

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek wet Magdaleny Kulus

Wykonana na zlecenie Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego – pismo z dnia 18 maja 2021 r.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska 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" została wykonana pod kierunkiem dr hab. Pawła Antosika. Obejmuje monotematyczny cykl 3 publikacji oraz opracowanie zawierające krótki wstęp, cel, opis metodyki, skrócone wyniki i dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz streszczenie w jęz. polskim i angielskim.

Na cykl publikacji składają się prace:

1. Kulus M, Sujka-Kordowska P, Konwerska A, Celichowski P, Kranc W, Kulus J, Piotrowska-Kempisty H, Antosik P, Bukowska D, Iżycki D, Bruska M, Zabel M, Nowicki M, Kempisty B. 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. *Int Journal of Molecular Sciences* 2019, 20, 3966 (140; IF 4.556) -14 współautorów
2. Kulus M, Kranc W, Sujka-Kordowska P, Mozdziak P, Jankowski M, Konwerska A, Kulus J, Bukowska D, Skowroński MT, Piotrowska-Kempisty H, Nowicki M, Kempisty B, Antosik P. The process of cellular growth, aging and programmed cell death are involved in lifespan of ovarian granulosa cells during short term IVC: study based on animal model. *Theriogenology* 2020,148, 76-88 (140; IF 2.094) – 13 współautorów



3. Kulus M, Kranc W, Sujka-Kordowska P, Celichowski P, Konwerska A, Jankowski M, Jeseta M, Skowroński MT, Piotrowska-Kempisty H, Bukowska D, Zabel M, Bruska M, Mozdziak P, Kempisty B, Antosik P. Transcriptomic analysis of expression of genes regulating cell cycle progression in porcine ovarian granulosa cells during short-term in vitro primary culture. *Histochemistry and Cell Biology* 2020,153, 397-412 (100; IF 3.418) – 15 współautorów

Cykl jest zwarty tematycznie i przygotowany z większościovym (według załączonych oświadczeń współautorów) udziałem Doktorantki obejmującym współdziałanie w wykonaniu analiz, interpretacji wyników oraz przygotowaniu maszynopisów. Sumaryczny IF publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej wynosi 10.06.

Na podkreślenie zasługuje uzyskanie współfinansowania na realizację pracy z Narodowego Centrum Nauki (2016/21/B/NZ9/03535). Zatem weryfikacja założonych tez była dokonana na poziomie NCN oraz Edytorów czasopism.

Procesy odbywające się w jajniku w przebiegu cyklu mają ogromne znaczenie dla prawidłowego rozrodu. Podlegają skomplikowanym procesom regulacji, które w części pozostają nadal niewyjaśnione. Regulacja ta wymaga stymulacji ekspresji wybranych genów, które zawierają informacje o określonych białkach, które z kolei muszą być zsyntetyzowane i uaktywnione, żeby regulacja miała szansę zadziałać. Dlatego każde opracowanie, które przybliży nowe, nieznanne aspekty mechanizmu działania komórek ziarnistych jajnika jest jak najbardziej uzasadnione. Tak jest właśnie w przypadku przedstawionej do recenzji pracy, gdzie wykorzystane są nowoczesne i specjalistyczne metody laboratoryjne do oceny zmian w ekspresji genów w pierwotnej hodowli komórek ziarnistych jajnika świń w czasie. Chociaż należy pamiętać, że jest to tylko fragment logicznej sekwencji zdarzeń w procesie regulacji, który może w ostatecznym efekcie doprowadzić do syntezy danego białka lub nie. Oznaczenie samej ekspresji genów nie daje gwarancji zaistnienia syntezy zapisanej w nich sekwencji łańcucha aminokwasowego ani jego aktywacji w postaci zwinięcia w strukturę wtórną czy ostatecznie „wykonania” działania biochemicznego np. aktywności katalitycznej zsyntetyzowanego w ten sposób enzymu.



Autorka postawiła następujący cel główny:

- Określenie profilu ekspresji wybranych genów regulujących procesy wzrostu, różnicowania i apoptozy w jajnikowych komórkach ziarnistych świni podczas pierwotnej hodowli in vitro

oraz cele szczegółowe:

- Izolacja oraz ustalenie warunków krótkoterminowej hodowli in vitro jajnikowych komórek ziarnistych świni domowej
- Analiza profilu ekspresji genów przy wykorzystaniu metody mikromacierzy (typu Affymetrix)
- Walidacja uzyskanych wyników ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-qPCR

Do badań we wszystkich 3 pracach wykorzystano pierwotne hodowle komórek ziarnistych wyizolowanych z jajników świń. Komórki hodowano przez 48, 96, 144 godziny i oznaczano ekspresję genów 2 metodami w układzie dynamicznym. Wyniki wzbogaciły preparaty histologiczne barwione HE. Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu narzędzi bioinformatycznych, które pozwalają na potencjalne przewidywanie interakcji pomiędzy genami oraz zmiany w ich ekspresji.

Stronę metodyczną oceniam jako adekwatnie wybraną do zdefiniowanych przez Doktorantkę celów i aktualnie akceptowaną dla opracowań typu doktoratu co potwierdzili recenzenci czasopism gdzie przyjęto maszynopisy do druku. Metodyka oraz narzędzia do przedstawienia wyników są identyczne w każdej z prac, prace różnią się wyborem grup analizowanych genów.

W oparciu o zdefiniowane cele uzyskano wyniki, które umożliwiły wyciągnięcie 5 wniosków.

Uzyskane wyniki pozwoliły na zdefiniowanie potencjalnej obecności procesów, za które mogą odpowiadać wyselekcjonowane geny w różnych grupach ontologicznych w warunkach doświadczenia czyli hodowli komórek ziarnistych w różnym czasie. W 3 publikacjach wykazano, zmiany w ekspresji wybranych genów w trakcie hodowli co zinterpretowano jako zmiany w intensywności procesów za które potencjalnie mogłyby te geny odpowiadać. Przeanalizowano kilka grup ontologicznych obejmujących procesy,



które w warunkach doświadczenia miały znaczenie – morfogenezę komórkową, rozwój komórek, różnicowanie komórek, apoptozę, starzenie się komórek, wzrost komórek, regulację śmierci komórkowej, dodatnią i ujemną regulację śmierci komórkowej, cykl komórkowy czy podział komórki. Wyniki badań mikromacierzy potwierdzono metodą PCR do której wybrano geny o największej i najmniejszej ekspresji w czasie hodowli. Uzyskany profil transkryptomyczny może być wykorzystany do dalszych badań nad biochemicznymi mechanizmami wzrostu, różnicowania i apoptozy w jajnikowych komórkach ziarnistych.

Przedstawione w 3 pracach wyniki mają charakter deskryptywny przedstawiający zaistniałe zmiany w zdefiniowanym czasie w warunkach hodowli. Wnoszą wartość poznawczą i wkład w dalsze badania nad aspektami proteomicznymi i metabolomicznymi działania komórek ziarnistych jajnika świni. W konsekwencji mogą w przyszłości przyczynić się do zdefiniowania ich profilu metabolicznego i aktywności biologicznej.

Opracowanie i podsumowanie nie jest przedmiotem niniejszej oceny. Niezręcznie także komentować już opublikowane prace, których poprawić się nie da ale z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na brak informacji o gatunku użytych zwierząt w tytule 2 z 3 maszynopisów.

Opracowanie jest przygotowane niestarannie i nie zawsze jest spójne z publikacjami. W publikacji nr 1 pojawia się zdanie – „Our previous experience has shown that porcine granulosa cells can be cultured in vitro in short term culture” i cytowanie pracy z 2013 podczas gdy w 1 celu szczegółowym z opracowania wymienia się: izolację i ustalenie warunków krótkoterminowej hodowli. Cel publikacji 1 również w tym kontekście niespójny, mógłby być lepiej sformułowany i nie powinien być powtarzany na końcu wstępu ponownie.

Generalnie definicja celu zarówno w opracowaniu jak i w publikacjach powinna być sformułowana inaczej – ocena ekspresji genów powinna być narzędziem i służyć rozwiązaniu problemu a nie być celem samym w sobie. Nie można określać walidacji wyników jako celu badań. Celu nie powtarza się w pierwszym akapicie podsumowania. Ostatecznie nie ma odniesienia do „ustalania warunków hodowli” w pracach złożonych



jako rozprawa doktorska. Wprowadzenie wspomina o zasadniczym celu badań czyli transkryptomice marginalnie w ostatnich liniijkach tekstu. Wnioski nr 3 i 4 mogłyby być sformułowane inaczej żeby uniknąć wrażenia powtórki wyników.

Być może potwierdzenie czy ekspresja badanych genów była efektywna i czy otrzymano w jej wyniku białka biologicznie aktywne wykracza poza opracowanie rozprawy doktorskiej ale zarówno w opracowaniu jak i w publikacjach wspomina się o tym aspekcie bardzo marginalnie a przecież brak tego potwierdzenia znacząco obniża wagę uzyskanych wyników. Autorzy jedynie deklarują uzyskane wyniki jako wstępne.

Najwięcej zastrzeżeń budzi wieloautorskość prac zgłoszonych jako rozprawa doktorska. Rozprawa powinna być pracą samodzielną doktoranta. Jeśli wymagała tak dużej pomocy może powinna być zaplanowana inaczej. Mimo, że z formalnego punktu widzenia nie jest to niedopuszczalne w opinii Recenzenta zgłaszanie publikacji 13, 14 czy 15 autorskich jako rozprawy doktorskiej jest niewłaściwe.

Wniosek końcowy

Recenzowana rozprawa doktorska formalnie (w oparciu o oświadczenia współautorów) odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.z 2018 r. poz. 1668 ze zm.).

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


Kierownik Katedry Biochemii
Prof. dr hab. Marta Kankofer

