

Dr hab. Tadeusz Bakuła

Olsztyn 29.11.2016 r.

Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UWM w Olsztynie

Recenzja

rozprawy doktorskiej

lek. wet. inż. Karola Wierchosławskiego

pt.: „**Wybrane białka ostrej fazy i cytokin w surowicy loch w okresie okołoporodowym oraz ocena ich przydatności diagnostycznej**” wykonanej w Zakładzie Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierownictwem naukowym dr hab. Małgorzaty Pomorskiej-Mól prof. nadzw. promotora oraz dr Krzysztofa Kwita promotora pomocniczego.

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 24 marca 2016 r. oraz pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej – znak BRN-410/9/16 z dnia 20.10.2016 r.

Jednym z ważniejszych okresów w produkcji świń jest okres okołoporodowy, który ma wpływ na liczbę i jakość urodzonych i odchowanych prosiąt. W tym okresie, wśród stanów patologicznych zaburzenia laktacji, o różnym stopniu nasilenia, są często zgłaszane przez hodowców jako istotny problemem w chowie świń. Prace hodowlane zmierzające do uzyskania w ciągu roku optymalnej liczby dużych miotów (na granicy fizjologii i patologii) mają swoje konsekwencje. Objawiają się one między innymi, występowaniem polietiologicznego poporodowego zespołu upośledzenia mleczności (PPDS lub PDS *postpartum dysgalactia syndrom*).

Diagnostyka terenowa zaburzeń laktacji loch ze względu na złożoną etiologię jest trudna. W dużej mierze opiera się na objawach klinicznych takich jak wzrost wewnętrznej ciepłoty ciała macior w pierwszych 3 dniach po porodzie, upośledzeniu laktacji, zmianach zapalnych w obrębie gruczołu mlekowego, zaburzeniach apetytu, zaparcia, wypływach z dróg rodnych, niechęci do karmienia prosiąt, słabej kondycji prosiąt. To główne objawy, które nie zawsze występują łącznie. Jeszcze gorzej jest z diagnostyką tego zespołu chorobowego w przebiegu postaci podklinicznej.

Każdy z wyżej wymienionych objawów klinicznych świadczy o toczącym się już procesie patologicznym. Wyleczenie loch jest możliwe po zastosowaniu odpowiedniej terapii, jednak straty powstałe w wyniku braku pobrania pełnowartościowej siary i mleka przez prosięta w pierwszych dniach ich życia są już nie odwracalne i nie do odrobienia.

Próba opracowania metod wczesnej diagnostyki zaburzeń okołoporodowych, która dałaby szansę na możliwie szybką interwencję terapeutyczną w stosunku do zagrożonych loch i szansę na pobranie odpowiedniej pełnowartościowej dawki siary i mleka przez prosięta jest jak najbardziej uzasadniona. Wyzwaniem jest określenie czynników zagrażających homeostazie organizmu, momentu ich pojawienia się i intensywności nasilenia.

W chwili krytycznej, mechanizmy obronne organizmu uruchamiają cały szereg reakcji, które mają zneutralizować powstające zagrożenia, między innymi, poprzez uwolnienie mediatorów zapalenia jakim są białka ostrej fazy i cytokiny prozapalne.

Z tego powodu podjęcie pracy zmierzającej do oceny przydatności diagnostycznej wybranych białek ostrej fazy i cytokin w surowicy loch w okresie okołoporodowym jako markerów we wczesnej diagnostyce zaburzeń laktacji loch jest uzasadnione, ma znaczenie poznawcze i aplikacyjne.

Przedłożona do oceny praca doktorska liczy 119 stron, w tym 110 strony tekstu i 9 stron wykazu piśmiennictwa zawierającego 143 pozycje ułożone alfabetycznie. Układ pracy jest typowy dla tego typu opracowań. Posiada ona następujący rozdziały: Wykaz skrótów, Wstęp (podzielony na podrozdziały), Cel pracy, Materiały i metody (podzielony na podrozdziały), Wyniki (podzielony na podrozdziały), Dyskusja, Wnioski, Streszczenia polsko- i angielskojęzyczne oraz Piśmiennictwo. Praca zawiera 28 rycin i 14 tabel przedstawiających wyniki badań. Do oceny i porównania wyników zastosowano 5 testów statystycznych.

We wstępie (na 28 stronach), w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo Autor przedstawił, zaburzenia laktacji oraz ich znaczenie w odchowcie prosiąt. Przedstawił krótki opis anatomii gruczołu mlekowego świń, opisał fizjologiczne procesy produkcji i wydzielania mleka, scharakteryzował fazy laktacji (siarową, wzrostu produkcji mleka, stabilizacji i spadku produkcji). W dalszej części wstępu Autor opisał stany patologiczne okresu laktacyjnego u loch. Wymienił przyczyny tych zaburzeń dzieląc je na anatomiczne, mechaniczne, fizjologiczne i zakaźne.

W kolejnym podrozdziale Autor opisuje poporodowy zespół upośledzenia mleczności PDS/PPDS (*postpartum dysgalactia syndrom*) loch. Na podstawie przytoczonego piśmiennictwa, uzasadnia używanie tego jako bardziej precyzyjnego, oddającego charakter tej

patologii - poporodowy zespół upośledzenia mleczności w miejsce dotychczas używanego określenia syndromu jako MMA (*metritis, mastitis,agalactiae*).

Autor na podstawie piśmiennictwa i własnej modyfikacji przedstawił ciekawą koncepcją etiologii zaburzeń laktacji, która wyraża się zaburzeniami w homeorezie organizmu loch jako *dys-homeoreza* (zaburzenie równowagi). Według tej koncepcji do zaburzeń laktacji prowadzą trzy główne przyczyny: kondycja loch (syndrom tłustej lochy lub syndrom nadmiernego umięśnienia loch), reakcja układu immunologicznego na proces zapalny w wyniku endotoksemii oraz stres.

W dalszej części Autor opisuje objawy kliniczne, diagnostykę i postępowanie terapeutyczne w poporodowym zespole upośledzenia mleczności. Przedstawił on również opis odpowiedzi ostrej fazy i poszczególnych białek ostrej fazy oraz cytokin.

W dwóch ostatnich podrozdziałach wstępu, bezpośrednio korespondujących z tytułem dysertacji, Autor na podstawie szeroko cytowanego piśmiennictwa, charakteryzuje białka ostrej fazy i cytokiny jako markery stanu zdrowia świń. Przedstawił badania innych autorów, którzy określali użyteczność monitorowania stężeń białek ostrej fazy we wczesnej diagnostyce wielu stanów patologicznych u ludzi i innych gatunków zwierząt. Doktorant przyjął, że takie markery mogą być również przydatne w rozpoznawaniu stanów patologicznych okresu okołoporodowego świń, w tym zaburzeń ich laktacji.

Celem badań była analiza kinetyki zmian stężeń wybranych białek ostrej fazy oraz cytokin w surowicy loch z fizjologicznie i patologicznie przebiegającym okresem okołoporodowym w okresie od 28 dnia przed porodem do 28 dnia po porodzie, ocena korelacji pomiędzy stężeniami badanych markerów w surowicy krwi a stanem klinicznym loch i parametrami produkcyjnymi oraz ocena możliwości wykorzystania tych markerów we wczesnym rozpoznaniu zaburzeń laktacji u loch.

Biorąc pod uwagę określony przez Autora cel badań, skonfrontowany z wynikami badań innych autorów przedstawionych w przeglądzie piśmiennictwa, można stwierdzić, że podjęte badania są jak najbardziej aktualne, wnoszą nową wiedzę do nauki i mogą być przydatne w praktyce terenowej. Tym bardziej, że poszukiwanie markerów we wczesnej diagnostyce zaburzeń laktacji u loch to pierwsze tego typu badania prowadzone na świniach.

Materiałem badawczym były loch z wielkoprzemysłowych hodowli, z dwóch różnych genetycznie stad utrzymywanych w odmiennych warunkach odchowu i charakteryzujących się różnymi parametrami produkcyjnymi.

Na przeprowadzenie doświadczenia na zwierzętach uzyskano zgodę Lokalnej komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Lublinie (Uchwała nr 38/2014 r. z dnia 24.06.2014).

Dla wszystkich loch biorących udział w badaniu stworzono jednolitą, przejrzyste opracowaną, kartę badania klinicznego dającą gwarancję uzyskania obiektywnych wyników. Na podstawie przebiegu okresu okołoporodowego loch podzielono je na 3 grupy: zdrowe - 58 szt., z poporodowym zespołem upośledzenia mleczności – 45 szt. i inne (z innymi objawami klinicznymi) – 36 szt.

Poza badaniami produkcyjnymi i klinicznymi, podstawą do analitycznych badań laboratoryjnych, były próbki krwi pobierane przez długi okres czasu od loch (w 28, 14, 7, 3, 1, dniu przed porodem i w 0, 1, 3, 7, 14, 28 dniu po porodzie). W uzyskanej z krwi surowicy oznaczano szeroki wachlarz wskaźników tj. białka ostrej fazy: białko C-reaktywne (CRP), haptoglobina (Hp), surowiczy amyloid A (SAA), główne białko ostrej fazy świń (Pig-MAP) i cytokiny: interleukina 4, 6, 8 i 10 oraz czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α). Do określenia stężeń białek ostrej fazy i cytokin wykorzystano komercyjne, ilościowe testy ELISA (metodyka badań była zgodna z zaleceniami producenta).

W obszernym rozdziale Materiały i metody (na 27 stronach) Autor bardzo szczegółowo opisał metodyki i stosowane materiały do badań laboratoryjnych poszczególnych białek ostrej fazy i wybranych cytokin.

Bez straty dla jakości dysertacji można było pominąć szczegółowy opis metodyk zawartych w zaleceniach producenta dla poszczególnych testów.

W dysertacji na szczególną uwagę zasługuje to, że Autor do analiz statystycznych zastosował aż 5 testów. W rozdziale Materiały i metody, zawarty jest opis tych testów (analiza wariancji, ocena jednorodności wariancji, porównanie wyników z 2 stad, analiza pomiarów powtarzalnych, i porównanie wyników z 3 grup). Testy te zastały wykorzystane do oceny i porównania przebiegu zmian stężenia białek ostrej fazy i cytokin w surowicy loch w poszczególnych grupach badawczych oraz parametrów klinicznych i produkcyjnych. Zastosowano również analizę krzywych ROC *Receiver Operating Characteristics* (ocena jakości klasyfikatora) do oceny przydatności badanych markerów we wczesnej diagnostyce zaburzeń laktacji u loch. Metody te stosowane w badaniach medycznych do rozdzielenia wyników dodatnich od ujemnych oraz porównanie różnych metod diagnostycznych po raz pierwszy zostały z powodzeniem zastosowane przez Autora w badaniach na świnia.

W rozdziale Wyniki, podzielonym na podrozdziały (na 26 stronach), Autor opisał uzyskane wyniki z badań klinicznych (pomiaru wewnętrznej ciepłoty ciała, apetyt, zmiany

kliniczne w gruczole mlekowym), parametry produkcyjne (czas trwania ciąży i porodu, cykl reprodukcyjny, liczba prosiąt w miocie) oraz wyniki badań laboratoryjnych (białka ostrej fazy i cytokiny). Wyniki zostały przedstawione w formie graficznej na wykresach. Wyniki analiz korelacji przedstawiono w formie wykresów i tabel. W dalszej części tego rozdziału Autor na podstawie analizy krzywych ROC oraz po określeniu pola powierzchni pod krzywą (AUC), oceny dokładności, czułości i swoistości wartości predylekcyjnej dodatniej (PPV - prawdopodobieństwo, że locha zachoruje mając pozytywny wynik testu) oraz wartości predylekcyjnej ujemnej (PNV - prawdopodobieństwo że locha nie zachoruje mając negatywny wynik testu) dokonał oceny przydatności diagnostycznej wybranych (o najsilniejszej korelacji) markerów z białek ostrej fazy tj. - surowiczy amyloid A i główne białko ostrej fazy świń oraz z cytokin - interleukina 6. Uzyskane wyniki są przedstawione w sposób czytelny i logicznie zinterpretowane.

W rozdziale Dyskusja (na 13 stronach) Autor dokonał analizy uzyskanych wyników i odniósł je do badań innych autorów przedstawionych w dobrze dobranym piśmiennictwie głównie z ostatnich lat. Wynikami badań własnych Autor potwierdził opinię innych, że diagnoza poporodowego upośledzenia laktacji loch oparta na, prostej do wykonania w terenie, metodzie pomiarów wewnętrznej ciepłoty ciała jest niedokładna i nie powinna być podstawą diagnozy. Potwierdził, że zaburzenia apetytu korelują z objawami zaburzeń laktacji u loch. Terenowa diagnostyka poporodowych zaburzeń laktacji u loch mająca bezpośredni wpływ na odchów prosiąt dokonywana jest po fakcie ich wystąpienia. Dlatego identyfikacja markerów pozwalających na wczesną diagnozę byłaby bardzo przydatna. Badania Autora wykazały znaczną dynamikę zmian badanych białek ostrej fazy i cytokin w okresie okołoporodowym. Szeroko zakrojone badania w tym zakresie i zastosowanie dobrze dobranych testów statystycznych oceniam jako pionierskie. Do oceny przydatności diagnostycznej badanych markerów jako metodę odniesienia (referencyjną tzw. złoty standard) przyjęto badanie kliniczne loch w 2 i 3 dniu po porodzie. Jak wynika z analizy statystycznej i korelacji tylko niektóre z nich mogą być potencjalnymi markerami we wczesnej diagnozie. Zdaniem Autora potencjalnymi markerami w ocenie stanu zdrowotnego loch w okresie okołoporodowym mogą być: białko C-reaktywne (CRP), surowiczy amyloid A (SAA), główne białko ostrej fazy świń (Pig-MAP), interleukina 10 (IL-10) i czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α) z nich najbardziej czułym markerem przedporodowym okazał się surowiczy amyloid A (SAA) Założenia i cele badań zostały zrealizowane prawidłowo, a na podstawie uzyskanych wyników lek. wet. inż. Karol Wierchosławski wysnuł 5 dobrze sformułowanych wniosków.

Zamieszczone w rozprawie streszczenia w języku polskim i angielskim w sposób syntetyczny przedstawiają badania i uzyskane wyniki.

Dokonując z obowiązku recenzenta krytycznej oceny zwracam uwagę na pewne nieścisłości:

- W Wykazie skrótów pominięto kilka skrótów użytych w dysertacji:

PPDS (str.14)– *postpartum dysgalactia syndrom* - poporodowy zespół upośledzenia mleczności skrót zamiennie używany jako PDS, chociaż w piśmiennictwie anglojęzycznym jest często stosowany skrót PPDS

FSS *Fat Sow Syndrom* (syndrom tłustej lochy) (str.16)

OMSS *Over Muscullled Sows Syndrom* (syndrom nadmiernego umięśnienia loch) (str.17)

A-I Apolipoproteina (str. 24)

HDL- lipoproteiny o dużej gęstości (str. 24)

Alb – albuminy (str 33) - w wykazie jest Ab

PRRSV – Zespół rozrodzo oddechowy świń (str. 39)

ZZZN – Zakaźne zanikowe zapalenie nosa świń (str.39)

ROC – *Receiver Operating Characteristics* Ocena jakości klasyfikatora (str.63)

OT – *Optimal Threshold* optymalna wartość (str 64)

PPV – wartość predylekcyjna dodatnia (str. 64)

NPV – wartość predylekcyjna ujemna (str.64)

- Na stronie 12 Autor przedstawiając istotność problemów zdrowotnych loch w stadach w pierwszych dniach po porodzie, na podstawie załączonego piśmiennictwa, określił je od kilku do kilkudziesięciu procent. W tym kontekście informacja o objęciu 13% stad amerykańskich poporodowymi zaburzeniami mleczności w oparciu o cytowane piśmiennictwo z roku 1973 może być już nieaktualna.

- Na stronie 13 Autor wymienił przyczyny zaburzeń laktacji u loch dzieląc je na anatomiczne, mechaniczne, fizjologiczne i zakaźne. Podział ten nie jest zbyt precyzyjny, ponieważ Autor w grupie przyczyn fizjologicznych ujął również błędy żywieniowe, które moim zdaniem powinny być wymienione jako oddzielna istotna grupa przyczyn zaburzeń laktacyjnych u loch, nie mająca nic wspólnego z fizjologią.

- Na stronie 14 w zdaniu na temat PDS ... „Może występować w formie ostrej, podostrej lub podklinicznej...” pominięto formę kliniczną, które jest opisana w dalszej części wstępu.

- W obszernym rozdziale Materiał i metody zawarte są szczegółowe opisy stosowanych testów ELISA spisanych z instrukcji opracowanej przez producenta. Pominięcie tych opisów istotnie skróciłoby rozdział a jednocześnie nie miałyby wpływu na jakość dysertacji.

Nieliczne niedociągnięcia redakcyjne i uwagi przedstawione w tej ocenie nie podważają merytorycznej strony przedłożonej do oceny dysertacji i nie obniżają jej wysokiej wartości. Rozprawa doktorska lek wet. inż. Karola Wierchosławskiego została przygotowana starannie, napisana jest jasno i nie stwarza trudności w jej zrozumieniu. Praca wykonana została z użyciem nowych metod badawczych, a wyniki poddano analizie z zastosowaniem doskonale dobranych testów statystycznych. Przeprowadzone badania mają duże znaczenie poznawcze i dają podstawę do opracowania testu do wczesnej diagnostyki zaburzeń laktacji u loch.

Dysertację lek wet. inż. Karola Wierchosławskiego na stopień doktora weterynarii oceniam pozytywnie. Spełnia ona warunki określone w art. 11 Ustawy o stopniach i tytule naukowym. W związku z powyższym wnoszę do Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie lek wet. inż. Karola Wierchosławskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Tadeusz Bakula

