Dr hab. n. o zdr. Angelina Wójcik-Fatla, prof. IMW
Zakład Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii
Instytut Medycyny Wsi im. W. Chodźki
ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin

Lublin, 03.09.2025 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Szczotko pt.
„Obecność patogenów a ekspresja wybranych genów odporności wrodzonej u kleszczy".

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Szczotko została wykonana w Katedrze Biochemii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem Pani Promotor dr hab. Małgorzaty Dmitryjuk, prof. UWM. Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Szczotko została skierowana do recenzji przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Pani mgr inż. Magdalena Szczotko ukończyła studia inżynierskie i magisterskie na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olszynie broniąc prac, których tematyka była związana z molekularnym oznaczaniem patogenów w kleszczach. W momencie rozpoczęcia prac nad rozprawą doktorską Doktorantka posiadała już doświadczenie w prowadzeniu badań nad kleszczami oraz znajomość metod biologii molekularnej. Pani mgr inż. Magdalena Szczotko jest współautorem, 9 oryginalnych artykułów naukowych i 2 rozdziałów w monografiach o sumarycznym wskaźniku IF wynoszącym 32,712 i łącznej liczbie 910 punktów MNiSW. Dorobek naukowy Kandydatki uzupełniają referaty i komunikaty konferencyjne. Ważnym elementem kariery naukowej były odbyte staże, głównie w ośrodkach zagranicznych oraz kierownictwo własnego grantu naukowego zdobytego w ramach konkursu PRELUDIUM finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki i grantu Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. W tym miejscu pragnę wyrazić duże uznanie dla Promotora rozprawy – Pani prof. Małgorzaty Dmitryjuk za znakomitą opiekę naukową, dzięki której Doktorantka posiada spójny dorobek naukowy, doświadczenie w prowadzeniu badań laboratoryjnych i możliwość kontynuowania pracy badawczej, m.in. w ramach zdobytego grantu PRELUDIUM.

W skład zaprezentowanej rozprawy doktorskiej wchodzą dwie oryginalne prace naukowe opublikowane w latach 2024-2025, o sumarycznym wskaźniku IF wynoszącym 6,5 i łącznej liczbie punktów MNiSW wynoszącej 280.

W obu artykułach Doktorantka jest autorem do korespondencji. Obie publikacje były wykonane pod ścisłą opieką naukową Pani prof. Małgorzaty Dmitryjuk, w tym opracowaniu koncepcji i metodologii badań. Doktorantka brała udział w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, wykonała część eksperymentalną, opracowała wyniki i brała udział w opracowaniu manuskryptów. Udział Pani mgr inż. Magdaleny Szczotko w powstaniu artykułów był wiodący, co pozwala zaliczyć przedstawiony dorobek jako osiągnięcie Kandydatki. W cyklu prac składających się na rozprawę doktorską zabrakło zwyczajowo zamieszczanego artykułu o charakterze przeglądowym. W tym jednak wypadku rolę tę z powodzeniem przejmuje sam Autoreferat, w którym Doktorantka zamieściła obszerną część wprowadzającą w temat rozprawy.

Przedstawiony w dysertacji cykl prac dotyczył badań nad ekspresją wybranych genów odporności wrodzonej u kleszczy z gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* w obecności wybranych patogenów odkleszczowych, obejmujących gatunki/rodzaje: *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. oraz *Neoehrlichia mikurensis*.

Na 17-stu stronach *Wstępu* scharakteryzowano dwa gatunki kleszczy objęte badaniami, opisano mechanizmy transmisji patogenów odkleszczowych oraz układ immunologiczny kleszczy. W części dotyczącej transmisji patogenów zabrakło mi odniesienia do konkretnych patogenów wybranych przez Doktorantkę do badań, tj. *Borrelia*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia*, *Rickettsia* i *Neoehrlichia mikurensis*. Bardzo dobrze został opisany szlak sygnałowy JAK/STAT oraz funkcjonowanie układu immunologicznego kleszcza w kontekście transmisji krętków *Borrelia*. Całość kończy podrozdział dotyczący defensyn kleszczowych. W podrozdziale dotyczącym szlaku JAK/STAT Doktorantka zawarła informację, że zahamowanie jego aktywności doprowadziło do zwiększenia poziomu zakażenia *A. phagocytophilum* u kleszczy *Ixodes scapularis*. Czy Doktorantce jest wiadomo jak tego typu zaburzenia wpływają w efekcie na sam organizm kleszcza? Podsumowując tę część Autoreferatu stwierdzam, że została przygotowana w sposób bardzo rzetelny. Całość bardzo dobrze wprowadza w tematykę obu publikacji.

Doktorantka sformułowała dwa cele szczegółowe odpowiadające każdej z prac. Pierwszym celem było określenie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji wybranych genów odporności wrodzonej kleszczy a obecnością patogenów chorobotwórczych u *I. ricinus* i *D. reticulatus*. Drugi cel dotyczył określenia zmian w ekspresji genów szlaku JAK/STAT w tkankach kleszczy z gatunku *I. ricinus* w obecności krętków *Borrelia burgdorferi*. Oba cele zostały opatrzone krótkim wyjaśnieniem, a na ich podstawie Kandydatka postawiła dwie hipotezy badawcze. Odnośnie hipotezy nr 2, nie do końca jasne jest stwierdzenie: „Poziom ekspresji genów AMPs i JAK/STAT wzrasta i różni się…". Czy Doktorantka miała na myśli, że niezależnie od wykazania różnic w badanych tkankach poziom ekspresji genów będzie zawsze wzrastał?

Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin
tel: 81 71 84 400, fax: 81 74 78 646, e-mail: imw@imw.lublin.pl
www.imw.lublin.pl
KRS: 0000126672, NIP: 712-010-37-81

W Zadaniu 1 materiał do badań stanowiło 428 kleszczy zebranych z wegetacji oraz osobniki pasożytujące na psach. W przypadku kleszczy z wegetacji do ich identyfikacji zastosowano klucz taksonomiczny (Nowak-Chmura, 2013). W publikacji podano, że wśród kleszczy zebranych z psów znalazły się samice obu gatunków kleszczy w pełni napite. Czy do prawidłowego rozpoznania gatunku napitych samic zastosowano metody molekularne czy były oznaczane na podstawie cech morfologicznych (np. wielkość, ciężar właściwy)? W przypadku izolacji kwasów nukleinowych z osobników napitych – czy wystąpiły trudności przy przecinaniu osobników z użyciem skalpela? Opis reakcji PCR (i jej odmian) został prawidłowo przedstawiony z uwzględnieniem odniesienia do Tabeli zawartej w publikacji, gdzie podano zastosowane markery genetyczne i sekwencje primerów dla każdego z badanych patogenów. Podobnie oceniam opis wykonania badań ekspresji genów kodujących trzy defensyny. W Zadaniu 2 materiał do badań stanowiło 50 kleszczy, z których wyodrębniono gruczoły ślinowe, jelito środkowe, a trzecią próbę stanowiły resztki tkanek po wykonanej sekcji. Do izolacji RNA wykorzystano ten sam zestaw co w przypadku Zadania 1 dla kleszczy nienapitych. Czy użyty zestaw był przeznaczony do jednoczesnej izolacji RNA i DNA z badanej próbki? Dla oznaczanie *B. burgdorferi* s.l. zastosowano gen 23S rRNA, który jak podała Doktorantka, jest wysoce konserwatywny wśród gatunków *Borrelia*. Czy amplifikacja wybranego fragmentu genu zapewniała wykrywanie gatunków *Borrelia* wchodzących w skład kompleksu sensu lato? Czy zastosowana kontrola pozytywna była pozyskana z własnej hodowli krętków? W przypadku opisu badań nad ekspresją genów szlaku JAK/STAT oraz AMPs, bardzo wysoko oceniam własne zaprojektowanie starterów oraz wykonaną optymalizację z ich użyciem. Stanowi to niewątpliwie dużą wartość pracy oraz dowód na samodzielność naukową Kandydatki. Podsumowując część metodyczną stwierdzam, że została przygotowana prawidłowo, ze szczegółowo podanym opisem zastosowanych odczynników, użytych w reakcjach stężeń i wykorzystanej aparatury badawczej.

W części wynikowej dotyczącej Zadania 1 zabrakło mi w Autoreferacie tabelki lub krótkiego opisu odnośnie prewalencji patogenów w zebranych kleszczach. Jak pisze sama Kandydatka: „…badania nad częstością występowania patogenów odkleszczowych stanowią jedynie tło Zadania 1…', stanowią one jednak integralną część rozprawy na co wskazuje sam tytuł. Doktorantka udowodniła, że ekspresja genu defensyny *D. reticulatus* wzrosła kilkukrotnie w porównaniu do grupy kontrolnej w obecności krętków *Borrelia*. Nie potwierdzono takiej zależności dla defensyn kleszczy *I. ricinus*. W publikacji zawarto natomiast ciekawy wynik odnośnie prewalencji bakterii z rodzaju *Borrelia*. Stwierdzono, że prewalencja patogenu była wyższa u kleszczy z gatunku *D. reticulatus* niż u kleszczy *I. ricinus*, i to zarówno biorąc pod uwagę osobniki napite jak i nienapite. Czy Doktorantka może odnieść się do uzyskanego wyniku?

Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin
tel: 81 71 84 400, fax: 81 74 78 646, e-mail: imw@imw.lublin.pl
www.imw.lublin.pl
KRS: 0000126672, NIP: 712-010-37-81

Odnośnie samej ekspresji genów defensyn, Kandydatka wyciągnęła prawidłowe wnioski. Kleszcze z gatunku *D. reticulatus* nie są kompetentnym wektorem krętków *Borrelia* i dużo rzadziej stanowią ich rezerwuar w porównaniu do kleszczy *I. ricinus*. Zatem różnice w ekspresji genów defensyn u różnych gatunków kleszczy mogą być związane z różnicami w ich zdolnościach wektorowych. Podobna zależność została wykazana w przypadku zakażeń kleszczy *D. reticulatus* patogenami: *A. phagocytophilum* i *N. mikurensis*. Badania nad ekspresją objęły również poszukiwania zależności w odniesieniu do fazy żerowania kleszcza, stadium rozwojowego i współwystępowania patogenów. Wyniki Zadania 1 potwierdziły, że na ekspresję genów defensyn u kleszczy zebranych w środowisku naturalnym wpływa obecność różnych patogenów oraz stopień napicia się kleszczy krwią żywiciela. Wykazano również, że współwystępowanie patogenów nasila ekspresję genów defensyn, potwierdzając ich udział w odpowiedzi immunologicznej kleszczy. Odnośnie hipotezy zawartej w Autoreferacie: „Poziom ekspresji genów defensyn wzrasta wraz z obecnością patogennych bakterii", miałabym tylko drobną uwagę. W podrozdziale *Obecność patogenów* sama Doktorantka pisze: „W przypadku *def1* i *def2* w obecności krętków ekspresja nie wykazywała istotnego wzrostu". W tym miejscu doprecyzowałabym jedynie, o jakim wzroście ekspresji genów defensyn jest mowa w przypadku kleszczy *I. ricinus*.

W części wynikowej Zadania 2 badaniom poddano łącznie 24 próbki pozyskane z 8 osobników dodatnich w kierunku bakterii *Borrelia burgdorferi* s.l. Jak wskazuje Autorka, kleszcze były zbierane w jednej lokalizacji, aby ograniczyć wpływ czynników środowiskowych na ekspresję badanych genów. Czy Doktorantka mogłaby wskazać przykłady takich czynników? W badaniach potwierdzono wzrost ekspresji genów STAM i SOCS, a także obniżenie ekspresji genu JAK. Natomiast nie wykryto istotnych zmian ekspresji genów STAT, PIAS, co nie do końca potwierdziło postawioną hipotezę. Uważam jednak, że w tym przypadku Doktorantka udowodniła, że nie boi się podejmowania nowych wyzwań naukowych. Otrzymane wyniki – nawet jeśli nie do końca zgodne z założeniami, skłaniają do formułowania nowych wniosków i dalszego poszukiwania odpowiedzi. W tym kontekście Doktorantka poradziła sobie bardzo dobrze, wysuwając wniosek, że wykazana ekspresja tylko w przypadku dwóch genów może mieć związek stopniowym tłumieniem szlaku JAK/STAT w okresie poza żywicielem i ustaleniem równowagi między układem odpornościowym kleszcza a obecnością krętków *Borrelia*. W badaniu stwierdzono również wielokrotną nadekspresję defensyny 1 w jelicie środkowym. W jakim stopniu ten wynik koreluje z określonym poziomem ekspresji genu *def1* w Zadaniu 1? Podsumowując całą część wynikową stwierdzam, że Doktorantka posiada umiejętność analizy otrzymanych wyników i wyciągania wniosków. Bardzo dobrze porusza się w wybranej tematyce badawczej i potrafi weryfikować stawiane hipotezy. Wszystkie stawiane przeze mnie pytania w niniejszej recenzji mają głównie charakter poznawczy i w żadnym stopniu nie umniejszają wartości przedstawionej pracy.

Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin
tel: 81 71 84 400, fax: 81 74 78 646, e-mail: imw@imw.lublin.pl
www.imw.lublin.pl
KRS: 0000126672, NIP: 712-010-37-81

Celem nadrzędnym prowadzonych badań naukowych było głębsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej kleszczy i mechanizmów wpływających na rolę kleszczy jako wektora i rezerwuaru patogenów. W tym kontekście uważam, że Pani mgr inż. Magdalena Szczotko cel osiągnęła. Chciałabym również wyrazić swoje uznanie dla sposobu przedstawienia osiągnięcia. Autoreferat został przygotowany w sposób bardzo przejrzysty, został napisany poprawnym językiem i opatrzony kilkoma rycinami, a oprócz części merytorycznej zawiera również charakterystykę dorobku naukowego Doktorantki. Słowa uznania kieruję do Pani mgr. inż. Magdaleny Szczotko oraz Pani prof. Małgorzaty Dmitryjuk, pod której opieką naukową rozprawa doktorska powstała.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Szczotko pt.: „Obecność patogenów a ekspresja wybranych genów odporności wrodzonej u kleszczy" stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i zarówno pod względem merytorycznym jak i formalnym spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2024 poz. 1571).

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr. inż. Magdaleny Szczotko do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora *w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*.

Zwracam się również do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Szczotko, mając na uwadze wysoki poziom naukowy rozprawy, zastosowanie autorskich metod badawczych oraz dużą wartość poznawczą pracy wnoszącej istotny wkład w rozwój nauki w zakresie poszerzenie wiedzy na temat funkcjonowania mechanizmów odpowiedzi immunologicznej u kleszczy.

Kierownik
Zakładu Biologicznych Szkodliwości
Zdrowotnych i Parazytologii

Dr hab. n. o zdr. Angelina Wójcik-Fatla, prof. IMW

Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin
tel: 81 71 84 400, fax: 81 74 78 646, e-mail: imw@imw.lublin.pl
www.imw.lublin.pl
KRS: 0000126672, NIP: 712-010-37-81