

INSTYTUT PARAZYTOLOGII im. Witolda Stefańskiego W LIKWIDACJI  
Polskiej Akademii Nauk

ul. Twarda 51/55  
00-818 WARSZAWA  
tel.620-62-26  
fax:620 62 27  
email: iparpas@twarda.pan.pl

Warszawa, 6 marca 2023 r.

dr hab. Jakub Gawor, prof. nadzw.

Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN  
W LIKWIDACJI

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Magdaleny Wysmołek „Badanie odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zarażenia *Dirofilaria repens* u psa (*Canis familiaris*)”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy niezwykle istotnej, zarówno z epidemiologicznego (w tym zoonotycznego), jak i klinicznego punktu widzenia, inwazji nicienia podskórnego *Dirofilaria repens* u psów.

Dirofilarioza podskórna stanowi poważny problem epizootyczny przede wszystkim z tego powodu, że inwazje *D. repens* często są diagnozowane przypadkowo u psów klinicznie zdrowych. Wśród rozpoznawanych przypadków najwyższy odsetek stwierdza się u psów bez widocznych objawów zarażenia, u których wyniki wszystkich parametrów morfologii i biochemii nie odbiegają od normy. Ukryty przebieg inwazji u psów wpływa na wzrost prevalencji *D. repens* w populacji *Canis familiaris*, ponieważ zarażone zwierzęta pełnią rolę rezerwuaru pasożyta, zarówno dla przedstawicieli swojego gatunku, jak i ludzi. Stadia larwalne - mikrofilarie są pobierane z krwią przez komary pełniące rolę żywicieli pośrednich i przenosicieli.

Z wymienionych wyżej względów (epizootiologicznego i epidemiologicznego znaczenia pasożyta), a także istniejących dużych luk odnośnie wiedzy o wpływie inwazji *D. repens* na organizm psów, za bardzo istotny należy uznać cel pracy, tj. zbadanie odpowiedzi immunologicznej u tych żywicieli w przebiegu zarażenia.

Podstawą rozprawy są trzy jednotematyczne publikacje, które ukazały się drukiem w latach 2020-2022 (2020 - 2 prace, 2022 - 1 praca).

Lek. wet. Magdalena Wyszomłek jest pierwszym autorem, z udziałem własnym deklarowanym na 43%, 86% i 86% w tych publikacjach. Współautorzy zadeklarowali swój udział na odpowiednio, od 2% do 42% (pierwsza publikacja), od 3% do 5% (druga) oraz od 2% do 8% (trzecia praca). Sumaryczny IF dla tych publikacji (wg listy JCR) wynosi 9,1, a sumaryczna punktacja wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - 210. Należy uznać te wyniki za zdecydowanie znaczące.

Praca doktorska obejmuje 97 stron i składa się ze streszczenia w jęz. polskim i angielskim, spisu treści, listy artykułów stanowiących podstawę dysertacji, wstępu, celów pracy, omówienia przeprowadzonych badań (opublikowanych oraz nieopublikowanych). Kolejne rozdziały to: wyniki, dyskusja, wnioski, spis piśmiennictwa, kopie publikacji wchodzących w skład cyklu opublikowanych prac oraz oświadczenia współautorów każdej z nich odnośnie odsetka wkładu wniesionego w powstanie publikacji.

Do obowiązku recenzenta należy w tym miejscu wzmianka, że w przypadku udziału współautorów w stworzenie pierwszej pracy (Wyszomłek i wsp. 2020 - Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*) sumaryczny odsetek udziałów wynosi 94%. Wynika to z braku oświadczeń dwóch (spośród siedmiu) współautorów.

W „Streszczeniu” polsko- i angielskojęzycznym autorka zawarła wszystkie niezbędne informacje na temat wykonanych badań oraz uzyskanych wyników. Układ pracy, który przedstawia „Spis treści” jest logiczny i klarowny.

We „Wstępie” autorka czytelnie opisała cykl życiowy pasożyta (na uznanie zasługuje przygotowanie własnego schematu graficznego - ryc. 1), opisała występowanie inwazji z obecnością i bez obecności mikrofilarii. Szczegółowo przedstawiła cechy odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zarażenia nicieniami z grupy filarii (do której należy *D. repens*), opisała wyniki przeprowadzonych na świecie badań nad odpowiedzią immunologiczną w przebiegu inwazji helmintów, zaznaczając jak niewiele wiadomo na temat odpowiedzi w przypadku zarażeń filariami, w tym *D. repens*. W podrozdziale 1.3. „Patogeneza inwazji” brak opisu zmian patologicznych (patrz dalej - Zastrzeżenia).

„Cele pracy” przedstawione w formie pięciu punktów są logiczne i trafne. Postawionym celom odpowiadają uzyskane przez doktorantkę wyniki. Pewne zastrzeżenia budzi cel nr 1 (patrz Zastrzeżenia).

W rozdziale „Materiał i metody” autorka pokrótce i trafnie opisała materiał badawczy (liczbę badanych psów) oraz metody, którymi posługiwała się w badaniach opublikowanych w postaci trzech artykułów naukowych, które ukazały się w *Front. Vet. Sci.* (dwie pozycje) oraz *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* Pozytywnie zwraca uwagę ryc. 2 - schemat metodyki będący kolejnym opracowaniem własnym.

W dalszej części „Materiałów i metod” autorka szczegółowo opisała „Materiał i metody nieopublikowane” (3.2), które zostały przedstawione w postaci dziewięciu podrozdziałów (3.2.1 - 3.2.9). Na uwagę zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz kolejna autorska rycina (nr 4 - schemat metodyki).

W rozdziale „Wyniki” autorka opisała skrótowo, ale celnie rezultaty badań, tych które zostały opublikowane w postaci trzech prac. W kolejnych podrozdziałach „Wyników” szczegółowo opisała rezultaty uzyskane w ramach badań nieopublikowanych (podrozdziały 4.1-4.3). Na uwagę zasługują klarowne i wysokiej jakości edytorskiej wykresy i grafiki (ryc. 5 - 12).

W „Dyskusji” autorka analizuje uzyskane wyniki własnych badań w odniesieniu do wyników innych autorów oraz wyciąga wnioski odnośnie znaczenia rezultatów swoich badań. Rozdział ten jest bardzo dobrze skonstruowany, wyniki są logicznie i klarownie argumentowane.

„Wnioski” (rozdział 6) przedstawione są w postaci ośmiu punktów. Z racji tej, że niektóre z nich mają postać wyników (wniosek 1, 2, 4, 5, 7), bezpieczniej byłoby zatytułować tę część pracy „Podsumowanie i wnioski”.

### **Zastrzeżenia do pracy doktorskiej**

Tytuł: właściwsze byłoby użycie liczby mnogiej w odniesieniu do liczby badanych psów (analogicznie jak brzmi tytuł angielskojęzyczny), tj. „Badanie odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zarażenia *Dirofilaria repens* u psów (*Canis familiaris*)”, co faktycznie odpowiada przedstawionym w pracy materiałom (badanych było 415 psów z dirofilariozą podskórną, 4 psy z wysoką mikrofilariemią, od 149 psów pobrano próbki krwi w kierunku oznaczenia swoistych przeciwciał, czy wreszcie 18 psów było badanych w kierunku określenia przebiegu komórkowej odpowiedzi immunologicznej).

W „Streszczeniu” autorka pisze, że „istnieje szczątkowa wiedza” na temat wpływu inwazji *D. repens* na organizm żywiciela ostatecznego. Właściwsze (mniej stanowcze) jest określenie użyte w „Summary”, tj. „a large gap in knowledge...”, a także w podrozdziale 1.4 Wstępu – „Nadal niewiele wiadomo na temat odpowiedzi immunologicznej...”.

W rozdziale „Patogeneza inwazji” (1.3.) znajdują się jedynie dane o lokalizacji nicieni u żywicieli, natomiast brak jest informacji, na które wskazuje nazwa podrozdziału, a więc danych o patogenności pasożyta (zmiany w tkankach, wywoływanie stanu zapalnego? etc.).

W części 1.4. („Odpowiedź immunologiczna w przebiegu inwazji nicieni”) autorka użyła dwóch określeń, które brzmią zbyt kolokwialnie: „helminy słyną”, „nicienie strategicznie promują”.

W przypadku cytacji Greenwooda (1968) brak sprecyzowania, że chodzi o zaburzenia autoimmunologiczne u ludzi.

Str. 21 (rozdział 1.4. Odpowiedź immunolog. w przebiegu inwazji) – *B. malayi* – brak pełnej nazwy rodzaju (*Brugia*), konieczna, jako że nazwa pasożyta została użyta po raz pierwszy w tej części pracy.

„Cele pracy” - pierwszy punkt w brzmieniu „Porównanie wskaźników hematologicznych i biochemicznych psów klinicznie zdrowych w kontekście zrozumienia ogólnego wpływu obecności *D. repens* na organizm psa” jest niepełny. Powinien on brzmieć: Porównanie wskaźników hematologicznych i biochemicznych klinicznie zdrowych psów zarażonych *D. repens* oraz zdrowych, niezarażonych w kontekście... A więc analogicznie do pierwszego zdania rozdziału „3.1. Materiały i metody opublikowane” (str. 25).

Materiał i metody opublikowane (3.1) – „W tym celu od 415 pacjentów, z którymi właściciele zgłosili się do lecznicy weterynaryjnej” - brak tu krótkiej, ogólnej informacji z jakiego powodu pacjenci trafiali do lecznicy, bo jak można przypuszczać nie w związku z problemami związanymi z inwazją filarii.

W podrozdziale 3.3.9. autorka pisze, że „Eksperymenty z wykorzystaniem myszy zostały zatwierdzone przez Komisję ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Medycznego w Wiedniu oraz Austriackie Federalne Ministerstwo Edukacji, Nauki i Kultury”. Zatwierdzone, a więc w domyśle także przeprowadzone w Wiedniu. Szkoda, że brak jest wcześniej informacji o wykonaniu tych badań na UM w Wiedniu, co bardzo pozytywnie świadczy o międzynarodowej współpracy doktorantki.

Wyniki (rozdział 4) – „W pierwszym artykule wyodrębniono 214 psów” - niefortunne. Raczej “wybrano”.

Wyniki, str. 36 – „...u psów wysoko filaremicznych...” – to kolokwializm. Raczej „z wysoką mikrofilarią”. Także dalej: „psy mikrofilaremiczne” – poprawniej „psy z mikrofilarią”.

Dyskusja – „nieswoistemu zapaleniu jelit u psów towarzyszy niższy odsetek populacji regulatorowej na terenie jelit niż u psów zdrowych,, – niefortunne oraz nieprawidłowe z racji użytej liczby mnogiej. Powinno być “w jelicie u psów”. Psów badanych mogło być wiele, ale jelito jako narząd traktujemy jako jedno.

Dyskusja, str. 50 - „wcześniej wyszkolonymi w rozpoznawaniu białek *D. repens* komórkami dendrytycznymi” – niefortunne.

## **Podsumowanie**

Uzyskane przez doktorantkę bardzo istotne wyniki stanowią o celowości oraz wysokiej wartości zaplanowanych i przeprowadzonych badań. Należy tutaj wymienić:

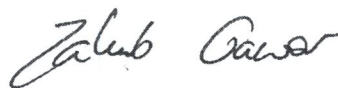
- stwierdzenie występowania zjawiska inwazji amikrofilaremicznych, tj. braku krążących we krwi mikrofilarii w przypadku obecności dorosłych osobników *D. repens*
- stwierdzenie zależności inwazji mikro- i amikrofilaremicznych od płci żywiciela (wyższy odsetek przypadków inwazji mikrofilaremicznych u samców)
- stwierdzenie przypadków bardzo wysokiej mikrofilaremii (ponad 10 tys. mikrofilarii/1ml krwi), nie notowanej nawet w krajach typowo endemicznych (południe Europy)

- stwierdzenie zależności poziomu IgG1 i IgG2 od typu inwazji (mikro-, amikrofilaremiczna)
- określenie wskaźników morfologii krwi wskazujących na bezobjawową dirofilariozę
- stwierdzenie występowania u psów zarażonych podwyższonego odsetka populacji limfocytów o właściwościach immunosupresyjnych
- stwierdzenie wywoływania przez inwazję *D. repens* przewlekłego stresu z wysokim poziomem glikokortykosteroidów
- wniosek, że dirofilarioza podskórna może potencjalnie chronić psy przed rozwojem chorób autoimmunologicznych
- wniosek o predysponowaniu psów wskutek zarażenia *D. repens* do rozwoju chorób współistniejących z powodu wywoływania przewlekłego stresu przez pasożyta

### **Wniosek końcowy**

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską tworzą trzy bardzo wartościowe publikacje, a także szerokie badania nieopublikowane. Uzyskane przez doktorantkę wyniki znacznie poszerzają istniejącą wiedzę na temat odpowiedzi organizmu psów na inwazje nicienia podskórnego. Wskazane w tej recenzji drobne zastrzeżenia nie obniżają wartości merytorycznej pracy.

Na podstawie przedstawionej wyżej oceny rozprawy doktorskiej pt. „Badanie odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zarażenia *Dirofilaria repens* u psa (*Canis familiaris*)” autorstwa lek. wet. Magdaleny Wymołek stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z późniejszymi zmianami. W związku z tym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynarii, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie lek. wet. Magdaleny Wymołek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Jakub Gawor, prof. nadzw.  
Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego  
W LIKWIDACJI  
Polskiej Akademii Nauk