

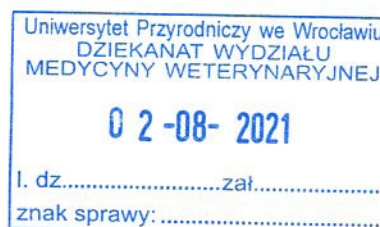
Prof. dr hab. S. Zduńczyk

28.07.2021.

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UWM w Olsztynie



## Ocena

pracy doktorskiej lek. wet. Magdaleny Kulus pt.: "Analiza profilu ekspresji wybranych genów regulujących procesy wzrostu, różnicowania i apoptozy w komórkach ziarnistych jajnika świni podczas ich krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*".

Komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych odgrywają ważną rolę w follikulogenezie i oogenezie, a szczególnie w syntezie estrogenów, dojrzewaniu jądrowym i cytoplazmatycznym oocytu oraz powstawaniu ciała żółtego. Posiadają one również właściwości multipotencjalnych mezenchymalnych komórek macierzystych. Podłoże molekularne follikulogenezy i oogenezy nie zostało jeszcze w pełni wyjaśnione. Z tych względów badania podjęte przez Doktorantkę są w pełni aktualne i uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 81 stron maszynopisu. Składa się ona ze spisu treści, wykazu publikacji stanowiących jej podstawę, wykazu skrótów, omówienia badań własnych, kopii artykułów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Omówienie badań własnych składa się z wprowadzenia, celu badań, opisu materiałów i metod, wyników i dyskusji, podsumowania, wniosków i piśmiennictwa.

Podstawę tej pracy doktorskiej stanowi cykl 3 oryginalnych prac naukowych opublikowanych w latach 2019-2020:

1. Kulus, M et al. New molecular markers involved in regulation of ovarian granulosa cell morphogenesis, development and differentiation during short-term primary in vitro culture – transcriptomic and histochemical study based on ovaries and individual separated follicles. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20, nr 16, art. nr. 3966, DOI:10.3990/ijms201163966.
2. Kulus, M. et al. The processes of cellular growth, aging, and programmed death are involved in lifespan of ovarian granulosa cells during short-term IVC: study based on animal model. *Theriogenology*, 2020, 148, 76-88.
3. Kulus, M. et al. Transcriptomic analysis of expression of gene regulating cell cycle progression in porcine ovarian granulosa cells during short-term in vitro primary culture. *Histochemistry and Cell Biology*, 2020, 153, 379-412.

We wszystkich trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Uwagę zwraca duża liczba współautorów, niemniej z ich oświadczeń wynika, że Doktorantka odgrywała wiodącą rolę w powstaniu tych prac. Należy podkreślić wysoki Impact Factor czasopism, w których prace te zostały opublikowane.

W krótkim wprowadzeniu Doktorantka omawia budowę pęcherzyka jajnikowego oraz funkcje komórek ziarnistych w produkcji hormonów oraz ich interakcje z komórką jajową. Wskazuje na potencjał macierzystości komórek ziarnistych oraz na znaczenie badań metodami biologii molekularnej w dokładnym poznaniu mechanizmów regulujących procesy follikulogenezy i oogenezy.

Wprowadzenie jest napisane interesująco, w oparciu o odpowiednio dobrane, aktualne piśmiennictwo.

Głównym celem badań było określenie profili ekspresji wybranych genów regulujących procesy wzrostu, różnicowania i apoptozy komórkach ziarnistych świni w pierwotnej hodowli *in vitro*.

Doktorantka realizowała 3 szczegółowe cele badawcze:

1. Izolację komórek ziarnistych świni domowej oraz ustalenie warunków ich krótkotrwałej hodowli *in vitro*.
2. Określenie profilu ekspresji genów metodą mikromacierzy typu Affymetrix.
3. Walidację ekspresji genów za pomocą techniki RT-qPCR.

Materiał badawczy stanowiły komórki ziarniste pobrane poubojowo od 126 dojrzałych płciowo loszek. Komórki ziarniste pozyskiwano na drodze aspiracji płynu pęcherzykowego z pęcherzyków o średnicy > 5 mm. Płyn pęcherzykowy wirowano, a osad komórkowy wykorzystano do założenia krótkoterminowej hodowli pierwotnej. W określonych przedziałach czasowych (0 h, 48 h, 96 h i 144 h) izolowano z komórek ziarnistych RNA, który wykorzystano w procesie odwrotnej transkrypcji celem uzyskania cDNA. Następnie dokonano pełnego profilowania transkryptomu komórek ziarnistych techniką mikromacierzy ekspresyjnych Affymetrix i wykonano analizę funkcjonalną mikromacierzy. Określono statystyczną istotność różnic w ekspresji badanych genów, dokonano selekcji genów o istotnie zmienionej ekspresji i przyporządkowano je do grup ontologicznych związanych z rozwojem, różnicowaniem się i morfogenezą komórek. Wyodrębniono również geny biorące udział we wzroście, starzeniu się i apoptozie oraz geny regulujące cykl komórkowy. Otrzymane wyniki ekspresji poddano hierarchicznej procedurze klasteryzacji i przedstawiono jak „mapy cieplne”. Wyniki otrzymane podczas analizy mikromacierzy ekspresyjnych poddano walidacji metodą RT-qPCR. Prawidłową budowę histologiczną jajników i pęcherzyków jajnikowych potwierdzono na preparatach mikroskopowych barwionych HE.

Wykazano, że spośród 20 analizowanych w pierwszym etapie badań genów prawie wszystkie (19) należały do grupy ontologicznej „różnicowanie się komórek”. W drugim etapie badań wykazano zmienioną ekspresję 186 genów, Największy wzrost ekspresji wykazywały geny należące do grup ontologicznych „wzrost komórek” i „starzenie się”. Szczególnie interesujący



wydaje się przy tym wzrost ekspresji genu białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu 5 (IGFBP5) związanego z procesami atrezji pęcherzyków jajnikowych. W trzecim etapie badań określono ekspresję genów związanych z regulacją cyklu komórkowego. Wykazano zmienioną ekspresję 133 genów, m.in. wzrost ekspresji genu białka spokrewnionego z białkami frizzled 2 (SFRP2) i genu trombospondyny 1 (THBS1), które biorą udział w procesach atrezji pęcherzyków jajnikowych.

W omówieniu wyników Doktorant dokonuje wyważonej interpretacji wyników badań własnych i porównuje je z danymi z piśmiennictwa.

Z przeprowadzonych badań wyciągnięto 5 wniosków, wynikających z uzyskanych rezultatów.

Badania przeprowadzone przez Doktoranta mają duże znaczenie naukowe. Dostarczyły one nowych danych o ekspresji genów w komórkach ziarnistych świni podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej *in vitro*. Wykazano, że niektóre geny mogą być markerami procesów zachodzących w komórkach ziarnistych, jak różnicowanie komórek i atrezja pęcherzyków jajnikowych.

Na podkreślenie zasługuje złożoność metodyczna przeprowadzonych badań, w których stosowano hodowle komórek i nowoczesne metody biologii molekularnej oraz mikroskopowe techniki histologiczne.

Ocenę tej pracy doktorskiej ułatwia fakt, że jej podstawę stanowi cykl 3 prac opublikowanych w renomowanych czasopismach o wysokim Impact Factor. Przed przyjęciem do druku prace te zostały poddane ocenie przez recenzentów tych czasopism.

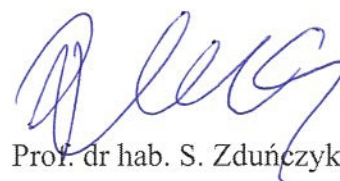
Moje uwagi krytyczne dotyczą jedynie pewnych niedociągnięć redakcyjnych w polskim opisie tych prac.

We wniosku 1 użyto określenia „Sugeruje się”, bardziej prawidłowe byłoby „Uzyskane wyniki wskazują”. Wniosek 5 wydaje się zbyt daleko idący, ponieważ wykorzystanie zmian

poziomu ekspresji genów w komórkach ziarnistych jako nowych markerów dla poprawy efektywności biotechnik rozrodu wymaga potwierdzenia w badaniach *in vivo*. W spisie piśmiennictwa niektóre tytuły czasopism pisane są małymi literami, np. Stem cell reviews and reports.

Przedstawione uwagi nie obniżają wysokiej oceny recenzowanej pracy, wynikającej z aktualności problematyki, nowoczesności i złożoności metod badawczych oraz naukowego znaczenia uzyskanych wyników. Recenzowana praca doktorska odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 118 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę wnoszę o dopuszczenie lek. wet. Magdaleny Kulus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. S. Zduńczyk