

Prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński
KATEDRA I ZAKŁAD IMMUNOLOGII KLINICZNEJ
UNIwersytet Medyczny w Lublinie

**ul. Chodźki 4a
20-093 Lublin**

Tel. (0-81) 448 64 20
fax (0-81) 448 64 21
e-mail: jacek.rolinski@gmail.com

Lublin dn. 23.12.2017r.

Ocena

osiągnięcia naukowego pt. „Neutrofilowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (NPP), właściwości, interakcje z neutrofilami i makrofagami, potencjalne zastosowania ekstraktu neutrofilowego we wspomaganiu procesów gojenia” oraz dorobku naukowego doktor nauk weterynaryjnych Joanny Sylwii Wessely-Szponder adiunkt w Zakładzie Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w związku z wszczęciem postępowania habilitacyjnego

Dr n wet. Joanna Sylwia Wessely-Szponder ukończyła studia na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) w Lublinie uzyskując tytuł lekarza weterynarii w 1993 roku (dyplom lekarza weterynarii nr 22805 z dnia 21 kwietnia 1993). Po ukończeniu studiów rozpoczęła pracę początkowo na stanowisku asystenta (w latach 1994-2006), następnie adiunkta (od roku 2006- nadal) w Zakładzie Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Uwieńczeniem badań prowadzonych w pierwszych latach pracy Habilitantki w Zakładzie Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, ówczesnej Akademii Rolniczej w Lublinie, jest tytuł doktora nauk weterynaryjnych, (specjalność – patofizjologia weterynaryjna) uzyskany w 2006 roku, na podstawie rozprawy pt. „Udział cytokin w destrukcyjnej odpowiedzi neutrofilów w przebiegu zespołu oddechowego u jałówek” nadany uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie w dniu 26 stycznia 2006 roku. Od początku pracy zawodowej w Katedrze Patofizjologii, zainteresowania Habilitantki koncentrowały się wokół oceny czynności

neutrofili oraz ich roli w rozwoju różnych stanów patologicznych. Swoje umiejętności dotyczące prowadzonych badań Kandydatka doskonaliła, odbywając 1 tygodniowe szkolenia: w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu, w 1996 r. i dwukrotnie w Dipartimento di Anatomia Biochimica e Fisiologia Veterinaria, Università di Pisa, w 2003 r. i 2004 r. Była również uczestnikiem kursu „Podstawowe metody badań białek i ich interakcji z DNA“ organizowanego przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, w 2008r. Publikacje powstałe zarówno przed uzyskaniem tytułu doktora nauk weterynaryjnych jak i te z ostatnich lat jej pracy w Zakładzie Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych są spójne tematycznie i świadczą o ukierunkowaniu jej zainteresowań naukowych. Działalność naukowa i stworzony przez Habilitantkę warsztat badawczy przyczyniły się do powstania szeregu wartościowych prac opublikowanych między innymi w czasopismach posiadających współczynnik wpływu (impact factor, IF), które znajdują się na liście filadelfijskiej. Należy do nich również osiągnięcie naukowe zatytułowane „Neutrofilowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (NPP), właściwości, interakcje z neutrofilami i makrofagami, potencjalne zastosowania ekstraktu neutrofilowego we wspomaganiu procesów gojenia” składającego się cyklu monotematycznych artykułów naukowych. Przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe składa się z cyklu 6 prac pełnotekstowych, które zostały opublikowane w czasopismach posiadających IF, znajdujących się na liście filadelfijskiej:

1. Wessely-Szponder J., Majer-Dziedzic B., Smolira A. 2010. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. *Journal of Microbiological Methods* 83, 8-12. IF (2010): 2,018, punkty MNiSW(2010):27.
2. Wessely-Szponder J., Bobowiec R., Szponder T. 2012. The influence of porcine prophenin on neutrophils isolated from rabbit blood during implantation of calcium sulphate graft material into bone tissue. *World Rabbit Science* 20, No 3, 163-172, IF (2012) :0,62, punkty MNiSW (2012):25.

3. Wessely-Szponder J., Szponder T., Bobowiec R., Smolira A. 2013. The influence of porcine cathelicidins on neutrophils isolated from rabbits in the course of bone graft implantation. *World Rabbit Science* 21, 175-183, IF (2013) :0,86, punkty MNiSW (2013):25.
4. Smolira A., Wessely-Szponder J. 2015. Importance of the matrix and the matrix/sample ratio in MALDI-TOF-MS analysis of cathelicidins obtained from porcine neutrophils. *Applied Biochemistry and Biotechnology Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology* 175, 2050-65. IF (2015): 1,606, punkty MNiSW (2015):20.
5. Wessely-Szponder J., Smolira A. 2015. Response of antimicrobial peptides from porcine neutrophils to pentoxifylline and antigens from Gram negative and Gram positive bacteria. *Research in Veterinary Science* 104, 160–165, IF (2015): 1,298 punkty MNiSW (2016):35.
6. Wessely-Szponder J., Szponder T., Bobowiec R. 2017. Different activation of monocyte-derived macrophages by antimicrobial peptides at a titanium tibial implantation in rabbits. *Research in Veterinary Science* 115, 201-210, IF (2015): 1,298 punkty MNiSW (2015): 35.

Wiodącym tematem badań w/w publikacjach są neutrofilowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (NPP) oceniane u dwóch gatunków zwierząt. Dzięki modyfikacji metody Anderson i wsp. Kandydatka mogła skutecznie wyizolować a następnie zbadać naturalne NPP, w warunkach „in vitro”, oceniając czynność granulocytów, monocytów i makrofagów po stymulacji różnymi czynnikami pro- i przeciwzapalnymi. Przykładem może być opracowana przez Habilitantkę metoda, izolacji z surowego ekstraktu neutrofilowego świń, a następnie identyfikacji katelicydyn, co pozwoliło na ocenę ich właściwości antibakteryjnych i cytotoksycznych. Ważnym elementem badań przeprowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego była optymalizacja metody identyfikacji peptydów w badanych próbkach za pomocą spektrometrii mas MALDI TOF.

W pięciu pracach z tego cyklu Habilitantka jest pierwszym autorem. Załączone oświadczenia wszystkich współautorów potwierdzają, że wkład Kandydatki w prezentowane prace jest

wiodący, a ona sama swój udział procentowy szacuje na 80-90%. (z wyjątkiem jednej publikacji – w której jej udział wynosi 10% i gdzie jest drugim autorem). Łączna punktacja prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi: impact factor = 7,7 według listy JCR, według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego=167 pkt. Pierwsza z publikacji składających się na osiągnięcie naukowe (Journal of Microbiological Methods 2010, 83, 8-12) jest pracą, której wyniki stanowiły bazę wyjściową do dalszych badań. Pozwoliły one na optymalizację preparatyki liofilizatu ekstraktu z granulocytów świń, z zawartymi w niej NPP (PR-39, PG1, PG2, PG3, PF2), do pomiaru metodą MALDI. Badania zostały wykonane we współpracy z Zakładem Spektrometrii Mas Instytutu Fizyki Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej. Należy podkreślić znaczenie, możliwości praktycznego wykorzystania opracowanej przez Kandydatkę metody, do oceny próbek biologicznych w celu szybkiego i dokładnego wykrycia w nich różnych rodzajów katelicyn. Znalazło to również odzwierciedlenie w publikacji (Applied Biochemistry and Biotechnology 2015, 175 (4), 2050-65). Podobnie jak w poprzednio omawianej pracy, jej wyniki mają również istotne znaczenie praktyczne. W kolejnych dwóch publikacjach (World Rabbit Science 20, No 3, 163-172. i World Rabbit Science 21, 175-183) składających się na osiągnięcie naukowe dr n wet. Joanna Sylwia Wessely-Szponder badała wpływ implantów do ubytku w kości piszczelowej, na neutrofile pobrane z krwi królików w różnych odstępach czasu po zabiegu. W pierwszej publikacji, gdzie zastosowano implant z siarczanu wapnia, badania wykazały, że profeniny uzyskiwane z neutrofilii świń oprócz działania bakteriobójczego wykazują efekty immunomodulujące, których dynamika zmieniała się w czasie. W drugiej z omawianych publikacji oceniono wpływ implantu tytanowego na krążące we krwi monocyty, w warunkach stymulacji ekstraktem neutrofilowym. Wyniki obu prac sugerują, że ekstrakt neutrofilowy wykazuje zróżnicowane wielokierunkowe działanie, zarówno pro- jak i przeciwzapalne. Wydaje się, że w odpowiednio dobranych stężeniach peptydy te mogą być

rozważane jako preparaty do miejscowego wspomaganie zrostu kostnego podczas implantacji biomateriału. Kolejna praca z tego cyklu (Research in Veterinary Science 2015, 115, 201-210), dotyczy oceny oddziaływania implantu tytanowego na krążące we krwi królika monocyty oraz wpływu ekstraktu antybakteryjnego pozyskanego z neutrofilii króliczych na makrofagi podczas implantacji tytanu do ubytku kostnego w kości piszczelowej królika. Badania wykazały możliwość częściowego wpływu na czynność makrofagów i proces gojenia tkanek przez dodanie ekstraktu neutrofilowego. Ważną częścią badań przeprowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego była ocena wpływu pentoksyfiliny (PTX), - jako czynnika, który może hamować niektóre prozapalne funkcje neutrofilii- np. na uwalnianie przez granulocyty dojrzałych, aktywnych postaci katelicydyn u świń. Uzyskane wyniki wskazują na istotne hamowanie przez PTX szeregu funkcji prozapalnych granulocytów, między innymi: zdolność do uwalniania elastazy, MPO, zasadowej fosfatazy (ALP), po stymulacji LPS lub fMLP. Co więcej Habilitantka wykazała, że wytwarzanie katelicydyn nie zostało zahamowane przez PTX (Research in Veterinary Science 2015, 104, 160-165).

Wyniki badań uzyskane przez Habilitantkę w ramach osiągnięcia naukowego pozwoliły na wyciągnięcie poniższych wniosków:

- 1) Opracowana przeze mnie modyfikacja metody separacji peptydów pozwala na równoczesną izolację wszystkich obecnych w neutrofilach katelicydyn, a także pozyskiwanie tych peptydów z hodowli komórkowych.
- 2) Wykazałam, że metoda MALDI TOF jest użyteczna do identyfikacji otrzymywanych peptydów antybakteryjnych zarówno z ekstraktów neutrofilowych, jak i hodowli komórkowych, tak więc pozwala na jakościową ocenę składu peptydowego frakcji pochodzących od różnych gatunków.

- 3) Ekstrakt komórkowy otrzymany z neutrofilii świń stymuluje prozapalnie neutrofile królicze. Wzmacnia uwalnianie enzymów (elastazy, MPO, ALP) i wytwarzanie wolnych rodników, wspomagając antybakteryjne działanie w przebiegu implantacji biomateriału.
- 4) Wyizolowane naturalne katelicydyny świń (profeniny, PR-39, jak i protegryny) zmniejszają uwalnianie MPO i ALP, ograniczają też generowanie wolnych rodników z neutrofilii króliczych w przebiegu implantacji biomateriału. Natomiast uwalnianie elastazy, niezbędnej na wczesnym etapie rozwoju reakcji zapalnej, nie jest hamowane.
- 5) Wpływ ekstraktu neutrofilowego na polaryzację makrofagów zarówno pro- jak i przeciwzapalną, zapewnia ich optymalne zastosowanie we wspomaganie zrostu kostnego i współuczestniczy ze znanym już działaniem przeciwdrobnoustrojowym, mającym znaczenie w ograniczeniu stosowania antybiotyków.
- 6) Zabieg wszczepienia do ubytku kostnego implantu tytanowego nie aktywuje krążących monocytów, w sposób, który zmieniałby morfologię i funkcję pochodzących z nich makrofagów.
- 7) Zastosowanie pentoksyfiliny, jako czynnika hamującego aktywność neutrofilii, nie ogranicza ekspresji dojrzałych postaci katelicydyn w hodowlach neutrofilowych.

Podsumowując, wyniki zaprezentowane w osiągnięciu naukowym stwierdzam, że są one cenną próbą opracowania nowych i modyfikacji opisanych już w literaturze naukowej metod izolacji peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz poznania ich wpływu w niezbadanych jeszcze warunkach na granulocyty i monocyty krwi świń i królików. Zbadanie mechanizmów bakteriobójczych i immunomodulujących NPP w warunkach związanych zarówno ze stanem zapalnym jak i z regeneracją tkanek, być może pozwoli na opracowanie nowych metod leczenia. Należy podkreślić praktyczny aspekt uzyskanych wyników badań, co wnosi nie tylko określone wartości poznawcze, ale ma również ważne znaczenie praktyczne.

Ocena pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (dorobku naukowego)

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze dr n. wet. Joanny Sylwii Wessely-Szponder obejmują 33 publikacje, w tym 13 oryginalnych prac znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) oraz 6 prac poglądowych. Jest pierwszym autorem w 21 pracach oryginalnych i 6 artykułach przeglądowych. Łączna suma punktów z włączeniem prac składających się na osiągnięcie naukowe wynosi: IF = 14.478, MNiSW = 504 pkt). Habilitantka jest również autorem lub współautorem 20 doniesień zjazdowych prezentowanych na kongresach krajowych i międzynarodowych. W dostarczonych materiałach dotyczących wszczęcia postępowania habilitacyjnego brak danych na temat liczby cytowań i indeksu Hirscha.

W początkowym etapie pracy zawodowej w Katedrze Patofizjologii, zainteresowania Habilitantki koncentrowały się wokół oceny czynności neutrofilii bydłych (w tym aktywności sekrecyjnej) w przebiegu ostrego i przewlekłego zespołu oddechowego u bydła (BRD), skaz krwotocznych u zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem choroby von Willebranda u psów, aktywności proliferacyjnej limfocytów oraz wpływu PMSC na wytwarzanie estrogenu przez komórki warstwy ziarnistej jajnika. Z tego czasu pochodzi 9 prac (IF=0,188, 27 pkt MNiSW). Kandydatka jako jedna z pierwszych w Polsce udowodniła, że nadmierna aktywacja granulocytów i sekrecja przez nie różnych czynników istotnie wpływa na przebieg kliniczny zespołu oddechowego u bydła (Polish Journal of Veterinary Sciences, 7,157-161) oraz na wydzielanie wybranych cytokin TNF α i IL-8 w warunkach in vitro (Acta Veterinaria Hungarica 56, 187-196). Wykazała również, że aktywność prozapalna neutrofilii może przyczynić się do nieodwracalnych uszkodzeń płuc u bydła, co wydaje się istotne z praktycznego i klinicznego punktu widzenia. Co więcej badania wykazały, że podawanie antybiotyku monenzyny u bydła w przebiegu BRD może dodatkowo nasilić objawy choroby (Medycyna Wet. 62(8), 951-954). Działalność naukową Habilitantki można podzielić na kilka tematów badawczych wśród których należy wymienić:

- 1) Zaburzenia krzepnięcia krwi i reakcji zapalnej w różnych stanach patologicznych – wykazano między innymi powiązania układu krzepnięcia i reakcji zapalnej u bydła, które prowadzić mogą do poważnych zaburzeń łącznie z zespołem rozsianego krzepnięcia śródnaczyniowego (DIC) i zespołem uszkodzeń wielonarządowych (MODS) (*Acta Veterinaria Hungarica* 57, 2, 283-293) oraz związek wybranych czynników krzepnięcia z zaburzeniami rozwojowymi u psów: chorobą Legg-Calve-Perthesa (LCD) i osteochondrozą (OC) (*J Bull Vet Inst Pulawy* 54, 433-436).
- 2) Wpływ znieczulenia na aktywność wydzielniczą neutrofilii króliczych – udowodniono, że badane środki znieczulające powodowały obniżenie uwalniania elastazy, MPO, ALP i NO na początku znieczulenia, a efekt ten ustępował po 24 godzinach od zabiegu operacyjnego (*World Rabbit Science* 2010, 18:169-177).
- 3) Aktywność wydzielnicza neutrofilii w odniesieniu do zaburzeń reprodukcyjnych u różnych gatunków zwierząt – interesujące badania, które wykazały, że w fazie lutealnej u loch zmniejszała się aktywność wydzielnicza, podczas gdy w fazie pęcherzykowej nasilała aktywność wydzielnicza neutrofilii co przekładało się na zmiany odporności zależne od fazy cyklu rujowego (*Bull Vet Inst Pulawy*, 2013, 57, 65-68), w kolejnej pracy z tego cyklu stwierdzono że zmniejszona czynność granulocytów zwiększa podatność klaczy na zakażenia układu rozrodczego (endometritis) i trudności z zażrebieniem w pierwszej rui po porodzie (*Journal of Equine Veterinary Science*, 2014, 34, 1286–1293).
- 4) Odpowiedź makrofagowa na stymulację prozapalną w przebiegu procesu nowotworowego – badania przeprowadzono na makrofagach od chorych na pierwotnego raka wątroby (hepatocellular carcinoma -HCC) oraz od szczurów z doświadczalnie wywołanym nowotworem (*In vivo* 2016, 30 (6) 853-862).
- 5) Znaczenie odpowiedzi zapalnej w stresie transportowym u koni - *Medycyna Wet.* 2014, (70), 546-549 i *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2015, Vol. 18, No. 2 , 407–413.

Zasługą Habilitantki jest też modyfikacja metody oceny aktywności sekrecyjnej granulocytów i dostosowanie jej do specyfiki gatunkowej zwierząt oraz udoskonalenie metody ilościowej analizy peptydów z użyciem MALDI TOF. Metody te wykorzystwała również w swoich późniejszych badaniach naukowych (Rapid Commun. Mass Spectrom. 2015, 29, 1811–1816).

Podsumowując pozostały dorobek naukowy stwierdzam, że uzyskane wyniki są istotne z praktycznego i klinicznego punktu widzenia. Wszystkie wymienione wyżej publikacje napisane zostały ze znajomością omawianych zagadnień. Zagadnienia prezentowane w przedstawionych pracach z całą pewnością wymagały żmudnej i skrupulatnej pracy badawczej.

Wśród pozostałych osiągnięć zawodowych należy wspomnieć o działalności dydaktycznej Habilitantki, która obejmuje wieloletnią pracę ze studentami Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Prowadziła i nadal prowadzi zajęcia z zakresu patofizjologii, współuczestniczyła w tworzeniu programu zajęć dla tego przedmiotu i innych. Od roku 2007 jest opiekunem Studenckiego Koła Patofizjologów, a członkowie tego Koła wielokrotnie zdobywali nagrody i wyróżnienia na Międzynarodowych Konferencjach Studenckich Kół Naukowych. Od 2007 jest kierownikiem lub wykonawcą projektów prezentowanych w trakcie Lubelskiego Festiwalu Nauki. Habilitantka jest członkiem następujących towarzystw naukowych: Polskiego Stowarzyszenia Biomateriałów, Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, od 2016 roku jest skarbnikiem Lubelskiego Oddziału PTNW. Od 2016 roku jest Członkiem Komitetu Redakcyjnego czasopisma Archives on Veterinary Science and Technology. Sześciokrotnie recenzowała prace w czasopismach o zasięgu międzynarodowym w tym dwukrotnie w czasopismach z listy filadelfijskiej.

Reasumując stwierdzam że wyniki badań dr n. wet. Joanny Sylwii Wessely-Szponder składające się na osiągnięcie naukowe jak i jej dorobek naukowy oraz pozostałe osiągnięcia zawodowe, spełniają warunki określone w Ustawie z dn. 18 marca 2011 r. o tytułach naukowych i stopniach naukowych oraz w rozporządzeniu Ministra Nauki i

Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r. Zarówno osiągnięcie naukowe jak i pozostałe prace świadczą o jej zaangażowaniu w pracę naukową i pozwalają na opracowanie praktycznych zaleceń dotyczących wykorzystania naturalnych NPP. Na podstawie dokonanej oceny osiągnięcia i dorobku naukowego mam przyjemność przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, wniosek o dopuszczenie dr n. wet. Joanny Sylwii Wessely-Szponder do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

Jacek Roliński

Prof dr hab n. med. Jacek Roliński