



Dr hab. Sławomir Giziński
specjalista rozrodu zwierząt
Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika
Zakład Rozrodu Zwierząt Andrologii i
Biotechnologii
Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW
w Warszawie

Warszawa 12.07.2021r

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz weterynarii

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”

Praca wykonana na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Promotor : dr hab. n. wet. Paweł Antosik

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny
Weterynaryjnej

Katedra Chorób Dużych
Zwierząt i Klinika

ul. Nowoursynowska 100
02-797 Warszawa
+48 22 593 61 91

Przekazana do recenzji dysertacja Pani lekarz weterynarii Magdaleny Kulus składa się z trzech spójnych tematycznie publikacji dotyczących procesów regulacji folikulogenezy i oogenezy na poziomie ekspresji wybranych genów z określonych grup ontogenetycznych, w oryginalnym układzie eksperymentalnym hodowli komórek jajnika świni. Podjęty przez Doktorantkę temat wydaje się istotny, z uwagi na niewielką liczbę publikacji dotyczących ekspresji genów w komórkach warstwy ziarnistej jajnika świni, regulacyjnych procesy oogenezy w szczególności w aspekcie wyjaśnienia molekularnego tła niepłodności u ssaków w tym także u ludzi. Recenzowana rozprawa liczy ogółem 81 stron. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy, poprzedzone są wykazem stosowanych skrótów, przeglądem literatury, opisem założeń badawczych, zastosowanej metodyki, a także dyskusją, wnioskami, spisem piśmiennictwa oraz podsumowaniem w klasycznym układzie pracy naukowej. Spis literatury



dotyczący wstępu, założeń, metodyki i dyskusji liczy 50 pozycji i, co warte podkreślenia, ponad połowa z nich została napisana w ciągu ostatnich 10 lat. Dysertację kończy streszczenie w języku polskim i angielskim. Zawarte w rozprawie publikacje mają charakter doświadczalny i zostały opublikowane w roku 2019 – 1 publikacja (International Journal of Molecular Science), 2020 – 2 publikacje (Theriogenology, Histochemistry and Cell Biology). Czasopisma te uznaje się za bardzo cenione i figurują na liście JCR. We wszystkich trzech artykułach Doktorantka widnieje jako pierwszy autor i główny wykonawca eksperymentu odpowiedzialny za przygotowanie doświadczenia, wybór metodyki, analizę danych oraz autorstwo większej części manuskryptów. Przemawia to za samodzielnością i dojrzałością badawczą Autorki. Z tekstu dysertacji nie wynika jednak, że Doktorantka jest autorem korespondencyjnym. Rozprawa nie zawiera także procentowego wkładu poszczególnych autorów, choć charakter ich udziału uwzględniony jest w przypisach redakcyjnych każdego z artykułów. Liczny zespół badawczy jednoznacznie świadczy o rzetelnym opracowaniu analizowanego tematu. Tytuł recenzowanej rozprawy lekarz weterynarii Magdaleny Kulus odpowiada zagadnieniom poruszonym w przedłożonych publikacjach. Warte podkreślenia są wysokie wskaźniki naukometryczne czasopism, łączny IF trzech analizowanych publikacji wynosi aż 10,068, a łączna liczba punktów MMISW 380. Prezentowane w dysertacji prace z pewnością znalazły uznanie dość skrupulatnych i krytycznych na tym poziomie recenzentów. Świadczy to o bardzo wysokim poziomie naukowym publikowanych artykułów, a także o właściwym planie badawczym, dobrze dobranej nowoczesnej metodyce i logicznie zestawionych wnioskach.

We wprowadzeniu Doktorantka w sposób bardzo jasny i zrozumiały przedstawia procesy folikulogenezy i oogenezy w jajniku świni: rolę poszczególnych hormonów regulujących i szlaki ich działania na poszczególne grupy komórek tworzących pęcherzyk jajnikowy. Lektura tej części świadczy o dogłębnej znajomości opisywanych zagadnień. W dalszej

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny
Weterynaryjnej

Katedra Chorób Dużych
Zwierząt i Klinika

ul. Nowoursynowska 100
02-797 Warszawa
+48 22 593 61 91



części wprowadzenia Doktorantka „schodzi” na poziom molekularny regulacji folikulogenezy. Wymienia markery genetyczne multipotencjalności komórek ziarnistych, klaruje hipotezę badawczą, stawia pytania, odnosi się do publikacji z medycyny człowieka dotyczących transformacji komórek *granulosa* w komórki tkanki mięśniowej, chrzęstnej kostnej czy nerwowej.

Główny cel badawczy jaki postawiła sobie Autorka sformułowany jest czytelnie i wynika z analizy danych literaturowych. Godne uwagi są dwa cele szczegółowe, które dotyczą zastosowania i oceny wiarygodności wybranej metodyki.

Materiały i metody zastosowane w pracy zostały już wysoko ocenione przez recenzentów czasopism w których się ukazały, więc nie budzą większych zastrzeżeń. W planowaniu doświadczenia warto było jednak określić fazę cyklu loszek „dawczyń”, gdyż poziom estrogenów wydaje się mieć istotny wpływ na ekspresję genów w tkankach docelowych, w tym w komórkach ziarnistych jajnika, w których ekspresja receptora ERB modeluje kodowanie genów regulatorowych i proliferację białek. (Morani A, Warner M, Gustafsson JA. *Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues*. J. Intern Med. 2008) W pierwszym artykule z cyklu jest co prawda, wzmianka, iż loszki były ubijane w fazie *anestus* brak jest jednak podstawy określenia tej fazy. Jednakże wobec zastosowanej metodyki (krótkoterminowa hodowla *in vitro*) ten drobny mankament w planowaniu doświadczenia wydaje się nie mieć wpływu na wiarygodność uzyskanych wyników. Dążąc do osiągnięcia swoich celów badawczych Autorka wykorzystuje szereg innowacyjnych metod diagnostyki molekularnej (spektrofotometria, analiza funkcjonalna mikromacierzy czy Real Time PCR).

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny
Weterynaryjnej

Katedra Chorób Dużych
Zwierząt i Klinika

ul. Nowoursynowska 100
02-797 Warszawa
+48 22 593 61 91



Pierwsza z cyklu publikacji (str 31-49) nosi tytuł :”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” Praca dotyczy analizy wybranych fragmentów transkryptomu komórek *granulosa* otrzymanych z jajników świń i utrzymywanych w krótkotrwałej hodowli in vitro. Wyniki badań pierwszej pracy są bioinformatyczną analizą genów, które podlegały zwiększonej lub zmniejszonej ekspresji, należących do określonych grup ontologicznych związanych z rozwojem, różnicowaniem się i morfogenezą komórek. Do analizy przynależności badanych genów do w.w. ontologicznych grup funkcjonalnych wykorzystano bioinformatyczne narzędzie DAVID (Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery). Następnym krokiem badawczym było wykorzystanie bioinformatycznego narzędzia STRING (Protein-Protein Interaction Networks Functional Enrichment Analysis), dzięki któremu Doktorantka zbadała zależności i interakcje pomiędzy produktami białkowymi wybranych genów. W powyższym opracowaniu Doktorantka wyodrębnia geny dotychczas nieopisywane w kontekście folikulogenezy jajników świń, a także opisuje ekspresję genów odpowiedzialnych za różnicowanie się komórek, co koresponduje z najnowszymi doniesieniami na temat macierzystych właściwości komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego.

Druga publikacja z cyklu (str.49-61 manuskryptu rozprawy), opublikowana w czasopiśmie *Theriogenology*, oceniana na 100 punktów ministerialnych, jest kontynuacją bioinformatycznej analizy opisanej wcześniej, lecz dotyczy innych grup ontologicznych genów: grupy funkcjonalne z zakresu wzrostu komórek, starzenia się a także procesu apoptozy. W pracy została dokonana analiza występowania i ekspresji genów mających wpływ na procesy atrezji pęcherzyka jajnikowego, a

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny
Weterynaryjnej

Katedra Chorób Dużych
Zwierząt i Klinika

ul. Nowoursynowska 100
02-797 Warszawa
+48 22 593 61 91



także opis profilu aktywności genów związanych z zaprogramowaną śmiercią komórki w kontekście pierwotnej hodowli *in vitro*.

Trzecia i ostatnia praca z cyklu (str.62-77), opublikowana w czasopiśmie *Histochemistry and Cell Biology*, punktowana na 100 pkt MNiSW, jest rozwinięciem poprzednich analiz i uzupełnieniem pełni obrazu transkryptomu komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni o analizę ekspresji genów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego. W pracy dokonano także wnikliwej analizy histologicznej jajników świń jak i pojedynczych wyodrębnionych pęcherzyków jajnikowych pobranych z próby 40 loszek wykorzystanych do cyklu badań.

We wszystkich trzech pracach z cyklu zostały wykorzystane te same metody: najpierw założenie hodowli pierwotnej z komórek *granulosa* pęcherzyków jajnikowych świń, a następnie izolacja materiału genetycznego i badanie ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy. Analiza wyników otrzymanych z mikromacierzy została przeprowadzona z wykorzystaniem ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych : DAVID i STRING. Wszystkie trzy prace składają się w jedną pełną analizę transkryptomu. Jedynym aspektem, którego zabrakło w opisywanej analizie jest rozróżnienie ekspresji danych genów w zależności od punktu czasowego pobrania materiału. W wynikach Autorka przedstawia zwiększenie/zmniejszenie ekspresji w odniesieniu do punktu „0” hodowli, brak jednak opisanie różnic pomiędzy wykorzystanymi punktami czasowymi: 48h, 96h, 144h. Taka analiza wydaje się istotnym punktem odniesienia w przypadku interpretacji wpływu hodowli *in vitro* na ekspresję genów, niezależnie od ich grupy ontologicznej.

Doktorantka w swojej pracy posługuje się systemem DAVID – Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery. Jest to jeden z

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny
Weterynaryjnej

Katedra Chorób Dużych
Zwierząt i Klinika

ul. Nowoursynowska 100
02-797 Warszawa
+48 22 593 61 91



wielu istniejących systemów zintegrowanych badań ontologii i sieci interakcji genów. Innym systemem, wykorzystywanym powszechnie w badaniu zarówno interakcji jak i stopnia ekspresji genów jest system PANTHER. W porównaniu z DAVIDEM system PANTHER ma kilka zalet. System ten jest obecnie częścią GO i integruje bardziej zaktualizowane dane na temat ekspresji i ontologii genów. Po drugie, PANTHER umożliwia użytkownikom analizę danych genomowych z 82 organizmów za pomocą narzędzi online oraz ewaluację danych z innych organizmów korzystających z tego narzędzia. Takie możliwości wydają się być przydatnym elementem oceny, zwłaszcza w próbach ekstrapolacji uzyskanych danych na inne gatunki czy na człowieka, co było jednym z pośrednich założeń projektu jako pracy na modelu świni – dobrym modelu translacyjnym człowieka. Wydaje się, że takie porównanie mogłoby rozwinąć w przyszłości wnioski zawarte w pracy. Szlaki regeneracyjne, multipotencjalność komórek ziarnistych i inne zagadnienia poruszane w recenzowanym doktoracie są, wszakże interesujące także w kontekście aplikacyjnym medycyny człowieka. Według niektórych bioinformatyków drzewa filogenetyczne w bibliotece białek PANTHER umożliwiają użytkownikom dokonywanie dokładniejszych przewidywań ortologów, a tym samym znacznie poprawiać analizę i wzbogacić w przyszłości wnioski z przeprowadzonego badania. W rzeczywistości jednak DAVID pobiera dane PANTHER i integruje je w swojej analizie, co przemawia za jak najbardziej trafnym wyborem Doktorantki. Niemniej, porównanie użycia obu narzędzi bioinformatycznych mogłoby przynieść wiele korzyści. Takie porównania były już zestawiane w ramach rozszerzenia metod analitycznych stosowanych na przykład w onkologii i wspomaganym rozrodzie (Li W, Wang S, Qiu C, Liu Z, Zhou Q, Kong D, Ma X, Jiang J. *Comprehensive bioinformatics analysis of acquired progesterone resistance in endometrial cancer cell line*. J Transl Med. 2019 Feb 27;17(1):58, Xie J, Wu Z, Xu X, Liang G, Xu J. *Screening and identification of key genes and pathways in metastatic uveal melanoma*

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny
Weterynaryjnej

Katedra Chorób Dużych
Zwierząt i Klinika

ul. Nowoursynowska 100
02-797 Warszawa
+48 22 593 61 91



based on gene expression using bioinformatic analysis. Medicine (Baltimore). 2020 Oct 23;99(43), Talbott H, Hou X, Qiu F, Zhang P, Guda C, Yu F, Cushman RA, Wood JR, Wang C, Cupp AS, Davis JS. Transcriptomic and bioinformatics analysis of the early time-course of the response to prostaglandin F2 alpha in the bovine corpus luteum. Data Brief. 2017 Sep 1;14:695-706.)

Reasumując, oceniana rozprawa doktorska charakteryzuje się trafnością wyboru tematu. Przedstawiony w dysertacji cykl publikacji jest integralny tematycznie i w sposób znaczny przyczynia się do rozwoju tak ważnych dla medycyny i medycyny weterynaryjnej dyscyplin jakimi są genetyka, fizjologia i patologia rozrodu. Wyniki pracy stanowią także mocną podstawę do kontynuacji badań w poruszanych tu kierunkach badawczych. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną i świetnym warsztatem laboratoryjnym, a także umiejętnością twórczej dyskusji i celnej interpretacji uzyskanych wyników.

Z dużą satysfakcją stwierdzam, iż recenzowana praca doktorska Pani lekarz weterynarii Magdaleny Kulus stanowi dość oryginalne rozwiązanie przedstawionej problematyki badawczej spełniając tym samym wszystkie ustawowe wymogi i kryteria nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria – art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku; Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.z 2018 r poz.1668 ze zm.). Wobec powyższego zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie pracy doktorskiej Pani lekarz weterynarii Magdaleny Kulus do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorskość opracowanego tematu, wkład pracy, a w szczególności wysokie współczynniki naukometryczne czasopism, w których został opublikowany cykl stanowiący postawę dysertacji, **wnioskuje o wyróżnienie niniejszej pracy.**

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny
Weterynaryjnej

Katedra Chorób Dużych
Zwierząt i Klinika

ul. Nowoursynowska 100
02-797 Warszawa
+48 22 593 61 91

12.04.2021

Grzegorz