



UNIwersytet Warszawski Wydział Biologii

ILJI MIECZNIKOWA str 1, 02-096 WARSZAWA,
Poland

TEL: (+22) 55-41-104, FAX: (+22) 55-41-106

e-mail: m.doligalska@uw.edu.pl



Prof. dr hab. Maria Doligalska
Zakład Parazytologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 27 lutego 2023 r.

Recenzja pracy doktorskiej pt. Badanie odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zarażenia *Dirofilaria repens* u psa (*Canis familiaris*) przedstawionej przez lek. wet. Magdalenę Elżbietę Wyszomolek

Rozprawa została przygotowana pod kierunkiem promotora ks. dr hab. inż. Marcina Wiśniewskiego i pani promotor pomocniczej dr inż. Ewy Długosz w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Katedry Nauk Przedklinicznych, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Do oceny Doktorantka przedstawiła manuskrypt w skład którego wchodzi:

1. Trzy spójne tematycznie artykuły stanowiące przedmiot pracy doktorskiej opublikowane w czasopiśmie, które w roku opublikowania były ujęte w wykazie Ministerstwa Edukacji i Nauki, a co ważne znajdują się na liście JCR. W jego części A.
2. Opis osiągnięcia naukowego przygotowanego wg zasad typowych dla manuskryptu pracy doktorskiej.
3. Wydruki publikacji stanowiących jednotematyczny cykl.
4. Deklaracje współautorów szacujących swój wkład naukowy w powstanie pracy. Doktorantka we wszystkich publikacjach jako pierwszy autor deklaruje zdecydowanie największy udział w ich przygotowaniu (od 43 do 86%).

Rozprawa składa się z dwóch części: pierwsza część to opis wyników, które nie są jeszcze opublikowane. Druga część to podsumowanie trzech opublikowanych artykułów stanowiących przedmiot rozprawy. Do rozprawy doktorskiej dołączone jest streszczenie w języku polskim i angielskim.

Ocena merytoryczna rozprawy.

Temat rozprawy jest bardzo aktualny, gdyż dotyczy szerzących się filarioz u psów z których niektóre są zoonotyczne, stanowiąc potencjalne zagrożenia dla ludzi, szczególnie tam gdzie występują endemicznie. Wczesne diagnozowanie zarażonych zwierząt jest bardzo istotne z punktu widzenia epidemiologii chorób pasożytniczych wywołanych przez filarie.

W rozdziale Wstęp, opisane są cykl rozwojowy pasożyta psów *Dirofilaria repens*, przyczyny i patogenezę filariozy objawowej i bezobjawowej, związek poziomego zarażenia z przebiegiem chronicznym i towarzysząca mu odpowiedź immunologiczna ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów immunoregulacyjnych rzutujących na skuteczność diagnostyki molekularnej tej filariozy. Słusznie podkreślono związek między topicznością osiedlenia się postaci dorosłych i nasileniem reakcji immunologicznych. Przedstawiono mechanizm negatywnej regulacji receptorowej komórek dendrytycznych i różnicowania limfocytów T w populacje efektorowe i regulatorowe.

Cel rozprawy jest sformułowany w pięciu szczegółowych punktach obejmujących porównanie wskaźników hematologicznych i biochemicznych, ocenę występowania wysokiej mikrofilaremii, analizę poziomu przeciwciał w filariozie objawowej i bezobjawowej oraz odpowiedź limfocytów T i B izolowanych z krwi i ocenę indukcji ścieżek sygnałowych rozpoznających wzorce molekularne oraz aktywację komórek dendrytycznych przez antygen somatyczny dirofilarii.

W mojej ocenie zabrakło sformułowania ogólnej/nadrzędnej hipotezy obejmującej powyższe zagadnienia, dlatego czasie prezentacji proszę Doktorantkę, aby korzystając z własnych wyników spróbowała dowieść, że identyfikowany stan aktywacji immunologicznej może być przydatny do oceny przebiegu choroby utajonej.

Rozdział Materiały i metody zawiera opis metod wykorzystanych do otrzymania wyników opublikowanych i oddzielnie dla nieopublikowanych a analizowanych w rozprawie. Zamieszczone schematy dobrze ilustrują etapy prowadzonych badań. Doktorantka opanowała bardzo wiele technik i metod badawczych. Są to między innymi: izolowanie komórek z narządów, prowadzenie hodowli komórek szpiku kostnego i ich różnicowanie, prowadzenie linii komórkowej nabłonka ludzkiego, transfekowanie komórek cDNA receptorów odpowiedzi wrodzonej, procedura znakowania komórek do oznaczeń molekularnych w tym FACS, przeprowadzanie testów ELISA, pozyskiwanie produktów wydaliniczo-wydzielniczych i somatycznych nicienia oraz oznaczanie poziomu przeciwciał w krwi i cytokin w hodowli po aktywacji komórek antygenami nicienia, ponad to ocena wskaźników hematologicznych, biochemicznych, immunologicznych.

W rozdziale Wyniki zamieszczone jest podsumowanie wyników już opublikowanych. Są one uzupełnione o dane niepublikowane, a charakteryzujące populacje i aktywność komórek izolowanych z krwi psów, szpiku kostnego myszy w hodowli *in vitro* z antygenem somatycznym filarii i aktywację szlaków sygnałowych w komórkach nabłonka ludzkiego.

Ocena merytoryczna wyników niepublikowanych.

Badano fenotyp limfocytów regulatorowych, cytotoksycznych i limfocytów B i nie wykazano istotnych zmian w proporcji tych komórek w krwi psów zarażonych i niezarażonych. Wraz ze wzrostem poziomu mikrofilaremii obserwowano przewagę limfocytów T CD4+ nad CD8+. U psów zarażonych obserwowano wzrost odsetka limfocytów T supresorowych CD4+CD25-Foxp3+.

W hodowli komórek krwi psów stymulowanych *in vitro* nieswoiście Con-A stwierdzono wzrost poziomu cytokin takich jak IFN- γ , IL-4, i IL-10 z dominacją IL-4. Wzór produkcji cytokin pod wpływem antygenów nicienia wskazuje na wybiórczą produkcję IL-10, cytokiny regulatorowej. Analiza poziomu cytokin w surowicach nie potwierdziła tak znacznej polaryzacji i różnic u psów zarażonych i niezarażonych.

W kolejnych badaniach ustalono wpływ antygenów dirofilarii na poziom ekspresji receptorów odpowiedzi wrodzonej na komórkach ludzkich HEK-293 transfekowanych cDNA wybranych receptorów. W oparciu o poziom mierzonej IL-8 wykazano zależną od stężenia antygeny pasożyta aktywację szlaków sygnałowych związanych z receptorami NLRC1, NLRC2, TLR2 ale nie TLR4.

Dalej badano wpływ antygeny somatycznego dirofilarii na aktywację i dojrzewanie komórek dendrytycznych wywodzących się komórek szpiku kostnego. Oceniono poziom cytokin wydzielanych przez komórki izolowane od myszy z wyłączoną ekspresją genu *il-1 β* i *TLR4*. Przebadano szereg cytokin. Antygen nie wpłynął na zmianę profilu cytokin wzbudzonych przez LPS, ale podnosił poziom ich produkcji. Interesujące są wyniki wykazujące brak syntezy IL-23 po aktywacji antygenem nicienia komórek z delecją genu *il-1 β* ^{-/-}. Ten wątek wyników jest bardzo dobrze podkreślony w dyskusji i wskazuje na obecność w antygenie somatycznym *D. repens* czynników hamujących odpowiedź immunologiczną już na poziomie aktywacji komórek dendrytycznych.

Badania te z wykorzystaniem różnych modeli badawczych potwierdzają złożoność mechanizmów molekularnych i immunologicznych, które w wyraźny sposób mogą rzutować na niejednoznaczny obraz patologii i podprogową wartość wskaźników fizjologicznych. Niski poziom aktywacji wydaje się wynikać z uruchomienia mechanizmów supresorowych już na poziomie aktywacji odpowiedzi immunologicznej u psów naturalnie zarażonych *Dirofilaria repens*. Pomimo to, wykazano przydatność immunoglobuliny klasy IgG1 do diagnozowania aktywnej ale utajonej inwazji.

Pozostałe trzy prace zostały opublikowane i podlegały skrupulatnej ocenie przez recenzentów czasopism. Nie będą zatem przedmiotem mojej dogłębnej recenzji. Wskażę tylko na istotne osiągnięcia.

Praca 1.: Magdalena Wymołek et. al. 2020. Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. *Frontiers in Veterinary Science* 7, 590.

Badania przeprowadzono na dobrze zdefiniowanej grupie psów, 98 naturalnie zarażonych i 112 niezarażonych. Tak liczna populacja umożliwia uzyskanie wiarygodnych wyników. Do badań wybrano osobniki bezobjawowe charakteryzujące się wskaźnikami biochemicznymi i hematologicznymi mieszczącymi się w zakresie normy, co umożliwiło wybór najczęściej występujących psów w naturalnej populacji. Wykazano, że zarażenie *D. repens* istotnie wpływa na stan zdrowia psów niezależnie od ich pierwotnego stanu klinicznego. Świadczą o tym zmiany w obrazie krwi; inwazja u bezobjawowych- bez mikrofilarii w krwi, doprowadza do anemii i stresu chronicznego o czym świadczy limfopenia, wzrost poziomu glukozy, ALP i kreatyniny, co przekłada się na większą chwiejność wskaźników fizjologicznych u psów z utajoną dirofilariozą.

Praca 2.: Magdalena Wymołek et al. 2020. Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with *Dirofilaria repens* as the primary disease or a disease complicating factor. *Frontiers in Veterinary Science* 7, 577466.

W pracy tej opisane są 4 przypadki zarażenia psów dirofilarią *D. repens*. Wyniki badań wskazują że zarówno mikrofilarie jak i formy dorosłe podskórne mogą bezpośrednio pogłębiać patologię już obecnych schorzeń. Opisane przypadki wskazują na indywidualny rozwój patologii u psów pomimo wysokiego poziomu mikrofilaremii. Ten także wykazuje duży rozrzut nie korelujący z zaawansowaniem schorzenia. Badania te stanowią mocną przesłankę do dalszych badań nad mechanizmami patogenezy tego układu pasożyt- żywiciel.

Praca 3.: Magdalena E. Wymołek et al. 2022. Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 86, 101818

W pracy tej pracowano i zanalizowano oryginalne wyniki poziomu przeciwciał klasy IgG1, IgE i IgM specyficznych wobec antygeny somatycznego filarii, charakteryzując odpowiedź humoralną w asymptomatycznej dirofilariozie podskórnej u psów zarażonych naturalnie *D. repens*. Wykazano że asymptomatyczną dirofilariozę podskórną można diagnozować na podstawie poziomu przeciwciał klasy IgG1 swoiście reagujących z antygenami nicienia.

Ocena formalna manuskryptu

Układ treści jest typowy dla manuskryptu pracy doktorskiej. Kolejne rozdziały to: Wstęp, Cele pracy doktorskiej, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo i wydruki publikacji wchodzących w skład jednotematycznego cyklu. Ostatni rozdział stanowią deklaracje współautorów.

Praca jest napisana logicznym, zwięzłym i zrozumiałym językiem naukowym. Nieliczne są skróty myślowe czy żargon, szczególnie w rozdziale materiał i metody, co trudne jest do uniknięcia przy opisywaniu różnorodnej metodyki molekularnej. Niektóre zdania wymagają wsparcia cytacją jak np. na stronie 19 wiersz 3 i 21, na stronie 20 wiersz 12, na stronie 37 wiersz 11.

Ilustracje są przygotowane bardzo starannie z wykorzystaniem odpowiednich programów graficznych. Wykresy są podpisane poprawnie, ale nie wszystkie (patrz strona 39, 41, 45) mają zaznaczoną istotność statystyczną różnicy wyników. Nie wszystkie słupki mają naniesioną wartość SD. Czy wynika to z niewystarczającej liczby oznaczeń?

Podsumowanie

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych dla potrzeb diagnostyki parazytologicznej a szczególnie filariozy wywołanej przez *D. repens* przy bezobjawowym przebiegu choroby u psów. Ma to znaczenie dla monitorowania endemicznych zarażeń i szerzenia się parazytozy. Wyniki istotnie poszerzają wiedzę teoretyczną i praktyczną przydatną do zrozumienia słabo poznanych mechanizmach patogenezy bezobjawowych zarażeń *Dirofilaria repens*. Opisano i scharakteryzowano poprzez wskaźniki metaboliczne, hematologiczne i immunologiczne stan przewlekłego stresu immunologicznego zależnego od limfocytów Th2. Wskazano na immunosupresyjne środowisko immunologiczne korelujące z poziomem mikrofilaremii, obecnością form dorosłych pod skórą czy

niedoborami immunologicznymi. Ustalono odrębne proporcje produkcji przeciwciała klasy IgG1 i IgG2 wskazujących na dominację odpowiedzi Th1 skierowanej przeciw mikrofilariom u samic, a dominację odpowiedzi Th2 u samców żywiciela, psa. Przydatne dla diagnostyki mogą być nie publikowane jeszcze wyniki badań nad aktywacją komórek prezentujących antygeny pod wpływem antygenów nicienia. Potwierdzono udział IL-1 β oraz ścieżki sygnałowej zależnej od receptorów odpowiedzi wrodzonej TLR2 i NLRC1 i NLRC2 na zaproponowanym modelu komórkowym po transfekcji cDNA receptorów odpowiedzi wrodzonej w komórkach linii nabłonkowej. O dwubiegunowej aktywacji komórek układu odpornościowego świadczy między innymi wzrost poziomu cytokin zarówno prozapalnych jak i regulatorowych. Podkreślono znaczenie populacji komórek regulatorowych TCD4+Foxp3+ w chronicznym zarażeniu filarią.

Po przeczytaniu rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Doktorantka prezentuje nie tylko ogólną wiedzę teoretyczną ale i szczegółową w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria, a także w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych. Wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Oceniając rozprawę doktorską Pani lek. wet. Magdaleny Elżbiety Wymołek, stwierdzam, że przesłane mi do recenzji materiały, których głównym elementem są trzy oryginalne artykuły opublikowane w specjalistycznych czasopismach naukowych oraz manuskrypt uzupełniający o wyniki nieopublikowane, spełniają wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (z późniejszymi zmianami). Przedstawione badania są nowatorskie, a wyniki zostały uzyskane przy użyciu właściwie dobranej zaawansowanej metodyki badawczej i mają bardzo istotny walor poznawczy oraz potencjał do praktycznego zastosowania.

Wniosuję do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego o przyjęcie rozprawy lek. wet. Magdaleny Elżbiety Wymołek oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, wskazując na bardzo wysoki poziom merytoryczny i nowatorstwo pracy oraz opracowanie bardzo trudnego zagadnienia i fakt, że wyniki zostały opublikowane w formie trzech oryginalnych artykułów, z wiodącym udziałem doktorantki, jako pierwszego autora we wszystkich pracach, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

