

Dr hab. Urszula Kosior-Korzecka, prof. uczelni
Zakład Patofizjologii
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 5.09.2023 r.

OCENA
osiągnięcia naukowego oraz pozostałego dorobku naukowego,
dydaktycznego i organizacyjnego
dr n. wet. MAGDALENY IRENY ŻMIGRODZKIEJ
w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk weterynaryjnych, w dyscyplinie weterynaria

Recenzja została przygotowana w oparciu o decyzję Rady Doskonałości Naukowej z dnia 29 maja 2023 r. oraz uchwałę Rady Dyscypliny Weterynaria SGGW w Warszawie z dnia 21 czerwca 2023 r. o powołaniu mnie w skład komisji habilitacyjnej jako recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk weterynaryjnych, w dyscyplinie weterynaria dr Magdaleny Żmigrodzkiej.

Podstawowe informacje o Habilitantce

Dr Magdalena Żmigrodzka w 2004 r. ukończyła studia na kierunku *weterynaria* na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Od 1 kwietnia 2005 r. do 11 marca 2010 r. była uczestnikiem stacjonarnych studiów doktoranckich w ww. Jednostce. W tym czasie zrealizowała w Katedrze Nauk Klinicznych projekt badawczy pt.: „Ocena aktywacji płytek krwi psów z małopłytkowością”. Uzyskane wyniki stały się podstawą do nadania Jej w marcu 2010 r., stopnia doktora nauk weterynaryjnych. 1 marca 2014 r. Kandydatka rozpoczęła pracę w Wojskowym Instytucie Higieny i Epidemiologii im. Generała K. Kaczkowskiego w Warszawie, gdzie do 30 września 2015 r. pełniła funkcję kierownika Zwierzętarń WIHE. 1 października tego samego roku Pani Magdalena Żmigrodzka została zatrudniona w Zakładzie Patologii Zwierząt, Katedrze Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Instytucie Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, gdzie do dziś pracuje na stanowisku adiunkta.

Całkowity dorobek naukowy Habilitantki (2007-2022 r.), obejmuje 25 oryginalnych i przeglądowych prac naukowych w czasopismach z listy JCR/ MEiN o łącznej liczbie punktów MNiSW/ MEiN wynoszącej 1875 i sumarycznym IF=68,386 oraz 14 publikacji popularno-naukowych, które ukazały się w Magazynie Weterynaryjnym lub Życiu Weterynaryjnym (łącznie 27 pkt. MNiSW). Kandydatka jest także współautorką 17 komunikatów kongresowych i konferencyjnych, w tym jednego zamieszczonego w recenzowanych materiałach konferencyjnych (15 pkt. MNiSW, IF=1,41). Cztery spośród nich zostały przedstawione na konferencjach międzynarodowych. Powyższy dorobek przekłada się łącznie na 1917 pkt. MNiSW/ MNiE oraz sumaryczną wartość IF=69,796. Liczba cytowań publikacji Habilitantki wg bazy *Web of Science Core Collection* na dzień 14.02.2023 r. wynosiła 333 (bez autocytowań - 321), natomiast indeks Hirscha - 10.

Ocena osiągnięcia naukowego

Dr Magdalena Żmigrodzka, jako osiągnięcie naukowe, wymienione w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 r., poz. 574 ze zm.), wskazała cykl powiązanych tematycznie oryginalnych prac naukowych pt.: „*Wpływ in vitro mikropecherzyków błonowych z płytek krwi i linii komórkowych CLBL-1 i CLB70 na limfocyty krwi psów*”.

Cykl ten składa się z trzech publikacji:

1. **Żmigrodzka M.**, Witkowska-Piłaszewicz O., Rzepecka A., Cywińska A., Jagielski D., Winnicka A.: *Extracellular Vesicles in the Blood of Dogs with Cancer - A Preliminary Study. Animals* (Basel). 2019, 9, 575; doi: 10.3390/ani9080575; pkt. MNiSW - 100; IF₂₀₁₉=2,32
2. **Żmigrodzka M.**, Witkowska-Piłaszewicz O., Pingwara R., Winnicka A.: *Platelet Extracellular Vesicles Are Taken up by Canine T Lymphocytes but Do Not Play a Role in Their Proliferation, Differentiation and Cytokine Production In Vitro. International Journal of Molecular Sciences* 2022, 10, 5504; doi: 10.3390/ijms23105504; pkt. MEiN - 140; IF₂₀₂₁=6,208
3. **Żmigrodzka M.**, Witkowska-Piłaszewicz O., Pingwara R., Pawlak A., Winnicka A.: *Canine B Cell Lymphoma- and Leukemia-Derived Extracellular Vesicles Moderate Differentiation and Cytokine Production of T and B Cells In Vitro. International Journal of Molecular Sciences* 2022, 17, 9831; doi: 10.3390/ijms23179831; pkt. MEiN - 140; IF₂₀₂₁=6,208

Suma punktów (wg listy czasopism punktowanych MNiSW/ MEiN) za ww. prace, zgodnie z rokiem ich opublikowania, wynosi 380, łączny IF – 14,736. Artykuły ukazały się w znaczących czasopismach o zasięgu międzynarodowym (punktacja prac mieści się w zakresie 100 - 140 pkt. (śr. 126,67 pkt.). Wartości IF czasopism, w których zamieszczone są prace plasują się w zakresie 2,32– 6,208 (śr. 4,912). Są to co prawda czasopisma pejoratywnie ocenianego w ostatnim czasie wydawnictwa MDPI, jednakże, co należy w tym miejscu podkreślić, wartość merytoryczna publikacji jest niezaprzeczalnie wysoka. Udział Habilitantki w powstawaniu wszystkich ww. artykułów jest znaczący (71-77%). Obejmuje opracowanie koncepcji badań, pobranie materiału biologicznego, opracowanie i interpretację uzyskanych wyników, dobór i analizę piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu oraz dyskusję z recenzentami, a w przypadku prac nr 2 i 3, również udział w wykonaniu większości analiz i technik laboratoryjnych, w tym oznaczeń cytometrycznych i doświadczeń z wykorzystaniem hodowli mononuklearnych komórek krwi obwodowej *in vitro*. Warto zaznaczyć, że w przypadku każdej z prac Kandydatka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Nie bez znaczenia jest również fakt, że wszystkie publikacje powstały w ramach realizacji projektu badawczego „MINIATURA” przyznanego Habilitantce przez Narodowe Centrum Nauki (2017/01/X/NZ5/01481; 2018-2019 r.). Ponadto, praca nr 3 została wykonana w kooperacji z Katedrą Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu, co świadczy o umiejętności nawiązywania przez Kandydatkę efektywnej współpracy naukowej.

Celem badań, których wyniki stanowią osiągnięcie Habilitantki, była analiza roli mikropecherzyków błonowych w regulacji swoistej odpowiedzi immunologicznej u psów, w tym określenie fenotypów i ocena ilościowa poszczególnych populacji mikropecherzyków błonowych we krwi u osobników zdrowych i z chorobą nowotworową. Kolejnym zadaniem,

jakie wyznaczyła sobie Kandydatka była ocena i porównanie wpływu mikropęcherzyków pochodzenia płytkowego oraz pochodzenia nowotworowego na fenotyp limfocytów i produkcję cytokin w warunkach *in vitro*.

Istotny wzrost liczby różnego typu i pochodzenia mikropęcherzyków błonowych we krwi i innych płynach ustrojowych stwierdzany jest w przebiegu wielu procesów patologicznych u ludzi, takich, jak choroby nowotworowe, choroby układu krążenia czy choroby metaboliczne, w tym cukrzyca. Prowadzone są intensywne badania mające na celu określenie roli mikropęcherzyków w etiopatogenezie tych chorób oraz ich wykorzystanie w diagnostyce i terapii. Brak jednak badań w tym zakresie w odniesieniu do zwierząt towarzyszących. Stąd, podjęcie przez Habilitantkę próby określenia znaczenia mikropęcherzyków błonowych w regulacji swoistej odpowiedzi immunologicznej u psów jest przedsięwzięciem w pełni uzasadnionym oraz cennym, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i potencjalnie aplikacyjnym.

W badaniach stanowiących podstawę **pierwszej publikacji** Habilitantka skupiła się na określeniu i porównaniu liczby różnych populacji mikropęcherzyków błonowych (pochodzenia płytkowego, leukocytarnego, z limfocytów T i B) we krwi psów zdrowych i psów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową. Należy podkreślić, że badania te mają charakter pionierski, gdyż Kandydatka podczas ich realizacji po raz pierwszy zastosowała kombinację specyficznych gatunkowo przeciwciał monoklonalnych pozwalających na określenie pochodzenia mikropęcherzyków błonowych, odpowiednio z trombocytów o fenotypie CD61+, leukocytów z ekspresją CD45+, limfocytów T z koekspresją CD3+ i limfocytów B z koekspresją CD21+ oraz z megakariocytów CD45+CD61+.

Analizie poddano mikropęcherzyki błonowe pochodzące z krwi pobranej podczas rutynowych weterynaryjnych czynności klinicznych od 13 psów zdrowych, stanowiących grupę kontrolną, oraz od 16 psów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową zakwalifikowanych do leczenia chirurgicznego lub chemioterapii, w zależności od typu nowotworu. Liczbę i pochodzenie mikropęcherzyków analizowano przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej. Mikropęcherzyki błonowe były klasyfikowane na podstawie ekspresji powierzchniowej aneksyny V (PS+) oraz koekspresji specyficznych markerów komórkowych (CD61, CD45, CD3, CD21).

Najważniejsze, oryginalne osiągnięcia Pani dr Magdaleny Żmigrodzkiej w przedstawionym powyżej zakresie:

- zaprezentowane przez Habilitantkę dane dotyczące oceny fenotypowej i ilościowej różnych populacji mikropęcherzyków błonowych (pochodzenia płytkowego, leukocytarnego, z limfocytów T i B) we krwi osobników zdrowych i osobników ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową stanowią pierwsze tego typu opracowanie z wykorzystaniem materiału pochodzącego od psów;

- badania mają charakter pionierski również ze względu na fakt, że Kandydatka podczas ich realizacji po raz pierwszy zastosowała kombinację specyficznych gatunkowo przeciwciał monoklonalnych pozwalających na określenie pochodzenia mikropęcherzyków błonowych, odpowiednio z trombocytów o fenotypie CD61+, leukocytów z ekspresją CD45+, limfocytów T z koekspresją CD3+ i limfocytów B z koekspresją CD21+ oraz z megakariocytów CD45+CD61+;

- Kandydatka wykazała, że liczba mikropęcherzyków błonowych pochodzenia płytkowego (PS+CD61+) i leukocytarnego (PS+CD45+) oraz mikropęcherzyków z limfocytów T (PS+CD3+) była znacząco wyższa u psów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową w porównaniu do grupy kontrolnej, co sugeruje, że po przeprowadzeniu kolejnych, bardziej precyzyjnych, poszerzonych badań, w tym zakresie, mogą one zostać wykorzystane jako markery biologiczne neoplazji

o znaczeniu diagnostycznym i rokowniczym;

- Habilitantka stwierdziła, że liczba mikropęcherzyków pochodzących z limfocytów T osiągała najwyższe wartości u psów z chłoniakami T komórkowymi i rozsiałym chłoniakiem B komórkowym;

- Kandydatka stwierdziła również brak znaczącej różnicy w odniesieniu do liczby mikropęcherzyków błonowych pochodzenia megakariocytowego (PS+CD45+CD61+) i pochodzących z limfocytów B pomiędzy grupą kontrolną i badaną, co eliminuje te typy mikropęcherzyków z grupy potencjalnych markerów diagnostycznych, jak i służących do monitorowania i prognozowania przebiegu chorób nowotworowych u psów.

Uwagi:

- Habilitantka, dokonując fenotypowej i ilościowej oceny różnych populacji mikropęcherzyków błonowych przeprowadziła badania z wykorzystaniem zróżnicowanej w wielu aspektach grupy psów ze zdiagnozowanymi chorobami nowotworowymi. Zwierzęta te (n=16) różniły się znacząco pod względem wieku (zakres od 9 miesięcy do 13 lat), płci i aktywności rozrodczej (10 suk, w tym trzy wysterylizowane oraz pięć osobników płci męskiej, w tym jeden po zabiegu kastracji – przy okazji: informacja ta dotyczy łącznie 15 psów, podczas gdy grupa badana liczyła 16 osobników (?)), rasy (6 różnych ras i dziewięć mieszzańców) oraz typu nowotworu (sześć psów z gruczolakorakiem gruczołu sutkowego, dwa z chłoniakiem T komórkowym, po jednym osobniku, odpowiednio, z ostrą białaczką limfoblastyczną, czerniakiem, gruczolakorakiem jąder, mięsakiem macicy, gruczolakorakiem wątroby, tłuszczakiem, naczyniakomięsakiem i rozsiałym chłoniakiem B komórkowym). Ponadto, były to psy zakwalifikowane do różnych typów terapii; tj. leczenia chirurgicznego i/lub chemioterapii, w zależności od typu nowotworu oraz stadium zaawansowania choroby. Grupa kontrolna, równie heterogenna, charakteryzowała się podobną do grupy badanej strukturą wiekową i pod względem płci, znacząco różniła się jednak w odniesieniu do ras psów. Jak wiadomo, chociażby wraz z wiekiem, jak również zależnie od wielkości rasy, a tym samym przeciętnej długości życia i związanych z tym czynników genetycznych warunkujących początek i tempo procesu starzenia układu immunologicznego, zmienia się zarówno liczba limfocytów, w tym limfocytów T, jak i proporcje ich poszczególnych immunofenotypów. Badania z wykorzystaniem jednokrotnie pobranego materiału badawczego o tak zróżnicowanym, niejednorodnym pochodzeniu, zwłaszcza w zestawieniu z niezbyt wysoką w tym kontekście liczebnością grup, wymaga dużej ostrożności podczas opracowywania wyników i formułowania konkluzji. W związku z tym, w mojej opinii, warto byłoby dodatkowo doprecyzować wnioski, uwzględniając w nich informacje nt. wieku i rasy psów, a także typu choroby nowotworowej zdiagnozowanej u osobników, od których pochodził materiał biologiczny wykorzystany w badaniach.

Oczywiście, opisana powyżej zmienność z pewnością w dużej mierze wynikała z dostępności materiału badawczego, który pochodził od psów pacjentów i miał charakter kliniczny. Ponadto, Pani dr M. Żmigrodzka wspomniała o niektórych aspektach heterogenności grupy badanej w rozdziale „3. Results”, podrozdziale „3.1. Study populations”, jak również w pewnym stopniu uwzględniła ten fakt dodając do tytułu publikacji informację, że przedstawione wyniki zostały uzyskane w efekcie badań wstępnych. Niemniej jednak, w celu sformułowania wiążących wniosków w tym zakresie, umożliwiających wykorzystanie badanych parametrów w charakterze markerów biologicznych pozwalających na diagnozowanie, monitorowanie i prognozowanie postępów chorób nowotworowych u psów z pewnością konieczne są dalsze badania z wykorzystaniem możliwie najbardziej ujednoczonych i zdecydowanie bardziej licznych grup zwierząt. Nie zmienia to, oczywiście, faktu, że Kandydatka przeprowadzając te pionierskie badania uzyskała wstępne, wartościowe wyniki,

które finalnie potrafiła właściwie przedstawić i zinterpretować.

Dr Magdalena Żmigrodzka, uwzględniając uzyskane uprzednio wyniki potwierdzające, że najlicniejszą populacją mikropęcherzyków we krwi psów są te pochodzenia płytkowego, postanowiła sprawdzić w warunkach *in vitro*, czy mikropęcherzyki tej populacji ulegają fuzji z limfocytami zdrowych osobników i czy zmieniają je pod względem czynnościowym, tzn. czy wpływają na proliferację limfocytów, ich fenotyp i produkcję cytokin. Stało się to podstawą przygotowania **drugiej pracy wchodzącej w skład cyklu**. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem krwi pobranej podczas czynności weterynaryjnych od dziesięciu klinicznie zdrowych psów w wieku od 1 roku do 6 lat. Celem pierwszego etapu badań było określenie, czy mikropęcherzyki błonowe pochodzenia płytkowego są pobierane przez limfocyty. W związku z tym zostały one wyznakowane fluorochromem, a następnie były inkubowane z komórkami jednojądrzastymi wyizolowanymi z krwi zdrowych psów. W kolejnym etapie pracy mikropęcherzyki były inkubowane z jednojądrzastymi komórkami krwi w obecności konkanawaliny A (przez 24 godz.) i, następnie, z IL-2 (przez kolejne 4 dni) w celu analizy ich potencjalnego oddziaływania na fenotyp i funkcje limfocytów. W celu analizy proliferacji limfocytów, ich fenotypu i ekspresji cytokin wykorzystano technikę cytometrii przepływową.

Najważniejsze, oryginalne osiągnięcia Pani dr Magdaleny Żmigrodzkiej w przedstawionym powyżej zakresie:

- Kandydatka wykazała różnice w oddziaływaniu mikropęcherzyków błonowych pochodzenia płytkowego na poszczególne subpopulacje limfocytów wyizolowanych z krwi psów. Stwierdziła liczne interakcje mikropęcherzyków z limfocytami T oraz rzadkie ich połączenia z limfocytami B;

- Habilitantka zaobserwowała fuzję mikropęcherzyków z limfocytami T po 7 godzinach ich wspólnej hodowli;

- badania przeprowadzone przez Habilitantkę pozwoliły na stwierdzenie, że mikropęcherzyki błonowe pochodzenia płytkowego nie wpływają na fenotyp limfocytów pochodzących z krwi zdrowych psów, ich proliferację, różnicowanie i produkcję wybranych cytokin (IFN- γ i IL-17) w warunkach *in vitro*;

- przedstawione w publikacji wyniki są efektem pionierskich badań dotyczących dynamiki fuzji mikropęcherzyków błonowych pochodzenia płytkowego z limfocytami zdrowych psów w warunkach *in vitro* oraz ich wpływu na fenotyp i właściwości komórek docelowych.

Uwagi:

- z opisu metodyki wynika, że badania zostały przeprowadzone na zbiorczej hodowli limfocytów pochodzących z 10 indywidualnych próbek krwi jednorazowo pozyskanych od psów podczas klinicznych czynności weterynaryjnych. Podobnie, jak w publikacji nr 1, również w tym przypadku grupa pacjentów była w znaczącym stopniu zróżnicowana pod względem wieku (zakres od 1 roku do 6 lat), płci (sześć suk, w tym dwie poddane uprzednio sterylizacji i cztery psy) oraz rasy (grupę tworzyły osobniki reprezentujące siedem różnych ras i dwa mieszańce). W związku z tym, z podobnych przyczyn, jak te, dotyczące publikacji nr 1, warto byłoby doprecyzować wnioski, uwzględniając w nich informacje nt. wieku i rasy psów, od których pochodził materiał biologiczny wykorzystany w badaniach.

W trzeciej publikacji Pani dr Magdalena Żmigrodzka poddała analizie oddziaływanie mikropęcherzyków błonowych pochodzenia nowotworowego na fenotyp limfocytów pochodzących z krwi obwodowej psów i produkcję przez nie wybranych cytokin. Modyfikacja

odpowiedzi immunologicznej przez czynniki wytwarzane przez komórki nowotworowe jest jednym z kluczowych elementów patogenezы wielu chorób nowotworowych mogących warunkować zarówno efektywną promocję i progresję rozwoju guza, jak i zwiększać tempo procesu metastazy. W związku z tym, wyniki uzyskane przez Kandydatkę w efekcie tego etapu badań, uważam za szczególnie cenne.

Kandydatka wykorzystwała w badaniach mikropęcherzyki pochodzące z linii komórkowych psiego chłoniaka (CLBL-1) i psiej białaczki (CLB70). Podobnie, jak w przypadku pozostałych dwóch publikacji Habilitantka przeprowadziła powyższe badania posługując się głównie techniką hodowli komórkowej *in vitro* i metodą cytometrii przepływowej. Limfocyty do badań pozyskała natomiast z krwi obwodowej ośmiu zdrowych psów.

Do najważniejszych, oryginalnych osiągnięć Pani dr Magdaleny Żmigrodzkiej w tym zakresie należy zaliczyć:

- wykazanie, że pęcherzyki błonowe wyizolowane z linii komórkowych CLBL-1 i CLB70 koinkubowane z komórkami jednojądrzastymi krwi psów są efektywnie pobierane przez limfocyty B, Tc i T, w zastosowanych stężeniach (5 i 20 $\mu\text{g/ml}$) nie wpływają jednak znacząco na proliferację tych komórek;

- stwierdzenie, że mikropęcherzyki błonowe pochodzące z linii CLB70 znacząco obniżają odsetek komórek CD8⁺ z ekspresją IL-17 o potwierdzonym działaniu przeciwnowotworowym, co sugeruje możliwe immunomodulujące i immunosupresyjne, a tym samym pronowotworowe działanie tych mikropęcherzyków;

- wykazanie, że mikropęcherzyki błonowe pochodzące z linii komórkowych CLBL-1 i CLB70 w sposób odmienny oddziałują na subpopulacje limfocytów CD4⁺ i CD8⁺: dziewiczych, centralnych komórek pamięci, efektorowych komórek pamięci i komórek końcowo zróżnicowanych. Habilitantka stwierdziła, iż pod wpływem mikropęcherzyków z CLB70 nastąpiło obniżenie odsetka efektorowych komórek pamięci CD4⁺, przy jednoczesnym zwiększeniu odsetka komórek końcowo zróżnicowanych CD4⁺. Analizując wpływ mikropęcherzyków z linii CLBL-1 zaobserwowała natomiast, wzrost odsetka efektorowych komórek pamięci CD8⁺ oraz zmniejszenie odsetka komórek dziewiczych CD8⁺;

- przedstawione przez Kandydatkę wyniki mają charakter pionierski, stanowią bowiem pierwsze doniesienie naukowe na temat wpływu pęcherzyków błonowych pochodzących z linii komórkowych CLBL-1 i CLB70 na limfocyty krwi obwodowej psów w warunkach *in vitro*.

Pozwolę sobie odnieść się również do „Autoreferatu”. W załączniku nr 4 na str. 4 znajdują się niepełne dane bibliograficzne publikacji popularnonaukowych nr 6, 7 i 9 – brakuje w nich nazw czasopism, w których zostały opublikowane prace. Artykułu nr 7, w przeciwieństwie do dwóch pozostałych, nie udało mi się odnaleźć w bazach internetowych. Szkoda, że do opracowania nie została dołączona, jak to jest powszechnie praktykowane, analiza bibliometryczna dorobku naukowego Habilitantki przygotowana i poświadczona przez Bibliotekę SGGW w Warszawie.

Oczywiście, posiadanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych przez Kandydatkę nie budzi żadnych wątpliwości, w dokumentacji brak jednak kopii dyplomu. W jego miejsce zostało przedstawione zaświadczenie, które nie zawiera informacji o tytule pracy doktorskiej, jej promotorze oraz recenzentach.

Podsumowując, należy stwierdzić, że przedstawiony do oceny cykl publikacji, wskazany jako osiągnięcie naukowe, jest spójny tematycznie, a uzyskane przez Habilitantkę wyniki

niewątpliwie mają charakter pionierski, w związku z czym stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny weterynaria. Kandydatka podjęła się analizy roli mikropęcherzyków błonowych w regulacji swoistej odpowiedzi immunologicznej u psów, w tym określenia fenotypów i oceny ilościowej poszczególnych populacji mikropęcherzyków błonowych we krwi u osobników zdrowych i z chorobą nowotworową. Dokonała również oceny i porównania wpływu mikropęcherzyków pochodzenia płytkowego oraz pochodzenia nowotworowego na fenotyp limfocytów i produkcję cytokin w warunkach *in vitro*.

Warto podkreślić, że Habilitantka, aby osiągnąć założone cele badawcze, wykorzystwała multipotencjalną, ale jednocześnie wymagającą zaawansowanej wiedzy, umiejętności i doświadczenia, technikę cytometrii przepływową. Przeprowadzając pionierskie badania, uzyskała wartościowe wyniki nie tylko o istotnym znaczeniu poznawczym, ale także o charakterze przedklinicznym ze względu na wskazanie nowych, możliwych elementów mechanizmu odpowiedzialnego za immunosupresję w przebiegu wybranych chorób nowotworowych układu krwiotwórczego u psów. W przyszłości (po przeprowadzeniu kolejnych badań w tym zakresie) wyniki te mogą zostać wykorzystane w klinicznej praktyce weterynaryjnej w celu diagnozowania, monitorowania przebiegu, oceny rokowania, a nawet opracowania terapii przyczynowych w przypadku ww. grupy chorób.

Wyszczególnione powyżej osiągnięcia w pracy badawczej nad wpływem mikropęcherzyków błonowych pochodzenia płytkowego i nowotworowego na limfocyty krwi obwodowej psów w połączeniu z wysokimi parametrami bibliometrycznymi publikacji wchodzących w skład cyklu, stanowią podstawę do pozytywnej, bardzo dobrej oceny dzieła. Pragnę dodać, że nie umniejszają jej przedstawione wcześniej uwagi, które ze względu na fakt wykorzystania w badaniach zwierząt towarzyszących i oczywistych trudności w pozyskaniu od nich materiału badawczego, mają w pewnym stopniu charakter życzeniowo-refleksyjny.

Ocena pozostałego dorobku naukowego, w tym aktywności naukowej realizowanej w innych, niż SGGW w Warszawie, instytucjach naukowych

W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych, badania Pani dr Magdaleny Żmigrodzkiej dotyczyły głównie zagadnień związanych z regulacją procesu aktywacji płytek krwi u psów. Efektem tej aktywności badawczej jest jedna publikacja oryginalna w czasopiśmie *Medycyna Weterynaryjna* (10 pkt. MNiSW, IF=0,219), której Habilitantka jest pierwszym współautorem. W tym czasie Kandydatka została również współautorką pięciu publikacji popularnonaukowych (cztery spośród nich ukazały się w *Magazynie Weterynaryjnym*, jedna w *Życiu Weterynaryjnym*) oraz czterech krajowych doniesień konferencyjnych (dwóch zaprezentowanych w formie referatów i dwóch przedstawionych w formie posterów). W przypadku wszystkich ww. artykułów popularnonaukowych i doniesień konferencyjnych Habilitantka była pierwszym współautorem.

W latach 2005-2010 Kandydatka prowadziła badania mające na celu ocenę aktywacji trombocytów u psów z małopłytkowością, m.in. pod wpływem aktywatorów i stabilizatora błony komórkowej. Uzyskane wyniki stały się podstawą do nadania Pani dr Magdalenie Żmigrodzkiej stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych.

Po uzyskaniu stopnia doktora, aktywność naukowa Habilitantki miała charakter wielokierunkowy i dotyczyła głównie: 1) zaburzeń czynnościowych płytek krwi (kontynuacja tematyki badań z okresu realizacji pracy doktorskiej); 2) regulacji aktywności i wybranych zaburzeń funkcji limfocytów i monocytów u różnych gatunków zwierząt; 3) regulacji i modulacji przebiegu ciąży i procesu laktacji u myszy przy wykorzystaniu wodnych

i wodno-alkoholowych ekstraktów roślinnych, m.in. z różeńca Kiryłowa; 4) wpływu różnych koniugatów nanocząsteczek srebra oraz dwumetalicznych nanocząsteczek srebra i złota na gojenie się ran; 5) analizy reakcji adaptacyjnych koni do treningu wyścigowego; 6) roli szlaku apoptozy Fas/FasL w patogenezie oraz powstawaniu i nasileniu objawów klinicznych atopowego zapalenia skóry.

Wymiernym efektem aktywności badawczej Kandydatki w okresie po uzyskaniu stopnia doktora (z wyłączeniem publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego) jest 21 oryginalnych i przeglądowych prac naukowych w czasopiśmie znajdujących się na listach ministerialnych (1485 pkt. MNiSW/ MNiE, IF=53,59) oraz 9 publikacji popularnonaukowych, które ukazały się w Magazynie Weterynaryjnym lub Życiu Weterynaryjnym (łącznie 25 pkt. MNiSW, w przypadku trzech spośród nich w „Autoreferacie” brak pełnych danych bibliograficznych trzech artykułów). Niestety, Habilitantka jest pierwszym współautorem jedynie sześciu (spośród 21) wspomnianych powyżej prac oryginalnych i przeglądowych (w tym trzech prezentujących wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej) oraz pięciu (spośród dziewięciu) artykułów popularnonaukowych.

Warto jednak podkreślić, że istotna część publikacji oryginalnych i przeglądowych ukazała się w znaczących, wysokopunktowanych czasopiśmie, m.in. takich, jak Equine Veterinary Journal (IF₂₀₁₉=2,47; 200 pkt.), International Journal of Nanomedicine (IF₂₀₂₀=6,342; 140 pkt.; IF₂₀₁₈=4,471; 35 pkt.), International Journal of Molecular Sciences (IF₂₀₂₀=6,342; 140 pkt.), Computational and Structural Biotechnology Journal (IF₂₀₂₂=6,15, 100 pkt.), Inflammation Research (IF₂₀₁₇=2,99; 20 pkt.); Journal of Physiology and Pharmacology (IF₂₀₁₈= 2,47; 25 pkt.), Tumor Biology (IF₂₀₁₆= 2,926; 25 pkt.), Preventive Veterinary Medicine (IF₂₀₂₁= 2,30; 140 pkt.), czy Toxins (IF₂₀₂₁= 4,536; 100 pkt.).

Habilitantka została również w tym okresie współautorką 13 komunikatów kongresowych (w tym 4 zaprezentowanych na konferencjach zagranicznych). W czterech spośród wszystkich doniesień, Kandydatka była pierwszym autorem. Dr Magdalena Żmigrodzka pięciokrotnie poddawała konfrontacji wyniki swoich badań prezentując je ustnie, m.in. podczas 19th International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnostics w Tajlandii (2019 r.) oraz XVI Kongresu Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych (2021 r.).

Podsumowując, przedstawione dane wskazują na znaczące powiększenie dorobku przez Kandydatkę po uzyskaniu stopnia doktora. Daty publikacji poszczególnych prac świadczą o systematycznej aktywności badawczej i publikacyjnej Habilitantki. Mimo, iż Kandydatka nie jest pierwszym, ani korespondencyjnym współautorem większości tych publikacji, Jej udział w ich powstawaniu wydaje się stosunkowo łatwy do wyodrębnienia, związany jest bowiem z doświadczeniem i umiejętnościami laboratoryjnymi, bez których prace te zapewne nie powstałyby.

W mojej opinii, zdecydowanie pozytywnie należy ocenić również aktywność naukową Pani dr Magdaleny Żmigrodzkiej realizowaną w innych instytucjach naukowych.

W czasie realizacji studiów doktoranckich Habilitantka podjęła współpracę z badaczami z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Jej efektem było uczestnictwo Kandydatki, jako wykonawcy, w projekcie badawczym kierowanym przez dr. hab. Kazimierza Obremskiego, prof. UWM (finansowanym przez MNiSW, N N308 237936, 2009-2012, „Badania nad oddziaływaniem toksyny T-2 i zearalenonu na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej jelita świni”) oraz współautorstwo dwóch prac oryginalnych z tego zakresu (Polish Journal of Veterinary Sciences 2015, Toxins 2021).

W latach 2014-2015 Kandydatka zatrudniona była w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. Generała K. Kaczkowskiego w Warszawie. Efektem współpracy badawczej z pracownikami ww. Jednostki są dwie prace oryginalne, których Habilitantka jest współautorem (Central European Journal of Immunology 2014, Inflammation Research 2017). Jako kierownik Zwierzętarni WIHE, Pani M. Żmigrodzka sprawowała kontrolę nad doświadczeniami lub współprowadziła eksperymenty na zwierzętach laboratoryjnych stanowiące podstawę wspomnianych wyżej publikacji. Uczestniczyła także w przygotowaniu finalnej wersji jednego z manuskryptów. Były to prace dotyczące regulacji i modulacji przebiegu ciąży i procesu laktacji u myszy przy wykorzystaniu wodnych i wodno-alkoholowych ekstraktów roślinnych z różeńca Kiryłowa oraz roli szlaku apoptozy Fas/FasL w patogenezie oraz powstawaniu i nasileniu objawów klinicznych atopowego zapalenia skóry.

W ramach współpracy z WIHE, dr Magdalena Żmigrodzka w latach 2014-2018, jako wykonawca, uczestniczyła w realizacji projektu OPUS pt.: „Nanocząstki srebra koniugowane taninami – badania nad ich aktywnością regeneracyjną w zastosowaniach dermalnych” (2014/13/B/NZ5/01356). Efektem tej kooperacji są dwie publikacje, których Habilitantka jest współautorem (International Journal of Nanomedicine 2018 i 2020).

Ponadto, w 2019 r., Kandydatka odbyła miesięczny staż na Uniwersytecie w Kentucky w Stanach Zjednoczonych. Podczas pobytu w Gluck Equine Center poszerzyła swoje umiejętności laboratoryjne, przede wszystkim z zakresu cytometrii przepływowej, techniki Luminex oraz Real Time PCR w kontekście oceny stanu układu immunologicznego koni z zespołem metabolicznym. Uczestniczyła także w badaniach dotyczących reakcji stresowej koni arabskich po treningu wyścigowym, wytrzymałościowym i zawodach. Efektem tej współpracy jest artykuł, który ukazał się w 2021 r. w czasopiśmie Preventive Veterinary Medicine.

W 2019 r. Habilitantka odbyła również tygodniowy staż w Szkole Cytometrii na Uniwersytecie w Genewie, pogłębiając swoją wiedzę i umiejętności w obszarze cytometrii przepływowej. W 2020 r. podjęła współpracę z Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu realizując badania z zakresu nowotworów hematopoetycznych u psów, co zaowocowało powstaniem jednej z publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

Warto podkreślić, że umiejętności laboratoryjne Kandydatki, jak również zdolność nawiązywania współpracy, zaowocowały łącznie Jej udziałem w realizacji pięciu projektów badawczych finansowanych w drodze konkursów krajowych m.in. przez MNiSW (2009-2012, wykonawca) oraz NCN (OPUS, 2015-2018, wykonawca; Preludium, 2018-2021, wykonawca; MINIATURA 1 DEC., 2018-2019, kierownik; OPUS, 2021-2025, wykonawca). W latach 2008-2009 Habilitantka była także beneficjentką „Mazowieckiego Stypendium Doktoranckiego” finansowanego ze środków Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego – działanie 2.6 Regionalne Strategie Innowacyjne i transfer wiedzy.

Podsumowując ocenę pozostałego dorobku naukowego oraz aktywności naukowej realizowanej przez Panią dr Magdalenę Żmigrodzką w innych instytucjach naukowych, stwierdzam, że Habilitantka, spełnia wymagania stawiane w tym zakresie osobom ubiegającym się o stopień naukowy doktora habilitowanego, m.in. ze względu na znaczące powiększenie dorobku publikacyjnego w okresie po uzyskaniu stopnia doktora, aktywny i wielokrotny udział w realizacji projektów grantowych oraz umiejętność nawiązywania współpracy potwierdzoną publikacjami i projektami zrealizowanymi w kooperacji z innymi jednostkami badawczymi. Należy jednak, niestety, zaznaczyć, że liczba prac oryginalnych (poza wchodzącymi w skład osiągnięcia), w których Kandydatka jest pierwszym współautorem, a tym samym twórcą koncepcji, jest stosunkowo niewielka.

Ocena aktywności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzatorskiej

Dr Magdalena Żmigrodzka od 2005 r. prowadzi działalność dydaktyczną, stale podnosząc i doskonaląc swoje kompetencje i umiejętności w tym zakresie poprzez uczestnictwo w stosownych kursach i szkoleniach. W okresie realizacji studiów doktoranckich prowadziła zajęcia z przedmiotów „Diagnostyka laboratoryjna” i „Interpretacja wyników wybranych badań dodatkowych w chorobach psów i kotów” dla studentów kierunku weterynaria, a także „Metody produkcji i praktyczne wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych” dla studentów kierunku biotechnologia SGGW w Warszawie. Po uzyskaniu stopnia doktora, w 2012 r. realizowała ćwiczenia z przedmiotu „Patofizjologia zwierząt” dla studentów weterynarii. Od 2015 r. prowadzi zajęcia z zakresu „Immunologii klinicznej” i „Patofizjologii” dla studentów kierunku weterynaria realizowanego w języku polskim oraz „Patophysiology” dla studentów anglojęzycznych. Ponadto, prowadzi zajęcia z przedmiotów „Techniki diagnostyczne”, „Inżynieria przeciwciał monoklonalnych”, „Metody produkcji przeciwciał monoklonalnych”, „Podstawy immunopatologii”, „Diagnostyka biochemiczna” i „Możliwości badawcze cytometrii przepływowej” dla kierunków biotechnologia oraz bioinżynieria zwierząt. Od 2020 r. jest głównym prowadzącym, a od 2022 r. również koordynatorem modułu „Podstawy immunopatologii” dla studentów biotechnologii. Habilitantka jest także współtwórcą przedmiotu fakultatywnego „Clinical immunology” realizowanego od 2019 r. dla studentów anglojęzycznych kierunku weterynaria.

Od roku 2016 Habilitantka aktywnie uczestniczy w działalności Koła Naukowego Medyków Weterynaryjnych, sprawując opiekę naukową nad studentami kierunku weterynaria wykonującymi prace badawcze oraz współorganizując Międzynarodową Konferencję Naukową Studentów Weterynarii „Non sibi sed omnibus” – Nie dla siebie, ale dla wszystkich” (2017 i 2018 r.).

Pani dr Magdalena Żmigrodzka bierze również aktywny udział w rozwoju młodych kadr naukowych. Była promotorem pomocniczym pracy doktorskiej Pani dr Alicji Rzepeckiej (2019 r.) pt.: „Ocena zmienności fenotypowej i funkcji monocytów krwi obwodowej psów zdrowych i z chłoniakami” oraz pracy magisterskiej Pani mgr Natalii Wilczyńskiej (2007) pt.: „Cytometryczna ocena subpopulacji limfocytów w węzłach chłonnych psów z chłoniakiem”. Wykonała recenzje czterech prac dyplomowych – trzech prac inżynierskich przygotowanych przez studentów kierunków biotechnologia, zootechnika i bioinżynieria oraz jednej pracy dyplomowej studentki kierunku weterynaria realizowanego w języku angielskim.

Habilitantka jest członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych oraz Polskiego Towarzystwa Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych (PoLLASA). Była gościnnym edytorem specjalnego numeru czasopisma *Animals* („Advances in Companion Animal Clinical Pathology”).

Warto również wspomnieć, że redakcje znaczących czasopism o zasięgu międzynarodowym (m.in. *BMC Veterinary Research*, *Veterinary Sciences*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Animals*) powierzają Pani dr Magdalenie Żmigrodzkiej manuskrypty do recenzji, co świadczy o pewnej Jej rozpoznawalności w międzynarodowym środowisku naukowym.

Habilitantka w okresie swojej aktywności zawodowej została dwukrotnie nagrodzona przez JM Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia organizacyjne (2018 r. – nagroda III stopnia; 2021 r. – nagroda I stopnia). W 2018 i 2021 r. została również wyróżniona za współautorstwo dwóch publikacji przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych.

Kandydatka w latach 2006-2023 podnosiła swoje kompetencje w zakresie immunologii

i diagnostyki hematologicznej oraz doskonaliła swoje umiejętności metodyczne dotyczące cytometrii przepływowej, hodowli komórkowych i metod biologii molekularnej w diagnostyce medycznej i badaniach naukowych, uczestnicząc w dziewięciu stosownych szkoleniach, kursach i seminariach. Jako eksperymentator prowadzący doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt, odbyła również prowadzone przez PolLASA szkolenia dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie, dla osób wykonujących procedury oraz dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach.

W ramach działalności organizacyjnej, Habilitantka uczestniczyła w przygotowaniu konferencji „Badanie genetyczne w monitorowaniu zdrowia i możliwości treningowych u koni wyścigowych” (Warszawa, 2017). Od 2015 r. corocznie jest współorganizatorem oraz prowadzącym warsztaty i wykłady w ramach Festiwalu Nauki w Instytucie Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie.

Uwzględniając przedstawioną powyżej wysoką i szeroko zakrojoną aktywność Habilitantki, pozytywnie oceniam Jej osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne i popularyzatorskie.

Podsumowanie

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe dr Magdaleny Żmigrodzkiej jest, w mojej opinii, wartościowe pod względem merytorycznym, a także posiada charakter pionierski i potencjalnie aplikacyjny, m.in. w odniesieniu do przeprowadzonej przez Habilitantkę analizy wpływu mikropęcherzyków błonowych pochodzenia nowotworowego na liczbę i fenotyp limfocytów pozyskanych z krwi obwodowej psów oraz produkcję przez nie wybranych cytokin. Modyfikacja odpowiedzi immunologicznej przez czynniki wytwarzane przez komórki nowotworowe jest jednym z kluczowych elementów patogenezы wielu chorób nowotworowych mogących warunkować zarówno efektywną promocję i progresję rozwoju guza, jak i zwiększać tempo procesu metastazy. W związku z tym, wyniki uzyskane przez Kandydatkę w efekcie tego etapu badań, uważam za szczególnie cenne.

Habilitantka, jako pierwsza, określiła i porównała liczby różnych populacji mikropęcherzyków błonowych (pochodzenia płytkowego, leukocytnego, z limfocytów T i B) we krwi psów zdrowych i psów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową. Następnie, po potwierdzeniu, że najliczniejszą populacją mikropęcherzyków we krwi psów są te pochodzenia płytkowego, sprawdziła w warunkach *in vitro*, czy mikropęcherzyki tej populacji ulegają fuzji z limfocytami zdrowych osobników i czy zmieniają je pod względem czynnościowym, tzn. czy wpływają na proliferację limfocytów, ich fenotyp i produkcję cytokin. Na bazie wyników uzyskanych podczas realizacji tych dwóch etapów projektu, zbadała oddziaływanie mikropęcherzyków błonowych pochodzenia nowotworowego na fenotyp limfocytów pochodzących z krwi obwodowej psów i produkcję przez nie wybranych cytokin. Wykazała, że pęcherzyki błonowe wyizolowane z linii komórkowych psiego chłoniaka (CLBL-1) i psiej białaczki (CLB70) koinkubowane z komórkami jednojądrzastymi krwi psów są efektywnie pobierane przez limfocyty B, Tc i T, jednakże w zastosowanych stężeniach (5 i 20 µg/ml) nie wpływają znacząco na proliferację tych komórek. Stwierdziła, że mikropęcherzyki błonowe pochodzące z linii komórkowej CLB70 znacząco obniżają odsetek komórek CD8⁺ z ekspresją IL-17 o potwierdzonym działaniu przeciwnowotworowym, co sugeruje możliwe immunomodulujące i immunosupresyjne, a tym samym pronowotworowe działanie tych mikropęcherzyków. Wykazała także, że mikropęcherzyki błonowe pochodzące z linii komórkowych CLBL-1 i CLB70 w sposób odmienny oddziałują na subpopulacje limfocytów CD4⁺ i CD8⁺: dziewiczych, centralnych komórek pamięci, efektorowych komórek pamięci i komórek końcowo zróżnicowanych. Zaobserwowała, że pod wpływem mikropęcherzyków z CLB70 nastąpiło

obniżenie odsetka efektorowych komórek pamięci CD4+, przy jednoczesnym zwiększeniu odsetka komórek końcowo zróżnicowanych CD4+. Analizując wpływ mikropęcherzyków z linii CLBL-1 stwierdziła natomiast, wzrost odsetka efektorowych komórek pamięci CD8+ oraz zmniejszenie odsetka komórek dziewiczych CD8+.

Wyszczególnione powyżej wyniki badań Kandydatki niewątpliwie stanowią znaczący wkład w rozwój dyscypliny weterynaria.

Jedyną, nieco słabszą, stroną dorobku Pani dr Magdaleny Żmigrodzkiej jest niewielka liczba publikacji (poza, oczywiście, pracami wchodzącymi w skład jednotematycznego cyklu), w których jest Ona pierwszym współautorem. Jednakże biorąc pod uwagę znaczącą wartość merytoryczną prac, których Kandydatka jest współtwórcą, światowy zasięg czasopism, w których zostały one opublikowane, wielokierunkowy charakter realizowanych badań, udział w realizacji projektów badawczych finansowanych ze źródeł zewnętrznych oraz, przede wszystkim, efektywną i udokumentowaną publikacyjnie aktywność naukową w innych zagranicznych i krajowych ośrodkach badawczych, należy zdecydowanie pozytywnie ocenić Jej pozostały dorobek.

Wniosek końcowy

Podsumowując powyższą ocenę, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że osiągnięcia naukowe Pani dr Magdaleny Ireny Żmigrodzkiej spełniają wymagania określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 i 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 r., poz. 574 ze zm.), w związku z czym stanowią podstawę do nadania Kandydatce stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauki weterynaryjne, w dyscyplinie weterynaria.

KIEROWNIK
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Urszula Kosior-Korzecka
-- hab. Urszula Kosior-Korzecka, prof. uczelni