



Dr hab. Zbigniew Arent, prof. URK
Ośrodek Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej
Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Rolniczy im Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, 08.03.2024 r

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana lek. wet. Jakuba Kulusa

z tytułu: „Ekspresja wybranych genów związanych z sygnalizacją międzykomórkową oraz strukturą komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego u świni domowej podczas krótkoterminowej pierwotnej hodowli in vitro”

Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. Pawła Antosika, prof. UMK
z Katedry Diagnostyki i Nauk Klinicznych Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska, autorstwa Pana lek. wet. Jakuba Kulusa, zatytułowana „Ekspresja wybranych genów związanych z sygnalizacją międzykomórkową oraz strukturą komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego u świni domowej podczas krótkoterminowej pierwotnej hodowli in vitro” złożona została z przyjętymi zasadami. Opiera się bowiem na trzech publikacjach anglojęzycznych. Publikacje te, ze względu na zawarte w nim treści w stopniu wystarczającym pozostają w zgodzie z tytułem rozprawy. Prace zostały opublikowane w czasopismach naukowych, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) posiadających sumaryczny współczynnik wpływu - impact factor (IF) równy 14,4 przy uwzględnieniu roku publikacji. Sumaryczna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wyniosła 340. Po zapoznaniu się z publikacjami oraz przedstawionym w języku polskim autoreferatem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne dla rozpraw doktorskich, określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.).

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska dotyczy ważnych procesów fizjologicznych i patologicznych zachodzących w obrębie jajnika, które wciąż spotykają się z dużym zainteresowaniem





naukowców. Proces folikulogenezy i oogenezy jest procesem złożonym. Wpływ na nie mają rozbudowane wzajemnie interakcje występujące w komórkach ziarnistych, ale również cytoszkielet, wraz z białkami transbłonowymi, a także macierzą zewnątrzkomórkową. Doktorant posługując się nowoczesnymi metodami mikromacierzy ekspresyjnych niewątpliwie przyczynił się do lepszego zrozumienia molekularnych podstaw tych procesów. Z tego względu podjęte przez Doktoranta badania są w pełni uzasadnione. Głównym celem rozprawy doktorskiej było określenie profilu transkryptomicznego genów regulujących wybrane procesy zachodzące w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni, utrzymywanych w trakcie ich krótkoterminowej pierwotnej hodowli *in vitro*.

Metodyka badawcza rozprawy doktorskiej została oparta na prowadzeniu pierwotnej hodowli *in vitro* komórek ziarnistych jajnika świni domowej oraz określeniu profilu ekspresji genów regulujących tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej, cytoszkieletu oraz uczestniczących w podziale komórki i sygnalizacji międzykomórkowej, szczególnie w oparciu o pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Materiał do badań stanowiły jajniki pozyskane poubojowo od 120 dojrzałych płciowo loszek świni domowej. Pobrane jajniki użyto do przygotowania hodowli pierwotnej komórek ziarnistych *in vitro*. W przeprowadzonym doświadczeniu wyznaczono przedziały czasowe 0, 48, 96 i 144 h, w których pozyskiwano komórki do dalszej izolacji całkowitego RNA. W kolejnym etapie wykorzystano metodę mikromacierzy ekspresyjnych do określenia profilu transkryptomicznego. W oparciu o bazy danych genów i ich produktów białkowych przeprowadzono analizę funkcjonalną. Dodatkowo walidację pozyskanych wyników przeprowadzono z zastosowaniem procedury RT-PCR.

Za pomocą tak skonstruowanego doświadczenia Doktorant realizował trzy szczegółowe zadania, sformułowane jako cele szczegółowe w rozdziale 3.2:

1. Badanie ekspresji wybranych genów biorących udział w steroidogenezie komórek ziarnistych jajnika świni.
2. Typowanie ścieżek sygnalizacyjnych biorących udział w integracji środowiska zewnątrz i wewnątrzkomórkowego komórek ziarnistych jajnika świni w hodowli *in vitro*.
3. Wytypowanie genów, które mogą być uznane w przyszłości za nowe markery folikulogenezy u świni domowej.





Badania odpowiadające celom szczegółowym prowadzone były w trzech etapach, z których rezultaty opublikowano w oryginalnych pracach badawczych. W pierwszym etapie Doktorant wykazał zwiększoną ekspresję genów odpowiedzialnych za skład i funkcjonowanie macierzy zewnątrzkomórkowej. Doktorant wskazał, że geny takie, odpowiedzialne za tworzenie mikrośrodowiska komórek ziarnistych mogą być wykorzystywane w aspekcie terapii celowanej schorzeń w obrębie jajnika. W drugim etapie badań wykazano podwyższony poziom ekspresji grup ontologicznych genów warunkujących powstawanie cytoszkieletu. W ostatnim, trzecim etapie przedstawiono analizę ekspresji genów zaangażowanych w adhezję komórkową, proliferację, migrację oraz produkcję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracach:

Jakub Kulus, Magalena Kulus, Wiesława Kranc, Karol Jopek, Maciej Zdun, Małgorzata Józkowiak, Jędrzej M. Jaśkowski, Hanna Piotrowska-Kempisty, Dorota Bukowska, Paweł Antosik, Paul Mozdziak, Bartosz Kepmisty: *Transcriptomic Profile of New Gene Markers Encoding Proteins Responsible for Structure of Porcine Ovarian Granulosa Cells*. Biology, 2021, 10, nr 11, nr art 1214, DOI: 10.3390/biology10111214.

Jakub Kulus, Wiesława Kranc, Magalena Kulus, Piotr Dzięgiel, Dorota Bukowska, Paul Mozdziak, Bartosz Kepmisty, Paweł Antosik: *Expression of genes regulating cell division in porcine follicular granulosa cells*. Cell Division, 2023, 18, 1-22. DOI:10.1186/s13008-023-00094-7.

Jakub Kulus, Wiesława Kranc, Magdalena Kulus, Dorota Bukowska, Hanna Piotrowska-Kempisty, Paul Mozdziak, Bartosz Kepmisty, Paweł Antosik: *New Gene Markers of Exosomal Regulation Are Involved in Porcine Granulosa Cell Adhesion, Migration, and Proliferation*. International Journal of Molecular Science, 2023, 24, nr 14, art. Nr. 11873, DOI: 10.3390/ijms241411873.

Na podstawie powyżej przedstawionych faktów uważam, że Doktorant postawił sobie za cel oryginalny problem naukowy i z sukcesem go rozwiązał. Autor sformułował 5 wniosków, które zostały wyciągnięte logicznie na podstawie uzyskanych wyników. Dodatkowo na każdym etapie swoich badań Doktorant starał się wskazać na możliwość wykorzystania swoich badań w przyszłości w technikach





wspomaganego rozrodu prowadzonych *in vitro* czy też w aspektach dotyczących lepszego poznania patofizjologii zaburzeń w obrębie jajnika.

W podsumowaniu analizy uzyskanych przez Pana lek. wet. Jakuba Kulusa wyników stwierdzam, że Doktorant wykazał, że potrafi zaplanować i przeprowadzić badania naukowe, a następnie opisać je i opublikować w wysoko punktowanych czasopismach. Wykazał się również szeroką wiedzą w zakresie prowadzonych badań, co udowodnił we wstępie i dyskusji polskiego opisu rozprawy jak również w poszczególnych trzech publikacjach. Potrafił posłużyć się odpowiednimi nowoczesnymi metodami laboratoryjnymi, właściwie zinterpretować uzyskane wyniki ekspresji genów w zaplanowanym doświadczeniu oraz powiązać je z odpowiednimi szlakami komórkowymi. Dodatkowo Doktorant potrafi dobrać odpowiednie narzędzia bioinformatyczne oraz zaawansowane programy statystyczne do rozwiązania postawionego sobie celu naukowego. Praca ma cenne walory poznawcze, ale również wskazuje na możliwości ich praktycznego zastosowania. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozumieniu roli wielu genów oraz produktów ich ekspresji w procesach fizjologicznych jak i patologicznych w obrębie jajnika. Wskazuje to, że spełnione zostały ustawowe kryteria merytoryczne, jakimi powinni wykazać się kandydaci do stopnia doktora.

Analizując tą bardzo ciekawą rozprawę doktorską, nasunęły mi się następujące pytania i uwagi, o ustosunkowanie się do których proszę Doktoranta podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej:

1. W rozdziale 3.2 Cel badań Doktorant podaje cele szczegółowe. Pierwszy z nich to „Badanie ekspresji wybranych genów biorących udział w steroidogenezie komórek ziarnistych jajnika świni w warunkach *in vitro*”. W moim odczuciu takie sformułowanie jest błędne, gdyż samo badanie nie jest celem. Celem takiego badania może być np. poznanie ekspresji genów. Jednak ten błąd w sformułowaniu zauważyłem jedynie w polskim opisie dysertacji, nie zauważyłem go w opublikowanych pracach.
2. Dopytać chciałbym również o dobór głównej metody używanej przez Doktoranta w prowadzonych badaniach transkryptomicznych. Do profilowania transkryptomicznego używane są obecnie dwie techniki, a mianowicie, stosowane przez Doktoranta mikromacierze





ekspresyjne, ale również sekwencjonowanie RNA (RNA-Seq). Za pomocą tej drugiej można badać zarówno znane, jak i odkrywać nowe transkrypty. Co zdecydowało, że doktorant do poznania ekspresji genów posłużył się techniką mikromacierzy?

Dysertacja, oraz stanowiące jej część publikacje zostały przygotowane jasno i przejrzysto i dają podstawy, aby uznać że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pana lek. wet. Jakuba Kulusa pt. *„Ekspresja wybranych genów związanych z sygnalizacją międzykomórkową oraz strukturą komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego u świni domowej podczas krótkoterminowej pierwotnej hodowli in vitro”* przygotowana pod opieką dr hab. Pawła Antosika, prof. URK spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.).

Wnioskuje zatem o dopuszczenie przez Radę Dyscypliny weterynarii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Pana lek. wet. Jakuba Kulusa do dalszych procedur związanych z nadaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych. Ponadto, biorąc pod uwagę przedstawione powyżej argumenty dotyczące walorów naukowych i praktycznych ocenianej pracy oraz opublikowanie wyników w renomowanych, wysoko punktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym wnioskuję o wyróżnienie ocenianej dysertacji i jej Autora zgodnie z przepisami obowiązującymi w UMK w Toruniu.

Dr hab. Zbigniew Arent, prof. URK

