

Kraków, 22.11.2016 r.

Dr hab. Kazimierz Tarasiuk prof. UR

Uniwersyteckie Centrum

Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

Al. Mickiewicza 24/28

30-059 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. inż. Karola Wierzechosławskiego pt. „Wybrane białka ostrej fazy i cytokiny w surowicy loch w okresie okołoporodowym oraz ocena ich przydatności diagnostycznej”

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska dotyczy oceny przydatności białek ostrej fazy i cytokin we wczesnej diagnostyce zaburzeń okresu okołoporodowego u loch.

Promotorem pracy jest dr hab. Małgorzata Pomorska-Mól prof. nadzw., a promotorem pomocniczym dr Krzysztof Kwit z Zakładu Chorób Świń PIWet-PIB w Puławach.

Zaburzenia okresu okołoporodowego u loch stanowią nieustannie problem produkcyjno-zdrowotny w chowie świń. Klinicznie charakteryzują się one różnego stopnia zaburzeniami mleczności u samic w ciągu kilku pierwszych dni po porodzie. Symptomom ograniczonej mleczności (dysgalakcja) lub całkowitej bezmleczności (agalakcja) towarzyszą zaburzenia w stanie klinicznym samicy, co w konsekwencji wpływa na zdrowotność i przeżywalność nowo narodzonych prosiąt. Występowanie zaburzeń okołoporodowych u loch jest zróżnicowane pod względem skali i zależy od przyjętych kryteriów, w oparciu o które dokonuje się kwalifikacji oraz oceny ostrości przebiegu zachorowań zarówno u pojedynczych zwierząt, jak również na poziomie stada. Do najważniejszych symptomów towarzyszących zespołowi okołoporodowemu u loch zaliczyć należy zapalenie wymienia z bezmlecznością, wypływy z dróg rodnych, podwyższenie wewnętrznej ciepłoty ciała, zaburzenia apetytu. U prosiąt urodzonych przez samice z objawami bezmleczności obserwuje się biegunkę, zwiększoną śmiertelność, różnicowanie się miotów oraz wyraźnie niższą wagę prosiąt w momencie odsadzania. Warto podkreślić, że natężenie objawów chorobowych jest zróżnicowane u poszczególnych loch, jak również liczba chorujących samic jest różna. Wg danych literatury zaburzenia laktacji u loch mogą sięgać od kilku do nawet 40%. W Polsce sytuacja w tym zakresie nie różni się od innych krajów. Z punktu widzenia etiopatogenezy zespół

okołoporodowy u loch ma charakter polietiologiczny. Oznacza to, że w jego wywoływaniu bierze udział cały szereg czynników natury organizacyjnej, żywieniowej i zakaźnej.

Wstęp rozprawy oceniam bardzo pozytywnie. Doktorant wykazał się dobrą znajomością piśmiennictwa z tego zakresu. Warto podkreślić, że we wstępie pracy wykorzystał najnowsze dane literaturowe z pojedynczymi tylko pozycjami o znaczeniu historycznym. Autor szczegółowo przedstawił w nim zaburzenia laktacji oraz ich znaczenie w odchowcie prosiąt. Doktorant skoncentrował się na szczegółowym opisie zespołu okołoporodowego u loch, który obecnie w literaturze fachowej określany jest poporodowym zespołem upośledzenia mleczności (postpartum dysgalactia syndrome- PDS). Wykazał się dobrą znajomością literatury, opisując szczegółowo mechanizmy etiopatogenezy tego zespołu chorobowego. Na rycinie 1. (str. 15) Doktorant przedstawił własną modyfikację koncepcji etiologii i patogenezy zaburzeń laktacji wg Martineau i wsp. z 2013 roku. Zgodnie z tym poglądem do wystąpienia zaburzeń laktacji prowadzą trzy główne drogi:

1. Związana z kondycją loch oraz ich statusem metabolicznym
2. Związana z reakcją układu immunologicznego oraz procesem zapalnym będącym następstwem endotoksemii
3. Związana ze stresem

Najwięcej uwagi i słusznie Doktorant poświęcił koncepcji związanej z reakcją układu immunologicznego oraz procesem zapalnym w przebiegu endotoksemii jako wyniku nadmiernego namnożenia się pałeczek E.coli, głównie w przewodzie pokarmowym, ich lizy i uwolnienia dużej ilości endotoksyn, a następnie ich wchłonięcia do krwioobiegu.

Endotoksyna inaczej lipopolisacharyd jest charakterystycznym komponentem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych odpowiedzialnym za ich chorobotwórczość. Ten uwolniony podczas rozpadu komórki bakteryjnej nietoksyczny, lipidowo-cukrowy heteropolimer aktywuje układ immunologiczny zainfekowanego makroorganizmu w stopniu zależnym od jego struktury chemicznej i stężenia. Endotoksemia prowadzi zatem do aktywacji układu immunologicznego, wydzielania cytokin prozapalnych, prostaglandyn, białek ostrej fazy wraz z symptomami uogólnionej reakcji zapalnej organizmu, z wysoką gorączką włącznie. Często konsekwencją tego stanu rzeczy jest utrata apetytu, aktywacja procesów katabolicznych mogących doprowadzić do poporodowego zespołu upośledzenia mleczności.

Ze względu na złożoną etiologię oraz różnorodną manifestację kliniczną zaburzeń mleczności u loch po porodzie Doktorant postanowił zidentyfikować pewne markery, które pozwoliłyby na wczesne rozpoznanie zespołu bezmleczności poporodowej u loch. Należy podkreślić, że jest to nie tylko ważne z naukowego, ale także, a może przede wszystkim z praktycznego punktu widzenia. Liczne dane literaturowe wskazują, że do wczesnych markerów stanów patologicznych okresu okołoporodowego u loch należą białka ostrej fazy oraz cytokiny. Na 16 stronach Doktorant bardzo szczegółowo przedstawia mechanizmy obronne organizmu, w wyniku czego dochodzi do uwolnienia wielu mediatorów zapalenia, w tym cytokin prozapalnych. W wyniku oddziaływania cytokin dochodzi do uogólnienia procesu zapalnego i odpowiedzi ostrej fazy, wywołującej w makroorganizmie szereg zaburzeń hormonalnych, metabolicznych i neurologicznych, które doprowadzają do wielu dysregulacji, w tym zmiany stężeń niektórych białek surowicy określanych mianem białek ostrej fazy. Autor dysertacji dokonał szerokiego przeglądu literatury z tego zakresu, co pozwoliło mu na kompetentne jej wykorzystanie w opisie i charakterystyce białek ostrej fazy oraz możliwości ich zastosowania w ocenie stanu zdrowia świń. W kolejnej części wstępu Doktorant poświęcił sporo uwagi cytokinom prozapalnym oraz przeciwzapalnym, opierając się na bogatym piśmiennictwie z tego zakresu. Na tej podstawie dokonał wyboru odpowiednich cytokin, które włączył do badań nad ich zastosowaniem, jako potencjalnych biomarkerów, w szeroko pojętej diagnostyce problemów zdrowotnych u zwierząt, w tym zaburzeń okresu okołoporodowego u loch.

W ostatniej części wstępu Doktorant prześledził dokładnie dostępne piśmiennictwo nad możliwościami wykorzystania monitoringu stężeń białek ostrej fazy oraz cytokin w diagnostyce chorób świń, ocenie skuteczności leczenia oraz dobrostanu świń. Dane literaturowe wskazują wyraźnie, że zarówno kinetyka stężeń białek ostrej fazy, jak również poszczególnych cytokin mogą stanowić użyteczny wskaźnik w diagnostyce, ale również różnicowaniu bakteryjnych i wirusowych chorób układu oddechowego i pokarmowego u świń. Z uwagi na nieliczne tylko prace dotyczące stężeń białek ostrej fazy oraz cytokin jako biomarkerów zdrowia w okresie okołoporodowym i to głównie u bydła, słusznym było podjęcie przez Doktoranta badań nad przydatnością analizy stężeń białek ostrej fazy i cytokin jako potencjalnych biomarkerów w diagnostyce poporodowego zespołu zaburzeń mleczności u loch.

W celu pracy Doktorant przedstawił uzasadnienie dla podjętych badań i zaznaczył, że są to pierwsze tego typu próby prowadzone u świń. Szczegółowe cele badań przedstawiono

w 4 punktach, opisujących pokrótce poszczególne etapy pracy doświadczalnej, zrealizowanej w warunkach terenowych i laboratoryjnych.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorant opisał szczegółowo materiał zwierzęcy wykorzystany w pracy, analizowane parametry kliniczne i produkcyjne oraz ilość i terminy pobierania próbek krwi do badań laboratoryjnych. Następnie bardzo dokładnie scharakteryzował metody oraz procedury badawcze przeprowadzone w laboratorium, co umożliwia dokładne śledzenie przebiegu doświadczeń. Warto podkreślić, że Doktorant wykorzystał w pracy, oprócz szczegółowej analizy parametrów klinicznych i produkcyjnych, wiele metod laboratoryjnych. Do oceny i porównania przebiegu zmian stężeń białek ostrej fazy i cytokin w surowicy loch z poszczególnych grup oraz parametrów klinicznych i produkcyjnych Autor zastosował szereg analiz i testów statystycznych.

Wyniki badań zostały opisane na 26 stronach i wzbogacone 21 rycinami oraz 12 tabelami. Ryciny i tabele umieszczono w korespondujących fragmentach rozdziału, co ułatwia szybkie porównanie opisu znajdującego się w tekście z ich graficznym przedstawieniem. Uzyskane wyniki badań stanowią ważny przyczynek w ocenie przydatności profilu stężeń badanych białek ostrej fazy i cytokin we wczesnej diagnostyce zaburzeń okołoporodowych u loch. Tym samym poszerzają wiedzę w zakresie możliwości zastosowania tych biomarkerów także w odniesieniu do problemów zaburzeń mleczności u loch. Należy w tym miejscu podkreślić, że Doktorant po raz pierwszy w Polsce podjął się tego typu badań.

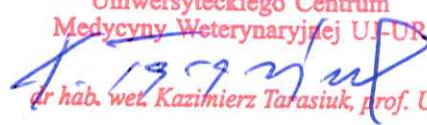
Uzyskane wyniki badań stały się podstawą do wnikliwej dyskusji, w której widoczna jest umiejętność Autora do samodzielnej, krytycznej oceny własnych wyników w konfrontacji z rezultatami otrzymanymi przez zespoły badawcze z innych krajów. Do istotnych osiągnięć tej pracy, zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia, zaliczyć należy uzyskanie statystycznie istotnych różnic pomiędzy profilem odpowiedzi białek ostrej fazy i cytokin u loch zakwalifikowanych, pod względem zdrowotnym, do różnych grup badawczych. Ważnym atutem badań było wielokrotne pobranie próbek krwi zarówno w okresie przed- jak i poporodowym, co dało możliwość dokładnego prześledzenia zachowania się stężeń markerów w okresie ostatniego miesiąca ciąży oraz trwającego 28 dni okresu laktacji. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że Doktorant poddał analizie szeroką gamę białek ostrej fazy (Hp, CRP, SAA, Pig-Map oraz cytokin (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α)). Włączenie do badań SAA pozwoliło na wykazanie silnej korelacji pomiędzy stężeniami SAA już na tydzień przed porodem, a wystąpieniem rzeczywistych zaburzeń laktacji u badanych loch. Potwierdzono tym samym, że SAA może być użytecznym diagnostycznie wczesnym

markerem zaburzeń laktacji u loch, pozwalającym z dużym prawdopodobieństwem na identyfikację samic narażonych na wystąpienie zaburzeń laktacji już na tydzień przed spodziewanym porodem. Uzyskane w badaniach wyższe stężenia Pig-MAP, SAA, IL-6, a także TNF- α u macior przed porodem korespondują z częstszym wystąpieniem zaburzeń mleczności u tych samic po porodzie, co czyni te białka potencjalnymi markerami stanu zdrowia loch w okresie poporodowym. Ponadto Autor uwzględnił w badaniach grupę samic klinicznie zdrowych, z objawami zaburzeń mleczności oraz stawkę zwierząt z innymi zaburzeniami okresu poporodowego. Pozwoliło to na bardziej obiektywną ocenę znaczenia badanych biomarkerów, których dynamika nie jest zjawiskiem o charakterze swoistym. Reasumując, Doktorant słusznie stwierdza, że zalecenie odnośnie do rutynowego stosowania monitoringu stężeń białek ostrej fazy i cytokin we wczesnej diagnostyce zaburzeń mleczności u loch musi być poprzedzone jeszcze dodatkowymi badaniami terenowymi z uwzględnieniem różnych systemów chowu świń, skali oraz technologii produkcji, jak również zarządzania i higieny chowu.

Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska nie budzi u mnie istotnych zastrzeżeń czy wątpliwości odnośnie do merytorycznej strony pracy. Moje zastrzeżenie dotyczy sformułowania czwartego wniosku, w którym Autor używa terminu „w ocenie statusu zdrowotnego loch w okresie poporodowym”. Terminu „status zdrowotny” używa się raczej w odniesieniu do stada, a określenie „stan zdrowia/zdrowotny” jest bardziej adekwatne do pojedynczego zwierzęcia lub ograniczonej grupy świń. Przy opisie wielu rycin powtarza się wyraz „locha” kilkakrotnie w jednym zdaniu. Proponuję stosować także słowa – synonimy takie jak samica czy maciora. W trakcie czytania moją uwagę zwróciły błędy interpunkcyjne oraz tzw. literówki stwierdzone w tekście pracy. Doceniam streszczenie pracy w języku angielskim, jednak wymaga ono pewnej korekty gramatycznej.

Powyższe uwagi nie umniejszają w najmniejszym stopniu merytorycznej wartości dysertacji, którą oceniam wysoko. Autor zrealizował założone cele pracy i uzyskał wartościowe wyniki, które pozwoliły na prawidłowe sformułowanie pięciu wniosków. Wyniki pracy, oprócz aspektu poznawczego, wnoszą istotny element praktyczny z możliwością jego zastosowania we wczesnej diagnostyce zaburzeń okołoporodowych u loch.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska lek. wet. inż. Karola Wierchosławskiego odpowiada warunkom stawianym na stopień doktora nauk w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, art. 13 ust. 2 i 4 (Dz.U. Nr65, poz.595 z późn. zm.) i mam zaszczyt przedstawić Wysockiej Komisji Przewodów Doktorskich Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. inż. Karola Wierchosławskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

DYREKTOR
Uniwersyteckiego Centrum
Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

dr hab. wet. Kazimierz Tarasiuk, prof. UR