

Łódź, 12.05.2025 r.

dr hab. Justyna Gatkowska, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Molekularnej
Uniwersytet Łódźski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Mateusza Pękacza pt. „Badanie molekularnych interakcji antygeny Dr20/22 *Dirofilaria repens* w układzie pasożyt – żywiciel oraz wytypowanie nowego narzędzia diagnostycznego dirofilariozy skórnej”

Dirofilarioza jest parazytozą, o dużym znaczeniu weterynaryjnym, notowaną głównie u psów, ale występującą także u innych zwierząt mięsożernych. Co więcej, człowiek może stać się przypadkowym żywicielem pasożyta i zarażenia notowane są także w Polsce. Za najistotniejsze, z weterynaryjnego i medycznego punktu widzenia, uznawane są dwa gatunki nicienia: *Dirofilaria repens* i *D. immitis*, z których pierwszy zwykle wywołuje postać skórną, a drugi sercowo-płucną dirofilariozy. Formy inwazyjne pasożytów przenoszone są przez komary, m.in. z rodzajów *Aedes*, *Culex* i *Anopheles*, które pełnią funkcję wektorów. Choć wykrywane są pojedyncze przypadki dirofilariozy sercowo-płucnej, to na razie inwazje *D. repens* stanowią zasadniczą większość notowanych przypadków dirofilariozy w Polsce, jednak zasięg występowania obu gatunków sukcesywnie się zwiększa, co przypisuje się zarówno zmianom klimatycznym jak i działalności człowieka. Niestety, dostępne obecnie metody diagnostyczne są niezadowalające, szczególnie w przypadku zarażenia *D. repens*. Biorąc zatem pod uwagę możliwość transmisji pasożyta od zwierząt towarzyszących człowiekowi, które stanowią rezerwuary nicienia, na innych żywicieli m.in. ludzi oraz brak swoistej immunoprofilaktyki parazytozy badania, których celem jest opracowanie nowych lub ulepszenie dostępnych narzędzi diagnostycznych, mają wysoką wartość, zarówno naukową jak i praktyczną.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr. inż. Mateusza Pękacza wpisuje się właśnie w ten niezwykle ważny i aktualny nurt badań. Praca została wykonana w Instytucie

Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod kierunkiem Ks. dr. hab. Marcina Wiśniewskiego, prof. SGGW oraz Dr hab. inż. Anny Zawistowskiej-Deniziak.

W skład recenzowanej rozprawy doktorskiej wchodzi trzy artykuły opublikowane w renomowanych czasopismach oraz nieopublikowane dane eksperymentalne. Dysertacja została podzielona na rozdziały, których układ jest typowy dla prac doświadczalnych o charakterze hybrydowym.

Rozprawę otwierają zwięzłe i treściwe streszczenia w języku polskim i angielskim, po których umieszczono obszerny i przemyślany wstęp. W rozdziale tym przedstawiono m.in. cykl rozwojowy nicieni z rodzaju *Dirofilaria*, przebieg i objawy inwazji u różnych żywicieli, w tym u ludzi, opisano także rozprzestrzenianie się najistotniejszych pod względem weterynaryjnym gatunków nicienia, ze zwróceniem uwagi na niebagatelny wpływ konfliktu zbrojnego w Ukrainie. Ponadto omówiono stosowane obecnie metody diagnostyczne i podkreślono ich niedostatki, szczególnie w kontekście stale wzrastającej częstości inwazji *D. repens*. Ta część wstępu doskonale podkreśla zasadność podjętych badań i stanowi logiczne przejście do prezentowanych w dalszej części rozprawy wyników, ujętych w publikacjach stanowiących podstawę niniejszej rozprawy. Następnie scharakteryzowano podstawowe mechanizmy odpornościowe w przebiegu dirofilariozy i zwrócono uwagę na potencjał immunomodulujący pasożytniczych robaków, co z kolei bezpośrednio wiąże się z częścią pracy obejmującą nieopublikowane dane eksperymentalne. Szczególnie dużo miejsca poświęcono zagadnieniom związanych z aspektem immunologicznym parazytozy, co w moim odczuciu jest słusznym wyborem, ponieważ opis teoretyczny związany z diagnostyką inwazji został już umieszczony w opublikowanych artykułach eksperymentalnych.

Cele pracy sformułowano w sposób bardzo zwarty i rzeczowy, w postaci czterech głównych punktów podsumowujących opisane w dalszej części rozprawy doświadczenia.

W dalszej kolejności pokrótce przedstawiono najważniejsze założenia ujętych w rozprawie artykułów, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR, a ich łączny IF = 9,9. Pan mgr inż. Mateusz Pękacz jest nie tylko pierwszym autorem prac, ale ma także

wiodący udział w planowaniu i wykonaniu opisanych w nich doświadczeń oraz w analizie otrzymanych wyników i przygotowaniu manuskryptów. Wszystkie trzy prace łącznie prezentują spójny

i logiczny ciąg badań związanych z opracowaniem alternatywnej metody diagnostyki zarażenia *D. repens*. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów otrzymano białko rekombinowane pasożyta Dr20/22, które choć nie sprawdziło się jako potencjalny antygen do diagnostyki serologicznej inwazji, to zostało wykorzystane w dalszych badaniach ujętych w pracy jako wyniki nieopublikowane. Wykorzystano także nowoczesne narzędzie biologii molekularnej, tzw. technologię „phage display” i wytypowano kilka peptydów o potencjalnej użyteczności diagnostycznej, które były swoiście rozpoznawane przez przeciwciała klasy IgG obecne w surowicach psów zarażonych *D. repens*. Ponadto wykazano przydatność wykrywania wolnokrążącego DNA, co jest szczególnie cenne w przypadku zarażeń, którym nie towarzyszy obecność mikrofilarii w krwi. Tę część rozprawy uważam za wyjątkowo interesującą, a uzyskane wyniki za bardzo cenne i użyteczne. Jestem ciekawa czy prowadzone będą dalsze prace nad wyselekcjonowanymi peptydami w celu opracowania, a być może wprowadzenia do użytku, nowych testów do diagnostyki dirofilariozy skórnej.

W ostatniej z prac wchodzących w skład rozprawy opisano postępowanie diagnostyczne, które pozwoliło na potwierdzenie mieszanej inwazji *D. repens* i *D. immitis*. Stwierdzono, że zastosowanie kilku metod, obejmujących techniki mikroskopowe oraz badania molekularne i serologiczne, umożliwia postawienie najbardziej trafnej i rzetelnej diagnozy, co podkreśla potrzebę opracowania nowych, czułych i swoistych narzędzi do diagnostyki dirofilariozy.

Następnie w rozprawie omówiono wyniki nieopublikowane, przy czym podzielono je na dwie części, z których każda przedstawiona została w podobny sposób obejmujący krótki wstęp teoretyczny z nakreślonym celem, metody doświadczalne, wyniki oraz dyskusję. Dla każdego z podrozdziałów zatytułowanych *Materiały i metody* przyjęto opis typowy dla publikacji naukowych, w którym stosowane odczynniki i materiały laboratoryjne podane są w tekście, jako integralna część wykorzystywanej procedury eksperymentalnej, co znacznie ułatwia śledzenie sposobu przeprowadzenia doświadczeń. W części pierwszej sprawdzono wpływ otrzymanego

białka rekombinowanego Dr20/22 na ludzkie komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego, m.in. poprzez określenie wydzielania przez nie wybranych cytokin po stymulacji antygenem. W związku z tym doświadczeniem chciałam poprosić o drobne uzupełnienie. Po pierwsze, dlaczego ze wszystkich cytokin produkowanych przez komórki dendrytyczne w supernatantach wykrywano TNF- α , IL-6 i IL-10? Myślę, że bardzo interesującą, pod względem funkcji tych komórek, jest np. IL-12. Ponadto żywotność komórek ma istotny wpływ na mierzone stężenie cytokin, warto więc przed stymulacją sprawdzić potencjalną cytotoksyczność rekombinowanego białka. W eksperymencie stosowano trzy stężenia antygeny, czy zatem na podstawie tego oznaczenia wybrano dawkę białka rekombinowanego do dalszych analiz produkowanych cytokin? Z opisu procedury wynika, że z tych samych kożuszków leukocytarno-płytkowych izolowano zarówno monocyty, jak i dziewicze limfocyty T, jednak nie znalazłam w pracy informacji jak utrzymywano limfocyty T do czasu założenia mieszanej hodowli, biorąc pod uwagę czas niezbędny na uzyskanie komórek dendrytycznych i ich stymulację. Proszę także o doprecyzowanie na jakiej podstawie określano „poziom markerów” przy analizie cytometrycznej? Czy kierowano się intensywnością fluorescencji? Zabrakło mi również przedstawienia schematu przeprowadzonej analizy uzyskanych danych cytometrycznych.

Drugą część nieopublikowanych wyników poświęcono zastosowaniu metody PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania i różnicowania inwazji *D. repens*, *D. immitis* i *Acanthocheilonema reconditum* oraz określeniu częstości występowania pasożytów u bezdomnych psów i kotów w wybranych rejonach Ukrainy. Należy zaznaczyć, że tego typu obserwacje mają fundamentalne znaczenie dla monitorowania tempa rozprzestrzeniania się inwazji, co z kolei umożliwia ocenę realnego zagrożenia, jakie mogą stanowić.

Uzyskane wyniki każdej z części podsumowano w wielowątkowej dyskusji, w której zostały one skonfrontowane z danymi literaturowymi. Na podstawie uzyskanych i przedyskutowanych wyników zostały wyciągnięte poprawne, rzeczowe i obiektywne wnioski końcowe. W pracy wykorzystano 140 dobrze dobranych pozycji literatury oraz źródła internetowe, przy czym dwa z nich wymieniono dwukrotnie w spisie publikacji.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na stronę edytorską przedłożonej rozprawy, w której napotkałam na błędy gramatyczne oraz niefortunne sformułowania. Moje wskazówki dotyczące zastosowanej terminologii obejmują 9 pozycji.

Zawarte w recenzji pytania i komentarze nie wpływają na moją wysoką ocenę strony naukowej dysertacji, która w mojej opinii jest wyróżniająca. Zaproponowane i przeprowadzone doświadczenia stanowią oryginalne rozwiązanie postawionego celu badawczego i odzwierciedlają konsekwentne dążenie do jego realizacji. Szczególnie wartościowe osiągnięcia rozprawy obejmują wytypowanie peptydów o potencjalnej użyteczności diagnostycznej oraz potwierdzenie przydatności metod real time PCR oraz wykrywania wolnokrążącego DNA do udoskonalenia diagnostyki dirofilariozy. Bardzo cennym elementem pracy jest także krytyczna i dojrzała analiza uzyskanych wyników z obiektywnym wskazaniem ich ograniczeń oraz możliwości dalszego zastosowania. Na wyróżnienie zasługuje również strona graficzna rozprawy, szczególnie niezwykle staranne i estetyczne schematy, które doskonale podsumowują bardziej złożone zagadnienia lub obrazują najważniejsze etapy prowadzonych doświadczeń.

Wniosek końcowy

W mojej ocenie, praca doktorska mgr. inż. Mateusza Pękacza spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 Ustawy – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. z późn. zm. (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). Opisane badania zostały przeprowadzone w sposób przemyślany i dobrze zaplanowany, z wykorzystaniem świetnego warsztatu metodologicznego i stanowią oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego. Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Weterynarii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr. inż. Mateusza Pękacza do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysokie walory naukowe rozprawy, składam wniosek o jej wyróżnienie.



BIURO OBSŁUGI NAUKI
RPW/13634/2025
2025-05-19
RPW/13634/RW
WPŁYNEŁO DNIA



PX 016 694 030 5

[illegible]

Opłata za połączenie z infolinią zgodnie z cennikiem operatora.

PP S.A. nr 43 www.pocztex.pl 804 104 104* 43 842 0 842*