
AUTOREFERAT

dr n. wet. Andrzej Puchalski

Zakład Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków

Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

LUBLIN 2019

1. Imię i Nazwisko

Andrzej Puchalski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2001 Stopień naukowy: **doktor nauk weterynaryjnych w zakresie chorób zakaźnych zwierząt**, nadany uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie w dniu 25 października 2001 roku; tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka białek błony zewnętrznej terenowych szczepów *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* oraz możliwość ich wykorzystania w swoistej immunoprofilaktyce syndromu oddechowego cieląt” (promotor: dr hab. Andrzej Wernicki).

1991 Tytuł: **lekarz weterynarii**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.12.2018 *Starszy wykładowca* w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej do chwili i Chorób Ptaków Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób obecnej Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

01.03.2002– *Adiunkt* w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków –30.11.2018 Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie (do 2008 r. Akademia Rolnicza)

01.10.1996– *Asystent* w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków –28.02.2002 Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie

01.07.1991– *Starszy technik* w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej Instytutu –30.09.1996 Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie

4. Wskazane osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Syntetyczne oligodeoksynukleotydy klasy C z niemetylowanymi sekwencjami CpG jako składnik zwiększający immunogenność komercyjnej szczepionki dla cieląt zawierającej antygen IROMP *Mannheimia haemolytica*

b) dane bibliograficzne osiągnięcia

Autor: Andrzej Puchalski

Pracę opublikowano w Wydawnictwie Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w serii Rozprawy Naukowe, Zeszyt 396, 2019 r.,

ISSN 978-83-7259-287-7

ISSN 978-83-7259-288-0 on-line

Recenzenci:

prof. dr hab. Dariusz Bednarek, Zakład Chorób Bydła i Owiec Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

dr hab. Jarosław Kaba, prof. nadzw. SGGW w Warszawie, Samodzielna Pracownia Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Udział własny: *mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu i metodyki badań, zebraniu materiału do badań, wykonaniu badań laboratoryjnych służących do zebrania wyników badań, statystycznym opracowaniu wyników badań oraz ich interpretacji, napisaniu manuskryptu pracy. Mój udział procentowy oceniam na 100%.*

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

I. Wprowadzenie

Syndrom oddechowy bydła (BRDC – bovine respiratory disease complex) stanowi jeden z bardziej istotnych problemów zdrowotnych w odchowcie cieląt i młodego bydła opasowego. Straty ekonomiczne, wynikające z występowania tego syndromu, ponoszone przez światową branżę hodowców bydła szacowane są na ponad 3 miliardy dolarów rocznie [Potter 2015]. W krajach Unii Europejskiej wydatki na profilaktykę i terapię tego schorzenia ocenia się na około 600 mln euro rocznie [Barrett 2000]. W złożonej etiologii syndromu, istotną rolę odgrywają zarówno czynniki wirusowe: syncytialny wirus oddechowy bydła (BRSV), wirus parainfluenzy 3 (PI3V), wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MDV), herpeswirus bydła typ 1 (BHV-1), jak i czynniki bakteryjne: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* i *Mycoplasma bovis* [Confer 2009, Ellis 2009]. Z wymienionych czynników zakaźnych na szczególną uwagę zasługuje *M. haemolytica* serotyp 1, odpowiedzialna za najciężej przebiegające postaci kliniczne syndromu, kończące się zwykle szybkim zejściem śmiertelnym [Klima i in. 2014, Potter 2015].

Poza maksymalnym ograniczeniem czynników stresowych, zasadniczą rolę w programach profilaktyki BRDC odgrywają metody immunologiczne. Trudności we wdrażaniu efektywnej immunoprofilaktyki tego schorzenia wynikają głównie z niskiej skuteczności dostępnych na rynku preparatów szczepionkowych. Szczepionki, powszechnie stosowane w immunoprofilaktyce syndromu, uzyskiwane są głównie metodami konwencjonalnymi. Ta grupa preparatów reprezentowana jest najczęściej przez inaktywowane wirusy i bakterie. Ich skuteczność jest jednak znikoma i w dużym stopniu uzależniona od rodzaju stosowanego adiuwanta. Drugą grupę szczepionek komercyjnych stosowanych w immunoprofilaktyce swoistej BRDC stanowią szczepionki podjednostkowe. Najprostsze pod względem technologii produkcji, a zarazem najbardziej efektywne szczepionki podjednostkowe zawierają oczyszczone i inaktywowane toksyny bakteryjne lub inne immunogenne składowe komórki bakteryjnych, takie jak np. białka błony zewnętrznej *M. haemolytica* kontrolowane jonem żelaza (IROMP) [Tucci i in. 2016]. Białka te pojawiają się w błonie zewnętrznej komórki bakteryjnej w warunkach niedoboru jonów żelaza i współzawodniczą o ten pierwiastek z glikoproteinami obecnymi w organizmie gospodarza. W przypadku *M. haemolytica* funkcję tę spełniają białka o masie około 71, 77 i 100 kDa [Ogunnariwo

i Schryvers 1990]. Funkcjonują one jako receptor dla kompleksów zawierających jony żelaza, odgrywając ważną rolę w ich transporcie do wnętrza komórki bakteryjnej. Szczepionki podjednostkowe, choć wysoce bezpieczne, charakteryzują się stosunkowo niską immunogennością. Uzyskanie pozytywnego efektu uodparniania wymaga przeważnie zastosowania skomplikowanego trzystopniowego schematu szczepień. Zwiększenie skuteczności działania szczepionek podjednostkowych można osiągnąć stosując precyzyjnie wyselekcjonowane adiuwanty. Mogą one nieswoiście pobudzać komórki układu immunologicznego i przyczyniać się do wydajniejszego pochłaniania oraz prezentacji antygeny. Dobierając odpowiedni adiuwant, albo mieszaninę adiuwantów, uzyskać można odpowiedź immunologiczną o określonym typie Th1 i/lub Th2. Powszechnie stosowane w szczepionkach adiuwanty na bazie soli glinu, prowadzą do powstania odporności głównie typu humoralnego, angażującej limfocyty pomocnicze Th2.

Jako potencjalne adiuwanty, wzmacniające komórkową gałąź odpowiedzi immunologicznej w stosunku do antygenów szczepionkowych, mogłyby zostać wykorzystane syntetyczne oligodeksynukleotydy naśladujące w działaniu bakteryjne DNA. Skuteczność syntetycznych oligodeksynukleotydów, zawierających niemetylowane sekwencje cytozyny-guaniny (CpG ODN) w stymulacji układu immunologicznego, została potwierdzona na wielu modelach zwierzęcych i u ludzi [Chaung, 2006, Vollmer i Krieg, 2009].

Immunostymulujące działanie bakteryjnego DNA oraz CpG ODN przypisano określonym palindrowym sekwencjom, zawierającym niemetylowane dinukleotydy cytozyny-guaninowe, umieszczone zazwyczaj w sąsiedztwie dwóch zasad purynowych od końca 5' i dwóch pirymidynowych od końca 3'. W genomie bakterii motywy CpG występują z częstością 1/16 par zasad podczas gdy u kręgowców 1/64 par zasad. Dodatkowo, około 75% sekwencji CpG u kręgowców jest metylowana w pozycji cytozyny, co zapobiega aktywacji układu immunologicznego przez DNA gospodarza. Natomiast bakteryjny DNA zawiera prawie wyłącznie dinukleotydy CpG niemetylowane [Krieg i in. 1995]. Za rozpoznanie niemetylowanych motywów CpG odpowiedzialny jest wewnątrzkomórkowy receptor TLR9 należący do receptorów Toll-podobnych [Hemmi i in. 2000], a jedynymi ludzkimi komórkami odpornościowymi, które konstytutywnie wyrażają ekspresję receptora TLR9 są plazmocytoidalne komórki dendrytyczne i limfocyty B [Iwasaki i Medzhitov 2004]. Wiązanie CpG ODN do TLR9 indukuje rekrutację białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału, a głównym białkiem adaptorowym w kaskadzie sygnalizacyjnej jest białko adaptorowe MyD88 [Latz i in. 2007]. Powstały aktywny czynnik transkrypcyjny NF-κB wnika do jądra komórkowego i indukuje ekspresję odpowiednich genów dla cytokin prozapalnych, molekuł

adhezyjnych i regulatorów wzrostu niezbędnych do proliferacji i różnicowania wielu komórek układu immunologicznego [Biswas i Tergaonkar 2007].

Tylko limfocyty B, komórki prezentujące antygen (APC) oraz monocyty i makrofagi reagują bezpośrednio na niemetylowane sekwencje CpG obecne w bakteryjnym DNA lub syntetycznych oligodeoksynukleotydach. Natomiast aktywacja komórek NK i limfocytów T pod wpływem CpG DNA ma charakter pośredni i zachodzi pod wpływem cytokin uwalnianych głównie przez komórki APC [Wilson i in. 2006]. CpG klasy B ODN indukuje komórki B do wejścia w fazę G1 cyklu komórkowego i stymuluje wydzielanie w ciągu kilku godzin IL-6 i IL-10 [Yi i in. 1996]. Oprócz wzrostu wydzielania cytokin i immunoglobulin, limfocyty B aktywowane przez CpG wykazują zwiększenie ekspresji genów dla receptorów Fcγ i cząsteczek kostymulacyjnych, takich jak MHC klasy II, CD80 i CD86 [Hartmann i Krieg 2000]. Wśród różnych subpopulacji komórek dendrytycznych, wyraźnie wykazano, że tylko plazmacytoidalne DC wykazują silną ekspresję receptorów TLR 9 i mogą być bezpośrednio aktywowane przez niemetylowane sekwencje CpG [Kadowski i in. 2001]. Pod ich wpływem dochodzi do wzrostu ekspresji cząsteczek powierzchniowych MHC klasy II, ICAM-1 oraz cząsteczek kostymulacyjnych CD40, CD54, CD80 i CD86 [Krieg 2002]. Ludzkie monocyty krwi obwodowej nie wykazują ekspresji receptorów TLR-9 i w związku z tym nie mogą być bezpośrednio aktywowane przez CpG ODN [Kadowaki i in. 2001], niemniej jednak bakteryjne DNA wtórnie powoduje wzrost ekspresji cząsteczek CD40 i CD69 na tych komórkach oraz zwiększone wytwarzanie IL-6 i TNF-α, [Krieg 2000]. Aktywacja komórek NK oraz limfocytów T pod wpływem CpG DNA ma charakter pośredni i zachodzi pod wpływem cytokin uwalnianych przez komórki APC [Krieg 2002].

Syntetyczne oligodeoksynukleotydy, zawierające niemetylowane sekwencje CpG pod względem budowy chemicznej i zdolności do indukowania odmiennych reakcji układu odpornościowego dzieli się na 3 podstawowe klasy: CpG-A, CpG-B i CpG-C [Vollmer 2004]. Charakterystyczną cechą ODN klasy A określanej również jako typ D [Verthelyi i in. 2001], jest ich zdolność do stymulowania wysokiej produkcji IFN-α przez plazmacytoidalne komórki dendrytyczne oraz aktywowania komórek NK. Ograniczona jest natomiast ich zdolność do aktywacji limfocytów B [Marshall i in. 2003]. ODN klasy A składają się z mieszanego szkieletu fosforodiestrowego (PO) i fosforotionianowego (PS). Przy szkielecie PS na końcach 5' i 3' obecne są sekwencje bogate w nukleotyd guanylowy. W centralnej części, stanowiącej szkielet PO obecne są palindromowe sekwencje zawierającą przynajmniej jeden motyw dinukleotydowy CpG [Vollmer i in 2004]. Klasa B ODN, określana również jako typ K, zawiera liniową, niepalindromową sekwencję CpG. Zbudowana jest z nukleazo-

opornego szkieletu fosfotioestrowego, co powoduje, że jest ona bardziej stabilna niż klasa A [Klinman i in. 2002]. ODN klasy B indukują sekrecję niewielkich ilości IFN typu I, natomiast bardzo silnie pobudzają dojrzewanie plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych, co objawia się wysoką ekspresją MHC klasy II i cząsteczek kostymulujących. Wywołują również silną proliferację limfocytów B [Krieg 2006]. ODN klasy C w sposób dogodny łączy w sobie właściwości ODN klasy A i klasy B, indukując jednak znacznie wyższe ilości IFN- α w porównaniu do ODN klasy B razem z jednoczesną aktywacją limfocytów B porównywalną do klasy B [Jurk i in. 2004]. Klasa C składa się ze stymulacyjnego heksamerowego motywu CpG umieszczonego na/lub w pobliżu końca 5' i połączonego przez tyminę z sekwencją palindromową bogatą w GC [Vollmer i in. 2004].

Szeroki zakres oddziaływania zarówno bakteryjnego DNA, jak i CpG ODN na komórki układu immunologicznego, sprawia, że od wielu lat trwają badania nad możliwością ich wykorzystania jako adiuwanta szczepionkowego oraz w immunoterapii alergii, nowotworów i chorób zakaźnych. Stymulowanie za pomocą CpG ODN mechanizmów wrodzonej odporności, przyczynia się do polepszenia zarówno humoralnej, jak i komórkowej odpowiedzi swoistej względem antygeny szczepionkowego. Mechanizmy, wpływające na silną aktywność adiuwantową CpG ODN w wywoływaniu humoralnej odpowiedzi immunologicznej, związane są z ich bezpośrednim wpływem na limfocyty B [Krieg i in. 1995]. Wyraża się to, m.in. poprzez pobudzenie podziałów dziewiczych limfocytów B i ich różnicowanie się w komórki plazmatyczne i w komórki pamięci immunologicznej oraz hamowanie procesu spontanicznej apoptozy tych limfocytów, co przekłada się bezpośrednio na wzrost ich przeżywalności [Yi i in. 1999]. Poprzez synergistyczne oddziaływanie TLR9 z receptorami BCR przyspieszony jest proces dojrzewania odpowiedzi immunologicznej, wyrażający się przełączeniem klas wytwarzanych immunoglobulin oraz wzrostem ich powinowactwa względem antygeny szczepionkowego [He i in. 2004]. Zdolność CpG ODN do zwiększania specyficznej dla antygeny odpowiedzi komórkowej jest pośrednią konsekwencją ich wpływu na plazmocytoidalne komórki dendrytyczne, które poprzez uwalnianie cytokiny promują rozwój odpowiedzi Th1-zależnej [Lipford i in. 2000].

Kluczowe dla wywołania optymalnej odpowiedzi immunologicznej względem antygeny szczepionkowego jest ściśle powiązanie między tym antygenem a CpG ODN [Vollmer i Krieg 2009]. Koniugacja syntetycznych oligodeoksynukleotydów do pewnych antygenów przyczynia się do preferencyjnego ich pobierania przez profesjonalne komórki APC oraz zmniejsza wymagania dotyczące samego antygeny [Tighe i in. 2000]. Alternatywnie, aktywność adiuwantową CpG ODN można znacznie poprawić przez podawanie ich razem

z innymi adiuwantami lub preparatami, takimi jak mikrocząsteczki, nanocząsteczki czy emulsje lipidowe [McCluskie i Krieg 2006, Vollmer i Krieg 2009]. Takie połączenia przyspieszają indukcję swoistej odpowiedzi immunologicznej i generują wytwarzanie wysokich mian przeciwciał ochronnych, od 10 do 1000 razy większych niż w przypadku podania samego antygeny [Gursel i in. 2001, Klinman 2006]. Adiuwanty oparte na CpG ODN poprawiają również parametry swoistej komórkowej odpowiedzi immunologicznej poprzez wyraźny wzrost zarówno liczby, jak i przeżywalności limfocytów T CD8+ [Overstreet i in. 2010]. Znaczemu wydłużeniu ulega również czas trwania odpowiedzi immunologicznej [Crompton i in. 2008, Tross i Klinman 2008]. Połączenie CpG ODN z innymi adiuwantami zwiększa wytwarzanie cytokin, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju odpowiedzi immunologicznej optymalizując w ten sposób działanie szczepionki. Dochodzi, m.in. do indukcji wydzielania IFN- α oraz zwiększenia wytwarzania IFN- γ i TNF- α . Te trzy cytokiny biorą udział we wrodzonych i nabytych mechanizmach odpowiedzi immunologicznej i kierują rozwojem odpowiedzi Th1-zależnej [Kovacs-Nolan i in. 2009b].

Opublikowano kilkaset przedklinicznych badań oceniających immunogenność szczepionek przeciwko różnym patogenom, w których jako adiuwant występował CpG ODN klasy B [Klinman 2006, Vollmer i Krieg 2009, Bode i in. 2011]. Większość tych badań została wykonana z wykorzystaniem szczepionek podawanych podskórną. Są też doniesienia potwierdzające skuteczność takich szczepionek podawanych domięśniowo [Nesburn i in. 2005, Tosi i in. 2018] oraz na błonę śluzową nosa lub tchawicy [Gallichan i in. 2001, Nichani i in. 2007, Muangthai i in. 2018], pochwy [Kwant i Rosenthal 2004] oraz jamy ustnej [McCluski i in. 2000, Eastcott i in. 2001].

Niektóre strategie szczepień obejmują stosowanie w jednej szczepionce wielu antygenów jednocześnie lub antygenów, które są trudne i drogie w przygotowaniu. W tych przypadkach uzasadnione jest wykorzystanie adiuwantów, które umożliwiłyby zmniejszenie dawki antygeny szczepionkowego potrzebnej do wywołania ochrony, z jednoczesną możliwością obniżenia kosztów i poprawą bezpieczeństwa. Taki efekt może być niezwykle istotny w szczepionkach przeciwko grypie, w przypadku których można byłoby ograniczyć produkcję odpowiednich ilości nowej szczepionki do szczepu pandemicznego [Vollmer i Krieg 2009].

Ważną korzyścią stosowania terapeutycznego CpG ODN jest ich zdolność do zwiększania odporności w grupach z osłabionym adaptacyjnym układem odpornościowym (noworodki, osobnicy geriatryczni oraz ze zdiagnozowaną immunosupresją). W populacjach tych trudności w wywoływaniu silnych odpowiedzi swoistych dla patogenów stanowią

przeszkodę w dążeniu do osiągnięcia „odporności stada”. Badania przedkliniczne i kliniczne wykazują, że CpG ODN mogą zwiększać odporność u osobników z osłabionym adaptacyjnym układem odpornościowym [Wilson i in. 2006, Vollmer i Krieg 2009, Bode i in. 2011].

Właściwości adiuwantowe CpG ODN, obserwowane u zwierząt o kompetentnym układzie odpornościowym, wzbudziły zainteresowanie ich potencjałem w poprawie odpowiedzi u starszych zwierząt, u których rozwinęły się defekty odporności komórkowej i humoralnej [Bode i in. 2011]. Szczepionki dla osób starszych muszą kompensować te zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Zaobserwowano, że dodanie CpG ODN znacząco zwiększa immunogenność szczepionki u myszy geriatrycznych i przywraca pierwotne działanie komórek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną do poziomów stwierdzanych u młodszych zwierząt [Qin i in. 2004, Sen i in. 2006].

Noworodki są nie tylko podatne na infekcje, ale także rozwijają słabe odpowiedzi immunologiczne na większość konwencjonalnych szczepionek i mają trudności z ugruntowaniem komórkowej odpowiedzi immunologicznej z powodu upośledzonej zdolności komórek T do wydzielania IL-12 i IFN- γ [Maródi 2006]. W wyniku zmian endokrynologicznych w czasie ciąży układ odpornościowy noworodków charakteryzuje się fizjologiczną nadreaktywnością limfocytów Th2 i wywołanie silnej odpowiedzi Th1-zależnej może być trudne. Innym problemem związanym ze szczepieniem noworodków jest możliwa interferencja istniejących przeciwciał matczynych z antygenem szczepionkowym. W związku z tym konwencjonalne szczepionki nie są w stanie indukować ochrony w obecności przeciwciał matczynych. Te niedobory aktywacji immunologicznej noworodków można pokonać przez zastosowanie immunostymulujących adiuwantów, takich jak CpG ODN [Siegrist 2003, Wilson i in. 2006].

II. Cel badań

Problem syndromu oddechowego bydła ze szczególnym uwzględnieniem udziału w nim bakterii *M. haemolytica* odgrywa istotną rolę w produkcji bydła mlecznego i opasowego. Poważne trudności we wdrażaniu skutecznej immunoprofilaktyki tego schorzenia, wynikające przede wszystkim z niskiej skuteczności dostępnych na rynku szczepionek, skłaniają do poszukiwania bardziej nowoczesnych preparatów do zwalczania BRDC. Jednym z takich działań jest możliwość wykorzystania syntetycznych oligodeoksynukleotydów zawierających niemetylowane sekwencje CpG jako potencjalnego składnika szczepionek zwiększającego działanie tradycyjnych adiuwantów w procesie immunizacji. W dostępnym piśmiennictwie

nie ma zbyt wiele doniesień poświęconych możliwości wykorzystania CpG ODN jako adiuwanta szczepionkowego w preparatach przeznaczonych dla bydła. Nieliczne publikacje dotyczą głównie szczepionek z antygenami doświadczałnymi lub antygenami patogenów wewnątrzkomórkowych, w których CpG ODN klasy B łączone było zazwyczaj z innymi adiuwantami [Zhang i in. 2003, Wedlok i in. 2005a, 2005b, Mapletoft i in. 2006, Kovacs-Nolan i in. 2009b, Chu i in. 2011].

W prezentowanych badaniach własnych zastosowano CpG ODN klasy C jako składnik adiuwanta w szczepionce przeznaczonej dla bydła, co jak należy podkreślić stanowi element nowatorski podejmowanych działań. CpG ODN zwiększają wielkość oraz przyspieszają rozwój zarówno humoralnej, jak i komórkowej odpowiedzi swoistej względem antygenów szczepionkowych. Charakterystyka nowych cząsteczek immunostymulujących, do których zaliczyć można CpG ODN klasy C, umożliwi połączenie związków adiuwantowych, które będą mogły addytywnie lub synergistycznie zwiększać lub modulować wytwarzanie cytokin, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju odpowiedzi immunologicznej, optymalizując w ten sposób działanie szczepionki.

Dlatego podjęcie badań nad wykorzystaniem CpG ODN klasy C, jako składnika zwiększającego immunogenność szczepionek u bydła jest uzasadnione, zarówno pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym. Uzyskane wyniki badań mogą przyczynić się do opracowania formuły szczepionki przeciwko BRDC pozwalającej indukować zarówno humoralną, jak i komórkową odpowiedź w stosunku do antygenów szczepionkowych. W praktyce powinno to ograniczyć zachorowania cieląt na choroby układu oddechowego. Mając powyższe na uwadze za cel badań przyjęto (1) określenie immunostymulacyjnych efektów CpG ODN klasy C w stosunku do bydlęcych PBMC w badaniach *in vitro* i porównanie ich do pozostałych klasy syntetycznych oligodeoksynukleotydów, dla których aktywność taka została już potwierdzona, (2) prześledzenie dynamiki kształtowania się odporności humoralnej i komórkowej po podaniu cielętom opracowanego biopreparatu celem jego porównania ze szczepionką komercyjną, (3) ocenę stopnia bezpieczeństwa stosowania CpG ODN klasy C jako dodatku do szczepionek dla cieląt.

III. Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 18 klinicznie zdrowych cielętach rasy HO (polska holsztyńsko-fryzyjska odmiana czarno-biała), w wieku 3-4 miesięcy, o średniej masie ciała 110,0 kg (SD=7,3 kg). Cielęta pochodziły z gospodarstwa rolnego hodowli krów mlecznych na terenie Lubelszczyzny i utrzymywane były w tradycyjnym cielętniku ściółkowym zgodnie

z zaleceniami Dyrektywy Rady 2008/119/WE ustanawiającej minimalne normy ochrony cieląt. Doświadczenie przeprowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie (Uchwała nr 78/2010)

Badania *in vitro*

W doświadczeniu wykorzystano oligodeoksynukleotydy zawierające niemetylowane sekwencje CpG należące do klasy A, B oraz C. Dla wszystkich CpG ODN została wcześniej potwierdzona ich aktywność immunostymulująca w stosunku do jednojądrzastych komórek krwi obwodowej u przeżuwaczy. Jako kontrolę ujemną zastosowano oligodeoksynukleotyd identyczny z ODN 2007, z wyjątkiem sekwencji CpG, które zastąpiono sekwencją GpC. Wszystkie oligodeoksynukleotydy były syntetyzowane, modyfikowane oraz oczyszczane w firmie Genomed S.A. ODN były następnie rozpuszczane (500 µg/ml) w sterylnej, wolnej od endotoksyn wodzie (Sigma) i przechowywane w temperaturze -80°C do czasu rozpoczęcia badań *in vitro*.

Lista oligodeoksynukleotydów (ODN) wykorzystanych w badaniach:

ODN	Klasa	Sekwencja (5'– 3')	Źródło
2216	A	ggGGGACGATCGTCggggg	Both i in. [2007]
8954	A	ggGGACGACGTCGTGggggg	Both i in. [2007]
2006	B	tcgtcgtttgcgttttgcgtt	Pontarollo i in. [2002]
2007	B	tcgtcgttgcgttttbcgtt	Pontarollo i in. [2002]
2429	C	tcgtcgtttcggcgcccg	Both i in. [2007]
2007GpC (K-)	B	tgctgcttgcttttgcgtt	Chu i in [2011]
Małe litery: szkielet fosforotionianowy; Wielkie litery: szkielet fosforodiestrowy			

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej bydła (PBMC) do badań *in vitro* izolowane były z krwi pobranej na heparynę (20U/ml krwi), od trzech cieląt z żyły szyjnej zewnętrznej. Rozdział komórek przeprowadzono metodą wirowania krwi w gradiencie gęstości Histopaque 1083 (Sigma). Oczyszczone komórki zawieszane były w podłożu RPMI 1640 z L-glutaminą (Biomed) z dodatkiem 2% (v/v) inaktywowanej płodowej surowicy bydlęcej, 50 µM 2-merkaptoetanolu, 100 IU/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny (Sigma).

Do oceny stopnia proliferacji stymulowanych PBMC wykorzystano komercyjny chemiluminescencyjny test ELISA z nieizotopowym znacznikiem 5-bromo-2'-dezyurydyną (Chemiluminescent BrdU ELISA kit-Roche Diagnostic). Poszczególne dołki zawierały odpowiednio 2, 5, 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$ ODN oraz podłoże RPMI bez ODN. Kontrolę dodatnią doświadczenia stanowiły dołki z 5 $\mu\text{g/ml}$ konkanawaliny A (ConA). Odczyt chemiluminescencji przeprowadzono w czytniku Luminescence Counter (1420, Victor 3; Perkin Elmer). Wyniki pomiaru podano w jednostkach cps (liczba fotonów na sekundę). Następnie obliczono indeks stymulacji (SI), dzieląc średnie wartości cps uzyskane dla komórek z hodowli stymulowanych przez średnie wartości cps limfocytów pochodzących z hodowli niestymulowanych. Do oceny stężenia IFN- γ w supernatantach hodowli jednojądrzastych komórek krwi obwodowej bydła stymulowanych przez CpG ODN wykorzystano komercyjny test ELISA (Bovine IFN- γ VetSet ELISA Development Kit – Kingfisher Biotech, Inc). Pomiaru absorbancji dokonywano w spektrofotometrze (Bio-Rad, model 680), przy długości fali 450 nm.

W reakcjach Real-Time PCR oceniono ekspresję genów dla cytokin charakterystycznych w odpowiedzi Th1-zależnej i Th2-zależnej oraz genów dla IP-10 i TLR9. Kontrolę endogenną stanowił gen referencyjny kodujący β -aktynę.

Lista starterów użytych w reakcji Real-Time PCR:

Gen	Sekwencja (5'– 3')	Wielkość produktu (bp)	Źródło
β -aktyna	F – CCTTTTACAACGAGCTGCGTGTG R – ACGTAGCAGAGCTTCTCCTTGATG	391	Chu i in. [2011]
IFN- α	F – ACTTCCACAGACTCACTCTC R – CTCCTGAAACTCTCCTGCAA	418	Chu i in. [2011]
IFN- γ	F – TTCAGAGCCAAATTGTCTCC R – CTGGATCTGCAGATCATCCA	185	Chu i in. [2011]
TFN- α	F – TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGC R – CCATGAGGGCATTGGCATAAC	104	Lahouassa i wsp. [2007]
IL-4	F – GGATGGCCACACCCTGAAG R – AGCCCATGCCATTAAAGTGACA	466	Peli i wsp. [2003]
IL-6	F – TCATTAAGCGCATGGTCGACAAA R – TCAGCTTATTTCTGCCAGTGTCT	105	Chu i in. [2011]
IL-12	F – TTATTGAGGTCGTGGTAGAAGCTG R – GGTCTCAGTTGCAGGTTCTTGG	115	Chu i in. [2011]
IL-21	F – CAGTGGCCCATTAAGTCAAGC R – TACATCTTCTGGAGCTGGCA	137	Chu i in. [2011]
IP-10	F – AAGTCATTCTGCAAGTCAATCCT R – TTGATGGTCTTAGATTCTGGATTCTAG	103	Tauber i wsp. [2006]
TLR9	F – TGGCTGTTCTCTGAAGTCTGT R – AAGTGGTGGATGCGGTTGGA	169	Chu i in. [2011]

Ekspresję każdego genu (względny współczynnik ekspresji badanego genu w próbie nieznanej - R) określano na podstawie równania:

$$R = \frac{(E_{\text{gen badany}})^{\Delta Ct_{\text{gen badany (kontrola-próba)}}}}{(E_{\text{gen kontrolny}})^{\Delta Ct_{\text{gen kontrolny (kontrola-próba)}}}}$$

$E_{\text{gen badany}}$ – wydajność powielania genu badanego; $E_{\text{gen kontrolny}}$ – wydajność powielania genu kontrolnego; $Ct_{\text{gen badany}}$ - różnica cykli progowych wyznaczonych dla genu badanego w próbie kalibracyjnej i nieznanej; $Ct_{\text{gen kontrolny}}$ – różnica cykli progowych PCR genu kontrolnego między próbą kalibracyjną i nieznaną.

W badaniu cytometrycznym określono typy komórek, które w największym stopniu ulegały immunostymulującym właściwościom CpG ODN. Oznaczono odsetek PBMC z podziałem na limfocyty T ($CD2^+$), limfocyty B ($CD21^+$) oraz monocyty ($CD14^+$) w 0 i 4 dniu doświadczenia. W badaniu tym użyto komercyjnego panelu mysich przeciwciał monoklonalnych (MCAs) koniugowanych z FITC (izotiocyjanian fluoresceiny) specyficznych dla leukocytów bydła (Serotec). Zastosowano MCAs anti: CD2 (MCA833F, klon hybrydoma – CC55), CD21 (MCA1424F, klon hybrydoma – CC21), CD14 (MCA2678, klon hybrydoma – CC-G33). Właściwe oznaczenie wymienionych markerów powierzchniowych wykonano przy użyciu cytometru przepływowego (flow cytometer Epis XL, Beckman-Coulter, Florida USA) stosując jednostopniowe znakowanie komórek. Wyniki przedstawiono w postaci odsetka PBMC wykazujących ekspresję poszczególnych cząsteczek powierzchniowych.

Białka IROMP wykorzystane w testach ELISA do określenia poziomu przeciwciał swoistych w stosunku do antygeny szczepionkowego, a także w teście Western Blotting, wyekstrahowane były z referencyjnego szczepu *M. haemolytica* serotype A1 ATCC BAA-410 według procedury opracowanej przez Morton i in. [1996].

Badania in vivo

W doświadczeniu wykorzystano komercyjną, poliwalentną szczepionkę Bovilis® Bovipast RSP (Intervet), zawierającą poza BRSV i IP3V, inaktywowane bakterie *M. haemolytica* A1, namnożone wcześniej w warunkach ograniczonej dostępności jonów żelaza, co doprowadziło do ekspresji w ich błonie zewnętrznej białek IROMP. Jako adiuwant w szczepionce producent zastosował wodorotlenek glinu oraz Quil A.

Cielęta podzielono na 3 grupy doświadczalne ($n=6$):

- Grupa I otrzymywała 5 ml szczepionki połączonej z 0,5 mg CpG ODN klasy C [Zhang i in. 2003];

- Grupa II otrzymywała samą szczepionkę (5 ml);
- Grupa III (kontrola) otrzymywała rozcieńczony dwukrotnie wodorotlenek glinu (5 ml).

Zwierzęta szczepiono dwukrotnie w odstępie 14 dni, w iniekcjach podskórnych wykonanych w fałd szyjny, topograficznie blisko miejsca lokalizacji węzłów chłonnych szyjnych powierzchniowych. W celu uzyskania surowicy, krew pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej w dniach podania szczepionki oraz 7, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 i 70 dnia po pierwszej iniekcji. Uzyskane według standardowych metod surowice przechowywano do chwili wykonania oznaczeń w temp. -20°C . Przez cały okres doświadczenia u wszystkich cieląt dokonywano codziennej obserwacji stanu zdrowia oraz rejestracji ciepłoty wewnętrznej ciała (c.w.c.).

Ocenę kształtowania się poziomów przeciwciał swoistych wykonano testem ELISA na podstawie analizy wartości absorbancji (OD) surowic uzyskanych od szczepionych cieląt. Do poszczególnych dołków wprowadzano po 100 μl zawiesiny IROMP (10 $\mu\text{g/ml}$) w buforze węglanowym o pH 9,6. Po powtórny trzykrotnym płukaniu płytek do poszczególnych dołków wprowadzano po 100 μl badanych surowic rozcieńczonych 1:100 w buforze PBS-T. Po trzykrotnym przepłukaniu, do poszczególnych dołków wprowadzano poliklonalne przeciwciała owcze skoniugowane z peroksydazą chrzanową, przeciwko bydłęcym:

- przeciwciałom klasy IgG (Bethyl Laboratories, Inc), w rozcieńczeniu 1:10000;
- przeciwciałom podklasy IgG1 (Bethyl Laboratories, Inc), w rozcieńczeniu 1:10000;
- przeciwciałom podklasy IgG2 (Bethyl Laboratories, Inc), w rozcieńczeniu 1:10000;
- przeciwciałom klasy IgM (Bethyl Laboratories, Inc), w rozcieńczeniu 1:10000.

W celu wywołania reakcji barwnej poszczególne dołki wypełniano chromogenem (TMB Peroxidase EIA Substrate Kit, Bio-Rad) w ilości po 100 μl . Pomiaru absorbancji dokonywano w czytniku do mikropłytek (Bio-Rad, model 680) przy długości fali 650 nm. Immunogenności IROMP potwierdzono w reakcjach Western Blotting.

W celu określenia wytwarzania IFN- γ w próbkach pełnej krwi pochodzącej od immunizowanych cieląt po stymulacji przez IROMP wykorzystano komercyjny test immunoenzymatyczny (Bovine Interferon Gamma ELISA Kit; MyBioSource). Pomiaru stężenia w IP-10 (CXCL10) w surowicach szczepionych cieląt dokonano za pomocą komercyjnego testu immunoenzymatycznego (Bovine CXC-Chemokine Ligand 10 (CXCL10) ELISA Kit; MyBioSource) zgodnie z zaleceniami producenta testu. Wartości absorbancji odczytywano w spektrofotometrze (Bio-Rad, model 680) przy długości fali 450 nm. Pomiar koncentracji haptoglobiny przeprowadzono metodą kolorymetryczną przy użyciu gotowego

zestawu przeznaczonego do oznaczania Hp w surowicach różnych gatunków zwierząt ("PHASE"TM Haptoglobin Colorimetric Assay; Tridelta Development LTD). Wartości absorbancji odczytywano przy długości fali 630 nm.

Analiza statystyczna wyników

Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne oraz przedziały ufności o poziomie ufności 95%, które podano w nawiasach kwadratowych. Różnice między średnimi testowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA lub analizy wariancji ANOVA z powtórzeniami oraz testu *post hoc* Tukaya jako korekty dla wielokrotnych porównań. Rozkład normalny danych sprawdzano za pomocą testu Shapiro-Wilka, natomiast jednorodność wariancji przy użyciu testu Browna-Forsythe'a. Jeśli dane nie miały rozkładu normalnego lub jednorodnej wariancji stosowano ANOVA Kruskala Wallisa oraz ANOVA Friedmana. Różnice istotne statystycznie przyjmowano dla $P < 0,05$. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA 12.5 (StatSoft, Inc.).

IV. Omówienie wyników

W badaniach własnych po raz pierwszy określano bioaktywności syntetycznych oligodeoksynukleotydów należących do klasy C w stosunku do bydlęcych PBMC. Były co prawda wykonane badania na owczych PBMC, ale ujawniły one, że istnieją istotne różnice w indukowaniu przez CpG ODN wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej pomiędzy tymi dwoma blisko spokrewnionymi gatunkami [Booth i in. 2007]. Do określenia stopnia bioaktywności użytych w badaniach CpG ODN zastosowano dwa podstawowe kryteria. Pierwszym była zdolność do indukowania przez nie proliferacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej bydła w warunkach *in vitro*. Drugim kryterium była zdolność do indukowania sekrecji IFN- γ przez PMBC. Wybrano te dwa badania, ponieważ proliferacja limfocytów stymulowanych CpG ODN jest ściśle powiązana z aktywnością adiuwacyjną indukowaną przez CpG *in vivo* [Hartmann i in. 2000], a sekrecja IFN- γ stanowi silny miernik *in vivo* odpowiedzi immunologicznej mediowanej przez limfocyty Th1 [Zimmermann i in. 1998].

W prezentowanych badaniach do oceny stopnia proliferacji bydlęcych PBMC wykorzystano komercyjny chemiluminescencyjny test ELISA z nieizotopowym znacznikiem 5-bromo-2'-dezoksyurydyną (BrdU), który jako analog tymidyny wbudowuje się do DNA dzielących się komórek. We wcześniejszych doświadczeniach wykorzystywano głównie

metodę izotopową, polegającą na analizie inkorporacji znakowanej radioaktywnym trytem tymidyny z DNA proliferujących komórek, a ocenę radioaktywności przeprowadzano w liczniku scyntylicyjnym beta [Pontarollo i in. 2002, Booth i in. 2007]. W badaniach własnych wykazano, że spośród wykorzystanych w doświadczeniu oligodeoksynukleotydów, ten należący do klasy C, był najbardziej efektywny w stymulacji *in vitro* proliferacji bydlęcych PBMC. ODN klasy C w porównaniu do tych należących do klasy B, mają tę samą sekwencję rozpoczynającą 5'-TCGTCGTT-3' i tylko jedną kopię sekwencji 5'-GTCGTT-3'. Wysokie wartości indeksu stymulacji dla tej klasy ODN, uzyskane w każdej z zastosowanych dawek, różniły się istotnie statystycznie ($P < 0,05$) w porównaniu do odpowiednich dawek ODN klasy A i B. Aby określić, które typy komórek odpowiadają na immunostymulujące motywy CpG ODN dokonano również analizy fenotypowej bydlęcych PBMC hodowanych w obecności oligodeoksynukleotydów. Wyniki badań własnych potwierdziły, że u bydła głównym typem komórek proliferujących w odpowiedzi na CpG ODN są limfocyty B. Po 4 dniach hodowli w próbkach zawierających CpG ODN nastąpił istotny statystycznie ($P < 0,05$) wzrost odsetka aktywowanych limfocytów B w porównaniu do samej pożywki. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Pontarollo i in. [2002]. W cytowanej pracy stwierdzono również, że usunięcie monocytów z hodowli PBMC drastycznie zmniejsza odpowiedź proliferacyjną indukowaną przez CpG ODN. Wynika z tego, że monocyty odgrywają znaczącą rolę w odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów B, indukowanej przez CpG ODN, przez dostarczanie zarówno bezpośrednich, jak i pośrednich sygnałów do rozpoczęcia proliferacji. W badaniach własnych potwierdzono za pomocą analizy cytometrycznej obecność monocytów w hodowlach bydlęcych PBMC.

Drugim parametrem ocenianym w badaniach *in vitro* był pomiar stężenia IFN- γ w supernatantach hodowli bydlęcych PBMC stymulowanych przez CpG ODN. W tym przypadku, zgodnie z oczekiwaniami, najlepszymi indykatorami wytwarzania IFN- γ okazały się oligodeoksynukleotydy należące do klasy A. Nieco słabiej od nich pobudzał komórki do wytwarzania IFN- γ ODN należący do klasy C. Również i w tym przypadku stwierdzono, że monocyty odgrywają kluczową rolę w indukowaniu przez CpG sekrecji interferonu gamma [Shoda i in. 2001]. Usunięcie monocytów z hodowli bydlęcych PBMC zaburzało wydzielanie IFN- γ w odpowiedzi na stymulację CpG ODN [Pontarollo i in. 2002]. Taki wynik był zgodny z doniesieniami, że to komórki NK stymulowane cytokinami uwalnianymi przez monocyty (IL-12, TNF- α , i IFN- α), wytwarzają IFN- γ [Krieg i Wagner 2000]. Z kolei IFN- γ z komórek NK stymuluje monocyty, tworząc w ten sposób pętlę indukcji cytokinin w odpowiedzi na

stymulację CpG ODN. W konsekwencji, kiedy monocyty są wybiórczo usuwane z PBMC owa pętla cytokinowa zostaje przerwana [Pontarollo i in. 2002].

Stężenie zastosowanego CpG ODN może mieć również znaczący wpływ na obserwowane efekty w stosunku do komórek układu immunologicznego. Z tego powodu w prezentowanych badaniach *in vitro* określono optymalne stężenia wszystkich CpG ODN. Najbardziej efektywną dawką ODN kasy C, stymulującą bydlęce PBMC do proliferacji i wytwarzania IFN- γ , było 8 $\mu\text{g/ml}$ i takie stężenie wykorzystano w fenotypowaniu cytometrycznym oraz określeniu za pomocą reakcji Real-Time PCR wewnątrzkomórkowej ekspresji genów kodujących wybrane cytokiny.

Indukcja różnych cytokin przez poszczególne klasy ODN CpG została zaakceptowana jako ważna cecha aktywności CpG ODN u ludzi i zwierząt [Dar i in. 2010]. W badaniach własnych wykazano, że w bydlęcych PMBC, wszystkie badane geny dla ocenianych cytokin uległy amplifikacji po sześciogodzinnej inkubacji w obecności CpG ODN. Uzyskane wartości względnego współczynnika ekspresji badanych genów (R) różniły się istotnie statystycznie ($P < 0,05$) od wartości R uzyskanej w przypadku kontroli. Należy zaznaczyć, że jest to również pierwsze badanie, w którym określono wpływ ODN klasy C na ekspresję genów dla szerokiego zestawu cytokin, chemokiny IP-10 oraz receptora TLR9. We wcześniejszych badaniach tego typu do stymulacji bydlęcych PBMC stosowano jedynie CpG ODN klasy B [Chu i in. 2011, Mena i in. 2003b, Zhang i in. 2003].

Po raz pierwszy prezentowane badania wykazały, że CpG ODN klasy C jest wysoce immunostymulacyjny w stosunku do bydlęcych PBMC. Obserwacja ta jest zgodna z badaniami na ludziach, myszach oraz owcach, które wykazały, że ODN klasy C łączące właściwości oligodeoksynukleotydów klasy A i B charakteryzują się szerokim zakresem aktywności w stosunku do komórek układu immunologicznego [Jurk i in. 2004, Vollmer i in. 2004, Booth i in. 2007]. Trzeba jednak pamiętać, że badania *in vitro* na PBMC nie odzwierciedlają w pełni potencjału immunostymulacyjnego CpG ODN. Both i in. [2007] w swoim doświadczeniu stwierdzili, że istnieją rozbieżności w odpowiedzi indukowanej przez poszczególne klasy CpG ODN pomiędzy populacjami komórek izolowanych z krwi (PBMC) i węzłów chłonnych (LNC), co po części może wynikać z różnic w populacjach komórek, które odpowiadają na CpG ODN. W węzłach chłonnych w porównaniu do krwi, stwierdzono zdecydowanie większą ilość dojrzałych limfocytów B oraz pDC [Booth i in. 2007].

Szczepienia w dalszym ciągu pozostają kluczowym narzędziem w zapobieganiu i leczeniu wielu chorób. Tradycyjne szczepionki inaktywowane oraz podjednostkowe, mimo że

efektywnie aktywują odpowiedź humoralną, są mniej skuteczne w indukowaniu swoistej odpowiedzi komórkowej [Perrie i in. 2008]. Immunogenność tego rodzaju szczepionek, wykorzystywanych również w immunoprofilaktyce syndromu oddechowego można znacznie poprawić stosując kombinacje adiuwantów, które będą wzmacniać i selektywnie modulować swoistą dla antygeny szczepionkowego odpowiedź immunologiczną. Adiuwanty mogą poprawiać skuteczność szczepionek, ułatwiając indukcję efektywnej odpowiedzi immunologicznej, wydłużając czas trwania tej odpowiedzi przy jednoczesnym zmniejszeniu ilości antygeny szczepionkowego oraz zwiększeniu liczby biorców osiągających serokonwersję [Perrie i in. 2008]. Kluczową i wspólną cechą adiuwantów, w tym również CpG ODN, jest ich zdolność do kształtowania odporności swoistej poprzez oddziaływanie na komórki prezentujące antygen. Jedną z funkcji komórek dendrytycznych jako komórek APC jest integracja informacji pochodzących z fragmentów drobnoustrojów czy składników szczepionek i przetworzenie tych sygnałów na odpowiednio regulowaną swoistą odpowiedź immunologiczną [Pulendran i Achmed 2011]. Adiuwanty immunostymulujące, do których zaliczamy m.in. CpG ODN, bezpośrednio aktywują wrodzony układ odpornościowy. Naśladując motywy CpG obecne w bakteryjnym DNA stymulują wrodzony układ odpornościowy gospodarza do wywoływania prozapalnej i ukierunkowanej na limfocytów Th1 odpowiedzi immunologicznej, charakteryzującej się sekrecją IL-6, IL-12, IL-18, IFN- γ i TNF- α [McCluskie i Krieg 2006, Mutwiri i in. 2009]. Trzeba pamiętać, że CpG ODN mają silne działanie immunostymulujące, ale ich szybka degradacja *in vivo*, z okresem półtrwania wynoszącym w przypadku klasy B 30-60 min. może ograniczać ich zastosowanie terapeutyczne. Aktywność biologiczną CpG ODN można znacząco zwiększyć łącząc je z innymi adiuwantami [Kovacs-Nolan i in. 2009a, Vollmer i Krieg 2009]. Zestawienie CpG w odpowiednim układzie może powodować lepszy efekt immuno-stymulacyjny, przez ochronę oligodeoksynukleotydów przed ich szybką degradacją przez nukleazy i umożliwić w ten sposób zwiększenie zaangażowania komórek w odpowiedzi na CpG ODN w miejscu iniekcji. Połączenia takie przedłużają w warunkach *in vivo* stabilność oraz wydłużają czas oddziaływania na komórki odpornościowe, przyczyniając się do zwiększenia wytwarzania cytokin IL-12, IL-6 oraz IFN- γ .

W prezentowanych badaniach po raz pierwszy podjęto próbę zastosowania CpG ODN klasy C jako składnika adiuwantu w szczepionce przeznaczonej dla bydła. Wybór tej klasy ODN do doświadczenia *in vivo* oparty był na kilku kryteriach. Po pierwsze, niemetylowane sekwencje CpG obecne w tym ODN stymulowały najlepiej w warunkach *in vitro* proliferację limfocytów B i ekspresję genów dla IL-12, IFN- α oraz IP-10 w bydlęcych PBMC. Po drugie,

CpG ODN klasy C mając szkielet fosforotioanowy nie będzie zbyt szybko degradowane w organizmie szczepionego zwierzęcia. Oligodeoksynukleotyd ten dodano do komercyjnej szczepionki Bovipast RSP z adiuwantem, w skład którego wchodził wodorotlenek glinu oraz z Quil-A. Takie połączenie wzmocniło u cieląt odpowiedź immunologiczną specyficzną dla IROMP *M. haemolytica* i spowodowało, że była ona bardziej zrównoważona. Wodorotlenek glinu, absorbując skutecznie na swojej powierzchni antygen szczepionkowy, zwiększa stabilność tego antygeny i usprawnia jego dostarczanie do komórek prezentujących antygen [Bachmann i Jennings 2010]. Szczepionki zawierające taki adiuwant wymagają zazwyczaj podania wielu dawek w celu uzyskania skutecznej ochrony oraz sprzyjają jedynie rozwojowi odpowiedzi Th2-zależnej [Dowling i Levy 2014]. Ich użycie może wiązać się z wystąpieniem niepożądanych reakcji miejscowych obejmujących rumień, guzki podskórne oraz rozwój nadwrażliwości kontaktowej [Perrie i in. 2008]. Należący do saponin Quil-A, w doświadczeniach na modelu mysim preferencyjnie indukował komórkowe mechanizmy odpowiedzi immunologicznej [Pascual i in. 2006]. W badaniach własnych wykazano że CpG ODN klasy C, koformułowany z wodorotlenkiem glinu i Quil-A, może wywoływać długotrwałą, swoistą dla antygeny, humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną. Szereg badań potwierdza, że połączenia CpG ODN z tradycyjnymi adiuwantami, takimi jak wodorotlenek glinu, czy Emulsigen wzmacniają wrodzone i nabyte mechanizmy odpowiedzi immunologicznej [Ioannou i in. 2002a, 2002b, 2003, Nichani i in. 2004b, Nichani i in. 2007, Nichani i in. 2010]. Adiuwanty te mogą tworzyć magazyn w miejscu wstrzyknięcia, z którego powoli uwalniane jest CpG ODN, co prowadzi do przedłużonej stymulacji układu odpornościowego. Indukują również stan zapalny i przyciągają komórki odpornościowe do miejsca podania, które mogą być aktywowane przez CpG ODN [Nichani i in. 2004a]. Formułacja CpG ODN z Emulsigenem pozwoliła także zmniejszyć dawkę oligodeoksynukleotydów nawet o 80% [Nichani i in. 2007]. Jest to istotne, biorąc pod uwagę, że wysokie dawki ODN CpG wymagane u dużych zwierząt mogą być nieekonomiczne.

Na aktywność immunostymulującą CpG ODN oprócz ich formułacji z innymi adiuwantami, mają również wpływ takie czynniki jak dawka oraz droga i miejsce podania [Mutwiri i in. 2003, Shiota i Klinman 2014]. W badaniach własnych, opierając się na danych piśmiennictwa dotyczących stosowania ODN jako adiuwantu u bydła, wybrano dawkę 0,5 mg CpG ODN na jedną immunizację cieląt [Zhang i in. 2003, Chu i in. 2011]. Należy zwrócić uwagę, że dawka CpG ODN wymagana do wytworzenia efektów adiuwantowych jest znacznie niższa od tej stosowanej w celach terapeutycznych [Ioannou i in. 2002b; Nichani i in. 2006]. U bydła CpG ODN najczęściej podaje się w iniekcjach podskórnych, albo

bezpośrednio na błony śluzowe. [Mena i in. 2003a, Nichani i in. 2004a, Nichani i in. 2006]. W późniejszych badaniach wykazano, że podskórna iniekcja CpG ODN indukowała wytwarzanie syntetazy 2'5'-A oraz, w przeciwieństwie do dotchawiczego podania, zapewniała przejściową ochronę przed infekcją wirusem para grypy-3 u jagniąt [Nichani i in. 2010]. Mechanizm, dzięki któremu pozajelitowe, ale nie śluzówkowe podanie oligodeoksynukleotydów, wywołuje ochronę przed wirusem oddechowym, nie jest znany. Leczenie za pomocą CpG ODN obiema drogami wywoływało podobne wytwarzanie syntetazy 2'5'-A, jednak jedynie iniekcja podskórna miała istotny wpływ na kontrolę infekcji wirusowej. Jest możliwe, że po podskórnym podaniu CpG ODN, przed infekcją wirusową chroniły cytokiny Th1-zależne, wytwarzane przez plazmacytoidalne komórki dendrytyczne obecne w lokalnych węzłach chłonnych [Krieg 2006]. Immuno-stymulujące działania CpG są w głównej mierze zależne od pDC, które występują z dużo większą częstotliwością we krwi, śledzionie i węzłach chłonnych niż w nabłonku i tkankach błon śluzowych, takich jak górne drogi oddechowe. Dlatego dotchawicze podanie CpG ODN może nie wywoływać aktywacji pDC [Krieg 2006]. Biorąc pod uwagę wszystkie te spostrzeżenia, w badaniach własnych zdecydowano się podawać preparaty szczepionkowe w iniekcjach podskórnych wykonanych w fałd szyjny, topograficznie blisko miejsca lokalizacji węzłów chłonnych szyjnych powierzchownych. W badaniach na świniach stwierdzono, że iniekcja CpG ODN w pobliżu węzłów chłonnych pachwinowych indukowała w nich znacząco wyższy poziom aktywacji komórek immunologicznych, w porównaniu do tych znajdujących się we krwi obwodowej [Dar i in. 2010]. Zaobserwowano, że biodystrybucja CpG ODN jest bardziej dynamiczna niż poprzednio sądzono. Już po 4 godzinach od podskórnej iniekcji w węzłach chłonnych myszy znajdowało się 10-15% podanego CpG ODN, podczas gdy w surowicy poziom ODN był bardzo niski [Noll i in. 2005]. Nagromadzenie ODN w węzłach chłonnych sugeruje, że może to być ważna tkanka dla rozwoju efektów indukowanych przez CpG *in vivo*.

W badaniach własnych, przeprowadzonych na cielętach stwierdzono, że dodanie CpG ODN klasy C do komercyjnego preparatu szczepionkowego pozytywnie wpłynęło na wzrost jego immunogenności, o czym świadczą wysokie poziomy surowiczych przeciwciał IgG, IgG1, IgG2 i IgM swoistych dla IROMP. Wartości absorbancji uzyskane w teście ELISA dla cieląt szczepionych takim preparatem były wyższe przez cały okres doświadczenia w porównaniu do dwóch pozostałych grup doświadczalnych. Zdecydowanej poprawie uległa zarówno swoista odpowiedź typu humoralnego (zwiększenie poziomu przeciwciał IgG1 i IgM), jak również mediowana przez limfocyty Th1 odpowiedź typu komórkowego, o czym świadczyły wysokie poziomy przeciwciał IgG2. Jak wykazali we wcześniejszych badaniach

Estes i Brown [2002] właśnie wytwarzanie swoistych IgG2 towarzyszy indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej u bydła. Warto zauważyć, że zwiększone ($P < 0.05$) poziomy IgG2 w surowicy obserwowano jedynie u krów immunizowanych za pomocą szczepionki z dodatkiem CpG. W przypadku komercyjnej szczepionki, pomimo obecności w składzie adiuwanta Quil A, nie stwierdzono tak wyraźnego wzrostu przeciwciał podklasy IgG2. Średnie wartości absorbancji surowic uzyskanych od cieląt Gr. I różniły się istotnie statystycznie ($P < 0,05$) od tych z Gr. II już od 7 dnia doświadczenia. Tak duża różnica w wartościach absorbancji może trochę zaskakiwać, tym bardziej że na modelu mysim po podaniu Quil A zaobserwowano preferencyjny wzrost podklasy przeciwciał IgG2a, a profil wydzielanych cytokin odpowiadał odpowiedzi Th1-zależnej [Pascual i in. 2006]. Prezentowane badania wykazały również, że CpG ODN 2429 nie tylko zwiększał produkcję swoistych dla antygeny IgG1, IgG2 i IgM, ale także powodował znaczne wydłużenie czasu trwania swoistej odpowiedzi immunologicznej. Szczególnie wyraźnie widoczne było to w przypadku przeciwciał IgG2 oraz IgM, dla których bardzo wysokie wartości absorbancji utrzymywały się przez cały okres doświadczenia tj. do 70 dnia po pierwszej immunizacji. Zarówno IgM, jak i IgG2 są głównymi opsoninami dla komórek fagocytyzujących u bydła [Estes i Brown 2002].

Uzyskane wyniki badań potwierdziły zdolność indukowania ochronnej odpowiedzi immunologicznej przez białka *M. haemolytica* A1 uczestniczące w kontrolowaniu jonów żelaza. W reakcji immunoblotingu z surowicami cieląt szczepionych preparatem z dodatkiem CpG ODN klasy C uzyskano wyraźne reakcje w stosunku do IROMPs o masie zarówno 70, 77 jak i 100 kDa. Podobne wyniki uzyskano we wcześniejszych doświadczeniach [Confer i in. 1995, Puchalski i in. 2013]. Białka o masie 100 oraz 71 kDa, określane odpowiednio jako TbpA oraz TbpB, współdziałają ze sobą jako kompleks. Są one podjednostkami gatunkowo swoistego receptora dla transferryny [Ogunnariwo i in. 1997]. Udział białek TbpA i TbpB w indukowaniu protekcji cieląt na eksperymentalne zakażenie *M. haemolytica* udokumentowały badania Potter i in. [1999]. W doświadczeniu, w którym wykorzystano zróżnicowane kombinacje obu białek w konstruowaniu szczepionek zastosowanych u bydła, wykazano wysoki poziom ochronnych przeciwciał w stosunku do rekombinowanej komponenty TbpB, natomiast minimalną odpowiedź humoralną w stosunku do białka TbpA. Wzrost protekcji w efekcie łącznego zastosowania obu protein cytowani autorzy tłumaczą możliwością indukcji odpowiedzi komórkowej wywołanej za pośrednictwem TbpA. Jak się wydaje, taki mechanizm stanowi synergistyczne uzupełnienie w stosunku do ochronnego efektu odpowiedzi humoralnej, umożliwiając tym samym bardziej efektywną ochronę

zwierząt. W badaniach własnych wyraźna reakcja przeciwciał obecnych w surowicach cieląt Gr. I w stosunku do białka o masie 100 kDa może potwierdzać indukcję mechanizmów odpowiedzi komórkowej przez CpG ODN, których wyrazem są wysokie poziomy surowiczych przeciwciał IgG2.

Poza oznaczaniem surowiczych przeciwciał IgG2, drugim parametrem świadczącym o rozwoju odpowiedzi Th1-zależnej u bydła jest wytwarzanie IFN- γ [Estes i Brown 2002]. Bezpośrednie monitorowanie poziomu interferonów w surowicy, za pomocą testów immunoenzymatycznych, jest jednak mało wiarygodne z powodu ich krótkiego okresu półtrwania. Z tego względu, we wcześniejszych badaniach jako biologiczny marker zwiększonego wytwarzania IFN po podaniu zwierzętom CpG ODN wykorzystywano enzym syntetaza oligoizoadenylowa (2'5'-A synthetasa) [Nichani i in. 2004a, 2006, 2007, 2010]. Jest ona ważną przeciwwirusową cząsteczką efektorową, indukowaną zarówno przez IFN- α , jak i IFN- γ . Syntetaza 2'5'-A jest aktywowana po kontakcie z dwuniciowym RNA wirusów i doprowadza w efekcie końcowym do aktywacji endorybonukleazy L (RN-aza L), która rozkładając mRNA blokuje cykl rozwojowy wirusów [Sen i Ransohoff 1993]. Pomiaru stężenia surowiczej syntetazy 2'5'-A, której poziom pod wpływem IFN wzrasta około 50-100 razy, dokonywano za pomocą komercyjnego testu radioimmunologicznego. Podskórna iniekcja CpG ODN indukowała u owiec już po 24 godzinach wzrost stężenia tego enzymu, osiągając 4 dnia maksymalne wartości, a 7 dnia wracając do wartości wyjściowych [Nichani i in. 2004a]. Z powodu braku dostępności testu radioimmunologicznego do oznaczania w surowicy stężenia syntetazy 2'5'-A konieczne było znalezienie innego typu biomarkera. W badaniach własnych do oceny aktywności IFN- γ po stymulacji CpG ODN wykorzystano po raz pierwszy u bydła IP-10 (białko indukowane przez interferon) w nowym mianownictwie określane jako CXCL10. Należy ono do chemokin prozapalnych wytwarzanych przez monocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, fibroblasty oraz keratynocyty w odpowiedzi na IFN- γ . Chemokina ta bierze udział w rozwoju stanu zapalnego, w aktywacji limfocytów T i komórek NK oraz modulacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych [Dufour i in. 2002]. Wzrost poziomu IP-10 w surowicy wskazuje na aktywację układu odpornościowego i jest dowodem indukcji wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Ponadto uważa się, że IP-10 jest bardziej trwałym biomarkerem aktywacji tych mechanizmów, niż ekspresjonowane przejściowo i szybciej zużywalne cytokininy [Krieg i in. 2004, Stewart i in. 2008]. Badania własne wykazały, że poziomy IP-10 w surowicach cieląt szczepionych komercyjnym preparatem z dodatkiem CpG ODN osiągały w 24 godzinie po pierwszej i drugiej immunizacji maksymalne, znacząco wyższe wartości w porównaniu do

tych uzyskanych u cieląt szczepionych preparatem komercyjnym oraz cieląt grupy kontrolnej. Te wysokie wartości utrzymywały się aż do 4 dni po podaniu szczepionki. Również w badaniu Real-Time PCR wartość względnego współczynnika ekspresji genu dla IP-10 była istotnie statystycznie wyższa dla CpG ODN klasy C w porównaniu do klasy A i B. Bydłęce PBMC stymulowane *in vitro* klasą C wykazały znaczny poziom indukcji mRNA IP-10 już w 6 godz. inkubacji. W prezentowanych badaniach wykazano więc, że stymulacja *in vitro* i *in vivo* bydłych PBMC przy pomocy CpG ODN klasy C konsekwentnie indukowała chemokinę IP-10, co sugeruje potencjał IP-10 jako obiecującego biomarkera wytwarzania IFN- γ . Potwierdzeniem tej hipotezy jest przeprowadzone doświadczenie, w którym wykazano wytwarzanie IFN- γ w próbkach pełnej krwi pochodzącej od cieląt szczepionych komercyjnym preparatem z dodatkiem CpG ODN klasy C. Po stymulacji tych próbek za pomocą IROMP, stwierdzono że antygenowo swoiste wytwarzanie IFN- γ rozpoczęło się już 14 dnia po pierwszym szczepieniu i trwało do 70 dnia doświadczenia.

Kluczową kwestią w pracach nad adiuwantami jest ich reaktogenność, czyli zdolność preparatu do wywoływania miejscowej, ostrej reakcji zapalnej (np. rumień, tkliwość), czy też reakcji systemowej (np. gorączka) [Bode i in. 2011]. Badania kliniczne wskazują, że CpG ODN są względnie bezpieczne, przy podawaniu jako adiuwanty szczepionkowe. Porównanie CpG ODN z innymi adiuwantami, w tym pełnym lub niepełnym adiuwantem Freund'a ujawniło, że oligodeoksynukleotydy stymulowały układ immunologiczny do wytwarzania większej ilości swoistych wobec antygenów szczepionkowego przeciwciał, którymi były przede wszystkim IgG2, oraz większego wytwarzania IFN- γ , wykazując przy tym najniższą toksyczność [Weeratna 2000]. Badania na modelach zwierzęcych i ludzkich sugerują, że toksyczność i działania niepożądane zależą od dawki i częstotliwości podania CpG ODN. Obejmują one raporty wykazujące, że konwencjonalne szczepionki i te z dodatkiem CpG ODN mają podobne profile bezpieczeństwa [Cooper i in. 2004]. W kilku badaniach odnotowano jednak wzrost częstości miejscowych zdarzeń niepożądanych o różnym stopniu nasilenia. Były to najczęściej reakcje w miejscu wstrzyknięcia, takie jak ból, obrzęk, stwardnienie, świąd czy rumień oraz objawy ogólnoustrojowe w tym objawy grypopodobne. Większość działań niepożądanych zgłaszanych w badaniach klinicznych miała przebieg łagodny do umiarkowanego, pojawiały się w ciągu 24 godzin po podaniu leku i utrzymywały się przez kilka dni [Bode i in. 2011]. W prezentowanych badaniach podanie cielętom CpG ODN wspólnie z komercyjną szczepionką nie wywołało poważnych skutków ubocznych. U wszystkich cieląt immunizowanych szczepionką z dodatkiem CpG ODN wystąpiła przejściowa gorączka, a u trzech wystąpiła reakcja lokalna w miejscu podania pierwszej oraz

drugiej dawki szczepionki, która ustępowała w czasie krótszym niż 48 godzin. Te lokalne reakcje składające się z ograniczonej strefy o średnicy ok. 30 mm nie były zaognione i bolesne. Opublikowane dane dotyczące skutków ubocznych po podaniu CpG ODN u bydła są ograniczone. Jednorazowe podanie dorosłemu bydłu 200 mg CpG ODN indukowało jedynie przejściowe zwiększenie odpowiedzi ostrej fazy, nie powodując przy tym rozwoju ogólnoustrojowej reakcji zapalnej [Ioannou i in. 2003]. W badaniach Nichani i in. [2004b], zaobserwowano lokalną reakcję w następstwie iniekcji ODN z 30% Emulsigenem. Badania immunohistochemiczne wykazały, że ODN2007 indukuje znaczną akumulację komórek w ciągu 48 godzin po iniekcji i większość z tych komórek były to makrofagi.

Reakcja ostrej fazy występuje jako normalny wynik szczepienia u bydła [Arthington i in. 2013]. Stymulacja makrofagów, monocytów i komórek dendrytycznych przez CpG ODN prowadzi do zwiększenia regulacji cząsteczek kostymulujących i wydzielania prozapalnych cytokin. Dlatego komórki te są ważne dla skuteczności szczepionek zarówno na etapie prezentacji antygeny limfocytom Th, jak i wytwarzania mediatorów stanu zapalnego, takich jak IL-1, IL-6 i TNF- α . Wykazano, że cytokininy te, indukują gorączkę i zwiększoną produkcję białek ostrej fazy [Arthington i in. 2013]. W związku z tym w badaniach własnych monitorowano reakcję ostrej fazy po podaniu cielętom CpG ODN. Jako pierwszy parametr służący do monitorowania odpowiedzi ostrej fazy wykorzystano pomiar wewnętrznej ciepłoty ciała. CpG ODN obecny w preparacie szczepionkowym indukował już w 24 godzinie od iniekcji, przejściowy wzrost średnich wartości ciepłoty wewnętrznej ciała. Wzrost ten utrzymywał się na średnim poziomie 40,8°C do 2 dnia od podania CpG ODN, po czym już piątego dnia osiągał wartości fizjologiczne. Drugim parametrem wykorzystanym w badaniach własnych do monitorowania reakcji ostrej fazy był pomiar stężenia haptoglobiny w surowicach badanych cieląt. Haptoglobina jako jedno z białek ostrej fazy, wytwarzana jest przez hepatocyty w odpowiedzi na prozapalne cytokininy. W rezultacie, stężenie haptoglobiny w surowicy daje wskazówkę o działaniu ogólnoustrojowym po zapaleniu lub infekcji [Godson i in. 1996]. Podanie cielętom CpG ODN klasy C indukowało wysokie stężenia haptoglobiny w surowicach. Stężenia te, w drugim dniu po każdej iniekcji, były blisko 5-krotnie wyższe niż u cieląt, które otrzymały sam preparat komercyjny. Podobne wyniki otrzymali Nichani i in. [2004b], podając owcom i bydłu CpG ODN klasy B wspólnie z Emulsigenem. W przypadku cieląt, stężenia haptoglobiny uzyskane w drugim dniu po iniekcji były prawie 10-krotnie wyższe niż te obserwowane u owiec. Cielęta, którym wstrzyknięto sam Emulsigen, również wykazały pewien wzrost poziomu haptoglobiny

w surowicy po pierwszym wstrzyknięciu, natomiast nie obserwowano go u cieląt kontrolnych, którym podano płyn fizjologiczny.

Na podstawie wyników prezentowanych badań można stwierdzić, że inicjowane przez CpG ODN klasy C różnorodne efekty immunologiczne potwierdzają ich zdolność do działania jako adiuwanty szczepionkowe, indukujące szybsze, silniejsze i dłużej trwające, mechanizmy swoistej odpowiedzi immunologicznej.

V. Stwierdzenia i wnioski

1. CpG ODN klasy C okazał się najbardziej efektywny w stymulacji proliferacji bydlęcych PBMC *in vitro*, przy czym głównym typem komórek proliferujących w odpowiedzi na jego działanie są limfocyty B.

2. Oligodeoksynukleotyd należący do klasy C najefektywniej indukuje wytwarzanie IFN- γ w hodowlach bydlęcych PBMC w dawce 8 $\mu\text{g/ml}$. Uzyskane średnie wartości stężenia IFN- γ w supernatantach hodowli były jednak statystycznie istotnie niższe w porównaniu do wartości uzyskanych w hodowlach prowadzonych w obecności CpG ODN klasy A.

3. CpG ODN klasy C indukuje w bydlęcych PBMC hodowanych *in vitro* ekspresję genów dla cytokin (IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-12, IL-21), chemokiny (IP-10) oraz receptora TLR9. Tylko w przypadku cytokin odgrywających kluczową rolę w rozwoju komórkowej odpowiedzi immunologicznej (IFN- α , IL-12) oraz IP-10 uzyskane wartości współczynnika R są bardzo wysokie i różnią się istotnie statystycznie od tych uzyskanych dla pozostałych klas oligodeoksynukleotydów.

4. Immunizacja cieląt szczepionką Bovipast RSP z dodatkiem CpG ODN klasy C indukuje w porównaniu do samego komercyjnego preparatu, szybszą, silniejszą oraz dłużej trwającą odpowiedź humoralną, o czym świadczą wysokie poziomy surowiczych przeciwciał IgG1 i IgM swoistych wobec IROMP *M. haemolytica*.

5. CpG ODN klasy C indukuje u szczepionych cieląt odpowiedź typu komórkowego, o czym świadczyło, utrzymujące się przez cały okres doświadczenia, zwiększone wytwarzanie swoistych dla antygeny szczepionkowego przeciwciał IgG2 oraz indukcja wytwarzania IFN- γ .

6. Wysokie stężenia IP-10 w surowicach cieląt szczepionych komercyjnym preparatem z dodatkiem CpG ODN klasy C, utrzymujące się przez 4 dni po podaniu każdej dawki szczepionki świadczą o tym, że chemokina ta jest wiarygodnym biomarkerem zwiększonego wytwarzania IFN- γ w odpowiedzi na CpG ODN.

7. CpG ODN klasy C są bezpieczne dla cieląt. Podawanie tych ODN w dawce 0,5 mg, wspólnie z komercyjnym preparatem nie wywołuje u szczepionych cieląt poważniejszych skutków ubocznych. Występuje jedynie przejściowa reakcja ostrej fazy oraz krótkotrwała, bezbolesna i niezaogniona lokalna reakcja w miejscu podania pierwszej oraz drugiej dawki szczepionki.

VI. Piśmiennictwo

- Arthington J.D., Cooke R.F., Maddock T.D., Araujo D.B., Moriel P., Dileo N., Lamb G.C. 2013. *Effects of vaccination on the acute-phase protein response and measures of performance in growing beef calves*. J. Anim. Sci. 91, 1831-1837.
- Bachmann M.F., Jennings G.T. 2010. *Vaccine delivery: as matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns*. Nat. Rev. Immunol. 2010, 10, 787-796.
- Barrett D. C. 2000. *Cost-effective antimicrobial drug selection for the management and control of respiratory disease in European cattle*. Vet. Rec. 146, 545-550.
- Biswas S.K., Tergaonkar V. 2007. *Myeloid differentiation factor 88-independent Toll-like receptor pathway: Sustaining inflammation or promoting tolerance?*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 1582-1592.
- Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T., Klinman D.M. 2011. *CpG DNA as a vaccine adjuvant*. Expert. Rev. Vaccines 10, 499-511.
- Booth J. S., Nichani A. K., Benjamin P., Dar A., Krieg A.M., Babiuk L.A., George K. Mutwiri G.K. 2007. *Innate immune responses induced by classes of CpG oligodeoxynucleotides in ovine lymph node and blood mononuclear cells*. Vet. Immunol. Immunopathol. 115, 24-34.
- Chaung H.C. 2006. *CpG oligodeoxynucleotides as DNA adjuvants in vertebrates and their applications in immunotherapy*. Int. Immunopharmacol. 6, 1586-1596.
- Chu C.Y., Lee S.C., Liu S.S., Lin Y.M., Shen P.C., Yu C., Lee K.H., Zhao X., Lee J.W. 2011. *Cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotides containing GACGTT motifs enhance the immune responses elicited by keyhole limpet hemocyanin antigen in dairy cattle*. Nucleic Acid Ther. 2011 21, 323-332.
- Confer A.W., McCraw R.D., Durham J.A., Morton R.J., Panciera R.J. 1995. *Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of Pasteurella haemolytica A1*. Vet. Immunol. Immunopathol. 47, 101-110.
- Confer A.W. 2009. *Update on bacterial pathogenesis in BRD*. Anim. Health. Res. Rev. 10, 145-148.
- Cooper C.L., Davis H., Morris M.L., Efler S.M., Al Adhami M.J., Krieg A.M., Cameron D.W., Heathcoat J. 2004. *CpG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study*. J. Clin. Immunol. 24, 693-702.

- Crompton P.D., Traore B., Kayentao K., Doumbo S., Ongoiba A., Diakite S.A., Krause M.A., Doumtable D., Kone Y., Weiss G., Huang C.Y., Doumbia S., Guindo A., Fairhurst R.M., Miller L.H., Pierce S.K., Doumbo O.K. 2008. *Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria*. J. Infect. Dis. 198, 1265-1275.
- Dar A., Nichani A., Lai K., Potter A., Gerdts V., Babiuk L.A., Mutwiri G. 2010. *All three classes of CpG ODNs up-regulate IP-10 gene in pigs*. Res. Vet. Sci. 88, 242-250.
- Dowling D.J., Levy O. 2014. *Onkogeny of ealry life immunity*. Trends Immunol. 35, 299-310.
- Dufour J.H., Dziejman M., Liu M.T., Leung J.H., Lane T.E., Luster A.D. 2002. *IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking*. J. Immunol. 168, 3195-3204.
- Eastcott J.W., Holmberg C.J., Dewhirst F.E., Esch T.R., Smith D.J., Taubman M.A. 2001. *Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid*. Vaccine 19, 1636-1642.
- Ellis J. 2009. *Update on viral pathogenesis in BRD*. Anim. Health Res. Rev. 10, 149-153.
- Estes D.M., Brown W.C. 2002. *Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle*. Vet. Immunol. Immunopathol. 90, 1-10.
- Gallichan W.S., Woolstencroft R.N., Guarasci T., McCluskie M.J., Davis H.L., Rosenthal K.L. 2001. *Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract*. J. Immunol. 166, 3451-3457.
- Godson D.L., Campos M., Attah-Poku S.K., Redmond M.J., Cordeiro D.M., Sethi M.S., Harland R.J., Babiuk L.A. 1996. *Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease*. Vet. Immunol. Immunopathol. 51, 277-292.
- Gursel I., Gursel M., Ishii K.J., Klinman D.M. 2001. *Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides*. J. Immunol. 167, 3324-3328.
- Hartmann G., Krieg A.M. 2000. *Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells*. J. Immunol. 164, 944-953.
- Hartmann G., Weeratna R.D., Balias Z.K., Payette P., Blackwell S., Suparto I., Rasmussen W.L., Waldschmidt M., Sajuthi D., Purcell R.H., Davis H.L., Krieg A.M. 2000. *Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo*. J. Immunol. 164, 1617-1624.
- He B., Qiao X., Cerutti A. 2004. *CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10*. J. Immunol. 173, 4479-4491.

- Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K, Wagner H., Takeda K., S. Akira S. 2000. *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature 408, 740-745.
- Ioannou X.P., Gomis S.M., Karvonen B., Hecker R., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S. 2002a. *CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein*. Vaccine 21, 127-137.
- Ioannou X.P., P. Griebel, R. Hecker, L.A. Babiuk, S. van Drunen Littel-van den Hurk. 2002b. *The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides*. J. Virol. 76, 9002-9010.
- Ioannou X.P., Gomis S.M., Hecker R., Babiuk L.A., van Drunen Little-van Den Hurk S 2003. *Safety and efficacy of CpG-containing oligodeoxynucleotides as immunological adjuvants in rabbits*. Vaccine 21, 4368-4372.
- Iwasaki A., Medzhitov R. 2004. *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat. Immunol. 5, 987-995.
- Jurk M., Schulte B., Kritzler A., Noll B., Uhlmann E., Wader T., Schetter C., Krieg A.M., Vollmer J. 2004. *C-Class CpG ODN: sequence requirements and characterization of immunostimulatory activities on mRNA level*. Immunobiology 209, 141-154.
- Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., de Waal Malefyt R., Kastelein R.A., Bazan F., Liu Y.J. 2001. *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J. Exp. Med. 194, 863-870.
- Klima C. L., Alexander T. W., Hendrick S., McAllister T. A. 2014. *Characterization of Mannheimia haemolytica isolated from feedlot cattle that were healthy or treated for bovine respiratory disease*. Can. J. Vet. Res. 78, 38-45.
- Klinman D.M., Takeshita F., Gursel I., Leifer C., Ishii K.J., Verthelyi D., Gursel M. 2002. *CpG DNA: recognition by and activation of monocyte*. Microbes Infect. 4, 897-901.
- Klinman D.M. 2006. *Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides*. Int Rev Immunol. 25, 135-154.
- Kovacs-Nolan J., Latimer L., Landi A., Jenssen H., Hancock R.E., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S. 2009a. *The novel adjuvant combination of CpG ODN, indolicidin and polyphosphazene induces potent antibody- and cell-mediated immune responses in mice*. Vaccine 27, 2055-2064.
- Kovacs-Nolan J., Mapletoft J.W., Latimer L., Babiuk L.A., van Drunen Little-van den Hurk S. 2009b. *CpG oligonucleotide, host defense peptide and polyphosphazene act synergistically, inducing long-lasting, balanced immune responses in cattle*. Vaccine 27, 2048-2054.
- Krieg A.M., Yi A.K, Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., D.M. Klinman D.M. 1995. *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature 374, 546-549.

- Krieg A.M. 2000. *The role of CpG motifs in innate immunity*. Curr. Opin. Immunol. 12, 35-43.
- Krieg A.M., Wagner H. 2000. *Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA*. Immunol. Today 21, 521-526.
- Krieg A.M. 2002. *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. Annu. Rev. Immunol. 20, 709-760.
- Krieg A.M., Efler S.M., Wittpoth M., Al Adhami M.J., Davis H.L. 2004. *Induction of systemic TH1-like innate immunity in normal volunteers following subcutaneous but not intravenous administration of CPG 7909, a synthetic B-class CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonist*. J. Immunother. 27, 460-471.
- Krieg A.M. 2006. *Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation*. Nat. Rev. Drug. Discov. 5, 471-484.
- Kwant A., Rosenthal K.L. 2004. *Intravaginal immunization with viral subunit protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protective immunity against HSV-2*. Vaccine 22, 3098-3104.
- Latz E., Verma A., Visintin A., Gong M., Sirois C.M., Klein D.C., Monks B.G., McKnight C.J., Lamphier M.S., Duprex W.P., Espevik T., Golenbock D.T. 2007. *Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9*. Nat. Immunol. 8, 772-779.
- Lipford G.B., Bendigs S., Heeg K., Wagner H. 2000. *Poly-guanosine motifs costimulate antigen reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines*. Immunology 101, 46-52.
- Mapletoft J.W., Oumouna M., Townsend H.G., Gomis S., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S. 2006. *Formulation with CpG oligodeoxynucleotides increases cellular immunity and protection induced by vaccination of calves with formalin-inactivated bovine respiratory syncytial virus*. Virology 353, 316-323.
- Maródi L. 2006. *Innate cellular immune responses in newborns*. Clin. Immunol. 118, 137-144.
- Marshall J.D., Fearon K, Abbate C., Subramanian S., Yee P., Gregorio J., Coffman R.L., Van Nest G. 2003. *Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions*. J. Leukoc. Biol. 73, 781-792.
- McCluskie M.J., H.L. Davis. 2000. *Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants*. Vaccine 19, 413-422.
- McCluskie M.J., Krieg A.M. 2006. *Enhancement of infectious disease vaccines through TLR9-dependent recognition of CpG DNA*. Curr. Top Microbiol. Immunol. 311, 155-178.
- Mena A., Nichani A.K., Popowych Y., Godson D.L., Dent D., Townsend H.G., Mutwiri G.K., Hecker R., Babiuk L.A., Griebel P. 2003a. *Innate immune responses induced by CpG oligodeoxyribonucleotide stimulation of ovine blood mononuclear cells*. Immunology 110, 250-257.
- Mena A., Nichani A.K., Popowych Y., Ioannou X.P., Godson D.L., Mutwiri G.K., Hecker R., Babiuk L.A., Griebel P. 2003b. *Bovine and ovine blood mononuclear leukocytes differ markedly in innate*

- immune responses induced by class A and class B CpG-oligodeoxynucleotide*. Oligonucleotides 13, 245-259.
- Morton R. J., Simons K. R., Confer A. W. 1996. *Major outer membrane proteins of Pasteurella haemolytica serovars 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars*. Vet. Microbiol. 51, 319-330.
- Muangthai K., Tankaeuw P., Varinrak T., Uthi R., Rojanasthien S., Sawada T., Sthitmatee N. 2018. *Intranasal immunization with a recombinant outer membrane protein H based Haemorrhagic septicemia vaccine in dairy calves*. J. Vet. Med. Sci. 80, 68-76.
- Mutwiri G., Pontarollo R., Babiuk S., Griebel P., van Drunen Littel-van den Hurk S., Mena A., Tsang C., Alcon V., Nichani A., Ioannou X., Gomis S., Townsend H., Hecker R., Potter A., Babiuk L.A. 2003. *Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals*. Vet. Immunol. Immunopathol. 91, 89-103.
- Mutwiri G., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A. 2009. *Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 61, 226-232.
- Nesburn A.B., Ramos T.V., Zhu X., Asgarzadeh H., Nguyen V., BenMohamed L. 2005. *Local and systemic B cell and Th1 responses induced following ocular mucosal delivery of multiple epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D together with cytosine-phosphate-guanine adjuvant*. Vaccine 23, 873-883.
- Nichani A.K., Kaushik R.S., Mena A., Popowych Y., Dent D., Townsend H.G., Mutwiri G., Hecker R., Babiuk L.A., Griebel P.J. 2004a. *CpG oligodeoxynucleotide induction of antiviral effector molecules in sheep*. Cell. Immunol. 227, 24-37.
- Nichani A.K., Mena A., Popowych Y., Dent D., Townsend H.G., Mutwiri G.K., Hecker R., Babiuk L.A., Griebel P.J. 2004b. *In vivo immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in cattle and sheep*. Vet. Immunol. Immunopathol. 98, 17-29.
- Nichani A.K., Mena A., Kaushik R.S., Mutwiri G.K., Townsend H.G., Hecker R., Krieg A.M., Babiuk L.A., Griebel P.J. 2006. *Stimulation of innate immune responses by CpG oligodeoxynucleotide in newborn lambs can reduce bovine herpesvirus-1 shedding*. Oligonucleotides 16, 58-67.
- Nichani A.K., Dar M.A., Krieg A.M., Mirakhur K.K., Kaushik R.S., Griebel P.J., Manuja A., Townsend H.G., Babiuk L.A., Mutwiri G.K. 2007. *Systemic innate immune responses following intrapulmonary delivery of CpG oligodeoxynucleotides in sheep*. Vet. Immunol. Immunopathol. 115, 357-368.
- Nichani A.K., Dar M.A., Mirakhur K.K., Krieg A.M., Booth J.S., Townsend H.G., Potter A.A., Babiuk L.A., Mutwiri G.K. 2010. *Subcutaneous, but not intratracheal administration of the TLR9 agonist, CpG DNA transiently reduces parainfluenza-3 virus shedding in newborn lambs*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 33, e111-e117.
- Noll B.O., McCluskie M.J., Sniatala T., Lohner A., Yuill S., Krieg A.M., Schetter C., Davis H.L., Uhlmann E. 2005. *Biodistribution and metabolism of immunostimulatory oligodeoxynucleotide*

- CpG 7909 in mouse and rat tissues following subcutaneous administration. *Biochem. Pharmacol.* 69, 981-991.
- Ogunnariwo J.A., Schryvers A.B. 1990. *Iron acquisition in Pasteurella haemolytica: expression and identification of a bovine transferrin receptor.* *Infect. Immun.* 58, 2091-2097.
- Ogunnariwo J.A., Woo T.K., Lo R.Y., Gonzalez G.C., Schryvers A.B. 1997. *Characterization of the Pasteurella haemolytica transferrin receptor genes and the recombinant receptor proteins.* *Microb. Pathog.* 23, 273-284.
- Overstreet M.G., Freyberger H., Cockburn I.A., Chen Y.C., Tse S.W., Zavala F. 2010. *CpG-enhanced CD8⁺ T-cell responses to peptide immunization are severely inhibited by B cells.* *Eur. J. Immunol.* 40, 124-133.
- Pascual D.M., Morales R.D., Gil E.D., Muñoz L.M., López J.E., Casanueva O.L. 2006. *Adjuvants: present regulatory challenges.* *Vaccine* 24, Suppl 2, S88-S89.
- Perrie Y., Mohammed A.R., Kirby D.J., McNeil S.E., Bramwell V.W. 2008. *Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens.* *Int. J. Pharm.* 364, 272-80.
- Pontarollo R.A., Rankin R., Babiuk L.A., Godson D.L., Griebel P.J., Hecker R., Krieg A.M., van Drunen Little-van den Hurk S. 2002. *Monocytes are required for optimum in vitro stimulation of bovine peripheral blood mononuclear cells by non-methylated CpG motifs.* *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84, 43-59.
- Potter A.A., Schryvers A.B., Ogunnariwo J.A., Hutchins W.A., Lo R.Y., Watts T. 1999. *Protective capacity of the Pasteurella haemolytica transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle.* *Microb. Pathog.* 27, 197-206.
- Potter T. 2015. *Bovine respiratory disease.* *Livestock (Electronic)* 20 (1), 14-18.
- Puchalski A., Urban-Chmiel R., Dec M., Wernicki A. 2013. *An electrophoretic characterization of iron-transporting proteins in Mannheimia haemolytica A1.* *Pol. J. Vet. Sci.* 16, 527-532.
- Pulendran B., Achmed R. 2011. *Immunological mechanisms of vaccination.* *Nat. Immunol.* 12, 509-517.
- Qin W., Jiang J., Chen Q., Yang N., Wang Y., Wei X., Ou R. 2004. *CpG ODN enhances immunization effects of hepatitis B vaccine in aged mice.* *Cell. Mol. Immunol.* 1, 148-152.
- Sen G., Chen Q., Snapper C.M. 2006. *Immunization of aged mice with a pneumococcal conjugate vaccine combined with an unmethylated CpG-containing oligodeoxynucleotide restores defective immunoglobulin G antipolysaccharide responses and specific CD4⁺-T- cell priming to young adult levels.* *Infect. Immun.* 74, 2177-2186.
- Sen G.C., Ransohoff R.M. 1993. *Interferon-induced antiviral actions and their regulation.* *Adv. Virus. Res.* 42, 57-102.
- Shirota H., Klinman D.M. 2014. *Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant.* *Expert. Rev. Vaccines* 13, 299-312.

- Shoda L.K.M., Kegerreis K.A., Suarez C.E., Mwangi W., Knowles D.P., and Brown W.C. 2001. *Immunostimulatory CpG-modified plasmid DNA enhances IL- 12, TNF- α , and NO production by bovine macrophages*. J. Leukoc. Biol. 70, 103-112.
- Siegrist C.A. 2003. *Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants*. Vaccine 21, 3406-3412.
- Stewart V.A., McGrath S., Krieg A.M., Larson N.S., Angov E., Smith C.L., Brewer T.G., Heppner Jr. D.G. 2008. *Activation of innate immunity in healthy Macaca mulatta macaques by a single subcutaneous dose of GMP CpG 7909: safety data and interferon-inducible protein-10 kinetics for humans and macaques*. Clin. Vac. Immunol. 15, 221-226.
- Tighe H., Takabayashi K., Schwartz D., Marsden R., Beck L., Corbeil J., Richman D.D., Eiden J.J. Jr., Spiegelberg H.L., Raz E. 2000. *Conjugation of protein to immune-stimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity*. Eur. J. Immunol. 30, 1939-1947.
- Tosi I., Bureau F., Farnir F., Denoix J.M., Lekeux P., Art T. 2018. *Effects of a P-class CpG-ODN administered by intramuscular injection on plasma cytokines and on white blood cells of healthy horses*. Vet. Immunol. Immunopathol. 201, 57-61.
- Tross D., Klinman D.M. 2008. *Effect of CpG oligonucleotides on vaccine-induced B cell memory*. J. Immunol. 181, 5785-5790.
- Tucci P., Estevez V., Becco L., Cabrera-Cabrera F., Grotiuz G., Reolon E., Marín M. 2016. *Identification of leukotoxin and other vaccine candidate proteins in a Mannheimia haemolytica commercial antigen*. Heliyon 2, e00158.
- Verthelyi D., Ishii K.J., Gursel M., Takeshita F., Klinman D.M. 2001. *Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs*. J. Immunol. 166, 2372-2377.
- Vollmer J., Weeratna R., Payette P., Jurk M., Schetter C., Laucht M., Wader T., Tluk S., Liu M., Davis H.L., Krieg A.M. 2004. *Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities*. Eur. J. Immunol. 34, 251-262.
- Vollmer J., Krieg A.M. 2009. *Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists*. Adv. Drug Deliv. Rev. 61, 195-204.
- Wedlock D.N., Denis M., Skinner M.A., Koach J., de Lisle G.W., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., van Drunen Little-van den Hurk S., Babiuk L.A., Hecker R., Buddle B.M. 2005a. *Vaccination of cattle with CpG oligodeoxynucleotide-formulated mycobacterial protein vaccine and Mycobacterium bovis BCG induced levels of protection against bovine tuberculosis superior to those induced by vaccination with BCG alone*. Infect. Immun. 73, 3540-3546.
- Wedlock D.N., Skinner M.A., de Lisle, G.W., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Hecker R., van Drunen Little-van den Hurk S., Babiuk L.A., Buddle B.M. 2005b. *Vaccination of cattle with*

- Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and CpG oligodeoxynucleotides induces protection against bovine tuberculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 106, 53-63.
- Weeratna R.D., McCluskie M.J., Xu Y., Davis H.L. 2000. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. Vaccine 18, 1755-1762.
- Wilson H.L., Dar A., Napper S. K., Lopez A.M., Babiuk L.A., Mutwiri G.K. 2006. Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides. Int. Rev. Immunol. 25, 183-213.
- Yi A.K., Klinman D.M., Martin T.L., Matson S., Krieg A.M. 1996. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. J. Immunol. 157, 5394-5402.
- Yi A.K., Peckham D.W., Ashman R.F., Krieg A.M. 1999. CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway. Int. Immunol. 11, 2015-2024.
- Zhang Y., Palmer G.H., Abbott J.R., Howard C.J., Hope J.C., Brown W.C. 2003. CpG ODN 2006 and IL-12 are comparable for priming Th1 lymphocyte and IgG responses in cattle immunized with a reckettsial outer membrane protein in alum. Vaccine 21, 3307-3318.
- Zimmermann S., Egeter O., Hausmann S., Lipford G.B., Rocken M., Wagner H., Heeg K. 1998. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. J Immunol. 160, 3627-3630.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy obejmuje 64 publikacje, w tym 42 prac eksperymentalnych i 1 pracę przeglądową, które zostały opublikowane w czasopismach wyszczególnionych w Journal Citation Reports oraz 21 artykułów zamieszczonych w periodykach nie posiadających współczynnika wpływu (IF) lub w monografiach. Jestem również współautorem 46 komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Od początku mojej pracy na etacie naukowo-dydaktycznym brałem czynny udział w realizacji badań naukowych prowadzonych w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków oraz w innych jednostkach Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie. Moje główne zainteresowania naukowe były i są nadal związane z immunoprofilaktyką, diagnostyką i charakterystyką czynników wywołujących zakażenia układu oddechowego u przeżuwaczy, ze szczególnym uwzględnieniem *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* jako nadrzędnego patogenu bakteryjnego izolowanego

z przypadków syndromu oddechowego bydła (BRDC – bovine respiratory disease complex). Z uwagi na brak w krajowym piśmiennictwie opracowań dotyczących tego problemu, w wykonanych dotychczas badaniach, przeprowadzonych pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Wernickiego określono udział poszczególnych serotypów *M. haemolytica* w etiologii syndromu oddechowego, dokonano oceny ich cech fenotypowych i genotypowych, w tym wrażliwości na stosowane chemioterapeutyki, oraz określono ich profile plazmidowe. Uzyskane wyniki pozwoliły na ocenę możliwości wykorzystania określonych grup antybiotyków w terapii syndromu oddechowego z udziałem szczepów *M. haemolytica*. W oparciu o uzyskane rezultaty wyodrębniono 9 profili antybiotykowych, przy czym oporność w stosunku do zastosowanych grup antybiotyków stwierdzono zarówno wśród szczepów posiadających plazmidy, jak również w szczepach bezplazmidowych

- Wernicki A., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R. 1999. Antybiotykowrażliwość oraz profil plazmidowy szczepów *Pasteurella haemolytica*. *Medycyna Weterynaryjna* 55, 623-626.

W badaniach dwóch podstawowych czynników wirulencji *M. haemolytica*, jakimi są leukotoksyna (Lkt) oraz kompleks białek zewnętrznej błony komórkowej (OMPs – outer membrane proteins), przeprowadzono analizę ich właściwości immunogennych poprzez ocenę odpowiedzi immunologicznej cieląt w warunkach terenowych, na przygotowane, własne, szczepionki zawierające ww. antygeny. Uzyskane wyniki pozwoliły dokonać oceny skuteczności profilaktycznej wyizolowanych z komórek bakteryjnych podjednostek, które posłużyły jako komponenty antygenowe w eksperymentalnych szczepionkach. Analiza elektroforetyczna 12 serotypów *M. haemolytica* wykazała, że najczęściej izolowane z przypadków chorobowych serotypy A1, A2 i A6 charakteryzowały się identycznymi profilami OMP. Spośród 15 frakcji, białka o masie 31, 41, 44 i 100 kDa uznane zostały jako główne, a wysoka immunogenność tych białek błony została potwierdzona w reakcjach immunoblottingu. Dowiedziono również, że indukcja wysokich poziomów przeciwciał surowiczych przez uzyskane OMP stwarza podstawę ich wykorzystania jako antygenów szczepionkowych w immunoprofilaktyce syndromu oddechowego cieląt. Efektem prowadzonych badań były publikacje:

- Wernicki A., Urban-Chmiel R., **Puchalski A.**, Mikucki P. 2001. Utilization of leukotoxin as vaccine antigen in immunoprophylaxis of shipping fever in cattle. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 4, 3, 193-198,

- Wernicki A., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R., Mikucki P. 2002. Ocena humoralnej odpowiedzi immunologicznej cieląt na antygeny białek błony zewnętrznej (OMPs) *Mannheimia haemolytica* serotyp 1. *Medycyna Weterynaryjna*. 58, 11, 860-862,
- **Puchalski A.**, Wernicki A., Mikucki P., Urban-Chmiel R. 2002. Profile białek błony zewnętrznej szczepów *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *M. glucosida*, *P. trehalosi* oraz szczepów nietypowych. *Medycyna Weterynaryjna* 58, 6, 439-443.

Te temat poruszała również moja praca doktorska pt.: „Charakterystyka białek błony zewnętrznej terenowych szczepów *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* oraz możliwość ich wykorzystania w swoistej immunoprofilaktyce syndromu oddechowego cieląt”, wykonana pod opieką naukową prof. dr hab. Andrzeja Wernickiego i obroniona w 2001 roku. Praca doktorska została wyróżniona nagrodą Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Uwagę naszą jako potencjalnych immunogenów szczepionkowych, zwróciły również białka błony zewnętrznej *M. haemolytica* oraz *P. multocida* kontrolowane jonem żelaza (IROMPs – iron-repressible outer membrane proteins). Białka te funkcjonują jako receptor dla kompleksów zawierających jony żelaza i odgrywają ważną rolę w ich transporcie do wnętrza komórki bakteryjnej. W przypadku *M. haemolytica* funkcję tę spełniają białka o masie około 71, 77 i 100 kDa. Natomiast dla *P. multocida* białkiem głównym, obserwowanym w rozdzielach elektroforetycznych bakterii hodowanych z dodatkiem, jak i bez dodatku chelatora jest proteina o masie 34 kDa. Wyraźne prążki dają także białka o masach 48, 68, 74 i 86 kDa. W badaniach własnych wykazano, że indukcja ekspresji IROMP następowała już w ciągu pierwszych 30 minut po zainicjowaniu warunków limitacji jonów żelaza. Wybrane IROMP *P. multocida* poddano również analizie metodą spektrometrii mas (MS/MS) i porównano je przy użyciu lokalnego serwera MASCOT, do znanych i zsekwencjonowanych białek umieszczonych w bazie NCBI. Wykazano wysoki stopień homologii tych białek z proteinami zaangażowanymi w bezpośredni transport jonów żelaza (ABC transporter ATPase component, transferrin binding protein A):

- **Puchalski A.**, Dec M., Wernicki A., Urban-Chmiel R., Gieral A., 2010: Characterization of outer membrane proteins participating in iron transport in *Pasteurella multocida* serotype A3. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 13: 121-127,
- **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R., Dec M., Wernicki A. 2013. An electrophoretic characterization of iron-transporting proteins in *Mannheimia haemolytica* A1. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 16, 527-532.

Na bazie przeprowadzonych eksperymentów na cielętach i owcach nasz zespół potwierdził wysoką skuteczność immunoprofilaktyczną Lkt podawanej w formie natywnej oraz inaktywowanej formaliną lub aldehydem glutarowym. Wzrost odpowiedzi humoralnej i miana protekcyjnego u owiec stwierdzono także po immunizacji antygenami uzyskanymi od szczepów *M. haemolytica* izolowanych od bydła. Korzystniejszy efekt immunoprotekcyjny u bydła i owiec uzyskano w efekcie stosowania szczepionek zawierających natywną oraz inaktywowaną farmaldehydem Lkt. Z uwagi na aplikacyjny charakter badań wykonano ocenę możliwości zwiększenia ekspresji tych antygenów poprzez stosowanie modyfikacji podłoża wzrostowego RPMI 1640. Wykazano, że do pełnej ekspresji immunogenów istotnych w humoralnej odpowiedzi cieląt, niezbędne są antygeny otrzymywane zarówno z logarytmicznej, jak i ze stacjonarnej fazy wzrostu komórek bakteryjnych, uzyskiwane na podłożu RPMI 1640 z dodatkiem oraz bez dodatku albuminy bydlęcej:

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., **Puchalski A.**, Mikucki P. 2004. Evaluation of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin prepared in nonsupplemented and BSA or FBS supplemented RPMI 1640 medium. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 7, 1-8,
- Mikucki P., Wernicki A., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R. 2006. Skuteczność natywnej i inaktywowanej leukotoksyny *Mannheimia haemolytica* w immunoprofilaktyce swoistej syndromu oddechowego owiec. *Medycyna Weterynaryjna* 62, 11, 1302-1306,
- Wernicki A., Mikucki P., Urban-Chmiel R., **Puchalski A.** 2008. Comparison of immunogenic properties of native and inactivated *Mannheimia haemolytica* Lkt in calves. *Polish Journal of Veterinary Sciences* Polish J. of Vet. Sci. 11, 2, 83-88.

W ramach kompleksowej analizy BRDC zwróciliśmy również uwagę na tzw. ostry syndrom oddechowy (ARDS – acute respiratory distress syndrom) o nietypowym przebiegu, zaobserwowany u bydła opasowego w makroregionie lubelskim. W sposób szczegółowy oceniono wpływ czynników niezakaźnych na rozwój tego procesu chorobowego. Wnioski wyciągnięto w oparciu o analizę makro- i mikroskopową tkanki płucnej oraz składu paszy z oceną zawartości substancji pneumotoksycznych z zastosowaniem techniki chromatografii wysokociśnieniowej, a także w oparciu o wyniki uzyskane w teście ELISA na obecność przeciwciał antywirusowych (BRSV). Otrzymane rezultaty badań wykazały, że poza czynnikami pokarmowymi ważną rolę w etiologii opisanych przypadków chorobowych

odgrywały czynniki wirusowe. Należy zaznaczyć, że był to pierwszy, opisany przypadek tego typu w kraju

- Wernicki A., Urban-Chmiel R., **Puchalski A.**, Mikucki P., Łopuszyński W. 2006. Ocena klinicznych przypadków syndromu oddechowego bydła opasowego w makroregionie lubelskim. *Annales UMCS sec. DD*. Vol. LXI, 197-206.

W naszych badaniach wykazano, że spektrometria masowa MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) wykorzystana jako strategia pojedynczego testu diagnostycznego umożliwia dokładną i szybką identyfikację szczepów *M. haemolytica* izolowanych z przypadków chorób układu oddechowego cieląt. Wszystkie badane szczepy zostały zidentyfikowane jako *M. haemolytica*, z czego aż 96,3% z dokładnością do gatunku i 3,7% z dokładnością do rodzaju. Wyniki identyfikacji porównano do rezultatów otrzymanych konwencjonalnymi metodami powszechnie stosowanymi w diagnostyce mikrobiologicznej, które opierają się na wykrywaniu i analizie właściwości biochemicznych i serologicznych drobnoustrojów. Stopień zgodności obu metod w identyfikacji *M. haemolytica* wyniósł 100%. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że MALDI-TOF MS może być wiarygodną alternatywą dla rutynowej identyfikacji *M. haemolytica* za pomocą metod fenotypowych i genotypowych

- **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R., Dec M., Stęgierska D., Wernicki A., 2016. The use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of *Mannheimia haemolytica*. *Journal of Veterinary Medical Science* 78: 1339-1342.

Badania naszego zespołu, prowadzone pod kierownictwem prof. dr hab. Renaty Urban-Chmiel obejmowały także ocenę czynników oddziałujących na organizm i usposabiających do rozwoju syndromu oddechowego, ze szczególnym zwróceniem uwagi na stres związany z transportem zwierząt. Oceniono m.in. przebieg humoralnej odpowiedzi immunologicznej u transportowanych cieląt, immunizowanych Lkt *M. haemolytica*. Uzyskane dotychczas wyniki badań upoważniają do stwierdzenia, że krótkotrwały stres związany z transportem cieląt nie wpływa negatywnie na poziom swoistej odpowiedzi humoralnej skierowanej przeciwko tej toksynie, co wydaje się mieć bardzo istotne znaczenie w przygotowaniu programów immunoprofilaktyki syndromu oddechowego bydła opasowego. W zakresie odporności komórkowej wykazano natomiast istotny wpływ stresu transportowego na przeżywalność leukocytów, ich zwiększoną wrażliwość na cytotoksyczne oddziaływanie Lkt

oraz zwiększoną podatność na indukcję stresu oksydacyjnego wyrażonego we wzroście końcowych produktów peroksydacji lipidów.

Oceniono również wpływ stresu transportowego na komórki bezpośrednio zaangażowane w odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko Lkt *M. haemolytica*. W tym celu przy użyciu kolorymetrycznego odczytu MTT wykonano analizę porównawczą odsetka leukocytów wrażliwych na cytotoksyczne oddziaływanie Lkt izolowanych od zwierząt przed oraz po transporcie. Badania dotyczące oceny przebiegu reakcji stresowej u zwierząt wywołanej transportem zostały poszerzone o analizę poziomu stresu oksydacyjnego. W badaniach wykonano ocenę stopnia peroksydacji lipidów w osoczu, wyrażonego zawartością końcowych produktów peroksydacji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) jako wyznacznika stresu oksydacyjnego u zwierząt. Intensywność reakcji stresowej wykonano w oparciu o pomiar stężenia kortyzolu we krwi z zastosowaniem testu EIA. Na podstawie uzyskanych wyników można przyjąć, że narażenie na sytuacje stresogenne, takie jak transport, objawia się u cieląt wzrostem poziomu kortyzolu (hormonu stresu) we krwi oraz wystąpieniem stresu oksydacyjnego. Brak równowagi pomiędzy obecnością reaktywnych form tlenu a biologiczną zdolnością do ich szybkiej detoksykacji jest ściśle powiązane z częstością wystąpienia syndromu oddechowego u cieląt. Rezultatem wyżej opisanych badań jest 6 publikacji, których jestem współautorem:

- Wernicki A., Urban-Chmiel R., Mikucki P., **Puchalski A.**, Kankofer M. 2003. The influence of transport stress on the humoral immunological response of calves induced by *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 6, 41-45,
- Wernicki A., Urban-Chmiel R., Mikucki P., **Puchalski A.**, Kankofer M. 2003. Wpływ stresu transportowego na wybrane wskaźniki odporności komórkowej u bydła. *Medycyna Weterynaryjna* 59, 608-611,
- Urban-Chmiel R., **Puchalski A.**, Wernicki A. 2006. Wpływ stresu transportowego na stopień wrażliwości leukocytów na działanie leukotoksyny *Mannheimia haemolytica*. *Medycyna Weterynaryjna* 62, 1045-1047,
- Wernicki A., Urban-Chmiel R., Kankofer M., Mikucki P., **Puchalski A.**, Tokarzewski S. 2006. Evaluation of plasma cortisol and TBARS levels in calves after short-term transportation. *Revue de Medecine Veterinaire* 157, 30-34,
- Urban-Chmiel R., Kankofer M., Wernicki A., Albera E., **Puchalski A.** 2009. The influence of different doses of α -tocopherol and ascorbic acid on selected oxidative stress parameters in in vitro culture of leukocytes isolated from transported calves. *Livestock Science* 124, 89-92,

- Wernicki A., Urban-Chmiel R., **Puchalski A.**, Dec M. 2014. Evaluation of the influence of transport and adaptation stress on chosen immune and oxidative parameters and occurrence of respiratory syndrome in feedlot calves. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 58: 111-116.

Kolejne zadanie badawcze realizowane przez nasz zespół dotyczyło oceny wpływu antyoksydantów, tj. witaminy C i E, na rozwój procesu zapalnego oraz na wybrane mechanizmy obronne przeciwko infekcjom wywoływanym przez *M. haemolytica*. Wykazano, że witaminy C i E korzystnie wpływają na funkcje leukocytów bydlęcych uczestniczących w reakcjach obronnych na zakażenia układu oddechowego. Zarówno komórki hodowane *in vitro* z dodatkiem witaminy C lub E, jak i leukocyty pochodzące od cieląt, u których stosowano suplementację tymi witaminami, odznaczały się zwiększoną opornością na cytotoksyczne działanie leukotoksyny wytwarzanej przez *M. haemolytica*. Zaobserwowano również stymulujące działanie witamin C i E na aktywność chemotaktyczną leukocytów oraz ich redukujący wpływ na ekspresję adhezyjnych receptorów β 2-integrinowych, z którymi wiąże się leukotoksyna:

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., **Puchalski A.**, Dec M. 2009. *In vitro* effect of α -tocopherol and ascorbic acid supplementation on selected immunological indicators in bovine leukocytes following transportation. *Acta Veterinaria Brno* 78: 589-594,
- Urban-Chmiel R., P. Hola P., Lisiecka U., Wernicki A., **Puchalski A.**, Dec M., Wysocka M., 2011: An evaluation of the effects of α -tocopherol and ascorbic acid in bovine respiratory disease complex occurring in feedlot calves after transport. *Livestock Science* 141: 53-58.

W prowadzonych aktualnie programach profilaktyki infekcji układu oddechowego bydła, poza eliminacją czynników usposabiających oraz stosowaniem immunoprofilaktyki swoistej wykorzystuje się również metafilaktykę. Polega ona na podawaniu cielętom niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz antybiotyków jeszcze przed pojawieniem się objawów chorobowych. W naszych badaniach prowadzonych warunkach *in vitro* oceniliśmy wpływ różnych stężeń megluminianu fluniksyny (niesterydowy lek przeciwzapalny) na żywotność, aktywność metaboliczną i chemotaktyczną oraz indukcję apoptozy leukocytów izolowanych od bydła w wieku od 1 tyg. do 2,5 roku. W badaniach nie potwierdzono istotnego wpływu megluminianu fluniksyny na żywotność limfocytów bydlęcych przy jednoczesnym zahamowaniu aktywności chemotaktycznej tych komórek oraz obniżenie żywotności neutrofilów i monocytów

- Wernicki A., Urban-Chmiel R., **Puchalski A.**, Dec M., Stęgierska D., Dudzic A., 2015. Evaluation of the *in vitro* effect of different concentrations of flunixin on leukocytes obtained from cattle of various ages. *Veterinarija ir Zootechnika* 72: 37-44.

Przedmiotem dalszych prac była ocena addytywnego oddziaływania fluniksyny z florfenikolem w połączeniu z witaminami C i E w metafilaktyce syndromu oddechowego. Oceniono również wpływ ww. chemioterapeutyków na wybrane mechanizmy odporności oraz ograniczenie stresu oksydacyjnego i procesu zapalnego. Nasze badania dowiodły, że zastosowanie metafilaktyczne takiego połączenia leków ogranicza zachorowalność cieląt na syndrom oddechowy. Zwiększa także odporność leukocytów na działanie leukotoksyny *M. haemolytica*, hamuje aktywność chemotaktyczną tych komórek i ekspresję na ich powierzchni receptorów β 2-integrynowych. Ponadto, zastosowana metafilaktyka poprzez obniżone stężenie reaktywnych form tlenu w surowicy zapobiegała u bydła stresowi oksydacyjnemu. Stwierdziliśmy również zależność pomiędzy rozwojem stresu transportowego, a poziomem haptoglobiny i surowiczego amyloidu A. Uzyskane rezultaty potwierdziły aplikacyjny charakter prowadzonych badań, które można wykorzystać w zapobieganiu syndromu oddechowemu u cieląt, a pomiar stężenia białek ostrej fazy w surowicy można wykorzystać jako wskaźnik diagnostyczny w ocenie wrażliwości cieląt na zachorowanie:

- Urban-Chmiel R., Stachura R., Hola P., **Puchalski A.**, Dec M., Wernicki A. 2015. Effects of flunixin and florfenicol combined with vitamins E and/or C on selected immune mechanisms in cattle under conditions of adaptive stress. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 59: 295-301,
- Wernicki A., Stachura R., Hola P., **Puchalski A.**, Dec M., Stęgierska D., Żurek A., Urban-Chmiel R. 2018. Efficacy of florfenicol and flunixin followed with vitamin E and/or C on selected oxidative and inflammatory mechanisms in young cattle under transport and adaptation stress. *Medycyna Weterynaryjna* 74: 266-271.

Kolejnym etapem badań prowadzonych w naszej jednostce była ocena w warunkach *in vitro* wpływu tylozyny, tylmikozyny i roksytromycyny na aktywność metaboliczną i chemotaktyczną leukocytów bydlęcych oraz na indukcję stresu oksydacyjnego i procesu apoptozy w tych komórkach. Badania te wykazały, że wszystkie użyte makrolidy wykazywały działanie modulujące funkcję leukocytów izolowanych od bydła. Najsilniejszym hamującym

oddziaływaniem na aktywność metaboliczną i chemotaktyczną leukocytów cechowała się roksytromycyna

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Lisiecka U., **Puchalski A.**, Dec M., Stęgierska D., Kurek Ł. 2017. The effect of selected macrolides on the properties of bovine leukocytes. *Veterinarski Arhiv* 87: 571-584.

Moje zainteresowania naukowe dotyczą również zagadnień z zakresu immunologii bydła, w tym konglutyniny – surowiczego białka z grupy kolektyn zaangażowanych w odporność nieswoistą. Zespół nasz pod kierunkiem dr Marty Dec, opracował chromatograficzną metodę izolacji konglutyniny z surowicy bydła, przedstawił charakterystykę elektroforetyczną tego białka, oszacował jego zakres występowania u zwierząt (dotychczas uważano, że występuje ono tylko u bydła), a także ocenił wybrane funkcje biologiczne tej kolektyny. W badaniach *in vitro* wykazano, że konglutynina połączona z resztami cukrowymi stymuluje aktywność leukocytów bydlęcych wyrażającą się wzmożoną produkcją reaktywnych form tlenu (O_2^- , H_2O_2) oraz ułatwia fagocytozę drobnoustrojów na drodze ich opsonizacji. Obecność konglutyniny wykryto (za pomocą metody Western blotting) nie tylko w surowicy dorosłych osobników bydła (ras mlecznych i mięsnych), ale także w sianie i surowicy płodowej tych zwierząt. Istnieje zatem przypuszczenie, że białko to odgrywa ważną rolę w odporności nieswoistej noworodków. Obecność lektyn o antygenowości podobnej do konglutyniny wykazano w surowicy u różnych przeżuwaczy, tj. u żubrów, owiec, kóz, antylop, lam, a wśród zwierząt nieprzeżuwających u świni. Na podkreślenie zasługuje unikatowy w skali światowej charakter podjętych badań. Poza naszą Jednostką badania dotyczące konglutyniny prowadzono jeszcze tylko w Danii na Uniwersytecie w Odensie. Przeprowadzone badania zaowocowały napisaniem 4 prac oryginalnych, których jest współautorem:

- Dec M., Wernicki A., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R., Grąż M. 2012. Purification and electrophoretic characterization of bovine conglutinin. *Biomedical Chromatography* 26: 684-690,
- Dec M., Wernicki A., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R. 2011. Conglutinin is not specific to cattle. *Veterinarni Medicina* 56: 510-519,
- Dec M., Wernicki A., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R., Waśko A., 2012. The effect of conglutinin on production of reactive oxygen species in bovine granulocytes. *Journal of Veterinary Science* 13: 33-38,

- Dec M., Wernicki A., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R., Radej S. 2012. Effect of conglutinin on phagocytic activity of bovine granulocytes. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 15: 455-462.

Uczestniczyłem także, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Reanty Urban-Chmiel, w realizacji projektu dotyczącego diagnostyki zakażeń wirusowych układu oddechowego u bydła (BRSV, BHV-1, BVDV. Badania te prowadzone były przez naszą Jednostkę we współpracy z PIW-PIB w Puławach oraz z Michigan State University, College of Veterinary Medicine w USA. Do diagnostyki infekcji wykorzystano testy PCR oparte na detekcji materiału genetycznego wirusów w próbkach biologicznych od bydła, szybkie, komercyjne testy paskowe (RAPID TRURSV i CLEARView) wykorzystywane w diagnostyce ludzkiego wirusa syncytialnego oraz testy ELISA służące do wykrywania swoistych przeciwciał lub antygenów czynników zakaźnych. Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką swoistość oraz czułość zastosowanych szybkich testów paskowych w detekcji bydlęcego wirusa syncytialnego i tym samym możliwość wykorzystania tych testów w szybkiej diagnostyce zakażeń BRSV u bydła. Nasze badania potwierdziły występowanie zakażeń BRSV u bydła w wieku poniżej 12 miesięcy zarówno w stadach bydła mlecznego, jak i opasowego. BRSV wykryto w 27 z 45 stad objętych badaniem:

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., **Puchalski A.**, Dec M., Stęgierska D., Grooms D.L., Barbu N.I. 2015. Detection of bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy and beef cattle in Poland. *Veterinary Quarterly* 28: 1-4.

Kontynuacją badań nad diagnostyką zakażeń wirusowych była ocena występowania wirusa BHV-1 u bydła w regionach wschodniej i południowo-wschodniej Polski. W badaniach wykorzystano testy ELISA potwierdzające obecność swoistych przeciwciał (ELISA BHV-1 Ab), jak i antygenu (ELISA BHV-1 Ag) oraz test PCR wykrywający obecność DNA wirusa. Materiał do badań stanowiły zarówno wymazy z nosa i tchawicy, jak też surowice. Spośród wszystkich przebadanych zwierząt 32% wykazywało obecność BHV-1 w teście ELISA. Obecność wirusa potwierdzono metodą PCR u 36,5% bydła. Swoiste przeciwciała wykryto w surowicach 33,9% przebadanych zwierząt:

- Wernicki A., Urban-Chmiel R., Rola J., Socha W., Stęgierska D., Dec M., **Puchalski A.** 2015. Prevalence of bovine herpes virus type 1 in small herds of young beef cattle in south-eastern Poland – a preliminary study. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 59: 467-472.

W kolejnych przeprowadzonych badaniach potwierdzono, że infekcje BVDV, dzięki wdrożonym programom immunoprofilaktyki, nie stanowią istotnego problemu w regionie wschodniej i południowo-wschodniej Polski. Zostało to potwierdzone w teście ELISA, w którym obecność swoistych przeciwciał wykazano zaledwie u 6,4% przebadanych zwierząt oraz w reakcjach PCR i RT-PCR, w których dodatni wynik uzyskano w 3,9% przypadków. Detekcję BVDV odnotowano tylko w 8,6% przebadanych stad bydła

- Wernicki A, Urban-Chmiel R., Stęgerska D., Adaszek Ł., Kalinowski M., **Puchalski A.**, Dec M. 2015. Detection of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in young beef cattle in eastern and south-eastern regions of Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 18: 141-146.

Dokonałiśmy również analizy porównawczej dotyczącej możliwości wykorzystania różnych linii komórkowych do hodowli *in vitro* wirusa BRSV. Hodowlę przeprowadzono na 3 liniach komórkowych: komórkach nerki bydlęcej (LLC-PK1), komórkach tchawicy bydlęcej (TBTR) i pierwotnych komórkach zarodków kurzych (CER). Analiza została przeprowadzona przy użyciu testu aglutynacji mikroplatek z erytrocytami z ludzkiej grupy 0 i erytrocytami bydła. Obecność BRSV we wszystkich liniach komórkowych potwierdzono metodą RT-PCR. Hodowlę wirusa z obserwowanym efektem cytopatycznym udało się uzyskać na wszystkich badanych typach komórek w zakresie mian średnich od $10^{3,71}$ /ml dla LLC-PK1 i TBTR do $10^{1,86}$ /ml dla CER. Najwyższe miano wirusa uzyskano przy użyciu linii TBTR. Miano uzyskane w hodowlach LLC-PK1 i CER wynosiło średnio $10^{1,86}$ /ml:

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Majer-Dziedzic B., Gnat S., **Puchalski A.**, Dec M. 2014. Use of different cell lines for *in vitro* cultures of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods* 204: 62-64.

Działania naukowe, prowadzone w ostatnich latach w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków, skoncentrowane są na alternatywnych metodach zwalczania infekcji u zwierząt. Prowadzone są badania z zakresu charakterystyki bakteriofagów i ich potencjalnego zastosowania w zwalczaniu wieloopornych patogenów bakteryjnych stanowiących zagrożenie dla ludzi i zwierząt. W pracy opublikowanej w 2015 r., w czasopiśmie *PLoS One* (IF-3,057) przedstawiono charakterystykę morfologiczną i genetyczną bakteriofagów łagodnych, swoistych dla *M. haemolytica*. Większość z pozyskanych fagów działała litycznie na bakterie izolowane z przypadków klinicznych

syndromu oddechowego bydła. Za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazano, że fagi te mają zróżnicowaną morfologię i należą do trzech różnych grup taksonomicznych: *Myoviridae*, *Siphoviridae* i *Podoviridae*:

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Stęgierska D., Dec M., Dudzic A., **Puchalski A.** 2015. Isolation and characterization of lytic properties of bacteriophages specific for *M. haemolytica* strains. *PLoS One* 10: e0140140.

W kolejnej pracy przedstawiono profile białkowe fagów przynależnych do rodziny *Myoviridae* indukowanych w komórkach *M. haemolytica*; frakcje białkowe zostały rozdzielone w elektroforezie SDS-PAGE oraz 2-DE, a następnie poddane analizie w technice spektrometrii masowej typu MALDI-TOF. Wyniki wykazały, że szczególnie elektroforeza dwukierunkowa, poprzez uwidocznienie różnic w wielkości białek oraz ich lokalizację w gradiencie pH, może być użytecznym narzędziem w charakterystyce białek fagowych. W najbliższej przyszłości planowane są dalsze badania mające na celu dopracowanie metodyki pozyskiwania fagów i ich praktycznego wykorzystania w leczeniu syndromu oddechowego u bydła

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Wawrzykowski J., **Puchalski A.**, Nowaczek A., Dec M., Stęgierska D., Alomari M.M.M. 2018: Protein profiles of bacteriophages of the family *Myoviridae*-like induced on *M. haemolytica*. *AMB Express* 8:102.

Prowadzone są również badania nad izolacją i charakterystyką bakteriofagów swoistych dla shigatoksycznych szczepów *E. coli* izolowanych od bydła. Bakterie te z reguły nie wywołują infekcji u zwierząt, ale są bardzo niebezpiecznymi patogenami ludzi. Dlatego jedna ze strategii ochrony zdrowia publicznego polega na zwalczaniu shigatoksycznych *E. coli* u bydła, które jest głównym rezerwuarem zarazki. Przeprowadzone badania wykazały, że fagi wyizolowane z próbek środowiskowych wykazują swoistość względem shigatoksycznych izolatów *E. coli* i jako fagi lityczne mogą mieć zastosowanie kliniczne. Wyniki tych badań zaprezentowane były na międzynarodowych konferencjach naukowych w Irlandii i na Węgrzech:

- Alomari M.M.M., Urban-Chmiel R., Dec M., Nowaczek A., **Puchalski A.**, Wernicki A. 2016: Isolation and characterization of the antibacterial effect of bacteriophages specific for Shiga-toxic

Escherichia coli strains isolated from calves. *The 29th Congress of the World Association For Buiatrics. Theme: Cattle Health - Tomorrow's Thinking Today. Proceedings of the World Buiatrics Congress 2016. Dublin, Ireland*, 305-306.

- Urban-Chmiel R., Alomari M., Dec M., Nowaczek A., Stęgierska D., **Puchalski A.**, Wernicki A., Kowalski C. „The experimental phage therapies of diarrhoea in newborn calves”, XVIII Middle-European Buiatrics Congress & XXVIII International Congress of the Hungarian Association For Buiatrics, 30 maj-02 czerwiec 2018, Eger, Węgry, s. 179-185.

Poza tym nasz zespół przedstawił charakterystykę morfologiczną i genetyczną bakteriofagów swoistych dla szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od kurcząt broilerów. Pozyskane bakteriofagi, ze względu na ich struktury morfologicznej, zostały przydzielone do rodziny *Myoviridae* i *Siphoviridae*. Wykazywały one aktywność lityczną w stosunku do wszystkich wyizolowanych bakterii z rodzaju *Campylobacter*:

- Nowaczek A. Urban-Chmiel R., Dec M., **Puchalski A.**, Stepień-Pyśniak D., Marek A., Pyzik E. 2018. Characterization of bacteriophages specific for *Campylobacter* spp. isolated from the gut of broiler chickens. *MicrobiologyOpen* e784, doi:10.1002/mbo3.784.

Prowadzone w jednostce badania obejmujące izolację oraz kompleksową charakterystykę bakteriofagów swoistych dla różnych grup patogenów mają nie tylko aspekt naukowy, ale również aplikacyjny. Efektem tych badań, co należy podkreślić jest opracowanie i złożenie przez nasz zespół badawczy po kierownictwem prof. dr hab. Andrzeja Wernickiego trzech wniosków patentowych do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej. Pierwszy wniosek (zgłoszenie patentowe nr P.424314) dotyczy preparatu probiotyczno-fagowego, w postaci czopków doodbytniczych dla bydła. W eksperymencie na grupie cieląt potwierdziliśmy jego prewencyjne i terapeutyczne działanie polegające na redukowaniu biegunek u cieląt wywołanych przez szczepy *E.coli*. Natomiast dwa pozostałe, dotyczą opracowania formuły preparatów fagowych przeznaczonych do leczenia u psów bakteryjnego zapalenia spojówek wywołanego przez *Staphylococcus aureus* (zgłoszenia patentowe nr P.427797 oraz nr P.427798). Zgłoszenia patentowe dotyczące ww. wynalazków aktualnie podlegają procesowi ewaluacji w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej.

Poza bakteriofagami i probiotykami alternatywą dla terapii antybiotykowej u zwierząt mogą być także nanocząstki metali takich jak srebro, złoto, miedź i platyna. Badania naszego zespołu wykazały, że komercyjne preparaty zawierające nanocząstki tych metali są skuteczne w zwalczaniu zakażeń gruczołu mlekowego u bydła. Najsilniejszą aktywnością bójczą wobec

bakterii (*E. coli*, *S. uberis*, *S. aureus*) i drożdży (*C. albicans*, *C. krusei*) izolowanych z przypadków mastitis odznaczały się nanocząstki srebra i miedzi. Stosowanie substancji zmodyfikowanych w procesie nanotechnologicznym w preparatach wykorzystywanych do pielęgnacji i dezynfekcji, mogłoby istotnie przyczynić się do zachowania niskiego, akceptowalnego poziomu drobnoustrojów środowiskowych odpowiedzialnych za wywołanie mastitis krów

- Wernicki A., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R., Dec M., Stęgierska D., Dudzic A., Wójcik A. 2014. Antimicrobial properties of gold, silver, copper and platinum nanoparticles against selected microorganisms isolated from cases of mastitis in cattle. *Medycyna Weterynaryjna* 70: 564-567.

Efektem badań nad alternatywnymi metodami zwalczania infekcji u zwierząt jest także praca przeglądowa dotycząca możliwości wykorzystania IFN alfa w profilaktyce i terapii. W przeciwieństwie do stosowanych u ludzi wysokich iniekcyjnych dawek tej cytokiny podawanie jej bezpośrednio na błonę śluzową nosa i gardła w niskich stężeniach, naśladujących naturalne wytwarzanie w organizmie, nie wiąże się z występowaniem skutków ubocznych i ma dodatni wpływ na przyrosty masy ciała zwierząt

- Dec M., **Puchalski A.** 2008. Use of oromucosally administered interferon-alpha in the prevention and treatment of animal diseases. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 11: 175-186.

Moje zainteresowania naukowe dotyczyły również charakterystyki cech fenotypowych i genotypowych szczepów *Enterobacteriaceae* izolowanych od ludzi i zwierząt. Z tego zakresu wykonano badania mające na celu określenie wybranych cech fenotypowych i genotypowych szczepów *E. coli* izolowanych z przypadków ropomacicza suk. Wykonana w badaniach analiza fenotypowych i genotypowych 128 szczepów *E. coli* obejmowała analizę profili plazmidowych, typowanie biochemiczne, serologiczne, profile odporności na chemioterapeutyki oraz na wybrane substancje chemiczne, wytwarzanie kolicyny, aerobaktyny, a także określenie właściwości hemaglutynacyjnych badanych szczepów. Uzyskane wyniki mogą zostać wykorzystane w badaniach epidemiologicznych mających na celu określenie źródeł pochodzenia *E. coli*:

- Wernicki A., Krzyżanowski J., **Puchalski A.**, Kowalczyk D. 2000. Charakterystyka wybranych właściwości szczepów *E. coli* izolowanych z przypadków ropomacicza suk. *Medycyna Weterynaryjna* 56, 49-52,
- Wernicki A., Krzyżanowski J., **Puchalski A.** 2002. Characterization of *Escherichia coli* strains associated with canine pyometra. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 5, 51- 56.

Zagadnienia epidemiologii były kontynuowane w odniesieniu do zakażeń wywołanych przez *Salmonella* Enteritidis u ludzi i zwierząt. W wykonanych badaniach oceniono przydatność epidemiologiczną wybranych, konwencjonalnych i molekularnych metod typowania tego drobnoustroju. Przeprowadzono również analizę profili elektroforetycznych białek błony zewnętrznej szczepów *Salmonella* Enteritidis oraz ocenę ich immunogenności. Szczepy bakteryjne hodowano zarówno w warunkach standardowych, jak i przy ograniczonym dostępie do jonów żelaza. Analiza densytometryczna rozdziałów elektroforetycznych oraz obrazów uzyskanych w reakcjach immunoblotingu wykazała, że głównym białkiem była proteina o masie 35 kDA zaliczana do termo labilnych poryn typu OmpA. Białka te nadają stabilność błonie zewnętrznej i stanowią ważną barierę chroniącą bakterie przed działaniem dopełniacza. Przemawia to za możliwością wykorzystania ich jako immunogenów w szczepionkach stosowanych w immunoprofilaktyce zakażeń *S. Enteritidis*:

- Kowalczyk D., Wernicki A., Pejsak Z., **Puchalski A.** 2001. Restriction endonuclease analysis of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis full genome by means of pulsed-field gel electrophoresis in FIGE modification. 4, 95-101,
- Kowalczyk-Pecka D., Wernicki A., **Puchalski A.** 2003. Lekowrażliwość oraz typy bakteriofagowe szczepów *Salmonella* Enteritidis izolowanych na terenie makroregionu lubelskiego. *Przegląd Epidemiologiczny* 57, 201-209,
- **Puchalski A.**, Kolasa A., Dec M., Urban-Chmiel R., Kowalczyk-Pecka D. 2008. Charakterystyka elektroforetyczna białek błony zewnętrznej szczepów *Salmonella* Enteritidis hodowanych w zróżnicowanych warunkach oraz ocena ich właściwości antygenowych. *Medycyna Weterynaryjna* 64, 193-196.

W ostatnim czasie biorę także udział w badaniach kierowanych przez dr Martę Dec, dotyczących doskonalenia metod identyfikacji, oceny właściwości probiotycznych i antybiotykowrażliwości bakterii z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych od drobiu. Zespół nasz dokonał oceny zróżnicowania gatunkowego lactobacilli występujących u gęsi i kur w Polsce. Na podkreślenie zasługuje fakt, że opublikowane przez nas badania dotyczące pałeczek

Lactobacillus izolowanych od gęsi, są jedynymi pracami w literaturze światowej opisującymi tę tematykę. Efektem tych badań jest opracowanie protokołów identyfikacji gatunkowej pałeczek *Lactobacillus* przy wykorzystaniu takich technik jak spektrometria masowa typu MALDI-TOF, analiza restrykcyjna 16S rDNA oraz analiza sekwencji 16S-23S rDNA. Zaproponowane przez nas metody genotypowania są stosunkowo proste, powtarzalne i możliwe do wykonania w każdym laboratorium biologii molekularnej, przez co stanowią alternatywę dla identyfikacji bakterii opartej na sekwencjonowaniu DNA. W prezentowanych badaniach oceniono potencjał probiotyczny lactobacilli występujących u drobiu. Wyselekcjonowano kilkadziesiąt izolatów *Lactobacillus*), które spełniają kryteria stawiane przez EFSA mikrobiologicznym dodatkom paszowym w zakresie antybiotykowrażliwości i jednocześnie odznaczają się innymi cechami probiotycznymi. Izolaty te mogą posłużyć do opracowania komercyjnego preparatu probiotycznego przeznaczonego dla drobiu. Określono również wrażliwości lactobacilli na szereg antybiotyków i chemioterapeutyków. Badania naszego zespołu wykazały, że naturalna mikroflora jelitowa drobiu hodowanego w Polsce jest rezerwuarem antybioopornych szczepów *Lactobacillus* i genów oporności. Przedstawione badania są także źródłem danych (wartości MIC) dla komitetów i instytucji kompetentnych w zakresie ustanawiania norm antybiotykowrażliwości drobnoustrojów. Realizacja wyżej opisanego projektu zaowocowała publikacjami, które weszły w skład osiągnięcia naukowego, aktualnie procedowanego postępowania habilitacyjnego Pani dr Marty Dec:

- Dec M., Urban-Chmiel R., Gnat S., **Puchalski A.**, Wernicki A. 2014. Identification of *Lactobacillus* strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Research in Microbiology* 165: 190-201,
- Dec M., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R., Wernicki A. 2014. Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. *Poultry Science* 93: 2464-2472,
- Dec M., Wernicki A., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R. 2015. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* strains isolated from domestic geese. *British Poultry Science* 56: 416-424,
- Dec M., **Puchalski A.**, Urban-Chmiel R., Wernicki A. 2016. 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiology* J16: 105,
- Dec M., **Puchalski A.**, Nowaczek A., Wernicki A. 2016. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains of chicken origin against bacterial pathogens. *International Microbiology* 19: 57-67.

Brałem również udział w badaniach dotyczących oceny antybiotykowrażliwości, wirulencji i genotypowania różnych grup bakterii izolowanych od zwierząt hodowlanych i dziko żyjących. Badania naszego zespołu z wykorzystaniem materiału pochodzącego z różnych źródeł wskazują, że zwierzęta hodowlane jak i dziko żyjące są rezerwuarem drobnoustrojów lekoopornych z rodzaju *Campylobacter*. Wykazaliśmy, że gołębie hodowlane oraz dziko żyjące są nosicielami bakterii *Campylobacter* spp. (gł. *C. jejuni*), a zebrane izolaty odznaczały się wysoką częstotliwością występowania oporności na antybiotyki powszechnie stosowane w leczeniu ludzi i zwierząt (makrolidy, streptomycynę, tetracykliny i penicyliny)

- Dudzic A., Urban-Chmiel R., Stępień-Pyśniak D., Dec M., **Puchalski A.**, Wernicki A., 2016: Isolation, identification and antibiotic resistance of *Campylobacter* strains isolated from domestic and free-living pigeons. *British Poultry Science* 57: 172-178.

Realizuję także projekty naukowe we współpracy z innymi jednostkami Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Wspólnie z zespołem z Katedry Epizootiologii i Kliniki Chorób Zakaźnych brałem czynny udział w badaniach nad boreliozą u psów, metodami diagnostyki tego schorzenia i właściwościami antygenowymi *Babesia canis*:

- Adaszek Ł., Winiarczyk S., **Puchalski A.** 2008. Badania serologiczne w kierunku boreliozy psów na Lubelszczyźnie. *Annales UMCS sec. DD*. Vol. LXIII, 1-7,
- Adaszek Ł., Winiarczyk S., Kutrzeba J., **Puchalski A.**, Dębiak P. 2008. Przypadki boreliozy u psów na Lubelszczyźnie. *Życie Weterynaryjne* 83, 311-313,
- Adaszek Ł., Winiarczyk S., **Puchalski A.**, Garbal M., Górna M. 2009. The diagnose of *Borrelia afzelii* infections in dogs. *Annales UMCS sec. DD*. Vol. LXIV, 15-21,
- Adaszek Ł., Winiarczyk S., **Puchalski A.**, Skrzypczak M. 2010. First cases of dog borreliosis in eastern Poland. *Veterinarija ir Zootechnika* 50, 102-104,
- Adaszek Ł., **Puchalski A.**, Dec M., Winiarczyk S. 2012. Analysis of the culture-derived soluble *Babesia canis canis* antigens derived from the Polish strains of the parasites. *Tierärztliche Praxis K.* 40, 399-403.

Uczestniczyłem również w badaniach nad występowaniem boreliozy i erlichiozy u świń i krów na Lubelszczyźnie

- Winiarczyk S., Adaszek Ł., Štefančíková A., Pet'ko B., Cislakova L., **Puchalski A.** 2007. Badania serologiczne w kierunku boreliozy i erlichiozy świń i krów na Lubelszczyźnie. *Medycyna Weterynaryjna* 63, 561-565.

Wspólnie z zespołem z Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych przeprowadziliśmy badania na temat występowania *Neospora caninum* w Polsce poprzez ocenę rozprzestrzenienia się tego pierwotniaka w gospodarstwach drobnotowarowych na Lubelszczyźnie

- Tomczuk K., Radzikowski A.B., Studzińska M.B., Witkowska A., **Puchalski A.** 2007. Przeciwciała przeciwko *Neospora caninum* w surowicy krów z niewielkich gospodarstw okolic Lublina. *Annales UMCS sec. DD. Vol. LXII*, 50-54.

Uczestniczyłem też w badaniach przeprowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej, których celem było opracowanie i porównanie profili białkowych preparatów antygenowych uzyskanych z wybranych szczepów drożdżaków z rodzaju *Malassezia*

- Ziółkowska G., Nowakiewicz A., **Puchalski A.** 2004. Profile białkowe preparatów antygenowych uzyskanych ze szczepów *Malassezia pachydermatis*. *Medycyna Weterynaryjna* 60, 1118-1123.

Wspólnie z zespołem z Katedry Zoologii, Ekologii Zwierząt i Łowiectwa, Wydziału Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki UP w Lublinie, dokonaliśmy wstępnej charakterystyki epidemiologicznej flory bakteryjnej *Enterobacteriaceae* związanej z układem pokarmowym ślimaków. W pracy opublikowanej w *Ecotoxicology and Environmental Safety* potwierdziliśmy hipotezę, że mikrodawki cynku i miedzi używane jako stymulatory, indukują reakcję fizjologiczną ślimaków w postaci zmian gospodarki lipidowej oraz stymuluje obronę antyoksydacyjną:

- Kowalczyk-Pecka D., **Puchalski A.** 2008. Potential interaction between the *Cepaea nemoralis* wild snail and *Citrobacter spp.* bacteria. *Medycyna Weterynaryjna*. 64, 786-790,
- Kowalczyk-Pecka D., Kowalczyk-Vasilev E., **Puchalski A.**, Klebaniuk R. 2018. Peroxidation and unsaturation indices as potential biomarkers of multifarious zinc and copper micro-supplementation in *Helix pomatia* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 148: 713-720.

W moim dorobku naukowym znajduje się również 46 doniesień konferencyjnych, prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, w formie prezentacji ustnych lub plakatów. Jestem też współtwórcą trzech wynalazków zgłoszonych w postaci wniosków patentowych. Szczegółowe dane na ich temat znajdują się w Załączniku nr 4 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Działalność dydaktyczna

Począwszy od 1997 r. do chwili obecnej prowadzę zajęcia dydaktyczne na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej dla studentów kierunku Weterynaria oraz na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie dla studentów Biotechnologii. Na kierunku Weterynaria realizuję ćwiczenia z Immunologii (II rok) i Prewencji weterynaryjnej (IV i V rok). Prowadząc wykłady i ćwiczenia jestem odpowiedzialny za przedmiot Higiena środków żywienia zwierząt (III rok). Ze studentami Biotechnologii do 2018 roku prowadziłem ćwiczenia z Immunologii (III rok).

Od 2000 r., czyli od chwili przejęcia przez Wydział Medycyny Weterynaryjnej całości spraw związanych z realizacją praktyk klinicznych oraz praktyk w Inspekcji Weterynaryjnej, jestem pełnomocnikiem Dziekana ds. Praktyk na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie. Funkcję tę pełnię do chwili obecnej, sprawując zarówno nadzór administracyjny, jak i opiekę merytoryczną nad studentami IV i V roku Medycyny Weterynaryjnej. W ramach powierzonych mi obowiązków udzielam konsultacji dotyczących wyboru miejsca odbywania praktyk i prowadzenia dokumentacji związanej z ich przebiegiem. Jestem współautorem dziennika praktyk oraz wydziałowego programu praktyk klinicznych i sanitarnych dla studentów IV i V roku. Opracowałem również moduł kształcenia dla praktyk klinicznych, uwzględniający efekty kształcenia w zakresie nabytej przez studenta wiedzy, opanowanych umiejętności oraz kompetencji społecznych. Dokonuję weryfikacji efektów kształcenia osiągniętych przez studentów podczas praktyk klinicznych. Rokrocznie opieką merytoryczną objętych jest około 300 studentów IV i V roku Medycyny Weterynaryjnej odbywających praktyki zawodowe. W 2018 r. za pracę związaną z opieką nad całością spraw związanych z praktykami studenckimi zostałem wyróżniony Medalem Komisji Edukacji Narodowej. Od 1998 roku jestem autorem rozkładów zajęć dydaktycznych realizowanych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej.

W latach 2014-2018 sprawowałem opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego pracy doktorskiej. Jestem promotorem 5 prac magisterskich oraz 3 prac

inżynierskich studentów kierunku Biotechnologia (Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie).

Pełny wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych znajduje się w Załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. Szczegółowe informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy z instytucjami i organizacjami, odbytych stażach naukowych oraz działalności popularyzującej naukę przedstawiłem w Załączniku nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Zestawienie liczbowe dorobku naukowego z uwzględnieniem punktacji MNiSW oraz współczynnika wpływu (Impact Factor, IF)

	Przed uzyskaniem stopnia doktora			Po uzyskaniu stopnia doktora		
	Liczba publikacji	Punktacja MNiSW	IF	Liczba publikacji	Punktacja MNiSW	IF
Czasopisma z listy JCR Publikacje oryginalne	2	14	0,339	40	780	41,542
Czasopisma z listy JCR Publikacje przeglądowe	–	–	–	1	15	0,218
Pozostałe czasopisma Publikacje oryginalne	1	6	–	15	96	–
Pozostałe czasopisma Publikacje przeglądowe	–	–	–	1	3	–
Rozdziały w monografiach	–	–	–	4	20*	–
Łącznie	3	20	0,339	61	914	41,76
Łączna liczba publikacji	64					
Łączna liczba punktów MNiSW	934					
Łączny IF	42,099					
Komunikaty zjazdowe Konferencje krajowe	9	–	–	24	–	–
Komunikaty zjazdowe Konferencje międzynarodowe	1	–	–	12	–	–
Łącznie	10	–	–	36	–	–
Łącznie liczba komunikatów	46					

* Punktacja rozdziału w monografii naukowej wieloautorskiej wg Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 12 grudnia 2016 r. w sprawie przyznawania kategorii naukowej jednostkom naukowym i uczelniom, w których zgodnie z ich statutami nie wyodrębniono podstawowych jednostek organizacyjnych, Dz. U. poz. 2154.

Lublin 11.02.2019

Andrzej Puchalski