

Lublin 13.05.2017.

**prof. dr hab. Anna Czech**  
Katedra Biochemii i Toksykologii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

## RECENZJA

pracy doktorskiej pt. **"Efektywność stosowania polifenoli i witaminy E w żywieniu kurcząt brojlerów utrzymywanych w warunkach stresu"**, wykonanej przez Panią mgr inż. **Magdalenę Annę Mazur** w Katedrze Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

W trakcie przemysłowego, wielkostadnego chowu drobiu ptaki narażone są na szereg czynników stresowych (tj. temperatura, infekcje, czy złej jakości pasza). Nazbyt nasilony i długotrwały stres powoduje zaburzenia dobowego rytmu wydzielania hormonów, zmiany fizjologiczne i morfologiczne, objawiające się m.in. zmianami w strukturze tkanki mięśniowej czego konsekwencją będzie powstawanie wad mięsa. Ponadto w konsekwencji długotrwanie działającego czynnika stresowego następuje osłabienie odporności, prowadzące do obniżenia efektów produkcyjnych a niekiedy nawet do śmierci. Dlatego też w produkcji drobiarskiej skuteczne minimalizowanie wszystkich czynników wpływających stresogennie na ptaki jest kluczowym elementem udanej produkcji. Jedną z metod minimalizowania skutków stresu jest wprowadzanie do pasz dodatków, które zahamowałyby efekty działania stresu poprzez stymulację reakcji odpornościowych. Takich cech można upatrywać w działaniu antyoksydantów. Dodatki te stosowane były i w dalszym ciągu są głównie w formie syntetycznej. Jednak ciągle poszukuje się alternatywnych do syntetycznych, naturalnych dodatków paszowych o właściwościach antyoksydacyjnych. Ten nurt badawczy ma istotne znaczenie zwłaszcza po wprowadzeniu zakazu stosowania w Unii Europejskiej antybiotyków paszowych. Zagadnieniem tym zajęła się właśnie w swoich badaniach

Pani Magdalena Mazur.

Głównym założeniem Jej rozprawy doktorskiej było przeanalizowanie wpływu polifenoli w skład, których wchodziły związki otrzymane z cebuli i pestek winogron oraz zwiększonej dawki syntetycznej formy witaminy E w mieszankach, na potencjał antyoksydacyjny oraz jakość mięsa brojlerów. Temat ten jest bardzo interesujący i nowatorski oraz bardzo dobrze wpisuje się w ważną i aktualną problematykę poszukiwania antyoksydacyjnych dodatków paszowych pochodzenia naturalnego.

### **Ocena formalna**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska liczy 112 ponumerowanych stron tekstu. Układ pracy jest konwencjonalny i nie budzi zastrzeżeń. Praca podzielona jest na ogólnie przyjęte rozdziały, łącznie z polskim i angielskim streszczeniem. W pracy zawarto aż 209 pozycji literaturowych, z których 178 to pozycje anglojęzyczne. W pracy umieszczono 15 tabel. Oceniona praca zawiera podstawowe elementy rozprawy doktorskiej, ma charakter naukowo-badawczy, napisana jest poprawnym naukowym językiem i formalnie odpowiada warunkom określonym dla rozpraw doktorskich w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.: Dz.U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365 oraz Dz.U. z 2011 r. nr 84 poz. 455).

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

W rozdziale „Wstęp” Doktorantka bardzo szeroko wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy, podkreślając między innymi, rosnące zainteresowanie nowymi, antyoksydacyjnymi dodatkami pochodzenia naturalnego. Wskazuje również na celowość badań nad efektywnością stosowania ich w żywieniu drobiu. W mojej ocenie rozdział ten jest dobrze opracowany jednak powinien być bardziej lapidarny.

Kolejny rozdział „Przegląd piśmiennictwa” liczący 26 stron tekstu, jest on merytorycznym uzasadnieniem podjętych badań, opartym głównie na aktualnej literaturze anglojęzycznej, co zasługuje na podkreślenie. Został on opracowany dość starannie ze wskazaniem sugestii, co do dalszych ewentualnie możliwych do podjęcia zadań badawczych. Należy zaznaczyć, że Doktorantka dość syntetycznie przedstawiła





zagadnienia związane z tematem rozprawy zajęła się wyjaśnieniem mechanizmu stresu oksydacyjnego, czynnikami stresogennymi, na które jest narażony drób podczas chowu, a także czynnikami, które minimalizują skutki działania czynników stresogennych np. wprowadzanie do mieszanek antyoksydantów. Doktorantka zajęła się również omówieniem mechanizmu reakcji antyoksydacyjnych, których główną rolę upatruje się w utrzymaniu homeostazy organizmu, co z kolei wpływa na uzyskanie lepszych efektów produkcyjnych i lepszej jakości mięsa.

Przy redagowaniu tej części pracy Doktorantka nie ustrzegła się jednak kilku nieścisłości, na które z obowiązku recenzenta muszę wskazać.

- na stronie 20 Autorka wykorzystała skrót IARC OTA A, który nie został wytłumaczony,

- tekst pracy powinien być pisany w formie dokonanej czasu przeszłego, co niekiedy nie było przestrzegane przez Doktorantkę,

- na stronie 29 – Doktorantka przedstawiła w niewłaściwy sposób symbole pierwiastków w formie jonów – jest  $\text{Cu}_2^+$  powinno być  $\text{Cu}^{2+}$

W kolejnym rozdziale „Cel pracy” Doktorantka, w oparciu o wnikliwą analizę danych literaturowych, sformułowała cel badań oraz hipotezę badawczą. Celem badań była weryfikacja hipotezy, iż zastosowanie polifenoli i zwiększonej ilości witaminy E w mieszankach wpływa na potencjał antyoksydacyjny oraz jakość mięsa kurcząt brojlerów. Doktorantka założyła, że „**efekty stresu oksydacyjnego istotnie ograniczają wyniki produkcyjne i negatywnie wpływają na status zdrowotny drobiu**” – w tym miejscu nasuwają się pytania:

- Co Doktorantka miała na myśli pisząc o poprawie statusu zdrowotnego drobiu?

- Jakie wskaźniki świadczące o tym były przez Doktorantkę analizowane? W mojej opinii aby odnieść się do stanu zdrowia ptaków nie wystarczy tylko śledzić częstotliwości biegunek należałoby również wykonać podstawowe analizy z zakresu badań hematologiczno-biochemicznych krwi czy wskaźników immunologicznych.

Ponadto wydaje mi się, że tak sformułowane założenie mija się z celem pracy, Doktorantka powinna skupić się raczej na czynnikach doświadczalnych, jakimi było wykorzystanie polifenoli czy syntetycznej formy witaminy E (dl alfa tokoferolu) w zwiększonej ilości i ich wpływie na niwelowanie skutków działania czynników stresogennych niż na wpływie samego stresu.





Kolejne stwierdzenie brzmiało „polifenole jako substancje zróżnicowane chemicznie i funkcjonalnie mogą być efektywnymi przeciwutleniaczami w żywieniu zwierząt gospodarskich” w tym miejscu mam kilka uwag:

- uważam, że Doktorantka użyła zbyt dużego uogólnienia pisząc o zwierzętach gospodarskich, należałoby konkretnie odnieść się do kurcząt brojlerów. Ponadto użyto sformułowania „polifenole jako substancje zróżnicowane chemicznie i funkcjonalnie” – Doktorantka nie analizowała budowy chemicznej polifenoli, dlatego uważam, że bardziej właściwe byłoby podkreślenie porównania efektywności działania naturalnych i syntetycznych antyoksydantów stosowanych osobno lub łącznie, co można by było ująć „polifenole jako naturalne metabolity cechujące się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi mogą skuteczniej niwelować/hamować skutki działania czynników stresogennych, w tym efektywniej wpływać na stymulację procesów antyoksydacyjnych niż przeciwutleniacze syntetyczne wykorzystywane w żywieniu drobiu.

Rozdział 4 „Materiał i metody” obejmujący 9 stron maszynopisu, zawiera opis doświadczeń żywieniowych, które stanowiły podstawę badań Doktorantki. Został on dość dobrze opracowany z podaniem metod analiz wskaźników statusu antyoksydacyjnego krwi i mięśni oraz analiz chemicznych pasz i fizykochemicznych mięśni.

Doktorantka przeprowadziła trzy doświadczenia żywieniowe na kurczętach brojlerach (łącznie na 360 jednodniowych kurczętach Ross 308). W każdej z sześciu grup żywieniowych we wszystkich trzech doświadczeniach było po 20 ptaków, które utrzymywano po dwie sztuki w klatce (10 powtórzeń w grupie), co uważam za dość niewielki materiał zwierzęcy służący do oceny wskaźników produkcyjnych, nie jest to jednak główny zakres badań Doktorantki.

Doświadczenia były zróżnicowane pod względem zastosowania różnych czynników stresogennych. W pierwszym doświadczeniu 21 dniowe kurczęta poddane zostały stresowi termicznemu polegającemu na podwyższeniu temperatury (do 34°C) przez 10h dziennie, natomiast kurczęta grupy kontrolnej na ten czas były przenoszone do innego pomieszczenia. W tym miejscu nasuwa się pewna wątpliwość **Czy dla ptaków z grupy kontrolnej (transport, warunki transportu) nie był to stres, który mógłby wpłynąć na uzyskane wyniki? – proszę o ustosunkowanie się do tego pytania. Ponadto proszę wyjaśnić, dlaczego czynnik ten był wprowadzony właśnie od 21 dnia?**





W drugim doświadczeniu kurczęta grup doświadczalnych poddane były stresowi związanemu z otrzymywaniem mieszanki skażonej ochratoksyną A w ilości 409 µg/kg. Doktorantka nie wyjaśniła jednak: **Czym kierowano się w doborze takiej dawki mikotoksyny?. Czy nie była ona zbyt wysoka?**

Trzecie doświadczenie dotyczyło zastosowania w mieszankach dla brojlerów poddanego utlenieniu oleju rzepakowego.

Zarówno przy drugim jak i trzecim doświadczeniu brakuje informacji dotyczącej wykonywania mieszanek paszowych tzn. **Czy były one sporządzane bezpośrednio przed skarmianiem, czy też były wykonywane na okres tuczu i przechowywane?.** Jest to bardzo istotne ponieważ czas i sposób przechowywania mają istotny wpływ na zawartość mikotoksyn jak i proces utlenianie tłuszczów.

**Nie podano również: Czy kurczęta otrzymywały te mieszanki od samego początku doświadczenia?.**

W pracy nie znalazły się również informacje dotyczące terminu wykonania doświadczeń tj. **Czy doświadczenia te odbywały się w jednym terminie i porze roku, czy też w różnych?.** Jest to ważne szczególnie, że panujące warunki temperaturowe mają znaczący wpływ nie tylko na oznaczane w trakcie doświadczenia parametry, ale również na czynniki doświadczalne (wzrost mikotoksyn czy utlenianie tłuszczów).

Ptaki przydzielono do 6 grup żywieniowych, stosując logiczny układ doświadczalny. Badane były efekty dodatku syntetycznej formy witaminy E lub/i polifenoli oraz efekty dwukrotnie wyższej ilości syntetycznej formy witaminy E. Ptaki z grup kontrolnych I i II nie otrzymywały wyżej wymienionych dodatków z tym, że grupa kontrolna pozytywna poddana była czynnikom stresowym. Taki układ doświadczenia uważam za dość interesujący i logiczny, warty weryfikacji badawczej.

W trakcie trwania doświadczenia rejestrowano wpływ wymienionych dodatków na wskaźniki produkcyjne oraz status antyoksydacyjny krwi i mięśni ptaków, wykonano również analizę rzeźną oraz ocenę fizyko-chemiczną mięśni i poszczególnych części przewodu pokarmowego.

Doktorantka w prawidłowy i wyczerpujący sposób opisała badany materiał zwierzęcy, schemat i warunki wykonania doświadczeń, sposób rejestracji danych doświadczalnych oraz zastosowane metody analityczne i statystyczne. Stwierdzam, że metodyka badań, w tym układ doświadczeń, a także metody analityczne i statystyczne,





nie budzą zastrzeżeń.

W trakcie czytania tej części pracy nasuwa się kilka szczegółowych uwag:

- ✓ Doktorantka nie wyjaśniła, na jakiej podstawie wybrała dawki stosowanych dodatków?.
- ✓ Zastanawiające jest również, że w zaprezentowanym premiksie stosowanym w mieszankach dla wszystkich zwierząt doświadczalnych znalazł się przeciwutleniacz w ilości 1000 mg – Czy to nie była przypadkiem pomyłka? Jeśli nie to uważam, że czynnik ten mógł wpłynąć na uzyskane efekty - nie podano również, co to za przeciwutleniacz, co ma kolosalne znaczenie szczególnie, że czynnikami doświadczalnymi są substancje o działaniu przeciwutleniającym.
- ✓ W podanym w tabeli 2 składzie chemicznym mieszanek paszowych brakuje informacji dotyczącej zawartości lizyny, metioniny, cysteina i tryptofanu oraz składników mineralnych takich jak sód, wapń i fosfor fitynowy, które są niezbędne w tego typu badaniach. Dane te zostaną zapewne uzupełnione przy przygotowywaniu pracy do druku.
- ✓ Doktorantka nie podała również informacji dotyczącej ilości prób składających się na oznaczenie zawartości składników pokarmowych w mieszankach paszowych, a także w ilu powtórzeniach były wykonane analizy – takich informacji nie ma również przy oznaczaniu zawartości ochratoksyny A w doświadczeniu II i oleju rzepakowego w doświadczeniu III.
- ✓ Autorka napisała, że oznaczała wartość liczby nadtlenkowej i kwasowej w oleju rzepakowym wykorzystywanym w mieszankach dla kurcząt w doświadczeniu III, danych tych nie dostrzeżono w prezentowanej pracy.
- ✓ Przy przygotowaniu pracy do publikacji należałoby również doprecyzować informacje dotyczące materiału biologicznego jakim była krew – Doktorantka podała, że pobierano ją na antykoagulant oraz skrzep (str. 42) a następnie odwirowano i surowicę odpipetowano – a co z osoczem? należy to dokładniej wyjaśnić. Ponadto w dalszej części metodyki Doktorantka pisze, że w heparynizowanej krwi oznaczono SOD (str. 45) – tego antykoagulantu wcześniej nie uwzględniono.
- ✓ Należy również uszczegółowić informacje dotyczące kontroli masy ciała i spożycia paszy przez kurczęta – Czy było to kontrolowane indywidualnie czy brano pod uwagę klatkę jako całość?.





Podane uwagi mają charakter dyskusyjny i należy żywić nadzieję, że będą pomocne przy przygotowaniu pracy do druku.

Uzyskane wyniki (rozdział 5 „Wyniki badań”) przedstawione zostały w bardzo staranny i czytelny sposób. Rozdział ten obejmuje 28 stron komputeropisu, w tym 11 tabel. Doktorantka omówiła uzyskane zależności z uwzględnieniem różnic statystycznie istotnych. W tym rozdziale wkrađło się jednak kilka błędów, które sędzę wynikały z mnogości wyników tj.

- ✓ Zabrakło odniesienia się do wyników uzyskanych podczas analiz mieszanek paszowych, czy też komponentów paszy, które były czynnikami doświadczałnymi mam tu na myśli pszenicę skażoną mikotoksyną czy olej rzepakowy.
- ✓ niepotrzebnie Doktorantka opisywała wyniki, pomiędzy którymi nie wykazano statystycznie istotnych różnic,
- ✓ Doktorantka powinna pod tabelą 4 wyjaśnić, co to oznacza grupa kontrolna negatywna i pozytywna, to znacznie ułatwiłoby czytelnikowi analizę uzyskanych wyników
- ✓ Przy przygotowaniu pracy do druku należy zmienić sformułowanie „dodatek oleju rzepakowego” na „udział oleju rzepakowego” ponieważ wchodzi on w skład mieszanki a nie jest dodatkiem paszowym,
- ✓ W pierwszym wierszu we wszystkich tabelach zamiast „Grupa” należy użyć „Grupa żywieniowa”
- ✓ Na stronie 53 Doktorantka pisząc, że największą śmiertelność wykazano w grupie otrzymującej 200 mg/kg polifenoli (grupa V) powinna powołać się raczej na grupę VI.
- ✓ Strona 55 – wystąpiła nieścisłość dotycząca informacji związanej z wpływem witaminy E na aktywność GSH-PX i sumy tokoferoli oraz ekwiwalentu witaminy E, który był najwyższy w grupach III i IV w porównaniu nie tylko do grupy II (jak podała Doktorantka) ale również do V i VI – tego rodzaju nieścisłości wkrađły się w pracy jeszcze w kilku miejscach (str. 56, 64, 66, 70, 73) są one zaznaczone w egzemplarzu Recenzenta. Dlatego uważam, że w trakcie przygotowywania pracy do druku należy opis uzyskanych wyników bardzo dokładnie przeanalizować i zweryfikować.
- ✓ Uważam również, że wykorzystanie aż tylu analiz statystycznych jest zbędne, należałoby się skupić na analizie jednoczynnikowej wariancji ANOVA, przy poziomie



istotności  $p \leq 0,05$  i  $0,01$ . Pokazywanie odchyłeń standardowych w znacznej mierze zamazuje nam obraz uzyskanych wyników.

W rozdziale 6 „Dyskusja” Doktorantka zrekapitulowała najistotniejsze rezultaty swoich badań i porównała je z badaniami innych Autorów. Doktorantka niestety w wielu miejscach powtórzyła uzyskane wyniki powołując się nawet na dane zawarte w tabelach, co nie jest wskazane w dyskusji. W tej części pracy brakuje jednak próby wyjaśnienia uzyskanych rezultatów, co znacznie podniosłoby wartość pracy, a jest wręcz konieczne, jeśli chcemy ją opublikować.

Zgromadzone wyniki badań, omówione na tle dokonań innych autorów pozwoliły mgr inż. Magdalenie Mazur na sformułowanie 5 wniosków wnoszących nowe informacje do aktualnego stanu wiedzy. Niektóre z nich są powtórzeniem wyników i wymagają doprecyzowania. Zabrakło mi jednak wniosku podsumowującego, który wskazałby, który z antyoksydacyjnych dodatków najefektywniej niwelował skutki stresu i czy polifenole, jako naturalne antyoksydanty mogłyby skutecznie zastąpić syntetyczną formę witaminy E.

Na szczególną uwagę zasługuje duży wysiłek, jaki Doktorantka włożyła w zgromadzenie ogromnej ilości literatury, bo aż 209 pozycji. Są one ściśle związane z prezentowanymi treściami i w większości są zawarte w tekście. W skład tych pozycji wchodzi 178 prac anglojęzycznych. Szkoda tylko, że Doktorantka nie opierała się również na badaniach wykonanych w ośrodkach polskich, które są ściśle związane z prezentowaną tematyką. Sądzę, że w przygotowaniu pracy do druku należałoby to uwzględnić. W wykazie piśmiennictwa znalazło się kilka pozycji, które nie były cytowane w tekście komputeropisu, są to m.in. Felver-Gant i wsp., 2012, El Iraqi i wsp., 2013, Halliwell 2006, Rutkowska 1981, Sahin i wsp., 2002, Tan i wsp., 2010, Tang i wsp., 2013, oraz Van Oeckel i wsp., 1999.

Inne drobne uwagi stylistyczne i interpunkcyjne oraz błędy w piśmiennictwie naniósł w tekście komputeropisu.






## Podsumowanie

Pomimo wielu uwag, które będą pomocne przy korzystaniu z pracy na potrzeby ewentualnych publikacji, a wynikają z obowiązku recenzenta uważam, że mgr inż. Magdalena Mazur przy realizacji tej pracy uwidoczniała swoje predyspozycje badawcze, wykorzystując przygotowanie dotyczące badań analitycznych. Rozprawa wnosi do nauki elementy poznawcze a wyniki mogą być wykorzystane w praktyce hodowlanej. Pragnę także ponownie podkreślić, że treść pracy napisana jest starannie, zwięźle i utrzymana w logicznej sekwencji. Styl sformułowań poprawny, a tekst komunikatywny. Zauważyć też należy staranne opracowanie tabel.

Reasumując wyrażam opinię, że przedłożona przez mgr inż. **MAGDALENĘ MAZUR** rozprawa, jest opracowaniem o charakterze naukowym, posiadającym duże znaczenie, zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne. Odpowiada ona warunkom określonym dla rozpraw doktorskich w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.: Dz.U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365 oraz Dz.U. z 2011 r. nr 84 poz. 455).

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Bioinżynierii Zwierząt w Olsztynie wnioski o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Mazur do dalszego etapu przewodu doktorskiego.

Kierownik  
Katedry Biochemii i Toksykologii  
  
Prof. dr hab. Anna Czech

