

Prof. dr hab. Łukasz Adaszek
Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr. inż. Mateusza Pękacza

„Badanie molekularnych interakcji antygeny Dr20/22 *Dirofilaria repens* w układzie pasożyt – żywiciel oraz wytypowanie nowego narzędzia diagnostycznego dirofilariozy skórnej”

Układ redakcyjny ocenianej dysertacji odpowiada wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy ona 166 stron wydruku komputerowego, w tym streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, wstęp, cele pracy, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz dwa nieopublikowane badania (ich metodykę, wyniki i dyskusję), wnioski końcowe i bibliografię. Przygotowana została w postaci cyklu 3 publikacji wieloautorskich o sumarycznym współczynniku IF=9.9 (punkty ministerialne 420) oraz opisu dwóch nieopublikowanych w żadnym czasopiśmie doświadczeń. Wszystkie artykuły wchodzących w skład pracy opublikowano w języku angielskim, w czasopismach zagranicznych. We wszystkich trzech pracach Pan Mateusz Pękacz jest pierwszym autorem.

Mgr. inż. Mateusz Pękacz w pracy nad doktoratem poruszył istotny problem zarówno z punktu widzenia medycyny weterynaryjnej, jak i medycyny człowieka, jakim jest dirofilarioza. Jest to choroba pasożytnicza uważana za jedną z najszybciej rozprzestrzeniających się chorób wektorowych w Europie, a w zależności od regionu jej prevalencja może wynosić od kilku do nawet kilkudziesięciu procent w skali kraju.

Badania przeprowadzone przez Doktoranta mają charakter aplikacyjny. Pan Mateusz Pękacz postawił przed sobą problem badawczy dotyczący opracowania czulej metody diagnostyki dirofilariozy skórnej oraz metody umożliwiającej różnicowanie zarażeń

wywołanych przez *Dirofilaria repens* i *D. immitis*. Inwazje na tle obu pasożytów stanowią narastający problem w naszym kraju o czym świadczą wyniki monitoringu prowadzonego w różnych województwach Polski, w kierunku dirofilariozy, którego wyniki wykazały, że średnio 16% psów jest zarażonych nicieniami *D. repens*. Prewalencja zarażeń *D. immitis* u rodzimych psów jest znacznie niższa, niemniej zwiększająca się liczba klinicznych przypadków robaczycy sercowej oraz napływ zarażonych psów na obszary Polski z Ukrainy, nakazuje prowadzić stały monitoring tej choroby i uwzględnić ją w diagnostyce różnicowej chorób płuc i serca.

Jest to wystarczający i uzasadniony powód podjęcia przez Doktoranta badań prezentowanych w pracy. Decyzję o ich realizacji podjął z nadzieją że ich wyniki przyczynią się do opracowania nowych i skutecznych metod diagnostyki zwłaszcza inwazji *D. repens*, pozwalających na wczesne rozpoznanie zarażenia, co z kolei umożliwia wdrożenie odpowiedniego nacełowanego na eliminację pasożytów leczenia.

Pracę rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści, a następnie wstęp, w którym w sposób jasny przedstawiono charakterystykę pasożytów *D. immitis* i *D. repens*, ich cykle rozwojowe, sytuacje epizootyczną dirofilariozy skórnej i sercowej na świecie i w Europie (w tym w Polsce), a także zjawiska immunologiczne jakie zachodzą w organizmie zarażonego żywiciela, wynikające z interakcji pasożyt – gospodarz, które pozwalają nicieniom uniknąć wczesnej eliminacji z zarażonego organizmu.

Ta część pracy wskazuje na dobrą znajomość przez mgr. inż. Mateusza Pękacza badanej tematyki. Całość wstępu jest tak napisana, że uzasadnia celowość prowadzenia zaproponowanych przez Doktoranta badań i pozwala na sformułowanie ich ostatecznego celu, który logicznie wypływa z przedstawionego we wstępie opisu.

Zakładanymi celami podjętych przez badań były: molekularna charakterystyka Dr20/22 oraz próba wykorzystania go jako markera diagnostycznego dirofilariozy skórnej; wytypowanie alternatywnego markera diagnostycznego dirofilariozy skórnej przy użyciu technologii phage display; walidacja metody diagnostycznej umożliwiającej molekularne różnicowanie inwazji *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* i *Acanthocheilonema reconditum* oraz określenie prewalencji wymienionych w wybranych regionach Ukrainy; potwierdzenie obecności rodzimych inwazji *D. immitis* oraz dyskusja na temat skuteczności stosowanych metod diagnostycznych oraz kierunku rozwoju dirofilariozy sercowo-płucnej w Polsce.

Wyniki zostały przedstawione w trzech publikacjach oraz w postaci opisu dwóch eksperymentów

W artykule pierwszym: Pękacz M., Basalaj K., Młocicki D., Kamaszewski M., Carretón E., Morchón R., Wiśniewski M., Zawistowska-Deniziak, A. (2024). *Molecular insights and antibody response to Dr20/22 in dogs naturally infected with Dirofilaria repens. Scientific reports, 14(1), 12979*, Doktorant przeprowadził molekularną charakterystykę antygeny Dr20/22 *D. repens* oraz oszacował jego potencjał w diagnostyce dirofilariozy skórnej. W tym celu sklonował cDNA kodującego Dr20/22, będącego homologiem białek z rodziny ALT, charakterystycznego dla L3 filarii. Analiza ekspresji genu wykonana przy użyciu Real-Time PCR wykazała 3-krotnie wyższą ekspresję w dorosłym stadium rozwojowym pasożytów niż w mikrofilariach, co wskazuje iż jest on specyficzny dla inwazyjnych larw *D. repens*. Następnie Doktorant wykorzystał sklonowane cDNA dr20/22 do otrzymania rekombinowanego antygeny w drożdżowym systemie ekspresji *Pichia*. Początkowo dzięki potwierdzeniu przy użyciu techniki Western Blot, obecności IgG specyficznych dla rDr20/22 w surowicach psów zarażonych *D. repens*, antygen został zaproponowany jako wczesny marker dirofilariozy skórnej. Potencjał diagnostyczny antygeny został także określony przy użyciu techniki ELISA. Niemniej jednak dalsze badania Pana Mateusza Pękacza wykazały, że przeciwciała anti-Dr20/22 obecne są zarówno w surowicach psów zarażonych, jak i zdrowych, a ponadto w testach serologicznych może on indukować reakcje krzyżowe z surowicami psów zarażonych *D. immitis*. W związku z tym ostatecznie wykluczono przydatność tego antygeny w diagnostyce inwazji *D. repens*. Należy zwrócić uwagę na bardzo dobre metodyczne przygotowanie Doktoranta, które pozwoliło Mu na przeprowadzanie niełatwych badań. Uzyskane wyniki zinterpretował On właściwie i bardzo umiejętnie skonfrontował z dotychczasową literaturą, co świadczy o dojrzałości w prowadzeniu badań.

Kolejny manuskrypt: „Pękacz M., Basalaj K., Kalinowska A., Klockiewicz M., Stopka D., Bąska P., Długosz E., Karabowicz J., Młocicki, D., Wiśniewski M., Zawistowska-Deniziak A.(2022). *Selection of new diagnostic markers for Dirofilaria repens infections with the use of phage display technology. Scientific reports, 12(1), 2288.*„ stanowi kontynuację badań podjętych w pierwszym artykule. Doktorant zaprezentował w nim wyniki badań nad pozyskaniem alternatywnego markera diagnostycznego dirofilariozy skórnej z wykorzystaniem technologii „phage display”. Jestem pod wrażeniem warsztatu metodycznego Doktoranta. Zaprezentowane w pracy metody badawcze są nowatorskie i dość skomplikowane – wymagają znacznej wiedzy i umiejętności, co w przypadku młodych naukowców nie jest oczywiste. Manuskrypt jest opracowaniem zbiorowym i zdaję sobie sprawę, że nie każdy etap badań Pan Mateusz Pękacz musiał realizować osobiście - nie umniejsza to jednak jego wiodącej roli w

doświadczeniu. Przeszukanie biblioteki bakteriofagów prezentujących na powierzchni kapsydu 12-merowe peptydy umożliwiło Mu wytypowanie fagów prezentujących na swojej powierzchni peptydy, przeciwko którym poziom specyficznych IgG w surowicach psów zarażonych *D. repens* był wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej. Peptyd LH10 został wytypowany przez Doktoranta jako nowy marker dirofilariozy skórnej, który być może w przyszłości zostanie wykorzystany do szerokiej diagnostyki choroby.

Ostatni z artykułów wchodzący w cykl składający się na rozprawę doktorską: Pękacz M., Basalaj K., Miterpáková M., Rusiecki Z., Stopka D., Graczyk D., Zawistowska-Deniziak, A. (2024). *An unexpected case of a dog from Poland co-infected with Dirofilaria repens and Dirofilaria immitis*. *BMC veterinary research*, 20(1), 66, przedstawia opis klinicznego przypadku mieszanej inwazji *D. repens* i *D. immitis* u psa, który nigdy nie podróżował poza granice Polski. Praca z jednej strony wskazuje na wzrastające zagrożenie dirofilariozą płucno-sercową oraz na to, że chorobę należy rozważyć w diagnostyce różnicowej u rodzimych psów z objawami duszności. Z drugiej strony Doktorant wykazał, że „proste metody badawcze” takie jak test Knott’a, czy szybkie testy serologiczne wykrywające antygeny *D. immitis* nie w każdym przypadku zarażenia są na tyle czułe by je właściwie zdiagnozować. Z tego też względu należy prowadzić szeroką edukację zarówno właścicieli psów, jak i lekarzy weterynarii odnośnie niebezpieczeństwa wystąpienia inwazji *D. immitis* w populacji tych zwierząt w Polsce (a temu celowi niewątpliwie sprzyja prezentacja takich przypadków jak przedstawiony w ocenianym artykule), a do ich diagnostyki wykorzystywać czułe badania jakim jest PCR w czasie rzeczywistym.

W kolejnej części pracy doktorskiej Pan Mateusz Pękacz prezentuje nieopublikowane wyniki przygotowane w postaci dwóch draftów manuskryptów.

W pierwszym, zatytułowanym „Badanie właściwości immunomodulacyjnych antygeny Dr20/22 *D. repens* na modelu komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego wyizolowanych od człowieka”, Doktorant określił wpływ rekombinowanego Dr20/22 na dojrzewanie oraz funkcjonalność komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego. Przeprowadzone badania wykazały, że antygen rDr20/22 *Dirofilaria repens* moduluje proces dojrzewania komórek dendrytycznych, prowadząc do powstania immunofenotypu charakteryzującego się współwystępowaniem cech właściwych zarówno niedojrzałym, jak i dojrzałym DCs. Fenotyp komórek można było określić więc jako „częściowo dojrzały”. Doktorant zasugerował że antygen rDr20/22 może odgrywać specyficzną rolę w strategii przetrwania pasożyta ułatwiając mu migrację między tkankami żywiciela oraz tworząc korzystne dla jego przetrwania mikrośrodowisko. Te badania pozwalają na lepsze poznanie

patogenezy dirofilariozy skórnej, co w przyszłości może mieć istotne znaczenie dla opracowania nowych form terapii tej choroby.

Druga część nieopublikowanych badań została opatrzona tytułem "Wykorzystanie metody Real-Time PCR w wykrywaniu oraz różnicowaniu inwazji *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* i *Acanthocheilonema reconditum* oraz określenie prewalencji wśród populacji bezdomnych psów i kotów w wybranych regionach Ukrainy. Doktorant postawił sobie za cel walidację metody molekularnej Real-Time PCR w kontekście diagnozowania i różnicowania inwazji *D. repens*, *D. immitis* i *A. reconditum* oraz jej zastosowanie w prowadzeniu nadzoru epidemiologicznego dirofilariozy wśród populacji bezdomnych psów i kotów w Ukrainie. Wartym zaznaczenia jest, że badania te prowadzone były pod egidą Europejskiej Rady Konsultacyjnej ds. Parazytów Zwierząt Towarzyszących (ESCCAP).

Uzyskane wyniki potwierdziły endemiczny charakter inwazji *D. repens* i *D. immitis* w Ukrainie oraz umożliwiły wykrycie pierwszych przypadków psów zarażonych *A. reconditum*. Ogólna prewalencja filarioz wśród psów z pięciu objętych badaniem regionów wynosiła 28,33%. Wśród 224 badanych próbek pochodzących od kotów, w 8 wykryto DNA *D. repens* lub *D. immitis*, co odpowiada ogólnej prewalencji wynoszącej 3,57%. Wśród zarażonych kotów 75% przypadków stanowiły inwazje *D. repens*, a 25% *D. immitis*.

Wyniki te pozwalają zaktualizować sytuację epizootyczną filarioz u psów i kotów na Ukrainie i są potwierdzeniem tego, że wdrożenie skutecznych strategii kontroli wektorów i monitorowania zdrowia zwierząt towarzyszących jest niezbędne do ograniczenia ryzyka transmisji patogenów na ludzi i inne zwierzęta.

Choć ostatnie z zaprezentowanych badań wnoszą nowe dane na temat rozpoznawania dirofilarioz i sytuacji epizootycznej tych inwazji na terenie Ukrainy, w moim przekonaniu nie należało ich ujmować w doktoracie, gdyż nie mieszczą się one w tytule pracy. Poza tym doświadczenia przedstawione w trzech artykułach i pierwszym drafcie opisano i przedyskutowano tak perfekcyjnie pod każdym kątem, zarówno problemu badawczego, metodyki, i interpretacji wyników, że w zupełności są one wystarczające by tworzyć prace doktorską

Wyniki przedstawione przez Doktoranta pozwoliły Mu na wyciągnięcie aż 10 wniosków, co w moim odczuciu jest zbyt dużo. Wniosek „Zastosowanie Real-Time PCR i gatunkowo specyficznych oligonukleotydów umożliwia rozróżnienie między inwazjami *D. repens*, *D. immitis* oraz *A. reconditum*” to wiedza powszechnie znana i powinien być usunięty z listy. Podobnie wnioski: „Stosowanie kompleksowego podejścia diagnostycznego, obejmującego różnorodne metody, zapewnia skuteczne wykrywanie oraz prawidłową

identyfikację inwazji *Dirofilaria* spp.” oraz „W Polsce występują rodzime inwazje mieszane *D. repens* i *D. immitis*”.

Ostatni z wniosków brzmi „Inwazje *D. repens*, *D. immitis* oraz *A. reconditum* są endemiczne wśród populacji bezdomnych psów i kotów w Ukrainie”. Tymczasem Doktorant nie wykazał obecności *A. reconditum* u kotów, a jedynie u psów. Należało być w tym przypadku bardziej precyzyjnym.

Nie sposób odmówić Doktorantowi, iż przeprowadzone przez Niego badania, których wyniki zaprezentowano w cyklu publikacji i dwóch nieopublikowanych manuskryptach składających się na pracę doktorską są nowatorskie i wnoszą wiele nowych informacji na temat epidemiologii i możliwości diagnostyki filarioz u zwierząt i ludzi. Dzięki przeprowadzonym niełatwym doświadczeniom zidentyfikował On potencjalne markery pasożytów oraz przestudiował wady i zalety różnych metod diagnostycznych wskazując, najbardziej wiarygodną w rozpoznawaniu inwazji *Dirofilaria*. Potwierdził, że medycyna weterynaryjna jest dynamiczną dziedziną nauki, stale ewoluująca i wymagającą stałej rewizji pewnych ustalonych standardów diagnostycznych. Niewątpliwie dzięki badaniom Pana Mateusza Pękacza diagnostyka parazytologiczna dirofilarioz będzie usprawniona, co z kolei umożliwi wdrożenie wczesnej i skutecznej terapii osobników z inwazjami na tle tych pasożytów.

Reasumując stwierdzam, że przedstawione w pracy zagadnienia stanowią ważne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy z zakresu problematyki dirofilariozy u ludzi i zwierząt. Prezentowane przez Doktoranta badania zawierają elementy nowatorskie, zostały wykonane metodycznie poprawnie, a ich wyniki mają duże znaczenie poznawcze.

Przedstawione w recenzji uwagi nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy. Doktorant, co należy podkreślić włożył wiele pracy w wykonanie badań. Wyniki opublikowano w czasopismach z listy filadelfijskiej o zasięgu światowym co potwierdza, iż Doktorant jest dojrzałym naukowcem, który potrafi umiejętnie zaplanować i przeprowadzić niełatwe badania i właściwie zinterpretować ich wyniki. Nie mam wątpliwości., że nieopublikowane manuskrypty niewątpliwie wkrótce ukażą się drukiem.

W konkluzji stwierdzam, że praca doktorska pt.: ” Badanie molekularnych interakcji antygeny Dr20/22 *Dirofilaria repens* w układzie pasożyt – żywiciel oraz wytypowanie nowego narzędzia diagnostycznego dirofilariozy skórnej” odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynarii SGGW w

Warszawie wniosek o dopuszczenie Pana mgr. inż. Mateusza Pękacza do dalszych etapów realizacji doktoratu i jednocześnie sugeruję wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą.

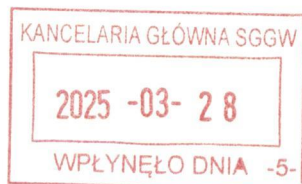
Lublin, 22 marca 2025

Prof. dr hab. Łukasz Adaszek



Prof. dr hab. Łukasz Adaszek
Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie

Lublin, 22 marca 2025



SZ. P.

Prof. dr hab. Tomasz Szadkowski

Przewodniczący Rady Dyscypliny Weterynaria

SGGW w Warszawie

Szanowny Panie Profesorze

W załączeniu przesyłam dwa egzemplarze recenzji rozprawy doktorskiej mgr. inż. Mateusza Pekacza: „Badanie molekularnych interakcji antygenu Dr20/22 *Dirofilaria repens* w układzie pasożyt – żywiciel oraz wytypowanie nowego narzędzia diagnostycznego dirofilariozy skórnej”

Z wyrazami szacunku

Prof. dr hab. Łukasz Adaszek,