



Prof. dr hab. Alina Wieliczko  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

#### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Barbary Małgorzaty Kalenik

pt.: **„Profile transkryptomyczne śledzion kur immunizowanych szczepionkami przeciwko wirusowi grypy ptaków H5N1”** wykonanej w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Agnieszki Sirko oraz dr Anny Góra- Sochackiej.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dyrektora Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, prof. dr hab. Jarosława Poznańskiego, z dnia 5 listopada 2020 r. (RN/SPD-12-710/2020).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech publikacji poprzedzony syntetycznym opracowaniem przeprowadzonych badań. Zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, art. 13 ust. 2 i 4 (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) cykl ten może być podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej stanowią monotematyczny cykl badań i dotyczą porównania profili transkryptomicznych śledzion kur typu mięsnego i nieśnego immunizowanych różnymi rodzajami szczepionek nowej generacji przeciwko grypie ptaków. Badania realizowane były w ramach dwóch projektów finansowanych przez: MNiSW ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka „Centrum Biotechnologii Produktów Leczniczych. Pakiet innowacyjnych biofarmaceutyków dla terapii i profilaktyki ludzi i zwierząt (WND-



POIG.01.01.02-00-007/08) oraz przez NCBiR w ramach projektu „Szczepionka przeciwko grypie- innowacyjne otrzymywanie antygenów podjednostkowych” (PBS2/A7/14/2014).

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej w formie cyklu publikacji, Doktorantka zachowała podstawowe elementy dysertacji. Opracowanie liczy 45 stron i składa się następujących rozdziałów: Indeks skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Założenia i cel pracy, Opis wyników, Podsumowanie oraz Bibliografia. Ponadto opracowanie zawiera Załączniki - publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów.

**We wstępie**, liczącym 18 stron, podzielonym na podrozdziały, Doktorantka w sposób czytelny przedstawiła aktualne informacje dotyczące wirusa grypy, w tym szczególnie klasyfikację wirusów grypy oraz zjawiska będące przyczyną zmienności genetycznej wirusów grypy. Podkreśliła przy tym fakt, że w przypadku wirusów RNA błędy polimerazy RNA, reasortacja segmentów genomów oraz rekombinacje genetyczne to procesy skutkujące powstawaniem nowych szczepów/wariantów wirusa o odmiennej wirulencji. Sytuację taką obserwujemy w odniesieniu do wirusów grypy ptaków, choroby, która od wielu lat stanowi poważny problem ekonomiczny w wielkotowarowej produkcji drobiu a także problem epidemiczny. Zróżnicowany przebieg zakażenia u ptaków, od łagodnego (przyczyną są nisko patogenne szczepy wirusa grypy) aż do bardzo ostrego z wysoką śmiertelnością ptaków (szczepy wysoce patogenne wirusa), transmisja międzygatunkowa wirusów grypy ptaków na wiele innych gospodarzy (zarówno zwierząt gospodarskich jak też dzikich), obecność i przeżywalność wirusów w środowisku oraz potwierdzony zoonotyczny charakter niektórych podtypów wirusa grypy ptaków - to realne podstawy do obaw pojawienia się kolejnych pandemii. Następne, istotne zagadnienia omówione we wstępie są ściśle powiązane z tematyką badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej. Doktorantka omawia rolę immunizacji ptaków jako jeden z istotnych elementów w programie kontroli grypy ptaków, charakteryzuje szczepionki przeciwko grypie ptaków, te tradycyjne oraz nowej generacji – a więc atenuowane szczepionki delecyjne, rekombinowane szczepionki wektorowe, szczepionki znakowane, inaktywowane szczepionki podjednostkowe i szczepionki DNA. W tej części wstępu omówione zostały również metody monitorowania skuteczności szczepień na grypę, w tym metody z użyciem mikromacierzy i sekwencjonowania nowej generacji



pozwalające na zrozumienie skomplikowanych zależności genetycznych i interakcji między wirusem a gospodarzem.

Za najbardziej ciekawy rozdział wstępu można uznać fragment, w którym Autorka syntetycznie przedstawia przegląd literatury na temat wykorzystania kury domowej jako modelowego organizmu do badań nad gripą ptaków. Od 2004 r., od kiedy opublikowano sekwencje genomu kury (a był to pierwszy zsekwencjonowany genom zwierzęcia hodowlanego) prowadzi się wiele badań genetycznych na modelu kurzym. W rozdziale tym Doktorantka przybliżyła dotychczasową wiedzę na temat odpowiedzi immunologicznej kur na zakażenie wirusem grypy oraz rolę śledziony w układzie odpornościowym.

W mojej ocenie wstęp jest zwięzły i starannie skomponowaną częścią pracy, dobrze wprowadzającą czytającego w całość zagadnień będących przedmiotem badań Doktorantki.

W rozdziale **Założenia i cel pracy** Doktorantka przyjęła pięć założeń badawczych, z których najistotniejsze dotyczą oceny profili transkryptomycznych śledzion ptaków immunizowanych różnymi szczepionkami przeciwko wirusowi grypy ptaków. Śledziona to narząd zawierający komórki układu odpornościowego, który reaguje zmianami proteomicznymi i transkryptomicznymi na podane antygeny szczepionkowe. Cele badawcze, jakie nakreśliła Doktorantka były z pewnością warte aby je zrealizować, zarówno w aspekcie naukowym i co bardzo istotne, również praktycznym w świetle problemów jakie napotyka światowa produkcja drobiu w ograniczaniu strat spowodowanych przez zakażenie wirusem grypy ptaków. Uzyskane wyniki z tego obszaru mogą przyczynić się do optymalizacji preparatów szczepionkowych, w tym polepszenia ich skuteczności i bezpieczeństwa

Założenia i cele pracy zostały zrealizowane w badaniach eksperymentalnych a wyniki przedstawiono w dwóch publikacjach oryginalnych oraz jednej pracy przeglądowej. Wszystkie te prace (wykaz poniżej) zostały opublikowane w latach 2018-2020, w czasopiśmie znajdujących się na liście czasopism punktowanych przez MNiSW. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) wyliczony dla tych prac wynosi 8.409.

Rozprawę stanowią następujące publikacje:

Prace oryginalne:

1. Kaleník BM, Góra-Sochacka A, Stachyra A, Pietrzak M, Kopera E, Fogtman A, Sirko A.:  
Transcriptional response to a prime/boost vaccination of chickens with three vaccine



variants based on HA DNA and Pichia-produced HA protein. Dev Comp Immunol. 2018. doi: 10.1016/j.dci.2018.07.001

2. Kalenik BM, Góra-Sochacka A, Stachyra A, Olszewska-Tomczyk M, Fogtman A, Sawicka R, Śmietanka K, Sirko A.: Response to a DNA vaccine against the H5N1 virus depending on the chicken line and number of doses. Virol J. 2020. doi: 10.1186/s12985-020-01335-9.

Praca przeglądowa:

1. Kalenik BM, Góra-Sochacka A, Sirko A.: B-defensins - Underestimated peptides in influenza combat. Virus Res. 2018. doi: 10.1016/j.virusres.2018.01.008.

We wszystkich pracach mgr Barbara Małgorzata Kalenik jest pierwszym autorem z wiodącym wkładem w realizację eksperymentów własnych badań, analizę wyników badań, przygotowaniem tabel, rycin, publikacji a także odpowiedzi dla recenzentów na etapie procedowania publikacji. Ponadto, wiodąca rola Doktorantki w każdej z publikacji została potwierdzona w załączonych oświadczeniach współautorów.

W rozdziale **Opis wyników** Doktorantka w syntetyczny sposób przedstawiła wyniki badań zaprezentowane obszernie w publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej. Podkreślić należy, że prace te dotyczące oceny zmian transkryptomu kur immunizowanych różnymi wariantami szczepionki opartej na hemaglutynie wirusa grypy ptaków oraz uwzględniające odpowiedzi różnych ras/typów kur szczepionych szczepionkami nowej generacji należą do nielicznych z jakimi możemy się spotkać w literaturze światowej. Najczęściej miarą oceny skuteczności podanej szczepionki jest określenie poziomu swoistych przeciwciał poszczepiennych, określanych w teście ELISA lub HI. Natomiast, dzięki zastosowaniu w badaniach nowoczesnych technik badawczych z wykorzystaniem mikromacierzy firmy Affymetrix Doktorantka mogła oznaczyć w śledzionach kur szczepionych i przeanalizować ekspresję genów oraz określić profile transkryptomiczne śledzion. Najwięcej genów o zmienionym poziomie ekspresji zaobserwowano w grupie Białko/białko, najmniej w grupie DNA/białko. Ponadto, w grupie genów najsilniej indukowanych przez szczepienie zidentyfikowano geny kodujące ptasie  $\beta$ -defensyny, krótkie polipeptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Kolejna publikacja to przedstawienie wyników odpowiedzi immunologicznej kur różnych ras i typów użytkowych, immunizowanych jedno- lub dwukrotnie szczepionką DNA opartą na



hemaglutyninie wirusa grypy ptaków. Autorka podkreśla, że zmianę ekspresji kilkudziesięciu-kilkuset genów w śledzionach kur stwierdzano w każdej grupie immunizowanych ptaków, niezależnie od sposobu immunizacji i typu produkcyjnego kur. Geny kodujące białka funkcjonalne powiązane z układem neuroendokrynoimmunologicznym stanowiły 22-45%, natomiast największe liczby genów o zmienionej ekspresji (DEGs) jak też największe zróżnicowanie poziomu ekspresji zaobserwowano u kur typu mięsnego. Natomiast u kur typu nieśnego stwierdzono większy niż kur typu mięsnego odsetek niekodujących RNA wśród genów o zmienionym poziomie ekspresji po szczepieniu. Ponadto zaobserwowano bardzo silną negatywną korelację między liczbą genów o zmienionym poziomie ekspresji oraz różnicami poziomu ekspresji a mianem hamowania hemaglutynacji (HI). Wyniki takie, jak wskazuje sama Autorka w celu lepszego zrozumienia i prawidłowej interpretacji wymagają dalszych badań.

Praca przeglądowa stanowi wartościowe uzupełnienie informacji na temat aktywności przeciwigrypowej  $\beta$ -defensyn.  $\beta$ -defensyny stanowią ważny, choć stosunkowo mało poznany czynnik odpowiedzi immunologicznej nieswoistej.  $\beta$ -defensyny mogą w przyszłości stanowić /być dodatkiem w szczepionkach DNA lub podjednostkowych w charakterze adiuwantu. Powinno się kontynuować badania w tym kierunku.

Na podstawie uzyskanych wyników badań eksperymentalnych Doktorantka w podsumowaniu podkreśla, że metody umożliwiające tworzenie profili transkryptomicznych charakteryzują zmiany powodowane przez podanie szczepionki dogłębniej niż analizy serologiczne czy cytometryczne. Ponadto poznanie i zrozumienie sieci zależności odpowiedzi immunologicznej w zależności od rodzaju podanej szczepionki, rasy/typu użytkowego kur czy też liczby immunizacji może być kluczem do tworzenia efektywniejszych i bezpieczniejszych szczepionek.

Ostatni rozdział zatytułowany **Bibliografia** zawiera 10 stron odpowiednio dobranego piśmiennictwa, wskazującego na umiejętność wyboru materiałów źródłowych wykorzystanych do planowania badań, analizy wyników oraz dyskusji. To też wyraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Reasumując, podstawą recenzowanej rozprawy doktorskiej są wymienione powyżej trzy artykuły, w tym dwa z wynikami prac eksperymentalnych i jedna praca przeglądowa, opublikowane w znaczących czasopismach o naukowych. Oznacza to, że wcześniej zostały



poddane wnikliwym recenzjom. Integralną część rozprawy stanowią również oświadczenia współautorów.

Tak więc moje nieliczne uwagi, które nasunęły mi się podczas czytania recenzowanej rozprawy doktorskiej generalnie dotyczą treści przedstawionego opracowania przeprowadzonych badań.

I tak we wstępie:

- podrozdział 2.2, str. 15 Doktorantka pisze: transmisja międzygatunkowa grypy ptaków – właściwie: transmisja międzygatunkowa wirusów grypy ptaków;
- podrozdział 3, str. 20: - przeciwciała odmadczyne – właściwie: przeciwciała matczyne; szczepienie kurczaków- szczepienie kurcząt; str. 21: szczepionki wektorowe przeciwko zakaźnym wirusie zapalenia krtani i tchawicy – właściwie: szczepionki wektorowe - np. przeciwko zakaźnemu zapaleniu krtani i tchawicy kur;
- podrozdział 4.1, str. 26 oraz str. 32: w teście inhibicji hemaglutynacji – właściwie: w teście hamowania hemaglutynacji; 4.2 – str. 27: obecność torebki Fabrycjusza – obecność bursy Fabrycjusza

W rozdziale „Założenia i cel pracy” w moim odczuciu z pierwszego celu można śmiało zrezygnować, tym bardziej, że nie mamy „Chorób weterynaryjnych”.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji dysertacja została przygotowana bardzo starannie i nie sposób doszukać się w niej błędów edytorskich.

Praca została dobrze zaplanowana, wykonana z zastosowaniem nowoczesnych technik diagnostycznych, we współpracy z ośrodkiem naukowym, w którym możliwe były do wykonania eksperymenty na modelu kury. Otrzymane wyniki są bardzo interesujące i wnoszą nowe wartości poznawcze i aplikacyjne do obecnego stanu wiedzy na temat szczepionek nowej generacji przeciwko grypie ptaków.

Drobne uwagi mają charakter porządkowy i dyskusyjny bez wpływu na wysoką ocenę pracy.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Barbary Małgorzaty Kalenik pt.: **„Profile transkryptomiczne śledzion kur immunizowanych szczepionkami przeciwko wirusowi grypy ptaków H5N1”** odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz warunkom określonym w § 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia



UNIwersytet  
Przyrodniczy  
we Wrocławiu

26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Barbary Małgorzaty Kalenik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 18 grudnia 2020 r.

  
prof. dr hab. Alina Wieliczko

