



Wrocław, 29.01.2025 r.

Dr hab. Jolanta Piekarska, prof. uczelni
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Chorób Wewnętrznych
z Kliniką Koni, Psów i Kotów
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Justyny Karabowicz

**pt. „Określenie roli nowo poznanych pasożytniczych czynników hamujących migrację makrofagów
w układzie *Dirofilaria repens* – żywiciel”**

wykonanej w Katedrze Nauk Przedklinicznych, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW
w Warszawie pod kierunkiem promotora ks. dr hab. inż. Marcina Wiśniewskiego, prof. SGGW oraz
promotora pomocniczego dr hab. inż. Ewy Długosz

Podstawą do wykonania recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny Weterynarii, Szkoły Głównej
Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 20 listopada 2024 r. i pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny
Weterynarii, SGGW w Warszawie prof. dr hab. Marcina Bańbury z dnia 27 listopada 2024r.

Podstawa prawna: Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2024, poz.
1571) (zgodność z elementami uwzględnionymi w art. 187 ustawy)

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Justyny Karabowicz stanowi zbiór dwóch
powiązanych tematycznie opublikowanych artykułów naukowych oraz wyników badań, które nie
zostały opublikowane co jest zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie
wyższym i nauce i może stanowić podstawę do uzyskania stopnia doktora.

W skład rozprawy wchodzi dwa artykuły naukowe opublikowane w 2022 i 2024 roku w
recenzowanych czasopismach z bazy JCR (Journal Citation Report).

P1. Karabowicz J, Długosz E, Bąska P, Wiśniewski M. (2022). Nematode Orthologs of Macrophage
Migration Inhibitory Factor (MIF) as Modulators of the Host Immune Response and Potential
Therapeutic Targets. *Pathogens*. 11 (2): 258. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020258>

P2. Karabowicz J, Długosz E, Bąska P, Pękacz M, Wyszomółek M, Klockiewicz M, Wiśniewski M. (2024).
Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host-parasite
interactions. *Journal of Veterinary Research*. 68 (3) : 381–388. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2024-0038>

Współczynnik wpływu (IF) prac wchodzących w skład cyklu wynosi 4,6 natomiast suma punktów
zgodnie z wykazem MNiSW z 2024r. wynosi 240. Obie publikacje wchodzące w skład dysertacji są



pracami wieloautorskimi, w których Doktorantka jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.

W pierwszej publikacji pani mgr Justyna Karabowicz współtworzyła koncepcję artykułu i przygotowała oryginalną wersję manuskryptu. W drugiej publikacji jej udział polegał na zaprojektowaniu eksperymentów, gromadzeniu, analizie i opracowywaniu danych, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje. Udział Kandydatki w obu pracach został określony procentowo odpowiednio na 85 i 70%.

Charakterystyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej

Przedstawione do recenzji 62 stronicowe opracowanie zostało przygotowane zgodnie z zasadami przyjętymi dla dysertacji doktorskiej i obejmuje 8 głównych rozdziałów poprzedzonych spisem treści. Praca rozpoczyna się streszczeniami w języku polskim i angielskim, które zwięźle przedstawiają tło badań oraz główne wyniki i konkluzje. Na kolejnych stronach Autorka zamieściła listę publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz objaśnienie zastosowanych skrótów. Do opracowania dołączono również kserokopie publikacji, wchodzących w skład cyklu oraz oświadczenia współautorów prac odnośnie wkładu w powstanie publikacji.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy nicienia *Dirofilaria repens* będącego przyczyną dirofilariozy podskórnej, inwazji pasożytniczej zwierząt mięsożernych, głównie psów i innych gatunków z rodziny psowatych i kotowatych, przenoszonej przez komary. Wprowadzone podczas ukłucia komara do organizmu żywiciela inwazyjne larwy (mikrofilarie) dojrzewają w tkance podskórnej oraz w jamach ciała powodując powstawanie guzków. Dorosłe samice nicieni rodzą do krwioobiegu nowe pokolenie mikrofilarii, co stwarza wysokie ryzyko przeniesienia i rozprzestrzeniania inwazji na innych żywicieli. Pasożyt posiada potencjał zoonotyczny stąd nie mniej istotna jest również świadomość zagrożenia zdrowia ludzi. W związku z obserwowaną w Europie tendencją zwiększania się zasięgu występowania nicienia, dirofilarioza stanowi obecnie istotny problem inwazjologiczny budzący duże zainteresowanie lekarzy weterynarii, szczególnie w kontekście diagnostyki klinicznej i laboratoryjnej.

W uzasadnieniu tematyki podjętych badań Autorka wskazała na konieczność poszerzenia badań dotyczących mechanizmów odpowiedzi immunologicznej rozwijającej się podczas inwazji *D. repens*. Badania te są istotne ze względu na problemy zdrowotne, które wywołuje ten pasożyt u zwierząt oraz u ludzi oraz są niezbędne dla zrozumienia patogenetyki oraz opracowania nowych metod leczenia i zwalczania tej pasożyty.



W rozdziale **Wstęp** Doktorantka w przystępny sposób omówiła zagadnienia związane z pasożytniczym nicieniem *D. repens* opisując jego biologię, patogenezę inwazji, rozprzestrzenienie w Europie jak również znaczenie w weterynarii i medycynie człowieka. Przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący złożonej odpowiedzi układu immunologicznego żywiciela w przebiegu inwazji wywołanych przez filarie w tym również *D. repens* zwracając uwagę, że pomimo rosnącego zagrożenia, jakie stwarza ten nicien, wiedza na temat molekularnych mechanizmów interakcji pasożyt-żywiciel w przebiegu dirofilariozy pozostaje ograniczona. *D. repens* może przeżyć w organizmie żywiciela wiele lat nie manifestując przy tym wyraźnych objawów klinicznych. Może również rozwijać się u innych żywicieli a strategię pasożyta, które pozwalają mu przeżyć w tkankach wciąż nie są do końca poznane. Identyfikacja oraz określenie na poziomie molekularnym funkcji wytwarzanych przez *D. repens* białek o właściwościach immunomodulujących wydaje się istotne dla zrozumienia mechanizmów odpowiedzi immunologicznej w przebiegu tej inwazji.

W dalszej części wstępu Autorka przedstawiła charakterystykę białka - czynnika hamującego migrację makrofagów (*macrophage migration inhibitory factor*; MIF) jak również dostępną wiedzę na temat jego homologów stwierdzonych u ponad 20 gatunków pasożytniczych nicieni, w tym także u filarii. Homologi MIF odgrywają istotną rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej żywiciela, zarówno poprzez hamowanie procesów prozapalnych, jak i indukcję różnicowania w kierunku makrofagów typu M2, co może sprzyjać przetrwaniu pasożyta w organizmie żywiciela. Doktorantka trafnie zidentyfikowała lukę badawczą i jako główny cel swojej pracy wybrała określenie roli dwóch homologów białka czynnika hamującego migrację makrofagów *D. repens* w układzie pasożyt - żywiciel. Wyznaczone pięć szczegółowych celów badawczych pozwoliło na weryfikację prawidłowo postawionych hipotez badawczych, które zakładały, że :

1. Homologi MIF *D. repens* wykazują właściwości immunomodulacyjne wpływając na aktywność makrofagów poprzez hamowanie ich prozapalnego działania, co sprzyja przeżyciu dorosłych pasożytów w tkance żywiciela
2. Rekombinowane białka rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2 są rozpoznawane przez surowice psów naturalnie zarażonych *D. repens*.

Aby zrealizować założone cele Autorka wyznaczyła szczegółowy zakres pracy, a proces organizacji badań szczegółowo opisała w rozdziale 3 rozprawy **Materiały i Metody**. Badania doświadczalne Doktorantka rozpoczęła po dokonaniu szczegółowego przeglądu literatury dotyczącej homologów MIF wydzielanych przez nicienie. W Publikacji 1 przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat ich struktury, aktywności enzymatycznej, wpływu na układ odpornościowy żywiciela oraz potencjalnego



zastosowania w leczeniu chorób pasożytniczych, zapalnych i autoimmunologicznych. Do osiągnięcia wyznaczonych celów badawczych Doktorantka wykorzystwała narzędzia bioinformatyczne jak analiza porównawcza sekwencji nukleotydów czy modelowanie przestrzenne białek oraz zróżnicowane metody biotechnologiczne, w tym techniki inżynierii genetycznej (tj. ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy /*quantitative polymerase chain reaction*; qPCR/, produkcja białek rekombinowanych w *E. coli*). W ramach rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone również badania na modelu zwierzęcym. Oczyszczonymi białkami rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2 immunizowano myszy BALB/c w celu otrzymania surowicy poliklonalnej a ocenę immunogenności badanych białek przeprowadzono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) oraz badaniem Western blot. Test ELISA wykorzystano również do oceny reaktywności rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2 z przeciwciałami surowicy psów naturalnie zarażonych *D. repens*. Wyniki badań przeprowadzonych wyżej wymienionymi metodami zostały opublikowane w Publikacji 2. Dodatkowo, przeprowadzono badania *in-vitro* oceniając wpływ rekombinowanego białka Dre-MIF-1 (rDre-MIF-1) na aktywność makrofagów ustalonej linii komórkowej monocytów THP-1, w tym profil wydzielanych przez nie cytokin i zmian w poziomie wybranych markerów pro- i przeciwzapalnych po stymulacji. Wyniki tych badań nie zostały opublikowane i stanowią integralną część przedłożonej do oceny pracy.

Doktorantka z dużą swobodą posługuje się prawidłowo dobranymi i zaawansowanymi technikami badawczymi w celu osiągnięcia założonych celów rozprawy doktorskiej. Opisy poszczególnych etapów badań, zastosowanej metodyki, warunków reakcji oraz stosowanej w badaniach aparatury są bardzo przejrzyste i świadczą o umiejętności dobrania odpowiednich narzędzi niezbędnych do zrealizowania planów badawczych.

Rozdział **Wyniki** zawiera syntetyczny opis wyników badań opublikowanych w Publikacji 2 oraz szczegółową analizę nieopublikowanych wyników badań *in-vitro* tj. ocenę żywotności makrofagów, poziom fosforylacji kinaz w makrofagach linii komórkowej THP-1 po stymulacji białkiem rDre-MIF-1 oraz stężenie (profil) wydzielanych cytokin i ekspresją określonych genów markerów pro- i przeciwzapalnych po stymulacji tym białkiem.

Analizując wyniki zawarte w rozprawie stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała cele naukowe oraz pozytywnie zweryfikowała postawioną hipotezę badawczą. Analiza bioinformatyczna sekwencji dwóch homologów MIF *D. repens* wykazała, że Dre-MIF-1 charakteryzuje się wyższym poziomem podobieństwa sekwencji aminokwasów do MIF człowieka i psa niż Dre-MIF-2. Stwierdzono wyższy poziom ekspresji mRNA kodujących *Dre-mif-1* i *Dre-mif-2* w dorosłych osobnikach *D. repens* w porównaniu do mikrofilarii. Wykazano, że u myszy rDre-MIF-1 jest bardziej immunogenny niż rDre-



MIF-2 a u zarażonych psów oba rekombinowane homologii MIF są specyficznym rozpoznawane jedynie przez przeciwciała podklasy IgG1. Nie zaobserwowano natomiast znaczących różnic w poziomach przeciwciał IgG, IgG2, IgE lub IgM pomiędzy surowicami psów zarażonych i niezarażonych co powinno być cenną wskazówką przy opracowywaniu nowych narzędzi diagnostycznych. Wyniki badań wykazały również, że rDre-MIF-1 wpływa na aktywność makrofagów, m.in. hamuje wydzielanie cytokin prozapalnych przez makrofagi pobudzone lipopolisacharydem (LPS), co świadczy o jego właściwościach przeciwzapalnych i potwierdza jego działanie immunomodulacyjne. Takie działanie białka Dre-MIF-1 może sprzyjać przeżyciu dorosłych nicieni *D. repens* w tkankach żywiciela.

Rozdział Wyniki jest bardzo dobrą syntezą uzyskanych w badaniach wyników i w sposób jednoznaczny prezentuje najważniejsze uzyskane rezultaty badań. Wszystkie wyniki w pracy zostały opracowane za pomocą dobrze dobranych metod statystycznych, umiejętnie przedstawione (za pomocą tabel i rycin), wnikliwie przedyskutowane oraz skonfrontowane z badaniami innych naukowców.

Bibliografia licząca 100 pozycji aktualnego piśmiennictwa ułożonego w porządku alfabetycznym została trafnie dobrana. Zawiera pozycje literatury opublikowane w renomowanych czasopiśmie o uznanym IF, głównie z ostatnich 15 lat. Rozprawa doktorska została przygotowana z dużą dbałością i dokładnością. Jest pracą naukową o typowym i czytelnym układzie, dobrze udokumentowanych wynikach badań, trafnym wyborze piśmiennictwa. Uzyskane wyniki są ważnym uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy dotyczącej mechanizmów interakcji pasożyt-żywiciel w przebiegu dirofilariozy. Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, sformułowane przez nią wnioski mają duże znaczenie praktyczne a podjęta przez Doktorantkę próba wyjaśnienia mechanizmów działania i roli homologów MIF *D. repens* i zachodzących zależności potwierdza jej dojrzałość naukową.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Justyny Karabowicz zatytułowana „Określenie roli nowo poznanych pasożytniczych czynników hamujących migrację makrofagów w układzie *Dirofilaria repens* – żywiciel” spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim określone w art. 187. Ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2024, poz. 1571). W związku z tym, z satysfakcją rekomenduję i przedkładam Radzie Dyscypliny



UNIwersYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII I CHOROÓB INWAZYJNYCH
KATEDRY CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH Z KLINIKĄ KONI, PSÓW I KOTÓW

Weterynaria SGGW w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Justyny Karabowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoki poziom merytoryczny badań zaprezentowanych w pracy doktorskiej oraz doskonały warsztat badawczy wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie ocenianej dysertacji.

KIEROWNIK ZAKŁADU
PARAZYTOLOGII I CHOROÓB INWAZYJNYCH
Katedry Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów
Jolanta Piekarska
dr hab. Jolanta Piekarska, prof. uczelni



UNIwersytet
PRzyrodniczy
WE WROCLAWIU

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII I CHOROÓB INWAZYJNYCH
KATEDRY CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH Z KLINIKĄ KONI, PSÓW I KOTÓW

Wrocław, 29.01.2025 r.



RPW/2620/2025 N
Data: 2025-02-03



Prof. dr hab. Marcin Bańbura

Przewodniczący Rady Dyscypliny Weterynaria

SGGW w Warszawie

W załączeniu przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej mgr Justyny Karabowicz oraz podpisane egzemplarze protokołu zdawczo odbiorczego.

KIEROWNIK ZAKŁADU
PARAZYTOLOGII I CHOROÓB INWAZYJNYCH
Katedry Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów
[Signature]
dr hab. Jolanta Pienkarska, prof. uczelni