



RECENZJA

Osiągnięcia naukowego oraz istotnej aktywności naukowej kandydatki do stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria

dr Ewy Długosz

➤ **Sylwetka Habilitantki**

Pani dr Ewa Długosz jest absolwentką Międzywydziałowego Studium Biotechnologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, a dyplom magistra inżyniera biotechnologii w zakresie biotechnologii w produkcji i ochronie zdrowia zwierząt uzyskała w 2003. Stopień doktora nauk weterynaryjnych uzyskała 23.04.2008 r. na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej. Podstawą uzyskania stopnia doktora była rozprawa doktorska zatytułowana „Stężenia wybranych cytokin u chomików syryjskich immunizowanych metaloproteinazą 7 *Ancylostoma ceylanicum* i zarażanych larwami inwazyjnymi tego nicienia” (stopień uzyskany z wyróżnieniem). Jej kariera naukowa od początku związana jest z Zakładem Parazytologii i Chorób Inwazyjnych w Katedrze Nauk Przedklinicznych, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie., gdzie od 1. 07. 2008 Habilitantka jest zatrudniona na stanowisku adiunkta.

➤ **Ocena osiągnięcia naukowego**

Osiągnięcie naukowe przedstawione przez Habilitantkę zatytułowane „Określenie roli larwalnych antygenów *Toxocara canis* w przebiegu toksokarozy” stanowi jednotematyczny cykl czterech publikacji oryginalnych, opublikowanych w latach 2015-2021 w trzech czasopismach. Wszystkie czasopisma znajdują się na liście JCR, a ich współczynnik wpływu (IF) waha się od 1,16-4,531 zgodnie z rokiem opublikowania:

- Parasitology Research (2015, IF: 2,027, 30 pkt MNiSW;
2019, IF: 1,641, 70 pkt MNiSW)
- Acta Parasitologica (2016, IF: 1,16, 20 pkt MNiSW)
- Pathogens (2021, IF: 4,531, 100 pkt MNiSW).

Łączny IF publikacji wskazanych jako osiągnięcie wynosi 9,359, a łączna liczba punktów MNiE wynosi 220. We wszystkich pracach Habilitantka jest pierwszym oraz autorem korespondencyjnym. Procentowy udział Habilitantki w powstawanie publikacjach został określony na 80-85%, i polegał na opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania, zaplanowaniu, przygotowaniu i przeprowadzeniu części doświadczeń, analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. Liczba autorów poszczególnych publikacji waha się od 2 do 4, a dane określające indywidualny wkład każdego z autorów w powstanie pracy oraz oświadczenia współautorów zostały zamieszczone w załącznikach 5 i 6 do Wniosku.

Osiągnięcie naukowe stanowią następujące publikacje:

- Długosz E, Wasyl K, Klockiewicz M, Wiśniewski M. 2015. *Toxocara canis* mucins among other excretory-secretory antigens induce *in vitro* secretion of cytokines by mouse splenocytes. *Parasitology Research* 114:3365–3371, DOI: 10.1007/s00436-015-4561-5.
- Długosz E, Wiśniewski M. 2016. *Toxocara canis* glycans influence antigen recognition by mouse IgG1 and IgM antibodies. *Acta Parasitologica* 61 (1):191–194. DOI: 10.1515/ap-2016-0026.
- Długosz E, Basała K, Zawistowska-Deniziak A. 2019. Cytokine production and signalling in human THP-1 macrophages is dependent on *Toxocara canis* glycans. *Parasitology Research* 118 (10):2925–2933. DOI:10.1007/s00436-019-06405-8.
- Długosz E, Milewska M, Baska P. 2021. Identification of *Toxocara canis* antigen-interacting partners by yeast two-hybrid assay and a putative mechanism of these host–parasite interactions. *Pathogens*, 10 (8):949. DOI:10.3390/pathogens10080949.

Toxocara canis jest nicieniem pasożytniczym powszechnie występującym u psów, jednakże może występować u wielu gatunków ssaków, w tym człowieka. Toksokaroza, choroba powodowana przez tego nicienia u ludzi jest chorobą odzwierzęcą występującą na całym świecie, a liczba serologicznie potwierdzonych przypadków waha się w zależności od regionu geograficznego: np. Europa – 7% u dorosłych, Japonia – 81,7% u dorosłych. W organizmie zarażonego żywiciela, unikając ataku immunologicznego, larwy nawet przez kilka lat mogą migrować przez tkanki osiedlając się w takich narządach jak płuca, wątroba, oko, i mózg powodując poważne komplikacje. Wędrujące larwy często stanowią przyczynę rozwoju chorób alergicznych (astma). Unikanie odpowiedzi immunologicznej żywiciela, to przede wszystkim wydzielanie przez pasożyta antygenów somatycznych i ekskrecyjno-sekrecyjnych (ES), które w cyklu życiowym pasożyta często ulegają znaczącym zmianom. Znacznie istotniejszą rolę w tym procesie przypisuje się antygenom ekskrecyjno-sekrecyjnym, a w przypadku inwazji *T. canis* glikoproteinom takim jak: TES-12, która zawiera O-glikozylowane mucyny; TES-32 i TES-70 które zidentyfikowane jako lektyny typu C (Tc-CTL-1 i Tc-CTL-4); TES-26 zidentyfikowane jako białko wiążące fosfatydyloetanolaminę czy TES-120 odpowiedzialnego za tworzenie płaszcza powierzchniowego larw. W przebiegu toksokarozy obserwuje się silną odpowiedź immunologiczną typu Th2 z jednoczesną produkcją IL-10 i TGF- β , co prowadzi do tłumienia odpowiedzi Th1 i obniżenia poziomu IL-12 i IFN- γ .

Znajomość literatury oraz wyniki wcześniejszych badań własnych skłoniły Habilitantkę do podjęcia dalszych badań procesów immunologicznych w przebiegu toksokarozy. Uzasadnienie konieczności ich podjęcia zostało sformułowane w 6 punktach (podrozdział 4.3 autoreferatu). Natomiast szczegółowe cele badawcze zostały zapisane w czterech punktach (podrozdział 4.4 autoreferatu) odzwierciedlając jednocześnie tematykę badań opisanych w poszczególnych publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe Habilitantki.

➤ **Syntetyczne omówienie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe**

- **Pierwsza publikacja z „cyklu”** dotyczyła określenia wpływu antygenów *T. canis* na produkcję cytokin przez mysie splenocyty. Badania zostały przeprowadzone na mysim modelu toksokarozy, z wykorzystaniem myszy BALB/c zarażonych dawką 500 inwazyjnych jaj *T. canis*. Jaja nicieni pozyskano z kału zarażonych psów odrobaczanych w warszawskich klinikach weterynaryjnych. Zastosowano następujące metody badawcze: dopracowania metodyki izolacji i warunków hodowli larw L3, przygotowanie antygenu ES pasożyta (TES), uzyskanie

rekombinowanych mucyn Tc-MUC-2, Tc-MUC-3, Tc-MUC-4 i Tc-MUC-5 poprzez klonowanie sekwencji cDNA w wektorze ekspresyjnym pPICZα w celu ich ekspresji w drożdżach *Pichia pastoris*, Westren blott, izolacja frakcji monocytów/makrofagów ze śledziony myszy i ich hodowla *in vitro*, określenie stężenia wydzielonych do pożywki cytokin metodą ELISA.

Uzyskane wyniki wykazały, że w eksperymentalnym modelu mysiej toksokarozy indukowana jest silna odpowiedź immunologiczna Th-2 ze zwiększoną produkcją IL-5, IL-6, IL-10 i TGF-β. Jednocześnie pomimo obecności IL-6 i TGF-β, które wydają się być kluczowymi cytokinami w różnicowaniu Th17, ten typ odpowiedzi immunologicznej nie jest indukowany. Wykazano również, że rekombinowane mucyny *T. canis* można stymulować splenocyty mysie do produkcji cytokin, jednakże pełen antygen TES ma większy wpływ na wydzielanie cytokin przez te komórki. W opinii autorów wynik ten może być powodowany obecnością wielu różnych cząsteczek/składników antygeny TES lub jest sumą efektów wszystkich, w efekcie czego antygeny TES mają silne właściwości immunomodulujące przez co w sposób różnorodny oddziałują na mysie komórki odpornościowe.

- Zbadanie roli reszt cukrowych antygenów w interakcji z przeciwciałami specyficznymi dla larwalnych antygenów *T. canis* to tematyka, którą Habilitantka podjęła w **drugiej publikacji z „cyklu”**. Badania te miały również na celu określenie przydatności białek rekombinowanych jako markera diagnostycznego. Podobnie jak w poprzedniej publikacji, badania przeprowadzono na mysim modelu toksokarozy. Zastosowano następujące metody badawcze: hodowla larw L3 i przygotowanie antygeny TES pasożyta, uzyskanie rekombinowanych mucyn w systemie ekspresji w drożdżach *Pichia pastoris*, SDS-PAGE. Reaktywność przeciwciał klas IgM, IgE, IgG1 oraz IgG2a z antygenami ES *T. canis*, rekombinowanymi mucynami Tc-MUC-2, Tc-MUC-3, Tc-MUC-4, Tc-MUC-5 wyprodukowanymi w drożdżach *P. pastoris* oraz z ich deglikozylowanymi odpowiednikami były analizowane indywidualnie oraz jako mieszanina czterech cząsteczek. W tym celu wykonywano niekomercyjny test ELISA, opłaszczając płytki antygenami w stężeniu 5 µg/ml. Uzyskane wyniki wykazały, że antygeny ES *T. canis* były rozpoznawane przez wszystkie mysie immunoglobuliny, aczkolwiek ich reaktywność różniła się. Reaktywność IgG2a na antygeny pasożyta była bardzo niska, a IgM najwyższa. Zaobserwowano również istotną różnicę w reaktywności przeciwciał z cząsteczkami pozbawionymi reszt cukrowych. Deglikozylowane antygeny TES, mieszanina mucyn oraz Tc-MUC-3 były słabiej rozpoznawane przez przeciwciała klasy IgG1 niż formy zawierające reszty cukrowe. Immunoglobuliny klasy IgM najsilniej reagowały z antygenami TES, szczególnie z resztami cukrowymi; znacznie słabiej reagowały z mucynami, a ich reaktywność z cząsteczkami pozbawionymi reszt cukrowych była dodatkowo obniżona. Wśród mucyn, Tc-MUC-4 był głównie rozpoznawany przez IgM, a deglikozylacja tego antygeny prowadziła do znacznej utraty reaktywności IgM.

Obecność glikanów na rekombinowanych mucynach również wpływała na ich antygenowość, a obecność reszt cukrowych wykazywała wyższą reaktywność w porównaniu do form deglikozylowanych.

W konkluzji Habilitantka stwierdza, że chociaż potencjał diagnostyczny rekombinowanych antygenów *T. canis* został już wcześniej wykazany to jednak większość tych badań dotyczy antygenów wytwarzanych w bakteryjnych systemach ekspresyjnych pozbawiając ich reszt cukrowych. Wykazując, że obecność reszt cukrowych zwiększa reaktywność

rekombinowanych antygenów z przeciwciałami IgG1 i IgM, tym samym Habilitantka wskazuje na duży potencjał rekombinowanych antygenów uzyskiwanych w drożdżowym systemie ekspresji w diagnostyce toksokarozy.

- *Toxocara canis* (jak również *T. cati*) posiadają potencjał zoonotyczny, a zarażając ludzi powoduje „ogromne spustoszenie” w organizmie żywiciela. Mając na uwadze fakt, że interakcje między *T. canis* a układem odpornościowym żywiciela (człowieka) nie są w pełni poznane, w publikacji trzeciej przedstawiono wyniki badań, które zostały wykonane przez Habilitantkę „na modelu ludzkim”, z wykorzystaniem ludzkich monocytów linii THP-1 (American Type Culture Collection). Celem tych badań, było określenie wpływu glikoprotein na produkcję cytokin i na przebieg szlaków sygnałowych w ludzkich makrofagach. Zastosowano następujące metody badawcze: hodowla larw L3, przygotowanie antygeny TES pasożyta oraz rekombinowanych i deglikozylowanych form mucyn Tc-MUC-2, Tc-MUC-3, Tc-MUC-4 i Tc-MUC-5, różnicowanie ludzkich makrofagów do monocytów w hodowli *in vitro*, ocena stymulacji i stężenia cytokin TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL10 i IL-23 z wykorzystaniem dwóch komercyjnie dostępnych testów ELISA. Dodatkowo określono również profil fosforylacji wewnątrzkomórkowych kinaz biorących udział w przekaźnictwie sygnałów w komórce z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array (R&D). Wykazano, że makrofagi różnicowane *in vitro*, a następnie stymulowane antygenami *T. canis* zareagowały zwiększonym wydzielaniem cytokin TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-10, których poziom był wielokrotnie wyższy w przypadku stymulacji glikozylowanymi mucynami. Stwierdzono, że usunięcie reszt cukrowych mucyny powoduje mniej efektywną stymulację makrofagów do produkcji cytokin, jednak na poziomie stymulacji TES. Na uwagę zasługuje natomiast sekrecja TNF- α . W przypadku makrofagów ludzkich jej wydzielanie znacząco wzrosło po stymulacji antygenami ES *T. canis* i formą deglikozylowaną. Natomiast w modelu mysim po stymulacji komórek antygenami TES stwierdzono obniżenie wydzielania tej cytokiny. Interesujący jest również fakt, że po stymulacji obu linii komórkowych samymi mucynami stwierdzono wzrost wydzielania TNF- α . Analiza produkcji cytokin w odpowiedzi na stymulację poszczególnymi mucynami wykazuje zbliżony efekt. Jedynie Tc-MUC-4 silniej stymulowała wydzielanie TNF- α , a deglikozylowana forma Tc-MUC-5 jako jedyna stymulowała sekrecję IL-12p70. Podsumowując tą część badań można stwierdzić, że stymulacja komórek THP-1 za pomocą mucyny indukowała odpowiedź cytokinową zależną od glikoprotein, a traktowanie makrofagów deglikozylowanymi mucynami było znacznie mniej skuteczne w porównaniu z nienaruszonymi cząsteczkami. Drugim nurtem badawczym publikacji była analiza profili fosforylacji kinaz zaangażowanych w transdukcję sygnału, która pozwoliłaby zrozumieć wpływ glikozylowanych mucyn na produkcję cytokin przez makrofagi THP-1. Najbardziej intensywny, bo aż 4-krotny wzrost fosforylacji zaobserwowano w przypadku białka szoku cieplnego 27 (HSP27) w komórkach traktowanych MUC i dMUC. HSP27 odgrywa istotną rolę podczas różnicowania monocytów do makrofagów, a także stymuluje ich przeżycie podczas stanu zapalnego. Interesujący jest natomiast wynik wskazujący, że HSP60 był fosforylowany na równym poziomie we wszystkich badanych kombinacjach. Warto zauważyć, że białko to odgrywa ważną rolę w prezentacji antygeny, aktywacji limfocytów i makrofagów oraz aktywacji i dojrzewania komórek

dendrytycznych. W makrofagach stymulowanych mucynami pozbawionymi reszt cukrowych w porównaniu do stymulacji pełnymi glikoproteinami, wzrosła również fosforylacja kinaz z rodziny MAPK (p38, JNK, czynnik transkrypcyjny c-Jun). W opinii Habilitantki wynik ten wskazuje że antygeny *T. canis* mogą być zaangażowane w szlak sygnałowy płynący od receptorów TLR (Toll-like receptors), a także powodować wyższą fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB w badanych makrofagach. Badano również poziom fosforylacji dwóch innych kinaz: AMPK i AKT. Pierwsza z nich uległa silnej fosforylacji po stymulacji makrofagów deglikozyłowanymi mucynami, natomiast kinaza AKT pełnymi mucynami. AMPK hamuje proces zapalny i wydłuża życie wielu typów komórek, a AKT pełni kluczową rolę w polaryzacji makrofagów w kierunku fenotypu M2.

- Mając na uwadze fakt, że po zarażeniu larwy *T. canis* migrują do różnych tkanek, powodując różnorakie objawy kliniczne wywoływane przez różne cząsteczki zawarte w puli antygenów oraz potencjał zoonotyczny toksokarozy w **czwartej publikacji z cyklu** Habilitantka kontynuowała badania na „modelu ludzkim”. Jej celem było wytypowanie ludzkich białek wiążących się z antygenami pasożyta i potencjalnych mechanizmów interakcji pasożyt-żywicieli. Aby uzyskać zamierzony cel wykorzystano drożdżowy system dwuhybrydowy (Y2H), który umożliwia przeszukanie biblioteki ludzkiego cDNA i analizy powiązań z antygenami larw *T. canis*. Należy podkreślić, że Y2H jest skomplikowaną, wieloetapową metodą polegającą na przeszukaniu całej puli białek kodowanych przez bibliotekę ekspresyjną ludzkiego cDNA w aspekcie wiązania z konkretnym białkiem pasożyta, transformowaniu komórek drożdży fragmentami cDNA kodującymi komponenty „ludzkie i antygenowe”, ich ekspresji i sekwencjonowaniu. Badaniom poddano trzy antygeny *T. canis*: mucyna - Tc-MUC-3, lektyna typu C – Tc-CTL-1 oraz białko wiążące fosfatydyloetanoloaminę - Tc-TES-26. Do dalszych analiz wykorzystano również bazę GO, zawiera trzy domeny: element komórkowy (CC), proces biologiczny (BP) i funkcję molekularną (MF). Uzyskane wyniki wskazały na 16 ludzkich białek wchodzących w interakcje z antygenami pasożyta. Było to 9 białek wiążących Tc-MUC-3 (TSPAN13, SMIM30, POLR2G, ADGRF5, UQCRFS1, AGR3, DAZAP2, TMEM199, PP2D1), 5 białek wiążących Tc-CTL-1 (SLC44A1, SELENOP, JAGN1, CTSB, ANKHD1) oraz 2 białka wiążące Tc-TES-26 (STX-8, CRISP).

Cząsteczki te były związane z głównymi procesami biologicznymi, takimi jak: przetwarzanie białek, transport, organizacja składników komórkowych, odpowiedź immunologiczna i sygnalizacja komórkowa. Niektóre zidentyfikowane interakcje są związane z rozwojem odpowiedzi Th2 poprzez aktywację kinaz i produkcję cytokin. Wśród innych ważnych interakcji należy wskazać degranulację neutrofilów, potencjalne procesy neurodegeneracji obserwowane podczas neurotoksokarozy czy te powiązane z patologią płuc stwierdzoną u zarażonych żywicieli.

Jednakże jak słusznie konkluduje Habilitantka w autoreferacie (3 akapit, str.10): „Jednak, należy pamiętać, że interakcje wytypowane z wykorzystaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego muszą być potwierdzone eksperymentalnie. Dopiero wtedy możliwe będzie pełniejsze zrozumienie procesów zachodzących w organizmie żywiciela podczas inwazji glisty psiej.”

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania podkreśliły nie tylko duży potencjał rekombinowanych antygenów uzyskiwanych w drożdżowym systemie ekspresji w diagnostyce toksokarozy. Używając dwóch modeli badawczych *in vitro* dla zarażenia *T. canis*: mysiego i ludzkiego oraz porównanie uzyskanych wyników umożliwiło dokładniejsze poznanie mechanizmów i szlaków sygnałowych zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną żywicieli na zarażenie. Dodatkowo uzyskane wyniki pozwoliły na dokonanie analizy mechanizmów interakcji badanych antygenów z komórkami żywicieli.

W akapicie tym nie może zabraknąć odniesienia do konkluzji zawartej w ostatniej z czterech publikacji cyklu cyt.: „**Uzyskane wyniki badań powinny otworzyć nowe obszary i dostarczyć dalszych pomysłów w dziedzinie badań toksokarozy i umożliwią lepsze zrozumienie tej złożonej i niedocenianej choroby.**”

➤ Ocena aktywności naukowej

• Aktywność publikacyjna

Jak wynika z analizowanych dokumentów, do chwili uzyskania stopnia doktora p. Ewa Długosz była współautorem 6 publikacji naukowych: w 3 czasopismach indeksowanych w IRC, oraz 3 z listy B MNiSW. Łączny współczynnik wpływu IF wynosi 1,342, a liczba punktów 43. Liczba punktów za artykuły opublikowane w czasopismach indeksowanych wynosi 31, a z listy B 12 pkt. W tym czasie Habilitantka była również współautorką 3 doniesień konferencyjnych.

Po uzyskaniu stopnia doktora Habilitantka znacząco powiększyła swój dorobek naukowy. Łącznie opublikowała 36 artykułów, w tym w 31 czasopismach indeksowanych w IRC oraz 5 z poza listy. Sześć artykułów opublikowano w czasopismach nie posiadających IF. Łączny współczynnik wpływu IF wynosi 68,064, a liczba punktów 1751. W okresie po uzyskaniu stopnia doktora dorobek został powiększony 6-krotnie, a IF zwiększył się ponad 50-krotnie. Może to być jednak wskaźnik niemiarodajny ze względu na zwieszanie się IF w kolejnych latach. W tym czasie Habilitantka była również współautorką 36 doniesień konferencyjnych.

Biorąc pod uwagę również te publikacje, które zostały przedstawione jako jednotematyczne osiągnięcie naukowe to po uzyskaniu stopnia naukowego doktora Habilitantka jest autorką lub współautorką 48 publikacji naukowych o łącznym IF 78,765 i 1995 pkt MNiSW/MEiN.

• Aktywność badawcza

• przed uzyskaniem stopnia doktora

W czasie swojej kariery naukowej Habilitantka uczestniczyła w realizacji 7 projektów naukowych. W 4 z nich pełniła rolę kierownika.

Już w czasie studiów magisteriach brała udział w projekcie “Badania nad szczepionką genetyczną przeciwko pasożytom żołądkowo-jelitowym przeżuwaczy na modelu: owca - *Hemonchus contortus*”. *H. contortus* to krwio pijny nicien, którego forma dorosła bytuje w trawieńcu przeżuwaczy (głównie owiec i kóz). Habilitantka była odpowiedzialna za klonowanie cDNA i produkcję rekombinowanego białka pasożyta w bakteryjnym systemie ekspresyjnym.

W trakcie studiów doktoranckich kontynuowała tematykę dotyczącą opracowania szczepionek przeciw pasożytniczych, biorąc udział w realizacji projektu pt. "Opracowanie wieloskładnikowej szczepionki przeciwko inwazjom tęgoryjców".

W kolejnych latach Habilitantka skierowała swoje zainteresowania na zagadnienia związane z humoralną i komórkową odpowiedzią immunologiczną żywicieli na inwazję tęgoryjców. Była głównym wykonawcą grantu promotorskiego pt. „Określenie profilu i dynamiki odpowiedzi cytokin u chomików syryjskich immunizowanych cDNA bądź białkiem enzymów proteolitycznych *Ancylostoma ceylanicum*, a następnie zarażanych larwami inwazyjnymi tego nicienia”.

Dodatkowo Habilitantka brała udział w badaniach odpowiedzi immunologicznej dwóch ras owiec Żałaznieńskiej i Wrzosówki naturalnie zarażonych *H. contortus* oraz badaniach dotyczących zmian biochemicznych w surowicach psów z babeszjozą. W czasie studiów interesowała się również diagnostyką inwazji pasożytniczych z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. Tematykę tą kontynuuje z powodzeniem do dziś.

- **po uzyskaniu stopnia doktora**

Pracując w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie kontynuowała prace badawcze dotyczące odpowiedzi immunologicznej chomika syryjskiego na inwazję tęgoryjców *A. ceylanicum*. Opublikowała wyniki badań uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej, a następnie rozpoczęła badania mające na celu uzyskanie kolejnych rekombinowanych cytokin TGF- β i IL-2, istotnych w odpowiedzi immunologicznej na inwazję pasożytniczą oraz ocenę ich wydzielania przez komórki żywiciela. Badała także wpływ rekombinowanego białka metaloproteazy Ace-MTP-2 *A. ceylanicum* na wydzielanie cytokin prozapalnych stosując model *in vitro* linię komórkową ludzkich makrofagów THP-1. Uczestniczyła w badaniach zespołowych nad opracowywaniem szczepionki przeciwko inwazji tęgoryjców. Wynikiem tych badań było sklonowanie cDNA szeregu antygenów sekrecyjnych *A. ceylanicum* (Ace-ASP-3, Ace-ASP-4, Ace-ASP-5) i ich produkcji w postaci białek rekombinowanych. Potencjał szczepionkowy tych białek zbadano na laboratoryjnym modelu tęgoryjczy: chomików syryjskich. Dalszym etapem tych badań było poszukiwanie najbardziej efektywnej metody immunizacji. Skupiono się na tzw. antygenach ukrytych (ang. hidden antigens), które nie są prezentowane układowi immunologicznemu podczas zarażenia. W tym celu sklonowano i uzyskano w formie rekombinowanej dwie podjednostki (katalityczną – Ace-GCLC i modyfikatorową – Ace-GCLM) ligazy glutaminianowo – cysteinowej (AceGCL), jednego z dwóch enzymów zaangażowanych w syntezę glutationu, który chroni komórki przed stresem oksydacyjnym i odpowiada za utrzymanie równowagi oksydoredukcyjnej. W dalszych badaniach dotyczących opracowania szczepionki przeciw tęgoryjom wykorzystano również cząsteczki DNA. Fragment cDNA kodujący metaloproteinazę Acemep-7 włączono w wektor pcDNA3.1 umożliwiający ekspresję w komórkach ssaków, a podanie zwierzętom tak przygotowanego konstruktów spowodowało obniżeniem intensywności inwazji o 50% i zmniejszenie liczby wydalanych jaj o 78%.

W ramach doskonalenia i wdrażania metod diagnozowania parazytoz metodami molekularnymi Habilitantka identyfikowała tasiemce koni, przywry i tasiemce dziko żyjących

norek, filarie psów oraz patogeny przenoszone przez kleszcze. Rezultatem tych badań było zdeponowanie 64 sekwencji nukleotydowych rDNA pasożytów w bazie danych GenBank.

Na uwagę zasługują udział Habilitantki w badaniach nad dirofilariozą, pasożytniczą chorobą wywoływaną przez nicienie z rodzaju *Dirofilaria*, rozpoczętych przez Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych w 2015 r. Dirofilarioza – choroba pasożytnicza najczęściej występuje u psów, ale dotyczyć może także innych przedstawicieli mięsożernych m.in. kotów, wilków czy lisów. W Europie rozróżniamy tzw. dirofilariozę sercową (*D. immitis*) oraz dirofilariozę podskórną (*D. repens*). Dorosłe pasożyty to kremowe lub białe, nitkowate robaki, w zależności od gatunku i płci, o długości od 5 do 30 cm. Postaci larwalne tego pasożyta to tzw. mikrofilarie – są tak niewielkie, że krążą w krwioobiegu zarażonych zwierząt. Choroba przenoszona jest przez różne gatunki komarów. Do zarażenia dochodzi poprzez ugryzienie komara, w którego ciele pasożyt osiąga tzw. formę inwazyjną.

Analizowano poszczególne przypadki zarażenia *D. repens* i poszukiwano nowych narzędzi diagnostycznych. Na podstawie wyników badań hematologicznych i biochemicznych krwi wysunięto hipotezę, że zarażenie tym nicieniem może wywoływać stan przewlekłego stresu u psów, a wysoka liczba mikrofilarii we krwi zwierząt jest najprawdopodobniej związana z występującym równolegle stanem immunosupresji. Poszukując nowych narzędzi umożliwiających diagnozowanie dirofilariozy analizowano obecność przeciwciał reagujących z antygenami somatycznymi pasożyta. Uzyskane wyniki wykazały, że IgG może być wykorzystana jako metoda serologiczna diagnozowania dirofilariozy. Jednak, przygotowanie testu może być trudne, ze względu na ograniczone możliwości uzyskania wystarczającej ilości antygenów natywnych. Dlatego też sklonowano fragmenty cDNA kodujące białka nicienia, wyprodukowano rekombinowane antygeny i sprawdzano ich przydatność diagnostyczną, ale żadna z cząsteczek nie była wystarczająco specyficzna. Dlatego też z wykorzystaniem biblioteki fagowej wytypowano krótkie peptydy o długości 12 aminokwasów, z których LH10 spełniał warunki markera diagnostycznego dirofilariozy psów.

➤ **Ocena działalności dydaktycznej i popularyzatorskiej**

Jako nauczyciel akademicki p. Ewa Długosz rozpoczęła działalność dydaktyczną jeszcze w trakcie studiów doktoranckich. Natomiast na stanowisku adiunkta, czyli od 2008 r. prowadziła wykłady i ćwiczenia z wielu przedmiotów na różnych kierunkach studiów: jak np. na kierunku Biotechnologia - Biologia molekularna, Zastosowanie biotechnologii w profilaktyce chorób zwierząt, Immunosupresja w chorobach zakaźnych i inwazyjnych, Molekularne mechanizmy interakcji pasożyt żywicieli i lekooporności pasożytów; na kierunku Bioinżyniera Zwierząt - Inżynieria genetyczna, Bioinżynieryjne techniki w produkcji szczepionek; na kierunku Weterynaria oraz Erasmus - Parazytologia i Inwazjologia (w języku polskim i angielskim).

Jest opiekunem studentów realizującymi prace dyplomowe; była promotorem 10 prac magisterskich, 13 prac inżynierskich i licencjackich. Wykonała 18 recenzji prac dyplomowych. Aktualnie jest promotorem pomocniczym dwóch uczestniczek studiów doktoranckich. Brała udział w kształceniu lekarzy weterynarii w ramach studiów podyplomowych – Studium Diagnostów Klinicznych, wygłaszając wykład na temat molekularnych i serologicznych metod diagnostycznych stosowanych w parazytologii.

W ramach działalności organizacyjnej i popularyzatorskiej Habilitantka koordynowała (jako jedna z dwóch osób) układanie planów dydaktycznych i rozliczanie godzin dydaktycznych pracowników Katedry Nauk Przedklinicznych. Była członkiem Komisji Hospitacyjnej na kierunku Biotechnologia na Wydziale Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu SGGW. Jest członkiem Rady Programowej na kierunku Biotechnologia na Wydziale Biologii i Biotechnologii. Brała udział w trzech Festiwalach Nauki prowadząc lekcje dla uczniów szkół podstawowych.

Od 2017 roku jestem członkiem Stowarzyszenia Polskiej Rady Konsultacyjnej ds.

Parazytoz Zwierząt Towarzyszących - ESCCAP Polska, która jest niezależną organizacją non-profit, której celem jest propagowanie wśród lekarzy weterynarii i właścicieli zwierząt prawidłowych zasad zwalczania, tj. zapobiegania i leczenia pasożytów u psów, kotów oraz innych gatunków zwierząt towarzyszących człowiekowi.

WNIOSEK KOŃCOWY

Wysoka ocena przedstawionego osiągnięcia naukowego zatytułowanego „Określenie roli larwalnych antygenów *Toxocara canis* w przebiegu toksokarozy” oraz pozostałych osiągnięć naukowych, dydaktycznych i organizacyjnych dr Ewy Długosz, dokonana na podstawie przedstawionych dokumentów upoważnia mnie do wyrażenia opinii iż Kandydatka w pełni spełnia warunki stawiane kandydatom w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego określone w obowiązujących aktach prawnych (art. 219 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce: Dz.U. z 2018 r. z późn. zm).

Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Weterynarii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie dr Ewy Długosz do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

Mauszowa 31.01.2023u

P. Modera