

Siedlce 15.05.2017 r

**Prof. dr hab. Teresa Banaszkiewicz**  
Katedra Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej  
Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

## **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Anny Mazur**

**pt. „Efektywność stosowania polifenoli i witaminy E w żywieniu kurcząt brojlerów utrzymywanych w warunkach stresu” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Zofii Antoszkiewicz i promotora pomocniczego dr inż. Mai Fijałkowskiej w Katedrze Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**

Wolne rodniki powstają naturalnie jako produkty uboczne w łańcuchu oddechowym żywych organizmów, wykorzystujących tlen. Mogą tworzyć się również w wyniku działania takich czynników środowiskowych jak promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe, podwyższona temperatura otoczenia, obecność metali (kadm, cynk, żelazo, miedź) i substancji toksycznych (pestycydy, mikotoksyny) w paszach, a także innych czynników wywołujących stres. Do wzrostu ilości wolnych rodników mogą przyczyniać się również pasze zawierające większe ilości tłuszczu, głównie gorszej jakości oraz ze zwiększonym udziałem kwasów nienasyconych. Jeżeli ilość powstających wolnych rodników tlenowych mieści się w normie fizjologicznej to nie wykazują one szkodliwego działania na organizmy. Ich toksyczny wpływ może być obserwowany po przekroczeniu norm fizjologicznych. Następuje wtedy zaburzenie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej ustroju i powstaje stres oksydacyjny, który prowadzi do uszkodzeń najważniejszych związków w organizmie. Konsekwencją uszkodzeń jest unieczynnienie białek transportowych, zaburzenie mechanizmów odpornościowych, w tym immunoglobulin, a powstający rodnik hydroksylowy może spowodować modyfikacje w budowie nukleotydów, chromosomów i prowadzić do zmian nowotworowych.

U zwierząt o szybkim metabolizmie i narażonych na działanie czynników stresogennych dochodzi do wzrostu ilości wolnych rodników, co przy dłuższym ich oddziaływaniu na organizm prowadzi do destabilizacji równowagi oksydacyjno-redukcyjnej i zmian w organizmie, a dalej do obniżenia wyników produkcyjnych oraz jakości uzyskiwanych produktów.

W intensywnej produkcji drobiarskiej kurczęta narażone są na szereg czynników negatywnych, które sprzyjają powstawaniu stresu oksydacyjnego i prowadzą do obniżenia wyników produkcyjnych oraz jakości mięsa. Do takich czynników stresogennych należy podwyższona temperatura otoczenia (stres cieplny), skażenie pasz toksynami grzybowymi, oraz obecność utlenionego tłuszczu w mieszankach.

Współczesne linie hodowlane kurcząt są bardziej wrażliwe na stres cieplny, który zwiększa wytwarzanie wolnych rodników. Skutkuje to uzyskiwaniem niższej masy ciała, obniżeniem wydajności rzeźnej oraz powstawaniem wad mięsa. Stres cieplny zwiększa również podatność lipidów obecnych w produktach zwierzęcych (mięsie) na utlenianie oraz uszkadza struktury w żywych organizmach. Mikotoksyny powodują wzmożoną produkcję wolnych rodników, które prowadzą do uszkodzeń oksydacyjnych w organizmie. Również zły jakości tłuszcz (utleniony) powoduje wzrost wolnych rodników, co prowadzi do stresu oksydacyjnego który uszkadza błony komórkowe, pogorsza wyniki odchowu i zwiększa śmiertelność ptaków. Niewłaściwie zbilansowana pasza, zawierająca nieodpowiednio przechowywane materiały paszowe (utlenione tłuszcze, pasze porażone przez grzyby i zawierające mikotoksyny) lub podwyższona temperatura otoczenia mogą stanowić czynniki stresogenne dla ptaków.

Organizmy zwierząt dysponują barierami ochronnymi broniącymi je przed nadmiarem wolnych rodników. Wykorzystują do tego systemy enzymatyczne oraz przeciwutleniacze niskocząsteczkowe, które neutralizują wolne rodniki tworząc produkty mniej toksyczne lub nieszkodliwe dla organizmu.

Do żywieniowych metod ograniczających negatywne skutki działania czynników stresogennych jest uzupełnianie mieszanek paszowych w antyoksydanty, które hamują powstawanie wolnych rodników i zapobiegają peroksydacji lipidów. Do najsilniejszych antyoksydantów niskocząsteczkowych rozpuszczalnych w tłuszczach zaliczana jest witamina E, a w wodzie witamina C.

W ostatnim czasie poszukuje się naturalnych dodatków paszowych które będą ograniczały powstawanie stresu oksydacyjnego i korzystnie wpływały na produktywność i zdrowotność drobiu. Spośród wielu dodatków poprawiających efektywność żywienia dużym

zainteresowaniem cieszą się preparaty roślinne - fitobiotyki, które dzięki obecności licznych związków biologicznie czynnych wykazują wielokierunkowe oddziaływanie na organizm ptaków (antybakteryjne, antywirusowe, immunostymulujące, antyoksydacyjne). Preparaty uzyskane z roślin zawierające skoncentrowaną ilość związków biologicznie czynnych są uważane za cenny dodatek paszowy dla drobiu. Do związków posiadających właściwości przeciwutleniające, porównywalne z witaminą E i C, należą polifenole, które charakteryzują się wielokierunkowym oddziaływaniem na organizm ptaków. Związki te posiadają właściwości przeciwzapalne, antymiażdżycowe, antymutagenne, przeciwalergiczne i immunomodulacyjne, a także mogą ograniczać negatywne skutki stresu oksydacyjnego. Badania z wykorzystaniem polifenoli dawały jednak zróżnicowane wyniki w odchowcie drobiu, od ich poprawienia do nawet pogorszenia.

Dodatek polifenoli jak wskazują badania może również wpływać na jakość produktów pochodzenia zwierzęcego, ograniczając w nich peroksydację lipidów i zwiększając zawartość tokoferolu.

**W tym kontekście, podjęcie badań przez Panią mgr inż. Magdalenę Annę Mazur** dotyczących „efektywności stosowania polifenoli i witaminy E w żywieniu kurcząt brojlerów utrzymywanych w warunkach stresu” uważam za zasadne i aktualne, a wybór tematu za trafny i celowy. Wybrane dodatki (witamina E i preparat zawierający polifenole) do oceny efektywności ich zastosowania w warunkach stresowych należy uznać za uzasadnione, gdyż wykazują duży potencjał korzystnego oddziaływania zarówno na kurczęta jak i produkt finalny. 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 15 tabelami, wykazem piśmiennictwa streszczeniem w języku polskim i abstraktem w języku angielskim oraz spisem tabel liczy 112 stron wydruku komputerowego, z których 2 strony to Spis treści, 3 strony to Wstęp, 27 stron to Przegląd piśmiennictwa, 1 strona to Cel pracy, 9 stron to Materiał i metody badań, 29 stron to Wyniki badań, 9 stron to Dyskusja, 1 strona to Wnioski, 20 stron to Wykaz piśmiennictwa. Streszczenie w j. polskim, angielskim oraz spis tabel podane na końcu pracy obejmują razem 6 stron (po 2 strony każdy rozdział). Na początku pracy Autorka zamieściła dodatkowo wykaz skrótów, którymi posługiwała się w pracy. Poszczególne rozdziały pracy Doktorantka podzieliła dodatkowo na podrozdziały pierwszego i drugiego rzędu, co czyni tekst bardziej przejrzystym i ułatwia jego analizę. Taki podział treści pracy, a także objętość poszczególnych rozdziałów świadczy o prawidłowym rozłożeniu akcentów.

Po przedstawieniu tytułu pracy w języku polskim autorka przedstawiła **Spis treści**, co ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z omawianymi w pracy zagadnieniami. W tym miejscu chcę zwrócić uwagę na kolejność oznaczonych podrozdziałów występujących w części dotyczącej Przeglądu Piśmiennictwa (dotyczy to zarówno Spisu treści jak i tekstu w samym Przeglądzie Piśmiennictwa).

Rozdział **Wstęp** dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie. Uważam jednak, że użyte w tym rozdziale słowo karcerogenne powinno, zostać zastąpione przez kancerogenne.

**Przeglądu piśmiennictwa** Autorka dokonała w oparciu o dane bibliograficzne zarówno krajowe jak i zagraniczne dobrze dobrane tematycznie. W tym rozdziale doktorantka omówiła następujące zagadnienia: Reaktywne formy tlenu i stres oksydacyjny, Czynniki stresogenne (wysokie temperatury, mikotoksyny w paszy oraz tłuszcz złej jakości), Obronę antyoksydacyjną organizmu, na którą składają się enzymy antyoksydacyjne i antyoksydanty nieenzymatyczne, scharakteryzowała związki polifenolowe opisując ich właściwości przeciwutleniające i immunomodulacyjne, a także ich wpływ na wyniki produkcyjne i jakość mięsa. 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. Drobną uwagą do tego rozdziału dotyczy stosowanego nazewnictwa. Zgodnie z obecnie obowiązującym nazewnictwem należy używać słowa triglicerydy zamiast wcześniej stosowanego trójglicerydy.

W rozdziale **Material i metody** Autorka czytelnie, jasno i zwięźle przedstawia przeprowadzone badania własne i ich poszczególne etapy. Doktorantka przeprowadziła 3 doświadczenia wzrostowe łącznie na 360 kurczętach brojlerach (kogutkach) mieszańcach Ross 308, kolejno na 120 ptakach w każdym doświadczeniu. Podaje miejsce przeprowadzonych badań, zakupu kurcząt i produkcji mieszanek oraz miejsca i sposobu przygotowania surowców paszowych jako czynników stresogennych oraz wykonanych analiz. W każdym doświadczeniu liczba podgrup w ramach grupy, kurcząt w podgrupie i grupie była taka sama i wynosiła odpowiednio: 10 podgrup, 2 kogutki i 20 sztuk. Kurczęta we wszystkich doświadczeniach były ubijane w tym samym wieku. W tym rozdziale podano schematy kolejnych doświadczeń wzrostowych (I, II, III), czynności wykonane podczas analizy poubojowej i określania jakości mięsa. Badania wzrostowe na kurczętach przeprowadzono na właściwie dobranym materiale, odpowiednim do porównań, jednak właściwsze wydaje się zastosowanie obydwóch płci w jednakowej liczbie co przyczyniło by się do lepszego odniesienia do praktyki. Uważam, że w sposób bardziej wyczerpujący

należałoby przedstawić przygotowanie mieszanek doświadczalnych dla kurcząt, sposób bilansowania składników pokarmowych w mieszankach (głównie lizyna, metionina, składniki mineralne). Każde doświadczenie wzrostowe Doktorantka kończyła przeprowadzeniem analizy rzeźnej kurcząt, podczas której wypreparowała mięśnie piersiowe, tłuszcz sadełkowy, serce, wątrobę oraz przewód pokarmowy w celu określenia ich udziału w tuszce lub masie ciała kurcząt. Z wątroby i mięśnia piersiowego pobierała próbki do oznaczeń chemicznych. W mięśniu określano podstawowy skład chemiczny, barwę, wartość  $pH_{15}$  oraz  $pH_{24}$ , wyciek naturalny i wodochłonność, a w wątrobie i mięśniu witaminę C, retinol i sumę tokoferoli oraz wskaźnik TBARS. We wszystkich doświadczeniach doktorantka ubijała 60 kogutków, co jest ilością wystarczającą do uchwycenia różnic między grupami. W 21 i 35 dniu życia kurcząt Doktorantka pobierała krew z żyły skrzydłowej od 60 ptaków w każdym doświadczeniu w celu oznaczenia zawartości witaminy A i E, aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz ogólnego statusu antyoksydacyjnego kurcząt. Uważam, że układ doświadczeń, stosowane metody badawcze i analizowane parametry doświadczalne zostały dobrze dobrane do postawionego celu badań.

W tym rozdziale dobrze byłoby jednak podać czy końcowa masa ciała kurcząt w doświadczeniach wzrostowych dotyczyła kurcząt głodzonych, czy z wypełnionym treścią pokarmową przewodem pokarmowym? Dobrze byłoby również zapis zawartości energii metabolicznej w mieszankach (tabela 2) ujednotwić w stosunku do używanych w dalszej części pracy, czyli zamiast MJ/kg podać  $MJ \cdot kg^{-1}$ . Sugeruję sprawdzenie składu premiksów dotyczących zawartości fosforu ogólnego i przyswajalnego. Jaki przeciwutleniacz był zastosowany w premiksie i czy mógł mieć synergistyczne działanie w stosunku do substancji dodanych jako czynniki doświadczalne? W nagłówku tabeli 2 należałoby zaznaczyć, że dotyczyło to mieszanek kontrolnych (negatywnych) na okres starter i okres grower. Również w innych miejscach pracy należy stosować określenie mieszanki na okres starter lub grower. Proszę przybliżyć jak regulowano temperaturę w pomieszczeniu (dośw. I) od 21 dnia życia kurcząt (10 godzin dziennie temperatura podwyższona, następnie obniżona). W jakim celu określano zawartość energii brutto w paszach, bo nigdzie tych wartości nie podawano i nie wykorzystano (str.43). W jaki sposób były inkubowane próbki mięsa do oznaczenia wycieku naturalnego?.

Rozdział **Wyniki badań** stanowi najobszerniejszą część pracy. Został podzielony przez Autorkę na 4 główne podrozdziały ze względu na wielowątkowość problematyki. Tak przedstawione wyniki czynią pracę czytelną. W rozdziale tym Doktorantka kolejno omówiła wyniki uzyskane w poszczególnych doświadczeniach i

zamieszczonych w 15 tabelach. Autorka omawia rezultaty swojej pracy w sposób systematyczny zaczynając od wyników produkcyjnych w grupach bez czynnika stresogennego (grupa) negatywna, następnie w grupach zawierających czynnik stresogeny, odpowiednio –podwyższona temperatura otoczenia (grupa pozytywna) Doświadczenie I, skażone ziarno pszenicy ochratoksyną ( II dośw.) lub utleniony olej rzepakowy ( dośw.III), a następnie zastosowanych przeciwutleniaczy w postaci wit E. (dwóch poziomów 100 i 200 mg/kg paszy), łącznego zastosowania wit E i preparatu polifenoli Previox Nucleus w ilości po 100mg oraz tylko 200mg preparatu polifenoli. Następnie przedstawiła wyniki dotyczące statusu antyoksydacyjnego kurcząt wynikającego z zastosowania wymienionych czynników stresogennych oraz dodania przeciwutleniaczy, oceny poubojowej i określenia cech morfometrycznych wybranych odcinków przewodu pokarmowego oraz pH treści w tych odcinkach, a zakończyła oceną jakości mięśni piersiowych (pH<sub>15min.</sub> i pH<sub>24 godz.</sub>, barwa, wyciek naturalny, wodochłonność i podstawowy skład chemiczny) w zależności od tych samych czynników stresogennych i dodanych przeciwutleniaczy. Pytanie do I doświadczenia dotyczy temperatury otoczenia: jaka właściwie była temperatura otoczenia 34°C (metodyka str.39) czy 38°C ( wyniki badań str. 48). Należałoby ujednoczyć oznaczenia grup. W rozdziale Materiał i metody badań Doktorantka podaje oznaczenia grup posługując się cyframi arabskimi (tabela 1), później używa cyfr rzymskich, również skrót ekwiwalentu wit. E jest pisany różnie: metodyka (str.45) i tabele 7,8 9.

Tabele zawarte w pracy zostały dobrze zaprojektowane i zawierają dane zgodnie z ich tytułami. Są czytelne, jednak moim zdaniem przyrosty, spożycie paszy oraz jej wykorzystanie dotyczą określonych okresów odchowu, a nie konkretnego dnia odchowu (tabela 4,5 i 6). Proponowałabym podać raczej jakich okresów dotyczą uzyskane wartości, szczególnie, że podczas omawiania wyników (np. strona 48) pisze Pani, że kurczęta w 28 dniu życia pobrały więcej paszy. Podobnie wykorzystanie paszy w 28 dniu doświadczenia. Również precyzyjniej proponowałabym określać różnice między grupami np. ptaki poddawane czynnikowi stresogennemu cechowała mniejsza o około 12 i 17% masa ciała. Analizując wyniki przedstawione w tabeli 6 przy braku różnic istotnych autorka podaje, że dodatek antyoksydantów do mieszanek zawierających zjełczały olej rzepakowy wpłynął korzystnie na produktywność, raczej uzyskane wartości wskazują na tendencję do poprawienia wyników.

W rozdziale **Dyskusja** autorka umiejętnie skonfrontowała rezultaty badań własnych z danymi z piśmiennictwa. W niektórych przypadkach gdzie było to trudne, bo nie było innych prac do porównania wyników własnych, proponowałabym, aby Doktorantka podjęła próbę własnej ich interpretacji.

**Rozdział Wnioski** proponowałabym zatytułować **Stwierdzenia i Wnioski** gdyż są to poprawnie i logicznie sformułowane stwierdzenia (podsumowanie) w oparciu o uzyskane wyniki badań. Wskazują one, że postawione cele badawcze Doktorantka w pełni zrealizowała. Jednak we wniosku pierwszym proponowałabym uściślić stwierdzenie dotyczące poprawy masy ciała kurcząt, przyrostów oraz pobrania paszy do konkretnego okresu, ponieważ tylko w 28 dniu życia kurcząt poddanych stresowi termicznemu masa ciała kurcząt po dodaniu substancji przeciwutleniających uległa istotnemu poprawieniu, a we wniosku 3 ogólne stwierdzenie dotyczące poprawienia wskaźników oceny poubojowej ograniczyć do udziału mięśnia piersiowego w dośw. I. Proponuję również sformułować jakiś ogólny wniosek dotyczący wpływu zastosowania czynników stresogennych na oceniane cechy, bo przecież w jakimś celu Pani wprowadziła grupę negatywną.

**W rozdziale Spis piśmiennictwa** Autorka zgromadziła liczną literaturę zagraniczną i krajową (wg moich obliczeń 210 pozycji), z tego 180 pozycji obcojęzycznych, a 30 polskojęzycznych. Przedstawiona na 20 stronach literatura jest aktualna i właściwie dobrana do tematyki badawczej. Do tego rozdziału mam uwagę dotyczącą zamieszczenia niektórych pozycji literaturowych:

- spis piśmiennictwa nie powinien zawierać pozycji nie cytowanych w pracy, a jest ich kilka - Awad i wsp.2013, El Iraqi K.G. i wsp.2013, Felver-Grant i wsp.2012, Hu M.L.- 2011, Prieto-i Campo 2010, Rutkowska 1981, Sahim i wsp.2002, Ścibior i Czczot 2006, Tan i wsp.2010, Tang i wsp.2013, Van Oeckel 1999 i analogicznie w pracy nie powinny być cytowane opracowania, których nie ma w spisie piśmiennictwa. Jeżeli doktorantka przyjęła zasadę, że podaje tytuły norm to trzeba podać wszystkie - w wykazie brak PN-EN ISO 14565.2002

Inne drobne uwagi dotyczące sformułowań stylistycznych, interpunkcji oraz błędów literowych podałam w tekście maszynopisu.

Obszerne badania podjęte przez Doktorantkę są ważne zarówno z poznawczego jak i utylitarnego punktu widzenia. Na podkreślenie zasługuje to, że Doktorantka podjęła się przeprowadzenia kompleksowych badań dotyczących oceny wpływu zastosowania polifenoli i witaminy E do mieszanek dla kurcząt narażonych na działanie czynników stresogennych które wymagały dużego nakładu pracy oraz wykonania wielu oznaczeń chemicznych. Doktorantka przeprowadziła 3 doświadczenia wzrostowe zakończone analizą rzezną i oceną mięsa oraz oceną statusu antyoksydacyjnego kurcząt brojlerów. Badania podjęte przez Doktorantkę obejmowały zagadnienia od produkcji mieszanek aż po ocenę mięsa i badanie krwi.

Reasumując należy podkreślić aktualność i kompleksowość przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, a biorąc pod uwagę liczbę czynników oraz liczbę i charakter cech, ocena których wymagała bardzo dużego nakładu pracy należy stwierdzić, że autorka wykazała się dużą pracowitością i sumiennością oraz dobrze poradziła sobie z zaprezentowaniem uzyskanych wyników.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani Magdaleny Anny Mazur odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim dotyczącym oryginalności wyników, poprawnie zaplanowanym i wykonanym doświadczeniom, odpowiedniej interpretacji wyników oraz logicznego wnioskowania w oparciu o uzyskane wyniki badań. Przytoczone uwagi nie obniżają wartości pracy, która jest interesująca, wykonana poprawnie i zgodnie z założonym celem, a uzyskane wyniki mają wartość naukową i praktyczną.

Biorąc pod uwagę wymienione walory pracy uważam, że spełnia warunki określone w ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (t.j. Dz.U. z 2016r. poz. 882, z późn. zm.) co upoważnia mnie do przedłożenia Wysokiej Radzie Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego wniosku o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Anny Mazur do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.



Prof. dr hab. Teresa Banaszkiewicz