

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

Lublin 10.02.2025

RECENZJA

dysertacji doktorskiej Pani mgr. Justyny Karabowicz
 pt. „ Określenie roli nowo poznanych pasożytniczych czynników hamujących
 migrację makrofagów w układzie *Dirofilaria repens* – żywiciel
 Determination of the role of newly discovered parasitic
 macrophage migration inhibitory factors in the *Dirofilaria repens*
 - host system interactions

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 jest transmisyjną inwazją o charakterze zoonozy, która od kilku dekad zagraża zwierzętom mięsożernymi człowiekowi w Europie Środkowej. Wywoływana przez nicienie *Dirofilaria repens* należące do rzędu Spirurida, rodziny Onchocercidae. Jeszcze do niedawna postrzegana jako pasożytoza strefy subtropikalnej, została zawleczona i obecnie jest jedną z częstszych pasożytów zwierząt z rodziny Canidae. Człowiek jest nietypowym żywicielem u którego udowodniono występowanie form inwazyjnych dla żywiciela pośredniego. Stan taki potwierdza jego rolę jako potencjalnego żywiciela ostatecznego. Jednocześnie człowiek staje się możliwym rezerwuarem inwazji. Dirofilarioza podskórna w warunkach bezpośredniej bliskości człowieka, zwierząt mięsożernych oraz komarów posiada wyjątkowo duży potencjał transmisji. Wynika on z faktu relatywnie długiego okresu życia dojrzałych nicieni jak i przeżywalności mikrofilarii.

49

Postacie dojrzałe u zwierząt mięsożernych żyją wg Thomasa Schniedera do 7,5 lat, a mikrofilarie do 2,5 lat. Mechanizmy warunkujące długowieczność tych nicieni nie zostały dotychczas szeroko wyjaśnione, podobnie jak i szczegółowy patomechanizm inwazji. Szczególnie interesujące są nowe pojawiające się tezy przypisujące znaczące zagrożenie związane z inwazjami *D. repens* cechującymi się masowymi mikrofilariami. Dlatego badania stawiające za cel wyjaśnienie wszystkich reakcji zachodzących między pasożytem a żywicielem w przebiegu tej inwazji są wyjątkowo ciekawe. Ich poznanie może w przyszłości zaowocować nowymi rozwiązaniami ułatwiającymi leczenie niespecyficznych skutków zwalczania dirofilariozy podskórnej zwierząt mięsożernych i człowieka. Ich znaczenie jest tym większe, że pośrednio może służyć również ochronie zdrowia publicznego. Dlatego wybór tematu pracy badawczej będącej podstawą dysertacji doktorskiej jest w mojej opinii szczególnie trafny i zasługuje na uznanie.

Recenzowana rozprawa doktorska została zredagowana w układzie hybrydowym i składa się z jednotematycznego zbioru oryginalnych prac naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, oraz części manuskryptu opisującego niepublikowane dane będące kontynuacją wcześniejszych badań. W ramach cyklu publikacji ujęto dwa artykuły opublikowane w latach 2020-2022 o danych bibliograficznych:

1. Karabowicz J*, Długosz E, Baska 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>
2. Karabowicz J*, Długosz E, Baska P, Pękacz M, Wismołek 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>

Publikacje te są opracowaniami wieloautorskimi, w których Doktorantka jest pierwszym autorem z zadeklarowanym swoim udziałem odpowiednio 85% i 70 %. Obie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy *Journal Citation Report* (JCR). Ich sumaryczny współczynnik wpływu (IF) wynosi IF=4,6 a łączna liczba punktów dla czasopism z bazy MEiN wynosi 240. Pierwsza z publikacji ma charakter pracy przeglądowej, gdzie przeprowadzono szczegółową analizę aktualnego stanu wiedzy dotyczącej homologów MIF związanych inwazjami. Szczególną uwagę zwrócono na zagadnienia związane z ich strukturą, bioaktywnością i ewentualnym praktycznym wykorzystaniem w medycynie człowieka i medycynie weterynaryjnej. Druga publikacja ma charakter doświadczalny i omawia analizę

sekwencji aminokwasów dwóch homologów MIF *D. repens*, w aspekcie ich pozyskania, metody oczyszczenia, analizę immunogenności oraz kompatybilności z przeciwciałami występującymi u psów naturalnie zarażonych *D. repens*. Badania nieopublikowane dotyczą wpływu rekombinowanego białka (rDre-MIF) na aktywność makrofagów linii komórkowej THP-1. Doktorantka badała profil wydzielanych cytokin oraz poziomy wybranych markerów związanych ze stanem zapalnym.

Dysertacja doktorska liczy 62 strony maszynopisu oraz 35 stron wydruków artykułów i oświadczeń o autorstwie. Na dysertację składają się: strona tytułowa, strona zawierająca oświadczenie promotora o spełnianiu warunków pracy doktorskiej. Doktorantka oświadcza także samodzielność jej wykonania oraz, że nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa autorskiego a także, że praca nie była wcześniej przedmiotem procedur innej dysertacji doktorskiej. Kolejna strona zawiera podziękowania dla promotorów, współautorów artykułów oraz rodzinie. Strony 7 i 8 zawierają spis treści a kolejne (9-12) streszczenia w języku polskim i angielskim. Na stronie 13 Doktorantka zamieściła dane bibliograficzne publikacji wchodzących w skład dysertacji doktorskiej oraz deklarację dotyczącą udziału własnego. Kolejne strony (15 i 16) zawierają wykaz skrótów. Strony 17-26 zawierają wstęp a na stronie 27 znajdujemy zrehabilitowane cele i zakres badań. Strony 28-35 poświęcone są materiałom i metodyce badań, kolejne (36-42) zawierają publikowane i nieopublikowane wyniki a następnie dyskusja (str 43-48). Kolejna strona (49) zawiera podsumowanie i wnioski. Strony 50-61 zawierają 100 pozycji piśmiennictwa. Następnie na stronach nienumerowanych Doktorantka zamieściła kopie oryginalnych artykułów naukowych wchodzących w skład dysertacji oraz oświadczenia współautorów deklarujące % udział w badaniach i powstawaniu publikacji. Ostatnia strona dysertacji zawiera zgodę Doktorantki na udostępnienie pracy w czytelnich biblioteki SGGW.

We wstępie Doktorantka przedstawiła najważniejsze fakty dotyczące zawleczonych transmisyjnej inwazji *Dirofilaria repens*, ze szczególnym uwzględnieniem biologii pasożyta, patogeny i rozprzestrzenienia w Europie. Wykazała skalę zagrożenia dla zwierząt mięsożernych jak i człowieka, wskazując szczególnie oddziaływanie mikrofilarii na stan zdrowia żywicieli. Wskazała jednocześnie na nie do końca wyjaśnione mechanizmy relacji pasożyt żywiciel, wpływające na długotrwałe utrzymywanie się inwazji jak i oddziaływanie patogenne. Doktorantka skupiła się prawie wyłącznie na reakcji układu immunologicznego żywiciela w przebiegu inwazji wywołanych przez filarie, koncentrując się szczególnie na roli czynnika hamującego migrację makrofagów (MIF). Przedstawiła charakterystykę homologów



MIF stwierdzanych u różnych gatunków nicieni w tym należących do nadrodziny Filarioidea potocznie nazywanych filariozami. Wstęp jest bardzo „syntetyczny”, lecz pozwala wykazać istotne „luki dostępnej wiedzy” które stały się źródłem inspiracji najważniejszych tez pracy doktorskiej. W mojej opinii brakuje tu szczegółowej systematyki nicienia, która byłaby podstawą dyskusji dotyczącej podobnych zależności u bliżej i dalej spokrewnionych gatunków nicieni. Doktorantka używa także określenia „postać dorosła” która jest bezpośrednim tłumaczeniem z j. angielskiego „adult”. W języku polskim w mojej opinii bardziej trafne byłoby określenie „postać dojrzała” co nawiązuje do okresu patentnego inwazji.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Cele” doktorantka przedstawiła pięć punktów będących celami pracy doktorskiej. Są nimi :

1. Molekularna charakterystyka homologów czynnika hamującego migrację makrofagów *D. repens*;
2. Analiza ekspresji mRNA Dre-mif-1 i Dre-mif-2 w mikrofilariach i osobniku dorosłym;
3. Uzyskanie homologów MIF *D. repens* w bakteryjnym systemie ekspresji;
4. Ocena immunogenności rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2 u myszy oraz określenie reaktywności badanych białek z przeciwciałami surowicy psów naturalnie zarażonych *D. repens*;
5. Określenie wpływu homologów MIF *D. repens* na aktywność makrofagów człowieka w modelu in vitro

Doktorantka przedstawiła także 8 punktowy zakres pracy obejmujący poszczególne fazy badań laboratoryjnych. Zarówno cele jak i zakres pracy są jasno nakreślone i pełni uzasadnione w kontekście poznania nowych aspektów relacji pasożyt żywicieli.

Rozdział III poświęcony jest materiałom i metodom użytym w badaniach własnych. W pierwszej kolejności została przedstawiona metodyka dotycząca badań publikowanych dotyczących pierwszych 4 celów pracy. Przeprowadzono bioinformatyczną analizę sekwencji nukleotydów kodujących dwa nowe homologi MIF *D. repens* dostępnych bazie GenBank. Następnie zbadano poziomy ekspresji genów kodujących te homologi w różnych stadiach rozwojowych i uzyskano białka rekombinowane, którymi po immunizacji myszy, otrzymano surowice poliklonalną. Następnie białka rekombinowane testowano z surowicami psów naturalnie zarażonych oraz wolnych od inwazji *D. repens*. Badano obecność swoistych przeciwciał różnych klas i podklas, skierowanych przeciwko tym białkom. Uzyskanie celu

piątego - określenie wpływu homologów MIF *D. repens* na aktywność makrofagów człowieka, związane jest z badaniami nieopublikowanymi. W tym celu wykonano hodowlę monocytów ustalonej linii komórkowej THP-1 i różnicowanie ich do makrofagów a następnie podjęto próbę przygotowania wspomnianych białek rekombinowanych do stymulacji komórek. Z powodu degeneracji białka rDre-MIF-2, w trakcie procedury usuwania endotoksyn, procedurę stymulacji tym białkiem zaniechano. Dalszym badaniom poddano jedynie białko rDre-MIF-1, oceniając jego wpływ na żywotność makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1. Przeprowadzono także analizę fosforylacji kinaz w makrofagach stymulowanych tym białkiem oraz oceniono aktywność makrofagów stymulowanych cytowanym białkiem przy braku i po wstępnej inkubacji z LPS poprzez ekspresję określonych genów markerów komórkowych. Wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA) z testem post-hoc (test Tukey'a lub test Dunnett'a).

W kolejnym rozdziale - wyniki - Doktorantka prezentuje dane dotyczące kolejno wykonywanych badań publikowanych i niepublikowanych. Uzyskano wiele bardzo interesujących wyników które będą podstawą analizy reakcji pasożyt-żywicieli. Wykazano, że MIF1 i MIF2 posiadają odmienne sekwencje aminokwasowe lecz podobną strukturę trzeciorzędową. Wykazano szczególnie wysoki poziom ekspresji genów kodujących MIF1 i MIF2 u nicieni dojrzałych. Uzyskano rekombinowane białka rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2 różniące się immunogennością i specyficznością reakcji. Ponadto u zarażonych psów stwierdzono podwyższony poziom przeciwciał podklasy IgG1 rozpoznających zarówno rDre-MIF-1, jak i rDre-MIF-2. W badaniach dotyczących części niepublikowanej, z uwagi na problemy z oczyszczaniem białek rekombinowanych pełną procedurę badań udało się przeprowadzić tylko wobec białka rekombinowanego rDre-MIF-1. Nie wykazano różnic w poziomie proliferacji makrofagów stymulowanych i niestymulowanych. Zaobserwowano natomiast niższą żywotność makrofagów stymulowanych LPS oraz LPS i białkiem. Nie potwierdzono zmian w fosforylacji wybranych kinaz (Akt1/2/3 oraz ERK1/2), wykazując ich wpływ na wzrost poziomu fosforylacji białka p53. Potwierdzono także zauważalny niższy poziom fosforylacji niektórych kinaz tyrozynowych. Zauważono również wzrost poziomu IL-10 oraz TNF- α . przy braku różnicy poziomu IL-1 β oraz IL-6. Po stymulacji makrofagów badanym białkiem rekombinowanym zaobserwowano wzrost ekspresji genów związanych z markerami CD206, CD163 oraz INOS. Podsumowując tę część pracy należy podkreślić bardzo wysoki poziom użytych rozwiązań badawczych oraz nowoczesność metod które opanowała Doktorantka. Uzyskane wyniki skonfrontowała z wynikami badań innych autorów



w rozdziale dyskusja. Wykazała się przy tym szeroką znajomością literatury naukowej dotyczącej analizowanego problemu. Wyniki badań własnych doskonale korelują z danymi literaturowymi i niewątpliwie przyczynią się do rozwiązania potencjalnych problemów związanych z inwazją *D. repens*. Szczególnie ważne jest wykazanie faktycznych mechanizmów relacji pasożyt żywiciel. Dodatkowo w badaniach tych można zauważyć ich aplikacyjny charakter, wynikający z możliwości ich wykorzystania do opracowania nowych sposobów terapii oraz testów diagnostycznych.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na wysunięcie 9 wniosków korespondujących do przyjętych celów badań. W mojej opinii są one bardzo szczegółowe, co częściowo wynika z wyjątkowo specjalistycznych badań. Sugerowałbym jednak sformułować je bardziej ogólnie i bez dodatkowych komentarzy, które znajdujemy w rozdziale dyskusja.

Nie wnoszę jakichkolwiek uwag co do części merytorycznej pracy, a nieliczne uwagi redakcyjne nie umniejszają jej wyjątkowej wartości. Pracę za jej wysoki poziom naukowy oceniam bardzo wysoko. Jest kolejnym, przykładem inplantacji nowych technik biologii molekularnej w parazytologii. Dysertacja doktorska Pani mgr Justyny Karabowicz pt. „Określenie roli nowo poznanych pasożytniczych czynników hamujących migrację makrofagów w układzie *Dirofilaria repens* – żywiciel” jest wyjątkowo wartościowym osiągnięciem naukowym. Doktorantka wykonując badania i redagując opracowanie wykazała swoje doskonałe przygotowanie do pracy naukowej.

Przedstawiona do oceny praca w mojej ocenie odpowiada w pełni warunkom stawianym dysertacjom doktorskim, 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).

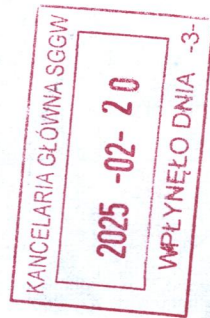
W związku z tym przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Justyny Karabowicz do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Dodatkowo z uwagi na wysoką wartość naukową dysertacji doktorskiej składam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria, SGGW w Warszawie o wyróżnienie jej Autorki stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Krzysztof Tomczuk

prof. dr hab. n. wet.
Krzysztof Tomczuk

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
KATEDRA PARAZYTOLOGII I CHOROÓB RYB
Zakład Parazytologii i Chorób inwazyjnych
20-033 Lublin, ul. Akademicka 12
tel. 81 445-69-27



R

(00)659007734151097642



(00)659007734151097642

2024



Sekretariat Instytutu Medycyny Weterynaryjnej

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

ul. Nowoursynowska 159, bud. 24, pok. 102,

02-776 Warszawa