

prof. dr hab. Iwona Markowska-Daniel
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej
SGGW w Warszawie

Warszawa, 8.04.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. SZYMONA POROWSKIEGO**
pt. „Przydatność wybranych immunostymulatorów w ograniczaniu występowania mieszanych
zakażeń u świń, poprawie wskaźników produkcyjnych oraz skuteczności profilaktyki swoistej
w kontekście do zróżnicowanego przestrzegania zasad bioasekracji”
wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. Kazimierza Tarasiuka prof. UR w Krakowie

Podstawę formalną mojej recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 24.02.2022 r. oraz pismo Przewodniczącej
ww. Rady - znak RD/Wet./531-8/2018 z dnia 4.03.2022 r.

Prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego chroni organizm przed
rozwojem zakażeń, pomimo praktycznie stałej obecności mikroorganizmów na błonach
śluzowych, tkankach nabłonkowych, skórze, czy w środowisku. Jest to uwarunkowane
stałością homeostazy organizmu i podlega wpływom układów nerwowego, hormonalnego i
immunologicznego.

Stymulacja odporności od lat jest przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków
naukowo-badawczych na świecie. Do badań klinicznych wprowadzono szereg substancji
pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, modulujących odpowiedź immunologiczną, w
tym podnoszących odporność ustroju na różnego rodzaju infekcje, w tym na często
występujące w fermach trzody chlewnej zakażenia mieszane układów oddechowego i
pokarmowego, stanowiące poważny problem ekonomiczny. Preparaty te różnią się
mechanizmem i siłą działania. W praktyce weterynaryjnej najczęściej stosowane są
modulatory niespecyficzne, o wielokierunkowym mechanizmie działania, których efektem
działania jest zmiana odpowiedzi immunologicznej organizmu na zakażenie wyrażająca się
skróceniem czasu wymaganego dla wywołania odpowiedzi lub podniesieniem jej poziomu i
przedłużeniem czasu trwania. W doborze immunostymulatorów należy kierować się
następującymi kryteriami: jak najmniejszym działaniem ubocznym, łatwością
kontrolowanego podawania przy jednoczesnym dużym jednorazowym stężeniu oraz
działaniem ukierunkowanym na makrofagi, które odgrywają rolę w prawidłowej inicjacji
reakcji odpornościowej, a to wymaga od lekarza weterynarii specjalistycznej wiedzy zarówno
w zakresie procesów odpornościowych, jak i mechanizmu działania konkretnych preparatów.

W ostatnich latach, w związku z całkowitym zakazem metafilaktycznego stosowania chemioterapeutyków, zagadnienie stymulacji odporności zwierząt szczególnie zyskuje na znaczeniu. Biorąc to pod uwagę uważam, że podjęte przez Pana lek. wet. Szymona Porowskiego badania są aktualne i uzasadnione. W pełni wychodzą one naprzeciw potrzebom praktyki terenowej i mają znaczenie dla poprawy zdrowia i tym samym konkurencyjności produkcji trzody chlewnej w Polsce.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 112 stron wydruku komputerowego. Ma ona formę manuskryptu o układzie typowym dla tego typu opracowań, obejmuje: wstęp, cele badań, materiały i metody, przebieg doświadczeń i wyniki badań, dyskusję, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazy: piśmiennictwa, skrótów, tabel i rycin, stanowiących dokumentację przeprowadzonych badań, które zostały wkomponowane w tekst rozprawy.

Wszystkie procedury wykonywane na zwierzętach zostały zatwierdzone przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach w Lublinie (pozwolenie nr 101/2018 z dnia 2.07.2018 r).

W liczącym 14 stron „Wstępie” Doktorant omówił organizację produkcji trzody chlewnej w Polsce. Następnie przedstawił problem występowania wieloczynnikowych chorób świń i ich znaczenie. W kolejnym podrozdziale omówił bioasekurację zewnętrzną oraz wewnętrzną ferm trzody chlewnej. Dalej opisał mechanizmy odporności nieswoistej i swoistej u świń oraz zwrócił uwagę na możliwości wykorzystania immunostymulatorów i mechanizmy ich działania, ze szczególnym uwzględnieniem Biotropiny i Lydium KLP, które były przez Niego wykorzystane w badaniach własnych. Rozdział ten został poprawnie i starannie opracowany, dowodzi on dobrej znajomości badanej problematyki oraz zagranicznego i krajowego piśmiennictwa, a także umiejętności przygotowania opracowania monograficznego przez Doktoranta.

Cele szczegółowe badań w liczbie 4 zostały jasno sformułowane. Obejmowały one ocenę właściwości immunostymulujących Lydium KLP i Biotropiny, na podstawie pomiaru poziomu poszczepiennej odpowiedzi humoralnej po immunizacji z jednoczesną immunostymulacją. Moim zdaniem cele badań 1 i 2 powinny być przereformowane i powinny być ujęte jako jeden punkt ponieważ *de facto* obydwie punkty dotyczą oceny wpływu immunostymulacji na poziom przeciwciał poszczepiennych po immunizacji świń wybranymi szczepionkami. Następnym celem pracy była ocena wpływu immunostymulacji na kształtowanie się wybranych parametrów zdrowotnych i produkcyjnych u świń. Ostatni cel pracy dotyczył oceny bioasekuracji w obiektach, w których wykonywano doświadczenia, w kontekście występowania w nich wybranych czynników patogennych dla świń. Ten cel pracy uważam za bardzo istotny ponieważ bezdyskusyjnie właściwa bioasekuracja jest podstawą zapobiegania występowaniu chorób zakaźnych.

W rozdziale „Materiały i metody”, na 18 stronach tekstu, Autor opisał szczegółowo 10 ferm trzody chlewnej, w których w latach 2019-20 prowadził badania kliniczne i pobierał materiał do badań laboratoryjnych.

Badania nad wpływem immunostymulacji na poziom odpowiedzi poszczepiennej przeciwko grypie świń oraz różycy (I etap pracy) przeprowadzono w 4 krajowych fermach, z których 3 zlokalizowane były w woj. wielkopolskim, a 1 w woj. mazowieckim. Warchlaki z grup doświadczalnych oraz zwierzęta kontrolne, o m.c. ok. 45 kg, immunizowano przeciwko

różycy i grypie świń, a dodatkowo zwierzęta z grup doświadczalnych otrzymywały *i.m.* odpowiednio Biotropinę lub Lydium KLP. Krew do badań laboratoryjnych pobierano od wszystkich świń 3-krotnie: w dniu 0, 21 i 42.

Z kolei badania nad wpływem immunostymulacji na zdrowotność i produktywność świń (II etap pracy) przeprowadzone zostały w 6 fermach, 4 zlokalizowanych w woj. wielkopolskim, oraz po 1 w woj. lubuskim i opolskim. Zwierzętom z grup doświadczalnych podawano, podobnie jak w pierwszym etapie, odpowiednio Biotropinę lub Lydium KLP i następnie przez kolejnych 47 dni analizowano wskaźniki zdrowotne (wskaźnik zachorowań, liczba interwencji lekarskich, wskaźnik padnięć) oraz produkcyjne (m.c. w dniu 0 oraz 47, średnie przyrosty m.c.).

Szczegółową charakterystykę gospodarstw, z uwzględnieniem żywienia, oraz zakres stosowanych w nich zabiegów profilaktycznych i stosowaną bioasekurację przedstawiono w formie tabelarycznej. Uważam to za bardzo dobry pomysł ponieważ umożliwiło to ujednoczenie sposobu prezentacji wszystkich danych, pomimo iż poszczególne fermy różniły się istotnie między sobą zarówno w zakresie skali produkcji, warunków zoohigienicznych, jak i stosowanej bioasekuracji. Jednocześnie wpłynęło to na dobrą czytelność i tym samym pozytywny odbiór zebranych danych, mimo mnogości informacji zawartych w tabelach.

Następnie Doktorant przedstawił szczegółowo układ doświadczeń, sposób postępowania z pozyskanym materiałem biologicznym i zastosowane testy ELISA (wszystkie badania laboratoryjne bazowały na komercyjnych zestawach ELISA różnych producentów). Za zbędne uważam powtórzenie na str. 41 tekstu części informacji podanych wcześniej, w początkowej części tego podrozdziału na str. 31.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w ramach doktoratu przeprowadzono badania na bardzo licznym materiale - w pierwszym etapie pracy łącznie wykorzystano 144 świnię, w tym 96 świń doświadczalnych i 48 zwierząt kontrolnych, a w drugim etapie 1159 świń, w tym 772 świnię doświadczalne i 387 kontrolnych.

W rozdziale Materiały i metody Doktorant przedstawił także analizę statystyczną uzyskanych indywidualnych wyników badań, co w mojej ocenie stanowi wartościowy element pracy, umożliwiający obiektywną ocenę wyników uzyskanych w poszczególnych grupach zwierząt. Dobór testów statystycznych jest właściwy.

Rozdział „Wyniki”, liczący 33 strony, obejmuje obszerny opis uzyskanych wyników badań, ich dokumentację w postaci 12 tabel i 22 starannie opracowanych, czytelnych, kolorowych rycin, prezentujących poziomy przeciwciał u zwierząt w poszczególnych grupach i w badanych odstępach czasowych. Zawarta w pracy dokumentacja wyników jest przekonująca.

Autor wykazał brak istotnego wpływu podawanych immunostymulatorów na poziom przeciwciał poszczepiennych. Ponadto wykazał, że jednoczesna immunizacja przeciwko różycy i grypie świń zwiększa efektywność odpowiedzi humoralnej, co stanowi osiągnięcie o dużym znaczeniu praktycznym. W drugim etapie badań Doktorant dowiódł także pozytywnego wpływu zastosowanej immunostymulacji na analizowane wskaźniki produkcyjne, aczkolwiek słusznie zauważył w dyskusji, że istotny wpływ na te wyniki mogła mieć prawidłowa bioasekuracja stosowana w fermach, w których te wskaźniki były najkorzystniejsze.

Dyskusję przedstawiono na 18 stronach. Ten rozdział stanowi umiejętną próbę krytycznej analizy uzyskanych wyników w kontekście badań wykonanych przez innych autorów. Doktorant dowiódł zdolności prowadzenia naukowej dyskusji, dokumentując tym samym dobrą znajomość badanej problematyki.

Rozprawę kończy 5 wniosków, zostały one sformułowane niezwykle ostrożnie (wydaje się, że....; może pozytywnie wpływać). Uważam, że przeprowadzone badania nie upoważniają Doktoranta do sformułowania wniosku 3 ponieważ nie wykonywał On badań umożliwiających bezpośrednią ocenę odporności nieswoistej.

Na końcu pracy Doktorant zawarł wykaz 149 pozycji piśmiennictwa zagranicznego i krajowego. Nie jestem w pełni przekonana, czy było konieczne opieranie się o podręczniki, materiały z konferencji i sympozjów oraz prace popularno-naukowe, zwłaszcza opublikowane 20 lat temu, których w wykazie jest ok. 30.

Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła pewne niedociągnięcia, które z obowiązku recenzenta zmuszona jestem przedstawić (być może Doktorant uzna za stosowne wzięcie pod uwagę moich sugestii przy opracowywaniu publikacji, które zostaną napisane w oparciu o uzyskane w pracy wyniki badań):

- Tytuł pracy jest bardzo długi - uważam, że pomimo, iż praca jest wielowątkowa należy go ponownie przemyśleć i skrócić;
 - Już w spisie treści zastosowano skróty, które zostały wyjaśnione dopiero na kolejnych stronach tekstu, ponadto w wykazie skrótów brakuje kilku skrótów, które zastosowano w tekście rozprawy, np. KE - Komisja Europejska, PE - Parlament Europejski, WPR - Wspólna Polityka Rolna, BCG - *Bacillus Calmette-Guerin*, EFSA - European Food Safety Agency (str. 16, 17, 25, 29); z kolei na str. 20 podano pełną nazwę *Bordetella bronchiseptica* i nie wprowadzono powszechnie używanego skrótu Bbr; we wstępie pracy brakuje pełnej nazwy niektórych drobnoustrojów, np. *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Glaesserella parasuis*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida* - zastosowano same skróty (str. 19). Podobnie, na str. 20 brakuje pełnej nazwy masa ciała, zastosowano sam skrót, mimo iż pojawia się on w tekście po raz pierwszy. Na str. 29 podano pełną nazwę Komisji Europejskiej i zastosowano skrót, pomimo, że skrót wprowadzono wcześniej na str. 16.
- Proponuję przyjąć powszechnie stosowaną zasadę - przy pierwszym użyciu podać pełną nazwę i wprowadzić skrót, a dalej w tekście pracy stosować sam skrót;
- Na str. 21 znalazł się niefortunny zapis "zakażenia PADS" - powinno być: czynniki zakaźne wywołujące PADS; na tej samej stronie Autor pisze "testy serologiczne (ELISA)" - powinno być np. ELISA ponieważ jest wiele różnych testów serologicznych;
 - W spisie treści znajduje się zapis "Materiały i Metody", a w tekście pracy na str. 31 napisano Materiał i metody, należy to ujednolicić;
 - Na str. 45 Autor podaje, że liczba zwierząt w grupach doświadczalnych i kontrolnych w poszczególnych fermach różniła się z powodu różnej wielkości grup technologicznych w badanych obiektach, wobec tego wydaje mi się, że bardziej obiektywne byłyby badania w których zastosowano by taki sam odsetek zwierząt z poszczególnych grup technologicznych;

- Zastanawia mnie fakt z jakiego powodu na wykresach obrazujących wyniki badań serologicznych w kierunku różycy oraz w opisie tych wyników nie uwzględniono fermy I (wykres 1, 2, 3, 4 str. 49-52);
- Na str. 51 znajduje się niedokończone zdanie lub omyłkowo zamiast kropki kończącej zdanie umieszczono znak >;
- Na str. 57 znajduje się niefortunne stwierdzenie "średnia koncentracja swoistych przeciwciał" - proponuję zastąpić je stwierdzeniem średni poziom przeciwciał ponieważ *de facto* Doktorant nie mierzył stężenia przeciwciał;
- Liczne błędy językowe i interpunkcyjne: tytuł należy poprawić pod względem językowym - proponuję zmienić zapis "w kontekście do zróżnicowanego przestrzegania zasad bioasekuracji na: w kontekście zróżnicowanego poziomu bioasekuracji (w kontekście czego, a nie do czego); str. 16: "jako głównego źródła białka" - powinno być: jako główne źródło białka; zbędna jest kropka po nazwisku Pejsak przy cytowaniu piśmiennictwa; zapewnienia - powinno być: zapewnienie; str. 17: właściwych praktyk odnośnie do bioasekuracji - proponuję zastąpić właściwej bioasekuracji; str.25: proponuję dopisać indukują one także wydzielanie cytokin; str. 27: błędy literowe w nazwiskach - powinno być Kotowski oraz Pomorska; str. 28: proponuję zastąpić słowo wykazuje słowem znajduje - Biotropina znajduje także szerokie zastosowanie..; str. 29: zamiast kropki po "weterynaryjnych produktów leczniczych" powinien być przecinek i dalej zdanie powinno być kontynuowane z małej litery; str. 43: powinno być: w temp. -20°C; str. 44 powinno być: dodatni status immunologiczny; str. 44: powinno być: w przeprowadzonych badaniach; u świń; ujemnej i dodatniej; str. 53/54 - zbędne są kropki po tytule ryc. 5, 6, 8, 14 i 18; str. 57 - powinno być: średni poziom przeciwciał wyniósł; str. 63: proponuję zmienić zapis "dla jakiegokolwiek z 3 grup" na dla żadnej z 3 grup; powinno być: był statystycznie istotnie mniejszy; zamiast "pomiędzy fermami gdzie" powinno być pomiędzy fermami w których, ta sama uwaga dotyczy str. 64; brakuje spacji pomiędzy słowami poziom przeciwciał; str. 68 zamiast "względem kontroli" proponuję zapisać w porównaniu do zwierząt kontrolnych, ta sama uwaga dotyczy str. 73; str. 83: zapis "mimo trwałej obecności tych preparatów" proponuję zastąpić stwierdzeniem: mimo posiadania w zestawach aptecznych tych preparatów przez niemal wszystkich lekarzy; na tej samej stronie powinno być: określaną; str. 86 powinno być: osłabieniem; powodują dysfunkcję; zapis: "polegające m.in. na osłabieniu reakcji prezentowania antygeny" proponuję zastąpić PCV2 zaburza prezentację antygenów oraz ekspresję genów cytokin pro- i przeciwzapalnych; w tym zdaniu 2-krotnie powtórzona jest IL-10; brakuje kropki na końcu ostatniego zdania; str. 88 - zamiast hialuronidazie powinno być hemaglutyninie; str. 90: zamiast określenia zainfekowanych grypą powinno być zakażonych wirusem grypy; zamiast przeciwciał przeciwko grypie powinno być przeciwciał przeciwko wirusowi grypy; kolejność pozycji piśmiennictwa: 92 powinno być przed 90; w poz. 147 powinno być IFN α .

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne mają charakter techniczny, nie umniejszają one wartości recenzowanej rozprawy i nie mają wpływu na jej pozytywną ocenę.

Podsumowując swoją recenzję chcę podkreślić przede wszystkim znaczenie aplikacyjne badań przeprowadzonych przez lek. wet. Szymona Porowskiego. Praco- i czasochłonne kompleksowe badania wykonane przez Doktoranta w warunkach terenowych dowodzą Jego ogromnej pracowitości i dużego zaangażowania. Badania w warunkach terenowych są niezwykle trudne do wykonania, z jednej strony wymagają doskonałej organizacji pracy, a z drugiej często obarczone są czynnikami, czy wręcz błędami, na które Doktorant nie ma żadnego wpływu. Na uznanie zasługuje także fakt, że badania zostały przeprowadzone na bardzo licznych materiałach zwierzęcych, co wpływa na obiektywizm uzyskanych wyników. Uważam, że uzyskane przez Niego wyniki są interesujące, zwłaszcza dla praktyki weterynaryjnej, mogą one wpłynąć na wzrost rentowności produkcji i stan zdrowia krajowej populacji świń.

Konkludując stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Szymona Porowskiego pt. „Przydatność wybranych immunostymulatorów w ograniczaniu występowania mieszanych zakażeń u świń, poprawie wskaźników produkcyjnych oraz skuteczności profilaktyki swoistej w kontekście do zróżnicowanego przestrzegania zasad bioasekracji” odpowiada ustawowym wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2004 r. z późn. zm. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018r. poz. 1669). W związku z tym przedkładam Radzie Dyscypliny Weterynarii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 8.04.2022 r.

