



**INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, tel.: (+48 89) 523-46-86; 524-03-13
Fax (+48 89) 524-01-24; e-mail instytut@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

Olsztyn, 12.04.2022 r

*Dr hab. Aneta Andronowska, prof. instytutu
Zakład Mechanizmów Działania Hormonów
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie*

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

Mgr Katarzyny Skulskiej

***pt. „Rola limfocytów T $\gamma\delta$ w kontroli statusu immunologicznego układu rozrodczego
w badaniach *in situ* i *ex vivo* oraz ich wpływu na odpowiedź na antygeny podawane
dopochwowo”***

wykonanej w Laboratorium Immunologii Rozrodu Instytucie Immunologii i Terapii
Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
oraz Laboratorium Bioobrazowania Sieć Badawcza Łukasiewicz – PORT Polski Ośrodek
Rozwoju Technologii we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. Grzegorza Chodaczka

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Skulskiej pt. „Rola limfocytów T $\gamma\delta$ w kontroli statusu immunologicznego układu rozrodczego w badaniach *in situ* i *ex vivo* oraz ich wpływu na odpowiedź na antygeny podawane dopochwowo” została wykonana pod kierunkiem dr hab. Grzegorza Chodaczka w Laboratorium Immunologii Rozrodu Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk oraz Laboratorium Bioobrazowania Sieć Badawcza Łukasiewicz – PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii we Wrocławiu we Wrocławiu. Badania były realizowane w ramach projektu NCN SONATA BIS 4 „Wieloparametryczna charakterystyka kontroli homeostazy nabłonka układu rozrodczego przez komórki T gamma-delta z uwzględnieniem wysokorozdzielczej mikroskopii przyżyciowej”.

Ocena formalna

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska liczy 165 stron wydruku komputerowego. Rozprawa została ujęta w sposób typowy dla prac na stopień naukowy. Autorka wyodrębniła w niej następujące rozdziały: wstęp (30 stron) poprzedzony spisem treści, streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów, założenia i cel pracy (1 strona), materiały i metody (27 stron), wyniki (56 stron), dyskusja (13 stron), wnioski (1 strona), 271 pozycji literatury (18 stron), spis rycin (3 strony, 65 Rycin) i spis 27 tabel (1 strona). Pracę kończy wykaz publikacji i prac opublikowanych w materiałach konferencyjnych

Wstęp, został podzielony na 7 podrozdziałów, w których doktorantka opisała budowę żeńskiego rozrodczego, oddziaływanie hormonów steroidowych z uwzględnieniem faz cyklu rujowego myszy. W kolejnej części scharakteryzowała elementy immunologiczne żeńskiego układu rozrodczego a także nieswoiste i swoiste mechanizmy odporności. Infekcje układu rozrodczego, szczepionki dośluzówkowe oraz procesy związane z immunostarzeniem zostały opisane w kolejnych podrozdziałach. Ciekawą częścią wstępu jest charakterystyka metod jakie mogą być wykorzystane do analizy komórek układu rozrodczego w układzie przestrzennym tzw. 3D, zwłaszcza metoda oczyszczania tkanek, dzięki której stają się przeziernie a detekcja wyznakowanych komórek łatwiejsza.

Doktorantka postawiła sobie za cel określenie roli limfocytów $T\gamma\delta$, zasiedlających śluzówkę układu rozrodczego w kontroli homeostazy zarówno w stanie fizjologicznym a także w odpowiedzi na modelowe antygeny. W celu realizacji założonego celu zaplanowano 5 zadań badawczych: 1/ opracowanie metody wizualizacji limfocytów $T\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy za pomocą technik mikroskopii konfokalnej, 2/opracowanie cytometrycznej metody analizy limfocytów $T\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy, 3/ ustalenie fizjologicznej dynamiki populacji limfocytów $T\gamma\delta$ w zależności of fazy cyklu hormonalnego (faza estrus i diestrus), 4/ ustalenie roli limfocytów $T\gamma\delta$ w indukcji odpowiedzi odpornościowej na antygeny modelowe, w tym trójsacharyd z *Candida albicans* oraz 5/ocena wpływu wieku na populację limfocytów $T\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy.

Materiałem badawczym były tkanki narządów rozrodczych (pochwy i macice) oraz węzły chłonne myszy C57BL/6, *Tcrd*^{-/-} oraz Tcrd-2BeGFP. Opis stosowanych materiałów, procedury oraz metody badawcze zostały przez Doktorantkę opisane w sposób bardzo dokładny i uporządkowany. Z przedstawionego w rozdziale **Materiały i Metody** opisu wynika, iż metodę oczyszczania tkanek Scales i CUBIC stosowano tylko do pobranych

pochev myszy. Brakuje tu jednak informacji czy pobrane tkanki były ważone i mierzone w celu oceny wpływu stosowanych procedur. Opis zastosowanych metod analizy mikroskopowej i cyfrowej obróbki obrazów jest bardzo precyzyjny i zwięzły, a zarazem imponująco szczegółowy. Dobór i wykorzystanie narzędzi komputerowych jest prawidłowy i świadczy o dużej wiedzy i dogłębnym przeanalizowaniu problemu badawczego. Zabrakło mi jednak klasycznej histologii do wykazania/potwierdzenia przydatności zastosowanych w prezentowanych badaniach metod.

Do realizacji zaplanowanego celu badań Doktorantka zastosowała także techniki umożliwiające analizę cytometryczną subpopulacji komórek w tkankach układu rozrodczego i węzłach chłonnych, a także ekspresji wybranych czynników na różnych poziomach tj. Real Time PCR i ELISA. Uzyskane dane zostały opracowane z zastosowaniem odpowiednich testów statystycznych.

W ocenie recenzenta wybrane metody badawcze i testy statystyczne stanowiły solidną podstawę do osiągnięcia zaplanowanego celu pracy.

Wyniki badań przedstawione zostały w sposób uporządkowany. W tekst rozdziału wkomponowane są liczne schematy oraz zdjęcia analiz mikroskopowych, wykresy i tabele dokumentujące wyniki badań (Ryc. 13-65; Tabela 22-27). Szkoda tylko, że przy opisie wyników nie cytowano odpowiedniej ryciny.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka dokonała analizy uzyskanych wyników badań, odnosząc je do badań innych Autorów. W pierwszej części rozdziału Doktorantka dokonała analizy przydatności zastosowanych metod oczyszczania tkanek w analizie komórek z ekspresją GFP. Kolejno odniosła się do analizy cytometrycznej subpopulacji leukocytów a także wpływu różnych typów immunizacji (donosowa, dopochwowa, podskórna) na produkcję przeciwciał. Porównała także ekspresję wybranych genów w tkankach młodych i starych myszy szczepu Tcrd^{-/-}.

Pracę doktorską kończy 13 **Wniosków**, które są odpowiedzią na wyznaczone zadania badawcze, **Literatura**, Spis Rycin, Spis Tabel oraz wykaz publikacji oraz doniesień konferencyjnych na których prezentowane były wyniki badań.

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Katarzyny Skulskiej stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Bardzo wysoko oceniam pracę zarówno pod względem metodycznym jak i merytorycznym, jednak mam kilka pytań i uwag:

1. Jednym z zadań badawczych było „Opracowanie metody wizualizacji limfocytów Tγδ w układzie rozrodczym myszy za pomocą technik mikroskopii konfokalnej”. Proszę

wyjaśnić na czym polegało „opracowanie” metody w porównaniu do prac już opublikowanych.

2. Jaka była wielkość wykorzystywanych w badaniach tkanek? Czy preparaty/tkanki o takiej grubości (co najmniej kilkaset μm) barwiono metodą free-floating tzn. swobodnie zawieszane w poszczególnych buforach i odczynnikach czy też przytwierdzono je do szkiełka nakrywkowego bezpośrednio po procedurze oczyszczania ScaleS/CUBIC ? Na str. 52 (linia 8) jest informacja o mocowaniu tkanki na szkiełku podstawowym w celu obrazowania. Czy oznacza to, że wcześniej skrawki były procedowane w formie free-floating? Należałoby to wyraźnie zaznaczyć w tekście.
3. Na stronie 71 opisane jest porównanie możliwości obrazowania komórek $\text{T}\gamma\delta$ w oczyszczonej i nieoczyszczonej tkance węzłów chłonnych pobieranych od transgenicznych myszy Tcrd-H2BeGFP, które są szczepem reporterowym dla komórek $\text{T}\gamma\delta$. Przytoczone wyniki wskazują, że skuteczna detekcja komórek $\text{T}\gamma\delta$ w oczyszczonej tkance możliwa jest do głębokości około 700 μm . Nasuwają się więc pytania:
 - jaka była faktyczna grubość analizowanych tkanek?
 - dlaczego nie pokuszono się o obrazowanie/skanowanie preparatów z obu stron (z umownej „góry” i „dołu”) ? Rycina 14 na stronie 72 wskazuje, że akwizycję wykonano tylko w jednej pozycji. Aby uniknąć zmiennych warunków preparatu można umieścić na szkiełku nakrywkowym o grubości $> 0,2 \mu\text{m}$ zamiast na grubszym szkiełku podstawowym. Pozwoliłoby to na uzyskanie pełniejszego wglądu w przekrój analizowanych tkanek.
 - czy w trakcie zamykania skrawków w preparacie ProLong Gold zabezpieczano tkanki przed nadmiernym zgniataniami, które miałyby duży wpływ na obserwowaną grubość poszczególnych warstw tkanek opisywanych w dalszej części pracy? (np. str 78). Jeśli skrawki nie były przykrywane szkiełkiem nakrywkowym po umieszczeniu na szkiełku podstawowym to należałoby tą informację umieścić w tekście.
4. Według opisu na stronie 53 (linia 8) w obrazowaniu osi Z stosowano interwał 3 do 7,5 μm . Od czego zależała różnica? Czy odległość rzędu 7,5 μm nie utrudnia w rozróżnianiu kilku komórek $\text{T}\gamma\delta$ położonych bardzo blisko siebie? Zwłaszcza jeśli są ułożone jedna nad drugą w osi Z.
5. Na stronach 76 (Ryc. 20) i 81 (Ryc. 26A), przedstawione modele 3D powinny zawierać opisaną skalę wielkości.
6. Czy rozważano użycie dodatkowej metody „wygaszania” autofluorescencji np. z użyciem roztworu SUDAN Black.

Przedstawione uwagi mają raczej charakter redakcyjny i dyskusyjny, nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej ocenianej pracy.

Wniosek końcowy

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Katarzyny Skulskiej oceniam pozytywnie. Praca ta ma znaczenie poznawcze i wskazuje na skomplikowaną i wciąż nie wyjaśnioną funkcję układu immunologicznego zwłaszcza roli limfocytów T γ δ w układzie rozrodczym. Uzyskane wyniki dostarczają również nową wiedzę na temat metod umożliwiających obrazowanie wyznakowanych komórek w układzie przestrzennym (tzw.3D) i wskazują możliwości analizy tkanek i narządów.

Z przekonaniem stwierdzam, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Skulskiej spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.IJ.Nr 65 poz. 595; z póź. zm.), zgodnie z art.175.1. ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę -Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne.

Andronawska Aneta

