

Prof. dr hab. Krzysztof Rypuła

Wrocław, 30 sierpnia 2023

Zakład Chorób Zakaźnych Zwierząt i Administracji Weterynaryjnej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Bolesława Gąsiorka
pt.: **„Podstawy immunologicznego postępowania u nerek zakażonych wirusem choroby
aleuckiej (AMDV) w celu minimalizowania strat hodowlanych“**
wykonanej w Katedrze Epizootiologii i Klinice Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny
Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem
dr hab. Andrzeja Jakubczaka, profesora uczelni i
dr wet. Andrzeja Żmudy - promotora pomocniczego.

Podstawą wykonania recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 29 czerwca 2023 dotycząca wykonania recenzji rozprawy doktorskiej lek. wet. Bolesława Gąsiorka pt. „Podstawy immunologicznego postępowania u nerek zakażonych wirusem choroby aleuckiej (AMDV) w celu minimalizowania strat hodowlanych“.

Podjęty przez Doktoranta temat jest ważny, ponieważ choroba aleucka (AD) stanowi największe zagrożenie dla zdrowia i życia nerek utrzymywanych w hodowlach na wolnym wybiegu, jak i na fermach hodowlanych na całym świecie. Wirus powodujący tę chorobę stanowi zagrożenie również dla zdrowia innych zwierząt zaliczanych do rodziny łasicowatych, w tym dzikich nerek, łasic, borsuków. Mimo wielu lat, które minęły od pierwszego opisu choroby do dziś nie udało się opracować jednego wspólnego programu zwalczania tego zakażenia i co byłoby najlepszym rozwiązaniem – szczepionki p/ko AD, której próby stworzenia prowadzone są przez wiele ośrodków naukowych na świecie.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi wielopłaszczyznowe spojrzenie na diagnostykę zakażeń powodowanych przez wirus choroby aleuckiej u nerek hodowlanych (*Neovision vision*), który powoduje wymierne straty w wielkotowarowej hodowli nerek.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z 9 rozdziałów obejmujących: Wstęp, Hipotezę i cel badań, Materiał i metody, Omówienie wyników badań i dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo liczące 170 pozycji oraz Spis treści i Streszczenie w języku polskim

i angielskim znajdujące się na pierwszych stronach dysertacji. Na całość pracy doktorskiej składa się:

- 117 stron tekstu w formie wydruku komputerowego,
- 9 tabel,
- 46 rycin,
- 2 fotografie,
- 170 pozycji piśmiennictwa.

Rozdział Wstęp składa się ośmiu podrozdziałów. W pierwszych podrozdziałach Doktorant przedstawił aktualne poglądy na etiologię, patogenezę procesu chorobowego choroby aleuckiej u nerek wraz z opisem mechanizmów zakażenia na poziomie komórki i produkowanych mediatorów. W kolejnych podrozdziałach przedstawił postęp badań nad stworzeniem skutecznej immunoprofilaktyki oraz mechanizmy odporności humoralnej i komórkowej towarzyszące zakażeniu AMD. Ostatni podrozdział poświęcił diagnostyce zakażeń AMD, wadach i zaletach stosowanych w codziennej praktyce metodach diagnostycznych. W tym podrozdziale przypomniał Autor dokonania w tym obszarze profesora Krzysztofa Kostro – byłego pracownika Katedry, w której Doktorant realizował badania.

W rozdziale Cel i uzasadnienie badań Doktorant uzasadnia celowość podjęcia badań, formułując je w postaci 5 punktów, które w toku realizowanych zadań pozwolą na ocenę stanu zdrowia nerek zakażonych bezobjawowo AMDV. W oparciu o pozyskany materiał diagnostyczny Doktorant planuje określić poziom przeciwciał w komercyjnym teście ELISA (wykorzystywany do brakowania zwierząt w stadach zakażonych, w których występuje AMD) i przeprowadzić badania z wykorzystaniem technik biologii molekularnej i cytometrii przepływowej.

Metodykę badań przedstawił Doktorant w rozdziale „Materiał i metody“, w którym opisał miejsce w którym prowadzono doświadczenie, ilość próbek pozyskanych do badań (krew, 72 samice, w wieku 2 lat), które podzielono na 3 grupy doświadczalne i grupę kontrolną oraz zastosowane metody diagnostyczne: test ELISA i qPCR oraz metody analityczne: analiza uzyskanych produktów sekwencjonowania (porównanie uzyskanych sekwencji i stworzenie drzewa filogenetycznego), cytometria przepływowa (określenie aktywności fagocytarnej granulocytów i fagocytów, określenie aktywności metabolicznej granulocytów). Badania hematologiczne zostały zlecone firmie IDEXX. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej: test Duncana, test Pearsona oraz analiza regresji wielokrotnej.

Wyniki przeprowadzonych badań i analiza uzyskanych danych podsumowane zostały w punkcie 7, w którym Doktorant wyznaczył Ct (cykl progowy, który piszemy Ct a nie CT – str. 50), który mimo braku różnic statystycznych był najwyższy dla zwierząt w grupie III. Skonstruował drzewo filogenetyczne dla izolatów AMDV z badanej fermi nerek wskazując, że izolaty są najbardziej zbliżone do sekwencji pochodzących od nerek dzikich i z terenu wielkopolski oraz pomorza. Natomiast cechuje je duża odrębność genetyczna w stosunku do wariantów AMDV z regionu wschodniej i południowo-wschodniej Polski.

W kolejnym etapie badań Doktorant określił aktywność fagocytarną granulocytów, monocytów krwi obwodowej oraz metabolizm tlenowy granulocytów. Wykazał, że średni metabolizm tlenowy granulocytów krwi obwodowej po aktywacji chemiluminescencji drogą pozareceptorową (PMA) był statystycznie niższy w grupach doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej oraz wyższy statystycznie odsetek limfocytów CD14+, CD21+, CD11M, CD18+, monocytów CD11b+i CD18+ i granulocytów CD18+ w grupach doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Odwrotną sytuację obserwował dla limfocytów CD11b+.

Badania biochemiczne wykazały statystycznie średnie niższe poziomy albumin, całkowitej liczby krwinek czerwonych, koncentracji hemoglobiny w grupach zwierząt doświadczalnych w odniesieniu do grupy kontrolnej i wyższe średnie poziomy leukocytów, monocytów w grupach doświadczalnych. Pozostałe oceniane parametry krwi obwodowej i wskaźniki biochemiczne nie były statystycznie istotne między grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną.

Ostatnim punktem realizowanych badań była analiza korelacji Pearsona oraz równanie regresji liniowej i wielokrotnej porównująca wartości gęstości optycznej (OD) z wynikami badań hematologicznych, biochemicznych i cytometrii przepływowej. Całość wyników autor odniósł w dyskusji do dostępnych w obszarze realizowanych badań publikacji.

Z przeprowadzonych badań Doktorant uzyskał 8 stwierdzeń i wniosków będących podsumowaniem realizowanych założeń pracy doktorskiej. Zdaniem recenzenta stwierdzenia, przemyślenia, wątpliwości, sugestie powinny być umieszczone w rozdziale wyniki i dyskusja, a wnioski to punkt w którym piszący podsumowuje swoje dokonania. Można przedstawione przez Doktoranta 8 punktów złożyć w 4 lub 5 jasnych wniosków będących podsumowaniem realizowanych badań.

Rozprawa doktorska lek. wet. Bolesława Gąsiorka napisana jest starannie, jasno i nie nasuwa trudności w zrozumieniu intencji przy planowaniu i realizowaniu poszczególnych zadań badawczych. Zamieszczone w pracy ryciny oraz tabele uzupełniają zaprezentowane wyniki badań, a piśmiennictwo jest aktualne, prawidłowo dobrane i wykorzystane przez Doktoranta w przedłożonej do oceny dysertacji.

Po przeczytaniu pracy mam pytania do Doktoranta:

- na ile założony podział zwierząt na grupy doświadczalne, a w terenie typujący zwierzęta na zakażone i niezakażone w oparciu o badanie testem ELISA (wynik od „-“ do „++++“) jest badaniem i podziałem „dobrym“ oraz obiektywnym w kontekście uzyskanych wyników badań molekularnych i analizowanych wykorzystując cytometr przepływowy?
- dlaczego wyniki badań serologicznych testem ELISA zostały zamieszczone po wynikach uzyskanych w qPCR i sekwencjonowaniu, skoro one były podstawą podziału na grupy doświadczalne i do nich odnoszono wartości Ct w qPCR?

Z obowiązku Recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na błędy, które powinny być uwzględnione przed oddaniem pracy do druku:

- brak jest punktu skróty użyte w dysertacji, z pewnością ułatwiłoby to czytanie i wszystkie skróty użyte w tekście miałyby swój opis np. str. 63 ...“po akatwacji PMA u norek“... i str.

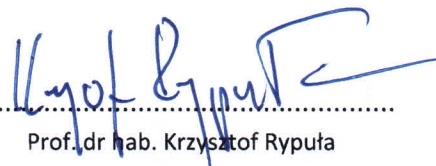
- 96 - OD, str. 97 – QTY, str 100 – Ct, i kolejnych stronach. Wielokrotnie powtarzana jest nazwa/opis i skrót;
- str. 10 – w tekście jest: ...“zawleczenie wirusa na fermy”... raczej „wprowadzenie wirusa“, wlecze się zwykle coś za sobą, jest to określenie potoczne;
 - str. 14 – w tekście wielokrotnie używany jest wyraz ...„infekcji“..., tak słownik języka polskiego akceptuje takie sformułowanie, jednak w języku polskim mamy słowo „zakażenie“, tak samo w fazie ...“po infekcyjnej“..., a zdecydowanie lepiej brzmi „po zakażeniu“;
 - str. 15 i 19 – ...“wirusa AMDV“..., określenie AMDV mówi nam, że omawiamy wirus AMD, oraz ...“infekcja wirusem AMDV“..., tak samo zakażenie wirusem AD lub AMD;
 - str. 20 – ...“infekcje chroniczne“..., jeśli to zakażenia przewlekłe, a określenie ...“persistent infection“... używa się do określenia zakażenia trwałego. To określenie używa się min. do opisanego zakażenia trwałego BVDV;
 - str. 21 i 22 – ...“po challenge wirusem“..., raczej po zakażeniu wirusem w warunkach doświadczalnych;
 - str. 22 – ...“szczepionka skutecznie infekowała hodowle komórkowe“..., raczej działanie szczepionki jest inne. Proszę o wyjaśnienie intencji;
 - str. 23 – w zdaniu na początku autor powołuje się na badania Potter et al ... i na końcu mamy cytaty [Potter i in. 1984], ponadto Autor przyjął jakąś logikę cytowań i powinna ona być zgodna dla całego tekstu i nie raz ...“et al.“..., a raz ... „i in.“...;
 - str. 25 – w tekście wielokrotnie używane jest sformułowanie ...„specyficzne przeciwciała“..., a powinno być ...“swoiste przeciwciała“...;
 - str. 26 – ... „po zainfekowaniu norki“... raczej po zakażeniu norki/norek;
 - str. 26 – ...“terminalnych fazach choroby“... Proszę o wyjaśnienie;
 - str. 34 – na pewno polakami nie byli Y. Li oraz A. Prieto, którzy zostali wymienieni jako polscy autorzy, którzy wykorzystali technikę PCR do wykrywania materiału genetycznego wirusa AMD;
 - str. 53 – powtarzanie wyrazów ...“zaprojektowanie“...;
 - str. 53 – kopiując tekst Doktorant winien zadbać o jednolity charakter czcionki w wersji ostatecznej manuskryptu;
 - str. 53 – proszę o wyjaśnienie sformułowania ...“patogenność pośrednia“...;
 - str. 55 – na rycinie 12 powinno być zaznaczone w ramce lub obok, które badane sekwencje są izolatami własnymi, to ułatwiłoby zrozumienie wykresu;
 - str. 96 – zapewne nie określenie ...“czynniki biochemiczne“..., a parametry biochemiczne;
 - str. 119 –...“miano anty-wirusowe w teście ELISA“ Proszę o wyjaśnienie?;
 - str. 129 – Doktorant wielokrotnie używa w pozycjach piśmiennictwa rok po nazwiskach i imionach autora/ów i po raz drugi na końcu. Np pozycja 22 – Best i wsp. 2002 lub pozycja 27 Bloom i wsp.

Wymienione błędy niestety ujmują ocenie ogólnej pracy, ponieważ wielokrotnie się powtarzają.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Bolesława Gąsiorka pt.: „Podstawy immunologicznego postępowania u nerek zakażonych wirusem choroby aleuckiej (AMDV) w celu minimalizowania strat hodowlanych” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 z późn. zm. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 poz. 1669) przedstawiam zatem Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pana lek. wet. Bolesława Gąsiorka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 30 sierpnia 2023


.....
Prof. dr hab. Krzysztof Rypuła