałem wcześniej tę część pracy, jej pomysł i realizację oceniam wysoko. Percepcję rozdziału 4.1.1. ułatwiłoby przedstawienie graficzne czasu przechowania oraz wykonywania poszczególnych analiz, w poszczególnych materiałach. Aktualny opis staje się czytelny dopiero po lekturze tabel zamieszczonych w rozdziale Wyniki badań. Zakres wykonanych analiz, opisanych w tej części rozprawy, świadczy o bardzo dużej pracy wykonanej przez Doktorantkę i o umiejętnościach przez Nią nabytych. Jeżeli praca doktorska ma być wstępem do dalszej pracy naukowej, umiejętności nabyte przez Doktorantkę będą owocowały w przyszłości.

Uzyskane dodatki jabłkowo-tłuszczowe podawano cielętom po uprzednim ich wymieszaniu z pójłem preparatu mlekozastępczego. Doświadczenie wykonano na 27 cielętach podzielonych na 3 grupy, po 9 cieląt. Nasze doświadczenia prowadzone na cielętach w warunkach produkcyjnych wskazują, że 9 cieląt w grupie jest niestety liczbą małą, co ze względu na znaczną zmienność może mieć wpływ na uzyskane wyniki. **Niestety, z opisu doświadczenia oraz z rozdziału Wyniki badań nie wiadomo niczego na temat pochodzenia cieląt (gospodarstwo w ramach HZZ Żołędnica), rozdziału płci, a także średniego wieku cieląt oraz masy ciała w dniu rozpoczęcia doświadczenia. Nie wiadomo jaki był ich stan odporności biernej, wynikający z pobrania siary? Stan odporności biernej mógł być jednym z czynników branych pod uwagę w metodzie analogów. O wpływie tego czynnika pisze Doktorantka w Dyskusji pracy (str. 116)**

Układ doświadczenia jest zrozumiały, chociaż **brakuje w nim grup żywionych z dodatkiem wyłącznie oleju lnianego lub estrów etylowych KT lub liofilizowanych jabłek.** Jeżeli tak wiele miejsca poświęcono w pracy testom przechowalniczym i aktywności antyoksydacyjnej, uzasadnione byłoby podanie **jaki był czas przechowywania dodatków zastosowanych w doświadczeniu wykonanym na cielętach?** Wyniki uzyskane w etapie 1 (np. liczba kwasowa) wskazują jak ważna jest ta informacja.

Opis wykonania tej części pracy doktorskiej ma wiele braków i uchybień, z których najważniejsze to:

- str. 39 – brak informacji na temat dawek preparatu mlekozastępczego, godzin pojenia,
- str. 39 – brak informacji na temat tego czy dawka pokrywała zapotrzebowanie cieląt na wzrost (jakie przyjęto przyrosty masy ciała ?)
- str. 39 – brak informacji na temat nazwy preparatu mlekozastępczego (czy był tylko 1 preparat – na str. 40 informacja o analizie „preparatów”)
- str. 40 – brak informacji na temat tego czy i jak ważono niedojady (także str. 45); z opisu wyników (tabela 12) wynika, że nie ważono niedojadów siana – dlaczego ?
- str. 40 – energii metabolicznej nie oznacza się, tylko wylicza, a sposobu jej wyliczenia nie podaje się w AOAC; w tabeli 1 podano zawartość energii brutto – czy ją oznaczano ? Podobnie, czy oznaczano skład mineralny preparatu mlekozastępczego ? Jeżeli tak, to jakimi metodami ?
- str. 41 – dlaczego w sianie podano zawartość energii metabolicznej i to w Mcal/kg (suchej masy ?), a w liofilizowanych jabłkach zawartość energii brutto i to w kcal/kg (suchej masy ?)
- str. 41 – podano, że oznaczano profil KT w paszach, to dlaczego nie w sianie ?

W trakcie doświadczeń pobierano od cieląt krew, a w niej (w pełnej krwi, w surowicy lub w osoczu) oznaczano wskaźniki hematologiczne, równowagi-kwasowo zasadowej, biochemiczne, układu immunologicznego oraz statusu antyoksydacyjnego. Oznaczano również profil KT w surowicy krwi. Chciałbym ponownie podkreślić olbrzymi zakres wykonanych analiz, także w tej części rozprawy, który świadczy o bardzo dużej pracy wykonanej przez Doktorantkę. **Uzasadnienie konieczności części wykonanych analiz jest dyskusyjne (np. NEFA, cholesterol całkowity).** Z pewnością uzasadnienie wykonywanie tak wielu analiz byłoby znacznie większe, gdyby w układzie doświadczalnym znalazły się grupy cieląt żywionych dodatkami tłuszczowymi, podlegającymi procesom utleniania, ale bez udziału liofilizowanych jabłek, które te procesy miały hamować lub ograniczać.

W trakcie doświadczenia cielęta badano klinicznie oraz ważono i ta część metod badawczych nie budzi zastrzeżeń. W przeciwieństwie do opisu analiz statystycznych (rozdział 4.3). **Z opisu wynika, że analizie statystycznej poddano tylko wyniki badań na cielętach....?** Podano, że wyniki poddano jedno- lub dwuczynnikowej analizie wariancji. **W opisie analiz powinno znaleźć się wyszczególnienie, które dane analizowano jedno- lub dwuczynnikową analizą wariancji. Niezrozumiałe jest podanie modelu (GLM) – czego on dotyczył ? Dlaczego nie podano modeli dla innych analiz statystycznych ?** O nie najwyższym poziomie analiz statystycznych świadczą opisy wyników – np. pod tabelą 5: cytata „*a, b – różnice wysoko istotne zaznaczone w wierszach przy  $P < 0.05$  dla estrów etylowych lub oleju lnianego*” – po pierwsze  $P < 0.05$  to różnice tylko istotne, po drugie jednak wyniki etapu 1 poddano analizie statystycznej, po trzecie wykonywano ją osobno dla oleju i estrów, czego nie podano w opisie analizy statystycznej. To tylko jeden z przykładów niejasności opisu analizy statystycznej.

W przygotowaniu pracy do druku proponuję rozważyć poddanie części wyników analizie wariancji dla pomiarów powtarzalnych (*repeated measures*). Wynik uzyskany w 35 dniu (np. masa ciała) nie wynika tylko z wpływu czynników doświadczenia i indywidualnego efektu zwierzęcia, ale także z wyniku uzyskanego w 28 dniu. Wpływ tego czynnika uwzględnia właśnie analiza pomiarów powtarzalnych. Wiele z wyników uzyskanych w niniejszej pracy powinno być analizowanych statystycznie tą metodą.

**Wyniki badań** uzyskane przez Doktorantkę zostały przedstawione w tabelach oraz na wykresach. W przeprowadzonych badaniach uzyskano szereg interesujących wyników, chociaż sposób ich opisanie jest często mało zrozumiały i wymagał równoczesnego „studiowania” rozdziału Dyskusja.

Bez względu na metodę oznaczenia, przechowywanie oleju lnianego lub estrów etylowych powodowało zmniejszenie udziału kwasu C18:3 n-3 (ALA) w sumie kwasów (a nie jak pisze Doktorantka zmniejszenie zawartości kwasu ALA; także strona 87). Dodatek liofilizowanych jabłek nie miał większego wpływu na udział tego kwasu w sumie kwasów (w tłuszczu) w badanych dodatkach tłuszczowych.

Zastosowane w doświadczeniu liofilizowane jabłka charakteryzowały się wysoką zawartością polifenoli, co ma wpływ na ich aktywność antyoksydacyjną. **W pracy nie podano, jak można wytłumaczyć zbliżoną zawartość polifenoli w dodatkach jabłkowo-tłuszczowych do zawartości w samych liofilizowanych jabłkach, przed przechowaniem ?** W czasie przechowywania, zwłaszcza w pierwszych 14 dniach zawartość polifenoli ulegała systematycznemu zmniejszaniu się, tak w dodatkach, jak i w liofilizowanych jabłkach. Niezależnie od metody oznaczenia, w wyniku przechowywania obniżała się aktywność przeciwutleniająca badanych próbek. Aktywność wygaszania wolnych rodników była niższa w próbkach z udziałem estrów etylowych. **Szkoda, że nie badano jaka była ta aktywność w próbkach oleju lub estrów bez dodatku liofilizowanych jabłek.**

Dodatek liofilizowanych jabłek do oleju lnianego spowolnił wzrost liczby kwasowej (czego można było oczekiwać), natomiast spowodował bardzo istotny wzrost LK (prawie 10 krotny) w przypadku estrów etylowych. **W dyskusji nie wytłumaczono dlaczego ?** Z drugiej strony dodatek liofilizowanych jabłek zwiększył liczbę nadtlenkową (LN) w oleju lnianym, natomiast istotnie spowolnił zwiększanie LN wraz z upływem czasu przechowywania estrów etylowych. **W dyskusji również nie wytłumaczono dlaczego ?**

W tabeli 11 należało oczekiwać informacji o profilu KT preparatów mlekozastępczych bez oraz z dodatkami jabłkowo-tłuszczowymi. W przygotowaniu pracy do druku należałoby takie informacje zamieścić. Ze względu na fakt, że oznaczano jedynie profil KT, bez wykorzystania standardów wewnętrznych, wyliczenie ilościowego pobrania poszczególnych KT (tabela 12) jest wątpliwe i wymaga komentarza.

Najwyższe przyrosty masy ciała, średnie tempo wzrostu oraz wykorzystanie paszy i pobranie paszy starterowej obserwowano w grupie cieląt żywionych z dodatkiem estrów etylowych. Natomiast najgorsze efekty produkcyjne uzyskano u cieląt w grupie kontrolnej. Cielęta z grup doświadczalnych pobierały (patrz uwaga powyżej !!!) istotnie więcej kwasów C18:1, C18:2 i C18:3. Cielęta z tych grup miały korzystniejsze wskaźniki badań klinicznych. Chociaż odnotowano pewien wpływ dodatków paszowych na wskaźniki równowagi kwasowo-zasadowej, różnice pomiędzy grupami okazały się bardziej numeryczne niż fizjologiczne. Dodatki jabłkowo-tłuszczowe zmieniły wskaźniki hematologiczne oznaczane w krwi cieląt, ale to również nie miało wyraźnego wpływu na ich zdrowie oraz wskaźniki produkcyjne. Wzbogacenie preparatu mlekozastępczego w dodatki jabłkowo-tłuszczowe zmniejszyło stężenie glukozy, Ca i aktywność AST, ALT oraz CK i zwiększyło stężenie białka całkowitego i aktywności ALP we krwi, a ich wpływ na inne wskaźniki gospodarki węglowodanowo-lipidowej i wskaźniki biochemiczne we krwi był nieistotny, niesystematyczny lub bardziej numeryczny niż biologicznie istotny. Wpływ czynników doświadczenia na status oksydacyjny, chociaż istotny dla niektórych wskaźników, był trudny do oceny ze względu na różnice pomiędzy grupami jeszcze przed rozpoczęciem doświadczenia (uwagę dotyczącą wykresów podano poniżej). Z pewnością, dodatki jabłkowo-tłuszczowe spowodowały istotne zmniejszenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), co może świadczyć o lepszym statusie antyoksydacyjnym cieląt. Zwłaszcza w przypadku tych wskaźników należy żałować, że w doświadczeniu nie było grup cieląt żywionych bez dodatku liofilizowanych jabłek, bo taki układ doświadczenia pozwoliłby na ocenienie wpływu samych polifenoli jabłek na status antyoksydacyjny cieląt. Wpływ dodatków paszowych na status układu immunologicznego cieląt okazał się niewielki, z wyjątkiem istotnego wpływu na stężenie TNF- $\alpha$ . Rozdział „Wyniki badań” kończy się opisem wpływu czynników doświadczenia na profil KT w surowicy krwi. Uważam, że ten rozdział powinien być umieszczony przed opisem efektów produkcyjnych, bo uzyskane wyniki potwierdziły transfer KT z dodatków jabłkowo-tłuszczowych z przewodu pokarmowego do krwi. Zastosowanie dodatków spowodowało zwiększenie udziału w sumie KT kwasów długołańcuchowych, zwłaszcza C18:2 n-6 i C18:3 n-3 oraz zmniejszenie udziału kwasów nasyconych, zwłaszcza C16:0 i C18:0.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na poniższe nieścisłości i wątpliwości dotyczące wyników i ich prezentacji:

- str. 49 i 50. – dlaczego różnice dla ALA w oleju lnianym w tabeli 5 były istotne, a już w tabeli 6 nie ?
- str. 50, tabela 6 – analiza statystyczna polegająca na porównaniu metod, osobno dla każdego wariantu nie ma jakiegokolwiek uzasadnienia, jest niepotrzebna w tej pracy (po co porównywać metody...)
- str. 54, tabela 7 – jaka to była analiza statystyczna ??? czy była to dwuczynnikowa analiza wariancji ??? czy w tej analizie była istotna interakcja ? – opis pod tabelą jest całkowicie niezrozumiały !!!
- str. 55 i 56, tabela 8, 9, 10 – zaznaczenie istotności różnic jest bardzo (!!!) mało czytelne (istotność w kolumnach ? – czy były to dwuczynnikowe analizy wariancji ?
- str. 57 i 58, tabela 11 – powinna być umieszczona po tabelach 1,2,3, dotyczących składu chemicznego i wartości pokarmowej pasz, co ułatwiłoby zrozumienie uzyskanych wyników; w tekście brakuje odniesienia do tabeli 11
- str. 59, tabela 12 – co oznacza zwrot „Termin pobrania” ? Wykonanie analizy wariancji dla pomiarów powtarzalnych całkowicie zmieniłoby jakość uzyskanych informacji i do takiej analizy zachęcam Doktorantkę w przygotowaniu pracy do druku
- str. 59, tabela 12 – należało zaznaczyć istotności różnic pomiędzy grupami ?
- wykresy 6-9, 10-11, 12 i 14, 15-17, 19-24 – oznaczenia istotności różnic są bardzo mało czytelne (!!!, różne kolory); w tytule osi OX powinno być „dni życia”, a nie dni, bo może to sugerować dni doświadczenia
- wykresy 19-26 – pomimo, że dotyczą tej samej informacji oznaczenia osi OX są różne, co utrudnia analizę wykresów
- str. 66, tabela 15 – konieczne byłoby wyjaśnienie znaczenia skrótów jednostek
- str. 70, wykres 13 jest niepotrzebny (nieistotna interakcja), a brakuje wykresu dla stężenia NEFA we krwi (istotna interakcja; tabela 16)
- str. 75, wykres 17 – czym można wytłumaczyć różnice pomiędzy grupami w aktywności ALP w 14 dniu doświadczenia (przed rozpoczęciem doświadczenia) ?
- str. 77, wykres 19, 20, 22, – czym można wytłumaczyć różnice pomiędzy grupami w TAS, GPx, MDA, w 14 dniu doświadczenia (przed rozpoczęciem doświadczenia) ? Na Wykresach 23 i 24 brakuje danych (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) dotyczących 14 dnia – celowo ?

- wykresy 27-29 – dlaczego nie ma danych dotyczących 14 dnia życia – dane z dnia „0” ?
- str. 105 – poziom cholesterolu całkowitego we krwi nie świadczy o wpływie dawki na funkcje wątroby.

**Dyskusja** jest dobrą częścią pracy i świadczy o dobrej znajomości tematyki badawczej. Wyjaśnia wiele wcześniejszych wątpliwości, nawet metodycznych. Chociaż zbyt obszernie, ale komentuje uzyskane wyniki na tle istniejącego stanu wiedzy. Jakość dyskusji byłaby jeszcze lepsza gdyby Doktorantka w większym stopniu odnosiła się do swoich wyników, podała ich przyczyny i ewentualne mechanizmy o nich decydujące, a nie tylko konfrontowała swoje wyniki z wynikami uzyskanymi w innych doświadczeniach lub z wartościami referencyjnymi. Na przykład w grupie cieląt karmionych preparatem z dodatkiem estrów obserwowano najniższą (w każdym okresie doświadczenia) wartość WBC (tabela 15) i taką informację podano w dyskusji (strona 102), nie dyskutując „dlaczego” ? Ta uwaga dotyczy większości badanych wskaźników. Moja ocena dyskusji byłaby również jeszcze wyższa gdyby Autorka podsumowała (strona 94) najważniejsze osiągnięcia uzyskane w etapie 1. **W tym fragmencie dyskusji brakuje informacji, które z uzyskanych danych w etapie 1 wykorzystano w etapie 2 ?** Ułatwieniem dla lektury dyskusji byłoby podsumowywanie jej fragmentów, z próbą uogólnienia. Na przykład co wynika z całego zestawu badań wskaźników hematologicznych czy biochemicznych ? Mankamentem dyskusji jest również bardzo skromne jej podsumowanie. Tak olbrzymia ilość uzyskanych danych, dotycząca wpływu czynników doświadczenia (grupa, wiek, interakcja) powinna być w rozdziale „Dyskusja” omówiona całościowo. Uzasadnione byłoby zaproponowanie praktycznego ich wykorzystania.

Takim podsumowaniem badań są trafne **Wnioski** zaproponowane przez Doktorantkę. Nie brakuje w nich kilku niezręczności językowych i skrótów myślowych („wzrost TAS i GPx”; „pozytywny wpływ na reakcje zapalne”). Szkoda, że bardzo dobry ostatni akapit streszczenia nie został dodany jako wniosek numer 8.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że, pomimo wielu wątpliwości dotyczących koncepcji pracy i układu doświadczenia, wielu uwag metodycznych, w tym analizy statystycznej, a także uwag dotyczących przygotowania pracy (błędy stylistyczne, błędy merytoryczne, skróty myślowe, określenia potoczne, niezrozumiałe opisy analizy statystycznej w tabelach i na wykresach) pracę doktorską Pani mgr inż. Kingi Śpitalniak oceniam pozytywnie. Bardzo ciekawy i nowatorski jest pomysł stabilizowania PUFA polifenolami pochodzącymi z owoców jabłoni. Interesujący jest sposób oceny wpływu przechowywania na skład chemiczny dodatków jabłkowo-tłuszczowych. Kompleksowy jest sposób oceny przydatności dodatków w odchowcie cieląt, uwzględniający ich wpływ nie tylko na wskaźniki produkcyjne, ale także na zdrowie oraz funkcjonowanie różnych narządów i układów. Praca, pomimo wspomnianych mankamentów, jest wartościowym opracowaniem, wnoszącym do nauki wiele interesujących wyników. Poszerza ciągle niedostateczną wiedzę z zakresu odchowu cieląt i możliwości wykorzystywania w nim specyficznych dodatków paszowych.

Wykonane badania, ich bardzo szeroki zakres oraz zastosowane metody świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki, a także o Jej umiejętności organizacji warsztatu badawczego, pracowitości i zaangażowaniu. Należy mieć nadzieję, że wyniki uzyskane w badaniach będą publikowane w dobrych czasopismach naukowych, a znaczna część na to zasługuje. Mam nadzieję, że uwzględnienie moich uwagi ułatwi przygotowanie prac do druku.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Kingi Śpitalniak odpowiada warunkom określonym w art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595, z późniejszymi zmianami). Tym samym wnioskuję do Rady Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr inż. Kingi Śpitalniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Zygmunt M. Kowalski

