

Prof. dr hab. Krzysztof Tomczuk
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Parazytologii i Chorób Ryb
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 23.03.2023

RECENZJA

dysertacji doktorskiej Pani Lek. wet. Magdaleny Elżbiety Wysmołek

pt. „Badanie odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zarażenia

Dirofilaria repens u psa (*Canis familiaris*)”

wykonanej pod kierunkiem naukowym

ks. dr. hab. inż. Marcina Wiśniewskiego

oraz promotora pomocniczego Pani dr hab. inż. Ewy Długosz

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Katedra Nauk Przedklinicznych

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Dirofilarioza podskórna zwierząt mięsożernych i człowieka jest przykładem inwazji zawleczonej na przestrzeni kilku ostatnich dekad, która charakteryzuje się dużym potencjałem rozprzestrzeniania w nowym środowisku. W wielu rejonach Polski prewalencja tej inwazji u psów przekracza poziom 20 % populacji psów. Coraz częściej pojawiają się także doniesienia o jej występowaniu również u ludzi. Czynnikiem sprzyjającym zawlekanii i rozprzestrzenianiu nowych inwazji jest zwiększona mobilność ludzi i zwierząt. W przypadku dirofilariozy dodatkowym czynnikiem sprzyjającym jest jednocześnie występowanie istotnych zmian klimatycznych, pozwalających na zajście w rodzimych warunkach klimatycznych pełnych cykli rozwojowych pasożyta. Biorąc pod uwagę fakt, iż zarażone zwierzęta są potencjalnym długowiecznym rezerwuarem inwazji, należy obecnie inwazję tę traktować jako rodzimą pasożytozę o charakterze zoonotycznym. Niewystarczająca świadomość problemu jakim jest dirofilarioza ludzi i zwierząt powoduje, że znaczna część personelu medycznego i weterynaryjnego nie zdaje sobie sprawy z występującego zagrożenia oraz różnorodnych skutków tej inwazji. Dlatego wszelkie badania oraz publikacje dotyczące

dirofilariozy są szczególnie cenne. Z uwagi na brak wyraźnych objawów klinicznych nawet w przypadku jej podejrzenia w znacznym odsetku zarażeń inwazja ta jest niedoceniana. W konsekwencji postępowanie terapeutyczne ogranicza się najczęściej do fizycznej eliminacji nicienia. Dopiero głęboka analiza immunologiczna z wykorzystaniem technik biologii molekularnej pozwala dostrzec często niewidoczne skutki zarażenia. Badania takie rzucają nowe światło na problem udziału mechanizmów immunologicznych na poziomie komórkowym na patogenezę tej oraz wielu innych podobnych inwazji. Dlatego analizowane badania naukowe dotyczące specyfiki reakcji immunologicznych w przebiegu dirofilariozy o zróżnicowanej intensywności są wyjątkowo interesujące i cenne. Wykorzystanie technik biologii molekularnej daje możliwość analizy reakcji żywiciela nawet w przypadkach bezobjawowego przebiegu inwazji. Pozwala to na prognozowanie patogenezы w przypadku występowania współtowarzyszących patogenów lub zaburzeń układu immunologicznego. Znaczenie badań jest o tyle większe, że dotyczy tych samych mechanizmów występujących u zarażonego człowieka. Dlatego wybór tematyki badawczej pracy doktorskiej Pani lek. wet. Magdaleny Wysmołek oceniam bardzo wysoko, zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Oceniana rozprawa doktorska ma formę jednotematycznego zbioru oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopismach o uznanej renomie w środowisku parazytologicznym. W ramach recenzowanej pracy ujęto trzy artykuły opublikowane w latach 2020-2022 jako jednotematyczny cykl publikacji.

1. Wysmołek M.E., Dobrzyński A., Długosz E., Czopowicz M., Wiśniewski M., Jurka P., Klockiewicz M.; Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*, *Front Vet Sci.* 2020 Sep 10;7:590, doi: 10.3389/fvets.2020.00590.
2. Wysmołek M.E., Klockiewicz M., Sobczak-Filipiak M., Długosz E., Wiśniewski M.; Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with *Dirofilaria repens* as the primary disease or a disease complicating factor, *Front Vet Sci.* 2020 Sep 22;7:577466. doi: 10.3389/fvets.2020.577466
3. Wysmołek M.E., Klockiewicz M., Długosz E., Wiśniewski M.; Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2022 Jul;86:101818. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101818

Publikacje będące podstawą dysertacji doktorskiej są opracowaniami wieloautorskimi, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Zostały opublikowane w czasopismach z listy *Journal Citation Report* (JCR) co odzwierciedla ich wysoki poziom naukowy i edytorski. Ich sumaryczny współczynnik wpływu (IF) wynosi 9,092 a łączna liczba punktów dla czasopism z bazy MEiN wynosi 210. Publikacje powstały w oparciu o zaplanowane i wykonane doświadczenia własne, stanowiąc zwarty jednotematyczny cykl, co jest wymogiem stawianym dysertacjom doktorskim.

Cykl publikacyjny poświęcony jest problematyce związanej z patogenezą dirofilariozy podskórnej a zwłaszcza tym jej aspektom które nie zawsze są dostrzegane przez lekarzy klinicystów a mają znaczący wpływ na szereg reakcji zarażonego organizmu, zwłaszcza w interakcji z innymi czynnikami chorobowymi. Analizując myśl przewodnią jednotematycznego cyklu publikacji zauważa się głęboko przemyślaną koncepcję Doktorantki oraz jej opiekunów naukowych. Znaczenie opracowania jest dodatkowo tym większe, że dotyczy analogicznych reakcji w inwazjach tym samym patogenem u ludzi. Dlatego poznawczy a także aplikacyjny charakter tego opracowania zarówno weterynaryjny jak i medyczny czyni z niego wyjątkowo cenne i ciekawe osiągnięcie.

Dysertacja doktorska liczy 97 stron maszynopisu. Poza stroną tytułową na str. nr 3 autorka przedstawiła oświadczenia promotora o spełnianiu warunków pracy doktorskiej oraz oświadczenie własne potwierdzające jej samodzielne autorstwo oraz, że praca nie była wcześniej przedmiotem procedur innej dysertacji doktorskiej. Kolejna strona zawiera bardzo sympatyczne podziękowania składane na ręce promotorów a także wielu innych osób które wspierały doktorantkę w dążeniu do zamierzonego celu. Strony 7 i 9 zawierają streszczenia opracowania w języku polskim i angielskim. Strony 9 i 10 zawierają spis treści. Na stronie 13 autorka przedstawiła dane bibliograficzne publikacji naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Strona 14 i 15 zawiera wykaz skrótów. Kolejne (str. 17 do 22) zawierają obszerny wstęp w którym Doktorantka uzasadnia celowość podjęcia badań stanowiących podstawę dysertacji. Na stronie 29 znajdujemy sformułowane cele badań. Następna obszerna część pracy zatytułowana „Materiał i metody” liczy dziesięć stron (str. 25-34) a kolejnych dwanaście stron (str. 35-46) zajmuje autorce omówienie wyników. Dyskusja w ujęciu konfrontacji wyników własnych z danymi literaturowymi zajmuje cztery strony pracy (str. 47-50). Na str. 51 autorka zredagowała osiem wniosków. Strony 53-56 zawierają 43 pozycje piśmiennictwa. Kolejne strony dysertacji (59-79) to kopie oryginalnych artykułów naukowych, stanowiących jednotematyczny cykl publikacji, będący podstawą pracy

doktorskiej. Strony 83-96 to oświadczenia współautorów publikacji przyznający doktorantce od 43 do 86 % udziału na wszystkich etapach badań oraz powstawania publikacji. Str. 97 to zgoda na udostępnienie pracy w czytelnich biblioteki SGGW.

W ramach wstępu doktorantka przedstawiła cykl rozwojowy *Dirofilaria repens* wraz z autorskim opracowaniem graficznym. Wstęp jest bardzo „syntetyczny” bez szczegółowej morfologii pasożytów oraz systematyki patogenu. W mojej opinii w tym miejscu zabrakło informacji wskazujących na przyczynę rozprzestrzeniania się inwazji. Myślę, że czytelnik powinien dowiedzieć się iż inwazjologia tej pasożytozy różni się w zależności od strefy występowania. W rodzimych warunkach klimatycznych komary są zdolne do transmisji inwazji jedynie w okresie lata i wczesnej jesieni co związane jest z określonymi uwarunkowaniami temperaturowymi. Inna uwaga dotyczy użycia przez Doktorantkę nieprecyzyjnych określeń np. (str 17) „dojrzewanie postaci larwalnych do stadium inwazyjnego L3”. W mojej opinii dojrzewanie i dojrzałość wiąże się z osiągnięciem postaci zdolnej do rozmnażania. Larwy są zawsze postaciami młodocianymi dlatego w odniesieniu do nich sugerowałbym użycie określenia jako osiągnięcie pewnego etapu rozwoju. Również w grafice cyklu rozwojowego autorka używa określenia „po ukąszeniu”. Pragnę zaznaczyć iż komary są solenofagami a ich sposób pobierania pokarmu polega na wkłuciu się do naczynia krwionośnego. Dlatego sugeruję użycie określenia -ukłucie. Następnie Doktorantka przedstawiła szczegółową patogenezę inwazji z uwzględnieniem aspektów immunologicznych. Bardzo trafnie wykazała różnice w przebiegu inwazji mikrofilaremicznych i amikrofilaremicznych wykazując rolę larw L1 jako potencjalnego istotnego patogenu. Podsumowując tę część dysertacji należy docenić jej zwięzły charakter i koncentrowanie się wyłącznie na aspektach dotyczących patogenezy inwazji, chociaż szersze spojrzenie wniosło by nowe argumenty uzasadniające wybór tematu. W mojej opinii z pozycji nauczyciela akademickiego zabrakło w pracy odniesienia do aktualnej systematyki tego nicienia (przynależność do rzędu Spirurida, rodziny Onchocercidae) pozwalającej na porównanie tego nicienia do wielu innych nicieni tkankowych których rozwój i oddziaływanie na żywiciela przebiega wg podobnego schematu.

W kolejnym rozdziale doktorantka przedstawiła pięć punktów będących celami pracy doktorskiej. Wszystkie są bardzo oryginalnie sprecyzowane i dotyczą wybranych serologicznych i molekularnych aspektów patogenezy inwazji *Dirofilaria repens*. Dostrzeżenie nieznanymi aspektów przebiegu inwazji i próba wyjaśnienia reakcji organizmu

żywiciela w przebiegu zarażenia wnosi nowe spojrzenie na nieznany dotychczas subkliniczny przebieg tej parazytozy.

Rozdział III poświęcony jest materiałom i metodom użytym w badaniach własnych. Autorka prezentuje dane dotyczące kolejnych wykonywanych badań oraz wykorzystanych analiz statystycznych. Prezentowana metodyka koresponduje z kolejnymi celami postawionymi w pracy nawiązując do artykułów włączonych w cykl publikacji. Zastosowane metody badawcze obejmowały począwszy od badań parazytologicznych dedykowanych inwazjom przebiegającym z mikrofilariemią, poprzez badania biochemiczne i morfologiczne krwi zarażonych zwierząt do zaawansowanych badań serologicznych i molekularnych analizujących immunologiczne reakcje na poziomie komórkowym. Dużą wartością tych badań było zastosowanie cytometrii przepływowej w celu oznaczania immunofenotypu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej psów zarażonych *Dirofilaria repens*. Również wyjątkowo innowacyjnym rozwiązaniem była analiza cytokin syntetyzowanych przez jednojądrzaste komórki krwi w przebiegu inwazji i bez jej obecności a także analiza aktywacji szlaków sygnałowych stymulowanych antygenami omawianego nicienia. Podsumowując tę część pracy należy podkreślić bardzo wysoki poziom użytych rozwiązań badawczych oraz nowoczesność metod które opanowała Doktorantka.

Wszystkie cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane w kolejnych etapach a wyniki zaprezentowano w rozdziale 4. Opublikowane prace zawierają szczegółowe analizy badań. Pierwsza z nich dotycząca porównania wyników morfologii i biochemii krwi psów bezobjawowych, zarażonych *D. repens* w porównaniu ze zwierzętami niezarażonymi dowiodła, że mimo braku objawów klinicznych u zarażonych zwierząt stwierdza się niższą liczbą erytrocytów, niższy hematokryt, niższą liczbę limfocytów, wyższe stężenie glukozy, oraz wyższą aktywność fosfatazy alkalicznej. Wyniki te potwierdzają, że inwazja mimo braku objawów klinicznych ma wpływ na funkcjonowanie organizmu żywiciela. Kolejna analiza dotyczy przypadków klinicznych psów zarażonych *D. repens* z wysoką mikrofilariemią. Badania biochemiczne, morfologiczne krwi tych zwierząt wykazały znaczące zaburzenie stanu zdrowia co dowodzi że larwy obecne w krążeniu ustrojowym są główną przyczyną zaburzenia stanu zdrowia zarażonych żywicieli. Wyjątkowo ważną informacją jest potwierdzenie, że wysoka mikrofilaremia a tym samym stan kliniczny jest skorelowany z zaburzeniami immunologicznymi występującymi u żywicieli. Udowodnienie szeregu reakcji na poziomie komórkowym o potencjalnym znaczeniu na patogenezę inwazji wykazano w ostatnim artykule. Między innymi wykazano, że psy zarażone miały wyższy odsetek

limfocytów regulatorowych o fenotypie T CD4+CD25-Foxp3+ o potwierdzonych właściwościach immunosupresyjnych. Wykazano także, że wysokie miana przeciwciał klasy IgG i IgE, są związane z antygenami somatycznymi *D. repens*. Jednocześnie potwierdzono wyższy poziom swoistych IgG1 w stosunku do IgG2 u psów z mikrofilariemią oraz wyższy poziom IgG2 u zarażonych zwierząt bez mikrofilaremii. Potwierdzono także, że u samców inwazje z mikrofilariemią są znacznie częstsze natomiast u samic statystycznie częściej stwierdzane są inwazje bez mikrofilaremii. Informacja ta może być wskazówką do postępowania dla lekarzy klinicyistów. Analiza cytokin wydzielanych przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej wykazała szczególną rolę IL-4 w inwazjach z wysoką mikrofilariemią oraz IL-10 w inwazjach z obecnością antygenów dorosłych osobników. Badania molekularne dowiodły bardzo ważnych nowatorskich teorii o wyjątkowo dużym znaczeniu klinicznym wynikającym z faktu mikrofilaremii.

Kolejny rozdział to dyskusja w którym Doktorantka porównuje uzyskane w badaniach własnych wyniki z wynikami dotyczącymi podobnej tematyki, uzyskanymi przez autorów innych badań. W dostępnej literaturze znajduje potwierdzenie na związek obserwowanych reakcji immunologicznych z faktem zarażenia *Dirofilaria repens* a także innych pasożytów. Znaczący synergizm reakcji stwierdzano także po analizie przebiegu inwazji *Brugia malayi* czy *Acanthocheilonema viteae* szczególnie w aspekcie obecności larw we krwi. Są to inwazje nicieni należących do rzędu Spirurida przebiegające również z fazą mikrofilaremii. Doktorantka znalazła także podobieństwa reakcji immunologicznych w przebiegu innych inwazji jak *Toxocara canis*. Porównywalną interakcję obserwuje się w reakcji organizmu żywiciela zwłaszcza na antygeny larwalne tego nicienia.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na wysunięcie 8 wniosków korespondujących do przyjętych celów badań. Sprowadzają się one do stwierdzenia, że każda forma inwazji a szczególnie przebiegająca z mikrofilariemią skutkuje zaburzeniem równowagi reakcji immunologicznej. Najbardziej intensywne reakcje mają miejsce w inwazjach o wysokiej liczbie mikrofilarii we krwi co skutkuje objawami klinicznymi mogącymi nawet zagrażać życiu żywiciela. Konkluzje te są o tyle ważne że mogą także dotyczyć reakcji zarażonego człowieka.

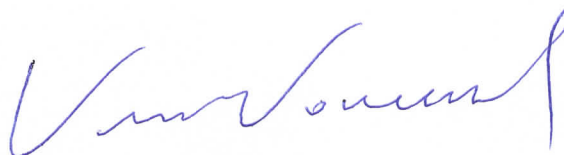
Nie wnoszę żadnych uwag co do części merytorycznej pracy. W tym aspekcie oceniam ją szczególnie wysoko. Jest cennym przykładem pracy interdyscyplinarnej z zastosowaniem technik biologii molekularnej w parazytologii. Uwagi dotyczące wstępu są jedynie subiektywnymi konkluzjami dotyczącymi szerszego spojrzenia na problematykę inwazji przebiegających z mikrofilariemią. Pracę doktorską Pani lek. wet. Magdaleny

Elżbiety Wysmołek pt. „Badanie odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zarażenia *Dirofilaria repens* u psa (*Canis familiaris*)” oceniam bardzo wysoko. Doktorantka wykonując serię nowatorskich analiz w pełni potwierdziła swoje przygotowanie do pracy naukowej oraz zrealizowała postawione w założeniach pracy cele i zredagowała ważne wnioski o dużym znaczeniu poznawczym jak i aplikacyjnym. Ich praktyczne wdrożenie może zmienić strategię terapeutyczne związane z dirofilariozą podskórną zarówno w medycynie weterynaryjnej jak i medycynie człowieka.

Przedstawiona do oceny praca jest wyjątkowo cennym oryginalnym i samodzielnym osiągnięciem naukowym Pani lek. wet. Magdaleny Elżbiety Wysmołek. W mojej ocenie odpowiada ona w pełni warunkom określonym w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (dz. U. 2018 poz.1669 z późniejszymi zmianami).

W związku z tym przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Magdaleny Elżbiety Wysmołek do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Dodatkowo z uwagi na znaczącą wartość pracy oraz wkład jaki ona wnosi do poszerzenia wiedzy dotyczącej wybranych aspektów immunologicznych w inwazjach pasożytniczych składam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria, SGGW w Warszawie o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Krzysztof Tomczuk