

Dr hab. Anna Chmielowiec-Korzeniowska
prof. nadzw. UP Lublin
Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska
Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Budny-Walczak pt. ***"Wpływ chelatu żelaza na parametry metaboliczne, immunologiczne i produkcyjne cieląt"*** wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. prof. nadzw. Roberta Kupczyńskiego i Pana dr nauk wet. Michała Bednarskiego

Okres okołoodsadzeniowy cieląt jest kluczowym elementem determinującym użytkowanie bydła przeznaczanego do dalszego chowu. Jakość odsadzanych cieląt decyduje o wskaźnikach produkcyjnych, a tym samym o opłacalności hodowli. Pierwsze dni i tygodnie ich życia są okresem krytycznym, w którym to notuje się najwięcej zachorowań i upadków. Największy problem stanowią choroby przewodu pokarmowego objawiające się w postaci biegunek o złożonej etiologii, gdzie obok czynników zakaźnych (enterotoksyczne szczepy *Escherichia coli*, rota- i coronawirusy) największe znaczenie odgrywiają czynniki środowiskowe i żywieniowe. W okresie tym, u młodych, szybko rosnących zwierząt istotny problem stanowi przejściowa, łagodna anemia, związana z nieadekwatną podażą żelaza lub zaburzeniami jego wchłaniania. Anemia u cieląt, jak wskazują liczne badania, dotyczy głównie pierwszych dziewięciu tygodni życia. Najcięższy okres niedokrwistości cieląt, któremu towarzyszy istotne obniżenie poziomu żelaza, hemoglobiny i krwinek czerwonych przypada między drugim a piątym tygodniem ich życia. Dzieje się tak, gdy żywienie opiera się wyłącznie na mleku pełnym lub na preparatach mlekozastępczych o niskiej zawartości żelaza. Wówczas jego suplementacja staje się koniecznym zabiegiem profilaktycznym.

Zwykle niedobory mineralne w paszy pokrywane są dodatkami nieorganicznymi, takimi jak: siarczany, fosforany, chlorki, węglany lub tlenki. Postać taka mikroelementów, często jest trudno lub całkowicie niedostępna dla zwierząt. Nieprzyswojona zostaje wydalana z organizmu, a tym samym obciąża środowisko naturalne. Rozwiązaniem może być wprowadzenie dodatków mineralnych w połączeniach organicznych w postaci chelatów.

Związki te to specyficzne kompleksy jonów metali z aminokwasami, posiadające w swojej strukturze silne, podwójne wiązania kowalencyjne. Dzięki niskiej masie cząsteczkowej łatwiej przenikają barierę jelitową i są efektywniej wykorzystywane przez organizm zwierząt. Zdecydowanie lepsza bioprzyswajalność chelatów w porównaniu z nieorganicznymi formami mikroelementów pozwala również na zmniejszenie dawki mikroelementu, przy jednoczesnym zwiększeniu jego pobrania z paszy.

W związku z powyższym podjęta przez Panią mgr inż. Annę Budny-Walczak problematyka oceny wpływu chelatu żelaza na parametry metaboliczne, immunologiczne i produkcyjne cieląt wychodzi naprzeciw istniejącym potrzebom, jest ważna ze względów poznawczych i aplikacyjnych. Rangę pracy podnosi fakt współfinansowania badań ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Budny-Walczak obejmuje łącznie 105 stron maszynopisu. Na 13. stronach wyodrębniono spis piśmiennictwa obejmujący 167. pozycji, w większości oryginalnych i anglojęzycznych artykułów naukowych, z czego duża część (94) pochodzi z ostatnich dziesięciu lat. Praca zawiera 38 tabel, 2. ryciny, w tym rycinę obrazującą schemat doświadczenia oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Na początku rozprawy zamieszczono wykaz skrótów przytaczanych w pracy, co ułatwia dalsze korzystanie z tekstu.

Układ rozprawy jest konwencjonalny i nie budzi zastrzeżeń. Rozpoczynają ją dwa rozdziały „Wstęp” i „Przegląd piśmiennictwa”, które stanowią interesującą syntezę ważnych problemów związanych ze specyfiką odchowu cieląt, w tym aspekty fizjologiczne oraz żywieniowe okresu przedodsadzeniowego. Podjęte na tym tle badania dotyczące zastosowania chelatu żelaza w żywieniu cieląt oraz jego wpływ na parametry metaboliczne, immunologiczne i produkcyjne cieląt uważam za celowe i aktualne, legitymujące się ponadto praktycznym aspektem zastosowania w praktyce zootechnicznej.

W pracy cel badań został sformułowany w sposób zrozumiały, w pełni wykazujący związek z tytułem pracy, jednak w dalszej części rozdziału „Cel pracy i hipoteza badawcza” postawione hipotezy nie w pełni odzwierciedlają kierunek zakładanego procesu badawczego.

Istotą nauk empirycznych, do których bez wątpienia należą nauki rolnicze, jest właściwe formułowanie i sprawdzanie hipotez poprzez próby ich falsyfikacji tj. odrzucenia. Hipoteza zatem powinna być tak sformułowana, aby możliwa była jej weryfikacja w toku podjętych badań. W przypadku niektórych hipotez zadanie to wydaje się być trudne a nawet (hipoteza 5.) niemożliwe. Sugeruję przerezagowanie postawionych hipotez badawczych tak, aby w podsumowaniu uzyskanych wyników postawione wnioski mogły potwierdzić lub wykluczyć założenia.

Bardzo ważnym elementem badań naukowych jest staranny dobór materiału badawczego oraz zastosowanie odpowiednich metod badawczych do jego oceny i analizy. Zostało to przedstawione przez Autorkę w kolejnym rozdziale „Materiał i metody”. Badania obejmowały dwa niezależne doświadczenia, podczas których do diety cieląt wprowadzano żelazo w postaci chelatu. Suplement otrzymany na bazie kazeiny przy udziale enzymu wyizolowanego ze szczepu *Yarrowia lipolytica* włączano do preparatu mlekozastępczego (doświadczenie I.) i mleka pełnego (doświadczenie II.). Doświadczenie przeprowadzono na 27. (w I. doświadczeniu) i 20. (w II. doświadczeniu) cielętach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. W doświadczeniu I. cielętom z grup doświadczalnych do preparatu mlekozastępczego dodawano 8 g i 16 g chelatu żelaza, tj. 0,75% i 1,5% SM dziennej dawki preparatu mlekozastępczego. W doświadczeniu II. grupa doświadczalna wraz mlekiem pełnym dziennie otrzymywała 16 g chelatu.

Oba doświadczenia obejmowały okres od 7. do 42. dnia życia. W okresie tym cielęta poddane zostały obserwacjom klinicznym obejmujących stan ogólny, stopień odwodnienia, ocenę występowania biegunki.

Od wszystkich cieląt w 7., 14., 28. i 42 dniu życia pobierano krew z żyły szyjnej zewnętrznej, w której oznaczano parametry hematologiczne i biochemiczne. Badania hematologiczne krwi obejmowały hematokryt (HCT), stężenie hemoglobiny (HGB), liczbę czerwonych (RBC) i białych krwinek (WBC) oraz wskaźniki czerwonych, tj. średnia objętość krwinki czerwonej (MCV), średnia zawartość hemoglobiny w krwince (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwince (MCHC). W tym miejscu należy wskazać pewną nieścisłość. Autorka wśród tych oznaczeń wymienia również wskaźniki RDW i PCT, których nie ma w zestawianych wynikach.

Parametry biochemiczne krwi obejmowały oznaczenia poziomu glukozy, wolnych kwasów tłuszczowych (NEFA), kwasu β -hydroksymasłowego (β -HM) i mlekowego (LA),

cholesterolu, białka całkowitego, albumin oraz wybranych enzymów (aminotransferaza asparaginianowa (AST), aminotransferaza alaninowa (ALT), glutamylotranspeptydaza (GGT), kinaza kreatynowa (CK)).

Oznaczenia te zostały uzupełnione parametrami immunologicznymi, takimi jak immunoglobuliny IgG i IgM, insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1), czynnik martwicy (TNF- α). Mierzono również poziom insuliny nieuwzględniony w metodyce.

W pobranych próbach wykonano również oznaczenia statusu oksydacyjnego (całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAS), peroksydaza glutationowa (GPx), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)) oraz gospodarki żelazowej (żelaza, transferyny, całkowitej i utajonej zdolności wiązania żelaza (TIBC i UIBC), procent wysycenia transferyny żelazem).

W ocenie krwi uwzględniono także parametry gazometryczne krwi (pH, prężność dwutlenku węgla (pCO₂), aktualne stężenie wodorowęglanów (HCO₃⁻), całkowitą zawartość dwutlenku węgla (tCO₂), nadmiar lub niedobór zasad (BE)), poziom elektrolitów (Na⁺, K⁺, Cl⁻) oraz poziom wapnia i nieorganicznego fosforu. Wyliczono także lukę anionową (AnGap). Mierzono również poziom zasad buforowych (BB), a nie jak wskazuje Doktorantka nadmiar zasad w dodatkowym płynie komórkowym (BE_{ecf}).

W materiale badań zabrakło ilości pobieranych prób oraz sposobu pobierania materiału do badań. W przypadku analizy krwi uzupełnienia wymaga sposób postępowania z materiałem. Morfologia krwi dotyczy krwi pełnej, zaś pozostałe oznaczenia analizy najczęściej są wykonywane w odwirowanej surowicy krwi, co determinuje odpowiednie użycie probówek do poboru krwi, tj. probówki z EDTA dla oznaczeń w pełnej krwi lub probówki z aktywatorem krzepnięcia dla analiz wykonywanych w surowicy.

Oceniając wpływ suplementacji na parametry produkcyjne Pani mgr inż. Anna Budny-Walczak wyliczyła dobowe przyrosty masy ciała, współczynnik wykorzystania paszy (FCR) i tempo wzrostu (GR). Podczas okresu doświadczalnego wykonano także oznaczenia mikrobiologiczne kału oraz chemiczne paszy (stałej i płynnej) i kału cieląt. W tym miejscu należy zaznaczyć, że podczas badań nie określano strawności paszy, jak sugeruje jeden z podtytułów rozdziału „Wyniki badań” (str. 54), a jedynie jej skład chemiczny. Niestety oznaczenia chemiczne kału i paszy, wskazane w metodyce nie pokrywają się z oznaczeniami omawianymi w wynikach badań. W próbkach kału oznaczano jedynie białko ogólne, energię brutto oraz zawartość Ca i P. Zaś w składowych paszy (pressatarter, produkt mlekozastępczy,

mleko pełne i chelat) nie oznaczano zawartości Ca i Mg. Tutaj również uzupełnienia wymaga liczba pobranych prób. W metodyce dotyczącej analizy mleka zamieszczono oznaczenia ogólnej liczby bakterii, liczby komórek somatycznych oraz zawartości laktozy i suchej masy beztłuszczowej (SMB), których nie zamieszczono w wynikach.

W tym miejscu należy podkreślić szeroki zakres prowadzonych badań. Zapewne z tego też powodu Doktorantka nie wszystkie oznaczenia zamieściła w metodyce lub zamieszczone oznaczenia nie miały odzwierciedlenia w omawianych wynikach. Pewne usystematyzowanie oznaczeń (pasza, kał, zdrowie, wyniki produkcyjne) pozwoliłoby uniknąć tych potknięć i ułatwiło omawiać wyniki w dalszej części pracy.

Rozdział „Wyniki i dyskusja” stanowi zasadniczą część dysertacji. W rozdziale tym Doktorantka szczegółowo przedstawiła uzyskane rezultaty zamieszczając je w przejrzystych i prawidłowo opisanych tabelach. Szkoda, że Autorka przy tak pełnej weryfikacji statystycznej nie wszystkie różnice istotne wskazuje w tej części dysertacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań Pani mgr inż. Anna Budny-Walczak sformułowała 7 wniosków. Wnoszącym walor aplikacyjny jest zdanie końcowe, gdzie Autorka stwierdza, że dawka 8 g chelatu żelaza wprowadzonego do preparatu mlekozastępczego ma korzystny wpływ na parametry metaboliczne, zaś wyższa dawka może powodować nadmierną podaż żelaza oraz niekorzystnie wpływać na parametry produkcyjne. W tym miejscu należałoby również nakreślić zalecenia suplementacji w przypadku żywienia cieląt mlekiem pełnym.

W mojej ocenie nie wszystkie wnioski postawione przez Doktorantkę są w pełni uzasadnione i nie zawsze uwzględniają ocenę statystyczną. Podczas ich redagowania należy uwzględnić, że:

Ad. wniosek 3. Zarówno preparat mlekozastępczy (niezależnie od dawki) oraz mleko pełne wzbogacone w chelat żelaza powodował obniżenie stężenia kwasu β -hydroksymasłowego w surowicy krwi.

Ad. wniosek 5. Wzrost stężenia Fe w surowicy krwi cieląt grupy II, odnotowano jedynie w ostatnim pobraniu krwi pierwszego doświadczenia, zaś wzrost stężenia transferyny obserwowano niezależnie od dawki Fe. Różnice w koncentracji całkowitej i utajonej zdolności wiązania żelaza (TIBC i UIBC) nie były istotne statystycznie.

Ad. wniosek 6. Wyższa dawka chelatu w obu doświadczeniach powodowała podwyższenie poziomu czynnika martwicy nowotworu-*alfa* (TNF α), lecz różnice te nie były potwierdzone statystycznie. O obciążeniu wątroby świadczyłyby podwyższone wskaźniki profilu wątrobowego, które w doświadczeniu mieściły się w wartościach referencyjnych i nie odbiegały od wyników uzyskanych w grupach kontrolnych. Jedynie poziom AST wykazywał nieznaczne odchylenia w pierwszym doświadczeniu, ale tutaj jej poziom przemawiał na korzyść suplementacji.

Ad. wniosek 7. Spośród parametrów stresu oksydacyjnego jedynie wskaźnik TAS ulegał zmianie. Różnice te były istotne statystycznie.

Uwagi o charakterze ogólnym i korektorskim

Praca została napisana poprawnym językiem, jest czytelna i logicznie skonstruowana, a zawarta w niej ilość błędów stylistycznych i interpunkcyjnych nie obniża jej wartości.

Podczas czytania pracy nasuwa się jednak kilka uwag natury redakcyjnej, które Doktorantka może wykorzystać podczas przygotowywania pracy do druku. Są one następujące:

- W pracy (str. 14) zwraca uwagę zapis liczb dziesiętnych. Tylko w tekstach anglojęzycznych w funkcji separatora dziesiętnego występuje kropka. W Polsce przyjęło się w funkcji separatora dziesiętnego używać przecinka, co też wyraźnie zostało nakreślone w terminologii fachowej, używanej w matematyce i innych naukach ścisłych.
- Zasadne jest podawanie w tabelach liczby prób poddanych analizie statystycznej.
- W pracy nie znalazłam odwołań do kilku pozycji piśmiennictwa, które zamieszczono w spisie piśmiennictwa.
 1. Choi JW, Kim SK, 2004. Association of serum insulin-like growth factor-I and erythropoiesis in relation to body iron status. *Ann Clin Lab Sci* 34: 324-328.
 2. Creech BL, Spears JW, Flowers WL, Hill GM, Lloyd KE, Armstrong TA, Engle TE, 2004. Effect of dietary trace mineral concentration and source (inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs from weaning through finishing. *J Anim Sci* 82(7): 2140-2147.
 3. Cui K, Tu Y, Wang YC, Zhang NF, Ma T, Diao QY, 2016. Effects of a limited period of iron supplementation on the growth performance and meat colour of dairy bull calves for veal production. *Anim Prod Sci* 57: 778-784.

4. Heinrichs AJ, Wells SJ, Losinger WC, 1995. A study of the use of milk replacers for dairy calves in the United States. *J Dairy Sci* 78: 2831-2837.
5. Makarski B, Zadura A, Kwiecień M, 2006. Diets on the results of slaughter analysis, chemical composition and the fattyacids profile in tissues. *Acta Sci Pol Zootechnica* 5(2): 57–66.
6. Novais AK, da Silva CA, de Kássia R, dos Santos S, Dias CP, Callegari MA, de Oliveira ER, 2016. The effect of supplementing sow and piglet diets with different forms of iron. *R Bras Zootec* 45(10): 615-621.
7. Papadopoulos GA, Maes DGD, Janssens GPJ, 2009. Mineral accretion in nursing piglets in relation to sow performance and mineral source. *Veter Med* 54(2): 41–46.

Podsumowując ocenę pracy Pani mgr inż. Anny Budny-Walczak stwierdzam, że Autorka przedstawiła ważny z punktu widzenia nauki oraz praktyki problem. Oceniana praca mimo kilku krytycznych, ale i dyskusyjnych uwag wnosi wiele ciekawych elementów zarówno poznawczych, jak i aplikacyjnych do zootechniki. Doktorantka w pełni zrealizowała postawiony cel badawczy, popierając wyniki obliczeniami statystycznymi. Zebrane piśmiennictwo związane z tematyką pracy zostało poprawnie dobrane i wykorzystane zarówno we wstępie, jak i przy interpretacji uzyskanych wyników badań własnych. Ponadto stwierdzam, że Doktorantka wykazała się dużym zasobem wiedzy z zakresu produkcji zwierzęcej i zdrowia cieląt. Na podkreślenie zasługują badania wykonane z dużym nakładem pracy i osobistego zaangażowania.

Stwierdzam, że oceniana praca wnosi nowe elementy poznawcze oraz spełnia warunki stawiane pracom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14. marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z 2003 r. z późn. zm.), dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Budny-Walczak do publicznej obrony.



Lublin 27.12.2018 r.

Anna Chmielowiec-Korzeniowska