

Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki
Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ocena

dorobku naukowego oraz rozprawy habilitacyjnej Pana dr n wet. Andrzeja Puchalskiego, starszego wykładowcy w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w związku z Jego ubieganiem się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego

Wykształcenie i uzyskane stopnie naukowe

Dr n wet. Andrzej Puchalski ukończył studia na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie w roku 1991 uzyskując tytuł zawodowy lekarza weterynarii. W 2001 roku uzyskał stopień naukowy doktora nauk weterynaryjnych w zakresie chorób zakaźnych zwierząt na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Charakterystyka białek błony zewnętrznej terenowych szczepów *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* oraz możliwość ich wykorzystania w swoistej immunoprofilaktyce syndromu oddechowego cieląt”.

Przebieg pracy zawodowej

Bezpośrednio po ukończeniu studiów na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie dr A. Puchalski został zatrudniony na stanowisku starszego technika w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Od 01 października 1996 r. do 28 lutego 2002 r. pracował w tej samej jednostce na stanowisku asystenta, natomiast od 01 marca 2002 r. do 30 listopada 2018 r. na stanowisku adiunkta. Od 01 grudnia 2018 r. do chwili obecnej pozostaje zatrudniony na stanowisku starszego wykładowcy. Zmiana stanowiska oraz przejście na etat dydaktyczny nie spowodowały odejścia Habilitanta od realizowanego konsekwentnie programu rozwoju naukowego, czego dowodem są ukazujące się systematycznie wartościowe publikacje naukowe, a także napisana i zgłoszona do oceny rozprawa habilitacyjna, stanowiąca osiągnięcie

wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Ogólna charakterystyka i ocena osiągnięć naukowo-badawczych Habilitanta

Zainteresowania naukowe dr A. Puchalskiego w dużym stopniu zdeterminowane zostały profilem badań realizowanych w macierzystej Jednostce, tj. w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków. Dotyczą one diagnostyki i charakterystyki czynników bakteryjnych i wirusowych wywołujących zakażenia układu oddechowego u przeżuwaczy ze szczególnym uwzględnieniem *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* oraz swoistej profilaktyki syndromu oddechowego bydła (BRDC). W prowadzonych badaniach określono m.in. udział różnych serotypów tych bakterii w etiologii syndromu oddechowego oraz dokonano oceny wybranych cech fenotypowych i genotypowych zarazków, takich jak wrażliwość na chemioterapeutyki oraz profile plazmidowe. Dokonano także oceny właściwości immunogennych podstawowych czynników zjadliwości *M. haemolytica*, tj. leukotoksyny i białek zewnętrznej błony komórkowej (OMPs). Badania te, wykonane w warunkach terenowych na cielętach, pozwoliły na określenie efektywności przygotowanych we własnym zakresie szczepionek podjednostkowych w zapobieganiu zakażeniom u bydła. Równolegle prowadzone badania *in vitro* umożliwiły natomiast wykazanie, które frakcje białkowe OMP cechują się największą immunogennością. Wymiernym efektem prowadzonych badań były publikacje eksperymentalne autorstwa lub współautorstwa dr A. Puchalskiego, które ukazały się w polsko- i anglojęzycznych krajowych czasopismach weterynaryjnych. Niezależnie od dorobku publikacyjnego prezentowana tematyka badawcza została wykorzystana także do przygotowania rozprawy doktorskiej, której obrona odbyła się 2001 r.

Interesujące z poznawczego i praktycznego punktu widzenia było zwrócenie przez Habilitanta uwagi na białka błony zewnętrznej wybranych modelowych drobnoustrojów, kontrolowane jonami żelaza. Białka te, których rola sprowadza się do umożliwienia transportu żelaza do wnętrza komórki bakteryjnej odgrywać mogą ważną rolę w stymulowaniu odpowiedzi immunologicznej organizmu, stąd możliwość ich wykorzystywania w szczepionkach przeciwko bakteryjnym zakażeniom układu oddechowego. W przeprowadzonych badaniach eksperymentalnych, których wyniki opublikowano w krajowym, anglojęzycznym czasopiśmie naukowym dokonano charakterystyki elektroforetycznej białek uczestniczących w transporcie żelaza, pochodzących ze szczepów *M. haemolytica* i *P. multocida*. Warto zaznaczyć, że w obydwu publikacjach Habilitant jest pierwszym autorem.

Podobne, ważne z praktycznego punktu widzenia badania wykonano na cielętach i owcach, którym podawano jako immunogen natywną oraz inaktywowaną leukotoksynę. Także wyniki tych badań opublikowano w krajowych czasopismach weterynaryjnych z udziałem dr A. Puchalskiego jako współautora. Prowadząc badania w obszarze bakteriologii weterynaryjnej, w tym zwłaszcza dotyczące etiologii syndromu oddechowego u bydła i owiec, Habilitant wykorzystuje zróżnicowane techniki badawcze i diagnostyczne, w tym konwencjonalne metody feno- i genotypowe oraz zaawansowane technologicznie metody spektrometrii masowej (Maldi-Tof MS). Wyniki dotyczące identyfikacji krajowych szczepów *M. haemolytica* uzyskane z wykorzystaniem tej nowoczesnej techniki Habilitant opublikował w zagranicznym weterynaryjnym czasopiśmie anglojęzycznym.

W opinii recenzenta za ważny w dorobku naukowym dr A. Puchalskiego należy uznać cykl prac dotyczący wpływu stresu transportowego na humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną przeciwko *M. haemolytica* indukowaną leukotoksyną. Badania te zostały poszerzone dodatkowo o ocenę zjawiska stresu oksydacyjnego badanego na modelu cieląt narażonych na czynnik stresowy związany z transportem. Część prac oryginalnych wchodzących w skład tego cyklu została opublikowana ze współudziałem Habilitanta w renomowanych anglojęzycznych czasopismach weterynaryjnych z listy JCR. Podobny charakter miały badania dotyczące wpływu antyoksydantów, takich jak witamina C i E na rozwój zapalenia oraz wybrane parametry immunologiczne u cieląt zakażonych *M. haemolytica* oraz narażonych na stres transportowy. Publikacje prezentujące wyniki tych badań ukazały się w zagranicznych czasopismach anglojęzycznych z listy JCR.

Interesujące badania opublikowane ze współudziałem dr A. Puchalskiego dotyczyły wpływu stosowania metafilaktyki syndromu oddechowego bydła na wybrane mechanizmy immunologiczne oraz komórki zaangażowane w reakcjach odpornościowych. W badaniach tych oceniono wpływ niesterydowych leków przeciwzapalnych, witamin C i E oraz wybranych antybiotyków na badane parametry immunologiczne, a ich wyniki opublikowano w krajowych i zagranicznych anglojęzycznych czasopismach weterynaryjnych.

Odrębny obszar zainteresowań naukowych Habilitanta stanowiły wirusowe zakażenia układu oddechowego bydła, zwłaszcza wywoływane przez BRSV, BHV-1 i BVDV. Badania podejmowane w tym obszarze wiązały się z realizacją projektu badawczego realizowanego we współpracy z uniwersytetem stanowym w Michigan (USA) oraz PIW-PIB w Puławach. Wymiernym efektem tych badań było wykazanie przydatności szybkich komercyjnych testów

paskowych do wykrywania zakażeń BRSV u bydła, analiza sytuacji epizootycznej dotyczącej tych zakażeń u bydła w Polsce oraz publikacja w zagranicznym czasopiśmie weterynaryjnym z listy JCR. Podobne badania dotyczyły oceny sytuacji epizootycznej w odniesieniu do zakażeń BHV-1 i BVDV. W obydwu badaniach wykazano, że zakażenia wywoływane przez te wirusy występują w populacji bydła krajowego, a zatem muszą być brane pod uwagę w ocenie etiologii syndromu oddechowego bydła, a także w opracowywaniu strategii leczenia i profilaktyki tego zespołu.

Najnowszy spośród głównych nurtów badawczych realizowanych w Jednostce zatrudniającej Habilitanta dotyczy alternatywnych metod zwalczania zakażeń bakteryjnych u zwierząt. W obszarze tym prowadzone są badania dotyczące charakterystyki bakteriofagów pod kątem możliwości ich wykorzystania w leczeniu zakażeń u ludzi i zwierząt, powodowanych przez bakterie wielolekooporne. Opracowanie procedury pozyskiwania fagów specyficznych dla poszczególnych gatunków drobnoustrojów stworzyło podstawy do wykorzystania tych cząstek m.in. w terapii syndromu oddechowego bydła. Ponadto, opracowane metody mogą być z powodzeniem wykorzystywane do izolowania i charakterystyki fagów swoistych dla innych grup bakterii, w tym enterotoksycznych szczepów *E. coli* i *Campylobacter*. Obiecujące wyniki badań klinicznych, w których wykazano pozytywny efekt terapeutyczny bakteriofagów w leczeniu zakażeń bakteryjnych u zwierząt gospodarskich skłoniły zespół, z którym stale współpracuje dr A. Puchalski do złożenia wniosków patentowych do Urzędu Patentowego RP w celu objęcia ochroną trzech preparatów fagowych przeznaczonych do leczenia biegunek cieląt na tle zakażenia *E. coli* oraz zapalenia spojówek u psów wywoływanego przez *St. aureus*. Aktualnie opracowane zgłoszenia patentowe podlegają procesowi urzędowej ewaluacji. Niezależnie od badań dotyczących terapii fagowej Habilitant współuczestniczył także w badaniach dotyczących wykorzystania nanocząsteczek metali, srebra, złota, miedzi i platyny jako alternatywy dla terapii antybiotykowej. Skuteczność nanocząsteczek metali wykazano m.in. w leczeniu zapalenia wymienia bydła.

Część dorobku naukowego dr A. Puchalskiego powstała w wyniku współpracy międzykatedralnej i międzywydziałowej. Współpraca z Katedrą Rozrodu macierzystego Wydziału zaowocowała dwoma publikacjami nt. właściwości fenotypowych i genotypowych szczepów *E. coli* izolowanych z przypadków ropomacicza u suk. Podobne badania wykonywane we współpracy z Wydziałem Biologii Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki dotyczyły oceny wybranych, konwencjonalnych i molekularnych metod typowania szczepów *Salmonella Enteritidis* w aspekcie wykorzystania tych metod w badaniach epidemiologicznych.

Nowoczesne metody feno- i genotypowe Habilitant wykorzystał także do oceny właściwości probiotycznych oraz wrażliwości na antybiotyki bakterii z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych od gęsi i kur. W powstałym na podstawie tych badań cyklu 5 prac eksperymentalnych dr A. Puchalski jest współautorem.

Z analizy dorobku naukowego dr A. Puchalskiego wynika, że obok autorstwa i współautorstwa oryginalnych publikacji naukowych wielokrotnie uczestniczył On w krajowych i międzynarodowych konferencjach i sympozjach naukowych, na których przedstawiano doniesienia prezentujące częściowe wyniki badań dotyczących immunoprofilaktyki zespołu oddechowego bydła oraz innych badań podejmowanych przez zespół zatrudniający Kandydata do stopnia naukowego. Udział w kongresach jest dowodem aktywnego uczestnictwa Habilitanta w działalności naukowej krajowego i zagranicznego środowiska weterynaryjnego oraz stwarza okazję do propagowania na zewnątrz osiągnięć naukowych macierzystej Jednostki.

Działalność dydaktyczna i organizacyjna

Od początku pracy w macierzystej Jednostce dr A. Puchalski, obok realizacji programu rozwoju naukowego, prowadzi także zajęcia dydaktyczne dla studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej oraz Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii z przedmiotów Immunologia i Prewencja weterynaryjna. Ponadto, Rada Wydziału Medycyny Weterynaryjnej powierzyła Habilitantowi prowadzenie wykładów i ćwiczeń z przedmiotu Higiena środków żywienia zwierząt czyniąc Go jednocześnie osobą odpowiedzialną za ten przedmiot. Na macierzystym Wydziale dr A. Puchalski pełni także od 2000 r. funkcję pełnomocnika dziekana ds. praktyk studenckich. W zakresie Jego obowiązków leżą wszystkie sprawy administracyjne związane z realizacją przez studentów IV i V roku praktyki klinicznej oraz praktyki w Inspekcji Weterynaryjnej. Działalność ta stanowiła podstawę wyróżnienia Habilitanta w 2018 r. Medalem Komisji Edukacji Narodowej.

Z dołączonego do przesłanej recenzentowi dokumentacji zestawienia liczbowego dorobku naukowego Kandydata do stopnia naukowego oraz analizy bibliometrycznej wynika, że jest On autorem lub współautorem 64 publikacji naukowych oraz 46 doniesień na krajowe i zagraniczne konferencje naukowe. Dorobek naukowy Habilitanta został istotnie powiększony w okresie po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Sumaryczny IF czasopism, w których ukazywały się publikacje autorstwa i współautorstwa dr A. Puchalskiego wynosi 42,099, w tym po uzyskaniu stopnia doktora – 41,76. Łączna liczba punktów wyliczona zgodnie z wykazami

Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 934, w tym po uzyskaniu stopnia doktora – 914. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science wynosi 174, w tym bez autocytowań – 135. Indeks Hirsha według bazy Web of Science wynosi 6.

Podsumowując analizę dorobku naukowego dr A. Puchalskiego, zwłaszcza przypadającego na okres po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, należy zwrócić uwagę na kilka jego cech mających w opinii recenzenta istotne znaczenie dla oceny osiągnięć naukowych Habilitanta w kontekście Jego ubiegania się o kolejny stopień naukowy, tj. stopień doktora habilitowanego.

Po pierwsze, warto podkreślić spójność tego dorobku, wyrażającą się koncentracją na kilku obszarach badawczych tematycznie powiązanych ze sobą, a jednocześnie wpisujących się w jeden podstawowy i główny nurt problemowy, jakim są zakażenia układu oddechowego bydła określane także mianem syndromu oddechowego. Wśród wspomnianych obszarów badawczych należy wymienić badania dotyczące izolacji, identyfikacji oraz charakterystyki fenotypowej i genotypowej czynników bakteryjnych i wirusowych odpowiedzialnych za wywoływanie syndromu oddechowego bydła, charakterystykę białek błony zewnętrznej terenowych szczepów *M. haemolytica* pod kątem możliwości ich wykorzystania w swoistej profilaktyce tego zespołu, wprowadzenie do diagnostyki i identyfikacji bakteryjnych czynników zakażeń układu oddechowego bydła nowoczesnych metod laboratoryjnych opartych na technologii spektrometrii masowej, metafilaktykę jako alternatywną metodę wspomagania układu immunologicznego w zwalczaniu zakażeń układu oddechowego bydła oraz izolację i charakterystykę bakteriofagów specyficznych dla bakterii ważnych z punktu widzenia etiologii syndromu oddechowego bydła.

Po drugie, badania naukowe prowadzone przy współudziale dr A. Puchalskiego posiadają obok walorów poznawczych także istotne znaczenie aplikacyjne. Wyraża się ono m.in. w możliwości praktycznego wykorzystania eksperymentalnie opracowanych szczepionek podjednostkowych wytwarzanych na bazie białek błony zewnętrznej oraz leukotoksyny *M. haemolytica* w swoistej profilaktyce syndromu oddechowego bydła. Aplikacyjny aspekt badań podejmowanych przez dr A. Puchalskiego widoczny jest wyraźnie także w odniesieniu do ostatniego obszaru zainteresowań naukowych Habilitanta, tj. fagoterapii. Obiecujące wyniki badań laboratoryjnych i klinicznych uzyskiwane z użyciem bakteriofagów stwarzają realną szansę na upowszechnienie w przyszłości fagoterapii jako alternatywnej dla stosowania antybiotyków metody celowanego leczenia zakażeń bakteryjnych. Warto przypomnieć, że

zespół autorów zajmujących się tą problematyką, z którym ściśle współpracuje dr A. Puchalski, ubiega się aktualnie o przyznanie opracowanym wynalazkom ochrony patentowej.

Po trzecie, jak wskazuje analiza składu autorskiego publikacji stanowiących dorobek naukowy dr A. Puchalskiego, jest On osobą niezwykle przydatną dla zespołu, w którym pracuje. Świadczy o tym fakt uwzględniania Go jako współautora we wszystkich niemal pracach eksperymentalnych afiliowanych do Jednostki, w której jest zatrudniony. Niewątpliwie jest to także związane z perfekcyjnym dopracowaniem warsztatu metodycznego przez Habilitanta, dającym gwarancję uzyskiwania wiarygodnych i powtarzalnych wyników badań eksperymentalnych.

Po czwarte, należy uwypuklić także umiejętność oraz łatwość i chęć podejmowania przez Habilitanta szeroko zakrojonej współpracy krajowej w zakresie badań interdyscyplinarnych. Dowodem na to są liczne publikacje firmowane przez autorów z innych jednostek naukowych macierzystego Uniwersytetu oraz spoza Uczelni, w których dr A. Puchalski odpowiadał za realizację części badań eksperymentalnych oraz wchodził w skład zespołu autorskiego. Umiejętność nawiązywania współpracy naukowej oraz prowadzenia badań interdyscyplinarnych jest ważna nie tylko w kontekście oceny dorobku naukowego Kandydata do stopnia naukowego, ale także istotna dla całej dyscypliny naukowej w odniesieniu do przyszłej oceny parametrycznej, prowadzonej zgodnie z zasadami przyjętymi w ustawie 2,0.

Analizując dorobek naukowy Kandydata do stopnia naukowego należy zwrócić uwagę także na te elementy, które zdaniem recenzenta w stopniu w nie w pełni wystarczającym wypełniają urzędowo wymagane oczekiwania wskazane w stosownym rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 1 września 2011 r. Konfrontując dorobek naukowy dr A. Puchalskiego z zapisami tego rozporządzenia uważam że byłoby wskazane większe usamodzielnienie się Habilitanta w tworzeniu koncepcji badawczych, modelowaniu badań eksperymentalnych i pisanu publikacji oraz w efekcie w firmowaniu powstałych prac swoim nazwiskiem jako pierwszego autora lub autora korespondencyjnego. Nie mniej ważnym elementem byłoby także otwarcie się na współpracę międzynarodową, co zaowocowałoby powiększeniem dorobku naukowego o interdyscyplinarne publikacje z udziałem współautorów z zagranicznych ośrodków naukowych. Jednocześnie taka współpraca stworzyłaby szansę na wzbogacenie dorobku publikacyjnego w wartościowe prace ukazujące się w renomowanych czasopismach anglojęzycznych z listy JCR o wysokim współczynniku wpływu. Kwestią

wymagającą podjęcia zdecydowanych działań jest natomiast intensyfikacja zakończonych sukcesem starań o przyznanie finansowania na badania naukowe pochodzące ze źródeł zewnętrznych. W dotychczasowej karierze naukowej Habilitant partycypował w realizacji tylko jednego projektu badawczego oraz nie kierował żadnym projektem realizowanym we współpracy z naukowcami z innych ośrodków krajowych i zagranicznych oraz we współpracy z przedsiębiorstwami. Wskazany deficyt w sposób istotny waży w ogólnej ocenie działalności naukowo-badawczej Kandydata do stopnia naukowego oraz wymaga radykalnej korekty jeśli zdecyduje się On w najbliższej przyszłości na dalszy rozwój naukowy oraz pracę na etacie naukowo-dydaktycznym.

Ocena osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki pt. „Syntetyczne oligodeoksynukleotydy klasy C z niemetylowanymi sekwencjami CpG jako składnik zwiększający immunogenność komercyjnej szczepionki dla cieląt zawierającej antygen IROMP *M. haemolytica*.

Recenzowane osiągnięcie jest monografią wydaną przez wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w serii Rozprawy Naukowe, opatrzoną numerem ISSN 1899-2374. Praca dotyczy wykorzystania syntetycznych oligodeoksynukleotydów z niemetylowanymi sekwencjami CpG jako potencjalnych adjuwantów wzmagających reaktywność układu immunologicznego w odpowiedzi na stymulację przy użyciu komercyjnej szczepionki przeciwko syndromowi oddechowemu bydła. Adjuwancyjne oddziaływanie syntetycznych oligodeoksynukleotydów zawierających CpG jest znane od dawna, a skuteczność ich działania została potwierdzona w licznych badaniach eksperymentalnych u ludzi i zwierząt. Dość dobrze poznane zostały także mechanizmy molekularne odpowiedzialne za potencjalizację humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej organizmu pod wpływem CpG. W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest natomiast danych odnośnie możliwości wykorzystania syntetycznych CpG jako adjuwantów dla szczepionek przeznaczonych dla bydła, w tym zwłaszcza przeciwko zakażeniom układu oddechowego. Podjęcie przez Habilitanta badań nad wykorzystaniem CpG klasy C jako adjuwantu szczepionki podjednostkowej przeciwko syndromowi oddechowemu bydła jest zatem uzasadnione tak z poznawczego jak i z aplikacyjnego punktu widzenia. Dodatkowym argumentem przemawiającym za celowością podjętych badań jest fakt powszechnie znanej słabej immunogenności aktualnie dostępnych na rynku szczepionek przeciwko temu zespołowi chorobowemu. W swoich badaniach Autor zaplanował określenie efektu immunostymulacyjnego CpG klasy C w stosunku do bydłych

komórek jednojądrzastych (PBMC) *in vitro*, ocenę dynamiki kształtowania się humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u cieląt po podaniu adjuwantu i/lub szczepionki komercyjnej oraz ocenę bezpieczeństwa stosowania CpG u cieląt, którym podawano preparat w formie adjuwantu szczepionkowego. W badaniach *in vitro* określono stopień proliferacji komórek PBMC stymulowanych CpG, stężenie interferonu gamma w supernatancie hodowli komórek jednojądrzastych oraz ekspresję genów wybranych cytokin typowych dla odporności typu Th1 i Th2. W badaniach tych wykorzystywano komercyjne testy ELISA oraz metodę Real-Time PCR. Dodatkowo zastosowano także metodę cytometrii przepływowej celem określenia typów komórek krwi, które w największym stopniu ulegały immunostymulacyjnemu wpływowi CpG. Badania *in vivo* wykonano ogółem na 18 cielętach podzielonych na 3 grupy, którym podawano komercyjną szczepionkę Bovilis Bovipast RSP firmy Intervet łącznie z adjuwantem w postaci CpG (grupa I), samą szczepionkę komercyjną (grupa II), oraz tylko komercyjny adjuwant (grupa III, kontrolna). W tej części badań określono stężenie przeciwciał swoistych dla antygenu IROMP *M. haemolytica*, stężenie interferonu gamma, chemokiny IP-10 oraz białka ostrej fazy – haptoglobiny. Uzyskane wyniki poddawano analizie statystycznej testami wariancji ANOVA przy wykorzystaniu programu Statistica 12.5.

Badania *in vitro* wykazały, że najbardziej efektywne w stymulacji proliferacji limfocytów bydlęcych okazały się CpG klasy C. wyniki analizy fenotypowej bydlęcych PBMC inkubowanych w obecności CpG wykazały, że głównym typem komórek proliferujących w odpowiedzi na stymulację CpG są limfocyty B. Najlepszym stymulatorem produkcji interferonu gamma okazały się natomiast CpG klasy A, a znacznie słabiej syntezę tę pobudzały CpG klasy C. Wykazano także, że już po 6-godzinnej inkubacji komórek w obecności CpG dochodzi do ekspresji genów wszystkich badanych cytokin, w tym głównie Il-12, IFN alfa, chemokiny IP-10, IFN gamma, TNF alfa, IL-4, IL-6 i IL-21. Wyniki tej części doświadczenia rzucają nowe światło na zjawisko stymulowania bydlęcych komórek jednojądrzastych przez syntetyczne ODN. Immunostymulacyjny efekt CpG klasy C wykazano również w badaniach *in vivo* wykonanych na cielętach. Suplementacja komercyjnej szczepionki przeciwko syndromowi oddechowemu bydła syntetycznymi CpG spowodowała zwiększenie jej immunogenności, o czym świadczył wzrost stężenia przeciwciał surowiczych klasy IgG, IgM oraz podklasy IgG1 i IgG2 swoistych dla antygenu IROMP. Dane te przemawiają za nasileniem obydwu typów odpowiedzi immunologicznej, tj. humoralnej i komórkowej, do czego dochodzi pod wpływem podania CpG klasy C łącznie ze szczepionką komercyjną. Przeprowadzone badania wykazały także, że syntetyczne CpG są związkami bezpiecznymi dla cieląt w przypadku ich podawania

drogą podskórną w dawce 0,5 mg. Świadczy o tym ograniczona i przemijająca miejscowa reakcja zapalna w miejscu iniekcji oraz słabo wyrażona reakcja ogólna w postaci gorączki. Za pobudzeniem reakcji ogólnoustrojowej przemawia również wykazane w badaniach zwiększone stężenie haptoglobiny w drugim dniu po pierwszej i po drugiej dawce immunostymulatora. Z przeprowadzonych badań Autor wyciągnął 7 wniosków. Wprawdzie znajdują one uzasadnienie w świetle wyników badań własnych, tym niemniej w opinii recenzenta w dużej części stanowią powtórzenie uzyskanych wyników badań.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę także na inne nieścisłości dostrzeżone w rozprawie habilitacyjnej, dotyczące głównie metodycznej części pracy oraz interpretacji uzyskanych wyników. Zastrzegam jednocześnie, że prezentowane uwagi krytyczne nie dyskwalifikują rozprawy jako dzieła stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego. Wyrażam jednak nadzieję, że będą one przydatne Autorowi w przyszłości w przypadku podejmowania innych badań o zbliżonej tematyce lub planowania zadań badawczych z wykorzystaniem fenotypowania komórek przy użyciu techniki cytometrii przepływowej.

Autor podaje w metodyce rozprawy, że komórki PBMC do badań *in vitro* izolowano tylko od 3 cieląt. Wydaje się, że taka liczba zwierząt nie w pełni gwarantuje wiarygodność uzyskiwanych wyników, a ponadto stwarza problem w odniesieniu do ich rzetelnego opracowania statystycznego.

Podobnie, w doświadczeniu *in vivo* na cielętach wykorzystano jedynie 18 zwierząt pochodzących z jednego gospodarstwa, podzielonych na 3 grupy, w tym dwie grupy doświadczalne i jedną kontrolną. Analogicznie, można mieć wątpliwości odnośnie miarodajności wyników uzyskanych w tej części badań.

W badaniach fenotypowych PBMC Habilitant oceniał marker powierzchniowy CD2 jako identyfikujący limfocyty T. Takie podejście nie jest do końca precyzyjne i właściwe ponieważ cząsteczka CD2 wprawdzie występuje na limfocytach T, ale stwierdzana jest także na komórkach NK. Należy zatem postawić pytanie w jaki sposób Habilitant rozróżnił obydwie subpopulacje komórek? Warto zwrócić uwagę, że podstawowym markerem limfocytów T przeżuwaczy jest cząsteczka TCR. Wiadomo, że komórki TCR-1(g i d)+ stanowią około 60% wszystkich limfocytów. Innymi markerami limfocytów T są cząsteczki CD1, CD2, CD5 i CD6 oraz CD4, CD8 i WC1. Wspólnym antygenem leukocytarnym komórek bydła jest natomiast cząsteczka CD45, jednak u przeżuwaczy nie występuje ona na limfocytach WC1+ oraz na

monocytach. O tych zależnościach warto pamiętać przystępując do analizy fenotypowej bydlęcych komórek jednojądrzastych.

Jako marker specyficzny dla limfocytów B Habilitant wykorzystał receptor CD21. Należy zaznaczyć, że CD21 ulega silnej ekspresji jedynie na dojrzałych komórkach B, a także na pęcherzykowych komórkach dendrytycznych i częściowo na niedojrzałych tymocytach i limfocytach T. W ontogenezie komórek B receptor CD21 pojawia się po etapie komórek prekursorowych (pre-B), utrzymuje się podczas rozwoju obwodowych komórek B i ostatecznie znika w trakcie końcowego różnicowania się limfocytów B do komórek plazmatycznych. Ekspresja CD21 ulega także stopniowemu zanikowi po stymulacji komórek B *in vitro*. Ponieważ Habilitant stosował w swoim doświadczeniu konkanawalinę A, będącą mitogenem komórek T, należy się zastanowić, czy w związku z tym faktem wykazana w badaniach ekspresja cząsteczki CD21 nie została zaniżona? W celu oceny wpływu badanych preparatów na limfocyty B byłoby natomiast uzasadnione określenie ekspresji cząsteczek BCR, CD19 i CD20.

W części metodycznej pracy nie określono dokładnie jakiej kontroli izotypowej użyto w badaniach cytometrycznych oraz jakie fluorochromy wykorzystywano do znakowania przeciwciał. Podanie wyłącznie numerów katalogowych nie wydaje się wystarczające.

Uporządkowania wymaga terminologia pobrań krwi do badań oraz wykonywania oznaczeń. Przykładowo, w rozdziałach 4.3.1/4.3.4/4.3.5 i 4.3.6 wskazywane są 3 różne scenariusze dotyczące schematu pobierania krwi od cieląt. W efekcie różne rodzaje oznaczeń wykonywano w różnych przedziałach czasowych. Taki stan wprowadza pewne zamieszanie i uniemożliwia porównywanie wyników oraz ich całościową analizę. W pracy brakuje przejrzystości w określeniach dotyczących tzw. dnia 0, czy jest to dzień w którym podawano pierwszą dawkę szczepionki i jednocześnie wykonywano badanie, jak to jest opisane w rozdziale 4.3.5, natomiast dzień 1 to w istocie dzień 2 po podaniu szczepionki, czy też dzień 0 to dzień przed podaniem szczepionki? Z rozdziału 4.3.1 wynika, że szczepionkę podawano w dniach 1 i 14, zatem należy doprecyzować co w doświadczeniu oznacza dzień 0 wskazywany w innych rozdziałach.

W nawiązaniu do zastrzeżenia podanego na wstępie, w rozdziale „Wyniki” oraz „Dyskusja” Autor w miejsce określenia „limfocyty T (CD2+)” powinien użyć sformułowania „limfocyty T i komórki NK”, ponieważ nie dokonywał w pracy ich rozróżnienia.

Nasuwa się także zasadnicze pytanie odnośnie części badań wykonywanych na cieleśach, dlaczego wzorem badań *in vitro* po podaniu szczepionki cieleśom nie izolowano PBMC i nie wykonywano badań cytometrycznych na pełnej krwi bądź izolowanych PBMC? Wydaje się, że wówczas Autor miałby bardziej klarowny obraz odpowiedzi immunologicznej po stymulacji organizmu przy użyciu CpG ODN. Analogicznie, w badaniach *in vivo* nie oceniano stężenia cytokin oraz ekspresji cytokin na izolowanych PBMC lub w pełnej krwi, co dałoby lepszy obraz odnośnie właściwości szczepionek zawierających CpG w kontekście indukowania odpowiedzi typu komórkowego i humoralnego.

CpG ODN są nowymi adiuwantami, o których wiadomo, że selektywnie pobudzają odpowiedź immunologiczną typu Th1, obniżając odpowiedź Th2. W tym kontekście warto byłoby ocenić profil cytokinowy charakterystyczny dla Th1, np. IFN- γ , IL-12 i IL-18 oraz IL-4 i IL-10 w odniesieniu do profilu Th2. Wiadomo również, że CpG ODN silnie pobudzają komórki APC, w tym m.in. komórki dendrytyczne (DC) i makrofagi (obydwa typy z ekspresją MHC I i II) oraz antygenowo specyficzne limfocyty CD4 i cytotoksyczne CD8. Mając na uwadze doniesienia o możliwości wywołania wstrząsu przez CpG warto byłoby także oznaczyć stężenie TNF- α i białek ostrej fazy, takich jak AGP, Fibrynogen i Cp, ewentualnie SAA. Niestety oznaczeń tych zabrakło w pracy Habilitanta w części dotyczącej badań prowadzonych na zwierzętach. Przeprowadzenie wieloparametrycznej analizy odpowiedzi immunologicznej cieleś, uwzględniającej oznaczenia wspomnianych parametrów pozwoliłoby na lepsze udokumentowanie skuteczności lub braku skuteczności szczepionek zawierających w składzie syntetyczne CpG, a także bezpieczeństwa ich stosowania.

W rozdziale „Dyskusja” brakuje jednoznacznego stwierdzenia nt. zasadności stosowania CpG w szczepionkach przeznaczonych dla bydła, co stanowiło przecież główną konkluzję wpływającą z badań zrealizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa habilitacyjna Pana dr A. Puchalskiego, pomimo wyeksponowanych uwag krytycznych, stanowi w opinii recenzenta opracowanie oryginalne, prezentujące wyniki badań uzyskane poprzez samodzielne wykonanie autorsko zaplanowanego doświadczenia oraz poddane naukowej analizie, skonfrontowane z dostępnymi danymi światowego piśmiennictwa i opublikowane w formie monografii naukowej wydanej przez wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W recenzowanej rozprawie Autor kompleksowo traktuje zagadnienie możliwości zastosowania u bydła syntetycznych niemetylowanych sekwencji CpG jako potencjalnych adjuwantów

szczepionkowych wzmagających immunogenność antygenów zawartych w komercyjnej szczepionce przeciwko syndromowi oddechowemu. Wykonanie badań eksperymentalnych *in vitro* i *in vivo* zaplanowanych w doświadczeniu oraz opracowanie uzyskanych wyników łącznie z analizą statystyczną stanowią znaczący wkład Habilitanta w rozwój badań z zakresu immunologii, wakcynologii, mikrobiologii weterynaryjnej oraz chorób zakaźnych bydła. Dzięki swoim badaniom Autor wniósł istotny wkład w rozwiązanie znanego od lat problemu słabej immunogenności szczepionek przeciwko zakażeniom układu oddechowego bydła. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań, jednoznacznie wskazujące na efektywność niemetylowanych sekwencji CpG w stymulowaniu komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej cieląt na antygen szczepionkowy, a także dowodzące bezpieczeństwa stosowania takich adjuwantów u bydła drogą podskórną, należy oczekiwać w perspektywie czasowej istotnego ograniczenia strat ekonomicznych w hodowli bydła, spowodowanych występowaniem syndromu oddechowego.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Analiza i ocena całokształtu dorobku naukowego, działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzującej wiedzę oraz rozprawy habilitacyjnej upoważniają recenzenta do stwierdzenia, że Pan dr n wet. Andrzej Puchalski wypełnia warunki do uzyskania awansu naukowego, zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) oraz spełnia większość wymogów zawartych w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 roku w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (Dz. U. Nr 196, poz. 1165). Na tej podstawie wnioskuję do Wysockiej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pana dr A. Puchalskiego do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Lublin, 07 maja 2019 r.


Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki