INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 9 lutego 2026 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Klimczak
Kierownik Samodzielnego Laboratorium
Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Iwony Moniki Szopa w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria

Tytuł rozprawy: Opracowanie metod aktywacji i różnicowania limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej psów domowych (Canis lupus familiaris)

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Iwony Moniki Szopa została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Małgorzaty Gajewskiej, prof. SGGW, w Katedrze Nauk Fizjologicznych Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi zbiór dwóch spójnych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych, opublikowanych w międzynarodowych recenzowanych czasopismach naukowych: jeden w *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:604066; pt. „Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach" https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.604066, IF=8,786, drugi w *International Journal of Molecular Sciences*, 2025; 26(10):4946; "A New Method of Canine CD4+ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity" https://doi.org/10.3390/ijms26104946, IF=4,9. Łączny IF=13,686 i punkty MNiSW = 280 wskazują na bardzo dobry wskaźnik naukometryczny co stanowi o właściwym poziomie przeprowadzonych badań, ocenionych przez niezależnych recenzentów.

Pani mgr Iwona Monika Szopa jest pierwszym autorem obu prac i autorem korespondencyjnym jednej publikacji, co wskazuje, że Doktorantka miała istotny wkład w wykonaniu przedstawionych prac badawczych, opracowaniu wyników oraz ich przygotowaniu do publikacji.

Badania naukowe będące podstawą niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach dwóch projektów: (1) projektu realizowanego w ramach programu FIRST TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (POIR.04.04.00-00-3EE9/17-00) pt. „Modification of signaling pathways of canine Th17 lymphocytes subset to improve adoptive cellular immunotherapy for humans" („Modyfikacja ścieżek sygnałowych w limfocytach subpopulacji Th17 na modelu psa w celu poprawy adoptywnej immunoterapii komórkowej u ludzi") oraz (2) projektu Narodowego Centrum Nauki (2023/49/N/NZ5/03656) Preludium 22 pt. „Określenie roli cytokin wydzielanych przez limfocyty Th17 w rozwoju czerniaka u psów - badania in vitro".

Badania eksperymentalne nad zastosowaniem adoptywnej immunoterapii w chorobach, których przyczyną są zaburzenia mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi w układzie odpornościowym, to dynamicznie rozwijająca się dziedzina a dotychczasowe wyniki badań niosą nadzieję na ich zastosowanie w aplikacjach klinicznych, szczególnie u chorych, dla których obecnie nie ma skutecznego sposobu leczenia. Jednakże, efektywność immunoterapii zależy od biologicznych właściwości stosowanych komórek, a dobór odpowiedniej populacji komórek efektorowych dedykowanych do określonego schorzenia powinien uwzględniać spersonalizowane podejście terapeutyczne. Postęp w rozwoju badań nad potencjałem terapeutycznym aktywowanych limfocytów T niesie nadzieję na opracowanie skutecznych terapii a wykorzystanie potencjału do różnicowania poszczególnych subpopulacji limfocytów T w kierunku pożądanych komórek efektorowych może przyczynić się rozwoju strategii terapeutycznych w tym obszarze. Takiego zadania podjęła się Doktorantka w badaniach mających na celu opracowanie metod aktywacji i ekspansji limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej oraz optymalizację warunków niezbędnych do różnicowania limfocytów T pomocniczych w kierunku fenotypu Th17 w modelu badawczym psa domowego.

Ocena formalna pracy:

Tytuł rozprawy doktorskiej jest prawidłowo sformułowany i odzwierciedla treści zawarte w publikacjach i w części opisowej, stanowiących dysertację doktorską.

Rozprawę doktorską rozpoczyna informacja o projektach naukowo-badawczych, które stanowiły wsparcie finansowe przeprowadzonych badań, następnie zamieszczono spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, w których Doktorantka w sposób zwięzły i komunikatywny przybliżyła główne cele i osiągnięcia swojej pracy doktorskiej, listę publikacji, które Doktorantka przedstawiła do oceny jako osiągnięcie naukowe, oraz wykaz skrótów. Po nich umieszczono obszerny Wstęp, w którym przedstawione zostały istotne informacje będące podstawą do podjęcia badań mających na celu opracowanie metod aktywacji, ekspansji i różnicowania limfocytów T pomocniczych w kierunku fenotypu Th17, w modelu limfocytów izolowanych z krwi obwodowej psa domowego. Na bazie tych informacji sformułowane zostały Hipoteza i cele badawcze pracy doktorskiej. Następnie zamieszczono obszerną informację o zastosowanym materiale i metodach badawczych ilustrowaną odpowiednimi schematami badań. Podsumowanie najważniejszych wyników oraz obszerna Dyskusja, stanowiące kolejne rozdziały rozprawy doktorskiej, zakończone zostały Wnioskami odpowiadającymi na postawione cele szczegółowe niniejszej pracy. Część opisową kończy bogaty wykaz literatury, obejmujący 267 pozycji, uzasadniający podjęcie tematu badań. Kolejną częścią składową dysertacji doktorskiej są kopie publikacji wchodzące w skład jednotematycznego cyklu, stanowiące osiągniecie naukowe Doktorantki, po których zostały umieszczone pisemne oświadczenia współautorów prac stanowiących rozprawę doktorską. Rozprawa doktorska nie zawiera informacji o dorobku naukowym Doktorantki.

Od strony formalnej rozprawa w przedstawionej formie spełnia, w mojej ocenie, wymogi stawiane tego typu pracom, stanowiącym cykl artykułów poświęconych danej tematyce

badawczej i stanowi spójne dzieło zawierające wyniki badań eksperymentalnych Doktorantki, przedstawione w kontekście założonych celów oraz dotychczasowej wiedzy w podjętym obszarze badawczym.

Ocena merytoryczna:

Zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowią artykuły naukowe, opublikowane w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, które zostały poddane szczegółowej recenzji przez międzynarodowych ekspertów m.in. w zakresie jakości, stosowanej metodyki badań oraz interpretacji i znaczenia prezentowanych wyników. Moja ocena, jako recenzenta rozprawy, przedstawia ocenę wartości merytorycznej całego osiągnięcia naukowego.

W obszernym **Wstępie** przedstawione zostały istotne informacje dotyczące dotychczasowej wiedzy związanej z funkcjonowaniem subpopulacji limfocytów T i ich znaczenia w regulacji odpowiedzi immunologicznej zarówno w procesach związanych z utrzymaniem homeostazy immunologicznej czy aktywnością przeciwnowotworową jak i w innych sytuacjach patologicznych np. związanych z rozwojem chorób autoimmunologicznych. Istotnym zagadnieniem podjętym we Wstępie jest aktywacja limfocytów T w kontekście wykorzystania tego zjawiska w opracowaniu strategii immunoterapii zarówno w leczeniu chorób autoimmunologicznych jak i w terapiach przeciwnowotworowych. Intersującym modelem doświadczalnym w badaniach in vivo, wskazanym przez Doktorantkę, jest pies domowy, którego układ odpornościowy wykazuje znaczne podobieństwa do ludzkiego zarówno na poziomie fenotypowym jak i odpowiedzi komórkowej i humoralnej.

Hipoteza i cele badawcze jak i zakres badań zostały w rozprawie jasno sformułowane w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. Głównym celem badań było opracowanie i optymalizacja aktywacji limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej psów domowych oraz opracowanie warunków skutecznego różnicowania i hodowli limfocytów T CD4+ w kierunku fenotypu Th17 zdolnych do syntezy cytokin efektorowych.

Rozdział **Materiały i metody** zawiera istotne informacje dotyczące materiału użytego do badań i metod stosowanych do weryfikacji założeń badawczych z odniesieniem do szczegółowego opisu metod zawartego w opublikowanych artykułach. Na uwagę zasługują schematy ilustrujące kolejne etapy badań i zastosowane procedury (Ryc. 4, Ryc. 5 i Ryc. 6) ułatwiające analizę toku postępowania badawczego. W badaniach zastosowano metody adekwatne do weryfikacji założeń badawczych oraz oceny i interpretacji wyników w tym: izolację limfocytów krwi obwodowej psów domowych z wykorzystaniem standardowej metody wirowania w gradiencie stężeń (Histopaque lub Lymphoprep), aktywację limfocytów przy użyciu mikrokulek magnetycznych pokrytych przeciwciałami skierowanymi przeciwko psim antygenom CD3 i CD28 (MicroBeads, Miltenyi Biotec lub Dynabeads^{TM} M-450 Epoxy, Thermo Fisher Scientific), analizę fenotypu, syntezy cytokin efektorowych i apoptozy z użyciem cytometrii przepływowej, ekspresję markerów wczesnych etapów aktywacji na poziomie mRNA (RT-qPCR), identyfikacji białek związanych ze ścieżkami sygnałowymi

MAPK i PI3K/Akt metodą Westen Blot, ocenę metabolizmu komórkowego z wykorzystaniem testu Seahorse XF Cell mito Stress Test i inne.

W rozdziale **Wyniki** Doktorantka w sposób jasny i przystępny opisała najistotniejsze wyniki uzyskane w procedurach eksperymentalnych odnosząc się do artykułów, w których zostały opublikowane. Wyniki badań opublikowano w dwóch (2) pracach oryginalnych, w których zaadresowane zostały cele szczegółowe.
W pierwszym etapie badań Doktorantka wykonała serię doświadczeń, których celem było ustalenie optymalnego stosunku ilościowego mikrokulek magnetycznych MicroBeads pokrytych przeciwciałami przeciwko psim antygenom CD3 i CD28, które odpowiadają za aktywację komórek z zaangażowaniem receptora TCR limfocytów T oraz sygnału kostymulującego CD28. Efektywność procedury została zweryfikowana ekspresją cząsteczki CD25 (podjednostki α receptora interleukiny 2) – głównego markera aktywacji limfocytów T. Optymalizacja stosunku liczby komórek do mikrokulek MicroBeads pozwoliła ograniczyć apoptozę limfocytów oraz zapewnić ich proliferację przy zachowaniu wysokiej żywotności. Badania wykazały, że temperatura w jakiej przebiega aktywacja ma wpływ na jej skuteczność a najwyższy poziom aktywacji uzyskano w temperaturze 38,5^{o}C, co odpowiada fizjologicznej temperaturze ciała psów domowych. Aktywacja limfocytów T mikrokulkami magnetycznymi MicroBeads prowadzi do wysokiej proliferacji limfocytów T, zdolności do nabywania fenotypu komórek pamięci efektorowej (CD62L i CD44) i aktywności funkcjonalnej w formie zdolności do syntezy cytokin efektorowych (IL-2 oraz IFN-γ). Wyniki badań potwierdziły, że psie limfocyty T odpowiadają na sygnał aktywujący w sposób zbliżony do komórek ludzkich, co nadaje uzyskanym wynikom istotne znaczenie w kontekście medycyny translacyjnej.
Celem drugiego etapu badań było opracowanie metody aktywacji i ekspansji limfocytów T, wyizolowanych z krwi obwodowej psów domowych, z wykorzystaniem mikrokulek epoksydowanych (nazywanych EpoxyBeads), opłaszczonych przeciwciałami przeciwko psim cząsteczkom CD3 i CD28 oraz ustalenie warunków hodowli in vitro niezbędnych do różnicowania subpopulacji limfocytów T pomocniczych w kierunku fenotypu Th17. Doktorantka podkreśla, że jest to pierwsze badanie, w którym wykazano, że połączenie metody aktywacji psich limfocytów T CD4+, opartej na równoczesnym zaangażowaniu cząsteczki CD3 i cząsteczki kostymulującej CD28, z hodowlą w odpowiedniej pożywce różnicującej zawierającej IL-1β, IL-6, TGF-β oraz przeciwciało przeciwko IL-4, umożliwia uzyskanie wysokiego odsetka limfocytów Th17 aktywnych funkcjonalnie, wytwarzających IL-17. Ponadto, zbadano wpływ czynników modyfikujących szlak sygnałowy Wnt/β-katenina na fenotyp oraz aktywność metaboliczną limfocytów Th17. Wykazano, że indometacyna, która działa hamująco na aktywność szlaku Wnt/β-katenina, wspiera różnicowanie psich limfocytów T CD4+ w kierunku fenotypu Th17 a komórki cechuje wysoko efektywna aktywność mitochondrialna. Z kolei, zastosowanie aktywatora szlaku sygnałowego Wnt/β-katenina (TWS119), hamowało różnicowanie limfocytów Th17, co przejawiało się istotnie niższym odsetkiem komórek produkujących IL -17 i obniżeniem poziomu aktywności mitochondrialnej. Uzyskane wyniki zostały starannie udokumentowane i opublikowane w załączonych artykułach

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

w formie tabel, rycin i wykresów a ich znaczenie zostało potwierdzone stosowną analizą statystyczną.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowane zostały 4 **Wnioski** będące podsumowaniem zaplanowanych celów badawczych weryfikujących postawione hipotezy niniejszej dysertacji doktorskiej.

Z uwagi na translacyjny charakter uzyskanych wyników, w przedstawionej pracy zabrakło mi porównania komórek układu odpornościowego psa domowego i człowieka. W swojej pracy Doktorantka wskazuje, że pies domowy stanowi wartościowy model do badań w obszarze immunologii i chorób nowotworowych z uwagi na znaczne podobieństwa układu immunologicznego psów do układu odpornościowego człowieka. Zatem, w czasie obrony pracy doktorskiej proszę wskazać podobieństwa i różnice w populacji komórek układu odpornościowego psa i człowieka w zakresie ich fenotypu i aktywności funkcjonalnej komórek.

Podsumowanie. Nowatorski charakter pracy doktorskiej Pani mgr Iwony Moniki Szopa wpisuje się w ważny aspekt badań z zakresu biologicznej aktywności limfocytów T w modelu psa domowego. Opracowanie metody aktywacji i ekspansji limfocytów T lub ich subpopulacji o zdolnościach do nabywania fenotypu komórek pamięci efektorowej i aktywności funkcjonalnej w formie syntezy cytokin efektorowych (IL-17) pozwoli na wykorzystanie tej metody w badaniach nad nowymi strategiami immunoterapii co ma istotne znaczenie w kontekście medycyny translacyjnej. Wykorzystanie modelu psa domowego w badaniach przedklinicznych może znaleźć szerokie zastosowanie w opracowaniu skutecznych rozwiązań terapeutycznych, szczególnie w zakresie chorób autoimmunologicznych oraz nowotworowych, zarówno w medycynie weterynaryjnej jak i w klinice człowieka.

Z uwagi na wysoką wartość poznawczą wyników niniejszej rozprawy doktorskiej oraz wyjątkową staranność w opracowaniu wielowątkowego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej dysertacji doktorskiej stosowną nagrodą.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zmianami), stawiane rozprawom na stopień doktora, wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie mgr Iwony Moniki Szopa do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk weterynaryjnych w dyscyplinie: weterynaria.

Aleksandra Maria Klimczak

Elektronicznie podpisany przez Aleksandra Maria Klimczak
Data: 2026.02.09 12:07:20 +01'00'