

Prof. dr hab. Emilia Bagnicka  
Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki  
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Aleksandra Kowala**  
**pt. „Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych**  
**gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)”**  
**wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Brygidy Ślaskiej – Promotora,**  
**w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo**  
**na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie,**  
**Wydziale Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,**  
**w Instytucie Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej.**

Rozprawa doktorska Pana mgr. Krzysztofa Kowala dotyczy niezwykle istotnego zagadnienia jakim są nowotwory zwierząt towarzyszących. W ostatnim czasie częstotliwość występowania tego schorzenia u psów znacznie wzrosła, przy czym rak sutka jest drugim pod względem częstotliwości występowania nowotworem, pojawiającym się zwykle w starszym wieku zwierząt (średnio 10 lat). Informację tę potwierdził również Doktorant w ocenianej rozprawie doktorskiej, gdyż wiek przeważającej liczby badanych zwierząt to 9 i więcej lat (ponad 50 lat w przeliczeniu na wiek człowieka). Sterylizacja suk w młodym wieku znacznie ogranicza częstość występowania nowotworów, jednak może powodować inne dolegliwości zdrowotne zwierząt. Nie wszyscy właściciele decydują się na przeprowadzenie tego zabiegu. Nastąpiła też antropomorfizacja i humanizacja zwierząt, przede wszystkim zwierząt towarzyszących, co, nawiasem mówiąc, prowadzi do zaburzeń dobrostanu zwierząt. Większość właścicieli zwierząt towarzyszących traktuje je jak członka rodziny, stąd w przypadku wystąpienia choroby prowadzona jest intensywna terapia.

Z drugiej strony procesy patofizjologiczne zachodzące podczas nowotworzenia, w tym podczas rozwoju nowotworów gruczołu sutkowego suk, mogą być modelem zwierzęcym dla chorób nowotworowych ludzi. Zatem podjęcie tej tematyki uważam za w pełni uzasadnione. Dotyczy ona aktualnych zagadnień, a otrzymane wyniki mają duże znaczenie nie tylko poznawcze, ale i aplikacyjne, np. opracowanie molekularnych biomarkerów nowotworów gruczołu sutkowego.

Dzięki nowoczesnym metodom i technikom genetyki molekularnej onkologia zwierząt towarzyszących również się rozwija. Poszukiwanie związku polimorfizmu genów lub poziomu ekspresji genów z wystąpieniem danego typu nowotworu daje bardzo obiecujące wyniki. Dotychczasowe badania skupione były przede wszystkim na analizie genomowego DNA lub analizowane były pojedyncze geny mitochondrialnego DNA. Natomiast celem dysertacji było poszukiwanie mutacji i polimorfizmów w całym mitochondrialnym genomie, nie tylko w genach kodujących białka, ale i kodujących cząsteczki

tRNA i rRNA, a następnie powiązanie ich z przebiegiem procesu transformacji nowotworowej gruczołu sutkowego suk.

Badania nad mitochondrialnym DNA, w tym psów, były podjęte przez zespół prof. dr hab. Brygidy Ślaskiej, Promotorkę niniejszej dysertacji już dekadę temu. W ramach pracy tego zespołu powstał przedstawiony mi do oceny doktorat. We wcześniejszych badaniach zespół zajmował się analizą mitochondrialnego DNA, a w zasadzie analizą poszczególnych genów lub jego fragmentów, nie tylko różnych gatunków zwierząt, ale i ludzi, między innymi również w aspekcie nowotworów gruczołu sutkowego. Naturalną kontynuacją pracy zespołu była więc analiza polimorfizmów w całym mitochondrialnym genomie psa, łącznie z regionem niekodującym, przy zastosowaniu nowoczesnych metod i technik genetyki molekularnej wraz z odpowiednią analizą bioinformatyczną, które nie były wykorzystywane dotychczas w poprzednich pracach zespołu. Należy podkreślić, że podobne badania są nieliczne w świecie i jak dotąd jedyne w Polsce.

Badania będące podstawą ocenianej dysertacji prowadzono w ramach projektu badawczego OPUS 18 2019/35/B/NZ5/00775 finansowanego przez NCN, którego kierownikiem jest Pani Promotor oraz projektu nr SzD/6/ZiR/2020 finansowanego przez Szkołę Doktorską Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Na przedstawioną do oceny pracę składają się trzy spójne tematycznie publikacje oryginalne, opublikowane w latach 2019 i 2022:

1. Kowal, K., Ślaska, B., Bownik, A., Horecka, B., Gawor, J., Śmiech, A., Tkaczyk, A. (2019). Analysis of mitochondrial genome from Labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms. *Annals of Animal Science*, 19(3), 619-632. DOI: 10.2478/aoas-2019-0027
2. Kowal, K., Tkaczyk-Wlizło, A., Pierzchała, M., Gawor, J., Ślaska, B. (2022). Molecular differences in mitochondrial DNA genomes of dogs with malignant mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 20(1), 256-264. <https://doi.org/10.1111/vco.12772>
3. Kowal, K., Tkaczyk-Wlizło, A., Pierzchała, M., Ślaska, B. (2022). Evaluation of the tRNA-Leu (UUR) gene haplotype profile observed in canine mammary gland tumours based on comparative analysis with the MT-TL1 human gene. *Annals of Animal Science*, 22(3), 915-922. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0009>

Impact Factor czasopisma *Annals of Animal Science* w roku ukazania się pierwszej publikacji był równy 1,572, a drugiej 2,667, a czasopismo plasowało i plasuje się w kwartylu drugim obszaru *Animal Science and Zoology*. W 2019 roku wydawnictwo znajdowało się na liście czasopism naukowych MEiN z liczbą 100 pkt, a w 2022 roku z liczbą 140 pkt.

IF czasopisma *Veterinary and Comparative Oncology* w roku ukazania się publikacji wynosił 2,385, co plasuje to czasopismo wg. bazy *Web of Science* w Q1 w obszarze nauk weterynaria. W wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MEiN czasopismu przypisano 200 pkt i zaliczane jest także do dyscypliny zootechnika i rybactwo.

Sumaryczny IF rozprawy wynosi 6,624, co w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo jest bardzo dobrym osiągnięciem. Łączna liczba punktów MEiN wynosi 440.

We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem. Do opracowania dołączono oświadczenia zarówno Doktoranta, jak i współautorów, w których dokładnie przedstawiono wkład pracy każdego ze współautorów oraz ich udział procentowy. Z oświadczeń wynika, iż wkład Doktoranta w powstanie prac był wiodący; wynosił odpowiednio 60% w dwóch pracach i 70% w ostatniej pracy i polegał przede wszystkim na udziale w opracowaniu koncepcji pracy i założeń metodycznych, wykonaniu analiz laboratoryjnych z zakresu genetyki molekularnej, analiz bioinformatycznych, interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptów artykułów oraz współudziale w odpowiedziach na recenzje.

Należy podkreślić, że Doktorant opanował konieczne metody analiz biologii molekularnej, a jedynie analizy NGS były wykonywane przez laboratorium komercyjne oraz analizy histopatologiczne były przeprowadzone przez dr hab. Annę Śmiech, prof. uczelni z Katedry Patomorfologii i Weterynarii Sądowej. Korzystał też z konsultacji odnośnie analiz bioinformatycznych oraz wyników badań sekwencji białkowych.

Wyżej wymienione prace zostały opatrzone omówieniem w języku polskim, ze streszczeniem w języku polskim i angielskim. Dołączono także, poza wspomnianymi już oświadczeniami współautorów, wykaz skrótów i publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej.

We wstępie liczącym 4 strony, doktorant przedstawił krótko stan aktualnej wiedzy dotyczącej m.in. molekularnych podstaw nowotworzenia u psów. Szczególny nacisk Doktorant położył na omówienie doniesień o związku zmian w mitochondrialnym DNA z występowaniem różnych typów nowotworów psów. Większość tych informacji pochodziła z wcześniejszych prac zespołu prof. dr hab. Brygidy Ślaskiej, ze względu na ograniczoną liczbę opublikowanych prac dotyczących analizowanego problemu.

Następny rozdział przedstawia trzy hipotezy badawcze i cel badań. Doktorant przedstawił cel swojej pracy jako poszukiwanie powiązań procesu transformacji nowotworowej w złośliwych nowotworach gruczołu mlekowego psa z czynnikami o potencjalnym znaczeniu prognostycznym z wykorzystaniem identyfikacji defektów w całym genomie mitochondrialnym metodą NGS, a następnie narzędzi bioinformatycznych.

W kolejnym rozdziale Doktorant w sposób jasny przedstawił materiał i szczegółową metodykę swych badań. Wyniki poszczególnych prac Doktorant przedstawił w osobnych podrozdziałach, a następnie przeprowadził dyskusję, łączną dla wszystkich prac, omawiając i interpretując uzyskane wyniki oraz konfrontując je z danymi literaturowymi, przede wszystkim informacjami uzyskanymi w badaniach na ludziach, z braku odpowiednio obszernej literatury dotyczącej nowotworów psów.

Metodyki analiz zostały przedstawione w opublikowanych artykułach, podlegały już zatem recenzji i są adekwatne do zaplanowanego zakresu badań.

Pierwsza z publikacji przedstawia wyniki badań wstępnych – przeanalizowano sekwencję mtDNA, wyizolowanego z próbek krwi i guza, pobranych od 9-cio letniej suki rasy labrador ze zdiagnozowanym rakiem cewkowo-brodawkowatym gruczołu sutkowego, o średnim stopniu złośliwości. Brak jest jednak informacji, zarówno w dysertacji, jak i opublikowanej pracy o liczbie powtórzeń analiz.

Kolejny etap objął już analizę próbek krwi i tkanki nowotworowej pobranych od 13 zwierząt, przy czym od jednego zwierzęcia pobrano próbki dwóch guzów nowotworowych jednakowego typu. Tym razem analizowano próbki trzech typów nowotworów, jednak raka płaskonabłonkowego rogowaciejącego (*carcinoma planoepitheliale keratodes*) stwierdzono tylko u jednego zwierzęcia. Oczywiście jest, że

wyniki analiz pojedynczej próbki nie są reprezentatywne, jednak warte przedstawienia jako wyniki badań wstępnych, co zostało podkreślone w opublikowanej pracy.

Ostatnia praca opierała się na wynikach NGS, omówionych w pracy drugiej, jednak skupiono się na związku między zmianami w genie kodującym tRNA-LEU z antykodonem UUR a procesem kancerogenezy. W pracy wykazano homologię z ludzkim mitochondrialnym genem MT-TL1, również kodującym tRNA dla leucyny. Mutacja w tym genie związana jest z ludzkim zespołem MELAS (miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa i udar). Mutację tę powiązano również z różnymi typami raka ludzi, zatem jest prawdopodobne, iż mutacja ta występująca u psów jest także powiązana z nowotworem złośliwym gruczołu sutkowego.

Należy podkreślić zakres analiz sekwencji genów przy wykorzystaniu najnowszych technik genetyki molekularnej oraz zakres analiz bioinformatycznych. Wyniki NGS zostały zdeponowane w bazie NCBI BioProject pod numerem PRJNA679417. Doktorant nie ograniczył się do wykrycia miejsc polimorficznych przez porównanie sekwencji DNA wyizolowanego z krwi i tkanek guzów, ale przeprowadził też analizę *in silico* np. w celu określenia struktury tRNA oraz drugorzędnych cech strukturalnych białek mitochondrialnych, czy przewidzenia efektu zmian niesynonimicznych na sekwencję aminokwasową tych białek. Doktorant ocenił również, przy wykorzystaniu odpowiedniego narzędzia bioinformatycznego, prawdopodobieństwo, iż dana mutacja może być szkodliwa, gdyż uważa się, że mutacje niesynonimiczne są w dużej mierze szkodliwe ze względu na ich właściwość zmiany aminokwasów, a mutacje nonsensowne indukują skrócone białka. Nasuwa się pytanie, dlaczego Doktorant nie zaplanował przeprowadzenia analiz białek mitochondrialnych w celu potwierdzenia wyników analiz *in silico* i czy planuje przeprowadzenie takich analiz w przyszłości na tym samym, a może innym, materiale.

W ramach badań przeprowadzono również analizę *in silico* regionu VNTR (zmienna liczba tandemowych powtórzeń), na podstawie której wyciągnięto wnioski o istnieniu wyspy CpG w tym regionie. Wysznuło przypuszczenie, że zmiany w tym regionie mogą wpływać na modyfikacje epigenetyczne tej wyspy wskazując, że hipoteza ta powinna być sprawdzona empirycznie. Znowu nasuwa się pytanie, czy Doktorant i zespół ma w planach przeprowadzenie takich analiz w przyszłości.

Kolejna hipoteza postawiona przez Doktoranta dotyczy prawdopodobnego zmniejszenia liczby kopii mtDNA w komórkach nowotworowych psów na podstawie podobieństw między rakiem piersi kobiet a gruczołu sutkowego suk. Badania takie nie były jeszcze prowadzone, stąd kolejne pytanie o plany Doktoranta w tym zakresie.

Zarówno w przedstawionej dysertacji, jak i opublikowanej pracy (praca druga) zabrakło głębszej analizy funkcji produktu białkowego genu *ATP8*, mimo, iż autorzy podkreślali, iż w badanej próbie z populacji okazał się jedynym, w którym nie zaobserwowano mutacji i polimorfizmów. Produkt białkowy tego genu wydaje się być zaangażowany w przebieg wielu chorób ludzi, w tym raka pęcherza moczowego. Ponadto w badaniach z udziałem Promotorki niniejszej dysertacji zidentyfikowano 5 zmian w genie *ATP8* w 10 (na 50 zbadanych) próbkach komórek raka piersi. Czy nie byłaby zasadna dogłębna analiza funkcji produktów białkowych tego genu?

Kolejny rozdział dysertacji to „Podsumowanie i wnioski”, które były prezentowane w opublikowanych już artykułach. Wnioski są sformułowane poprawnie. Bardzo interesujący wniosek został wysnuty na podstawie wyników wskazujących na łagodny charakter efektu fenotypowego zidentyfikowanych

polimorfizmów i mutacji w 12 (z 13) genów kodujących mitochondrialne białka, gdyż genomy mitochondrialne zawierające szkodliwe mutacje obecne w komórkach nowotworowych są efektywnie eliminowane przez reaktywne formy tlenu nadmiernie produkowane przez mitochondria o podwyższonej aktywności jaka występuje w komórkach nowotworowych. Kolejny interesujący wniosek, nie wspomniany dotychczas przeze mnie, mówi, iż punktowe zmiany w mtDNA mogą wpływać na więcej niż jeden gen.

Kolejny rozdział to Literatura, zawierający 78 pozycji o zasięgu światowym, w przeważającej większości opublikowanych w ostatnich 15 latach. Niedociągnięcia redakcyjne w tej części pracy: brak kompletnych danych bibliograficznych dla wielu pozycji.

#### **Drobne uwagi redakcyjne do całości pracy:**

Kandydat nie ustrzegł się kilku potknięć językowych, redakcyjnych, czy interpunkcyjnych (np. przecinek przed „oraz”), jednak należy podkreślić, że błędy są nieliczne. Są to rusycyzmy, np. : „Zaobserwowano również tendencję do dłuższego życia u psów o większej różnorodności genetycznej”, zamiast „życia psów”. Niektóre sformułowania, czy wyrażenia są zastosowane niefortunnie, np. „...zwiększają się również oczekiwania właścicieli i hodowców psów wobec szybkiej i precyzyjnej diagnostyki...” – słowo „wobec” powinno być zastąpione np. wyrażeniem „odnośnie”. Trafiało się powtórzenie wyrazu w zdaniu, czy skrót myślowy „...poziom ekspresji genu *BRCA2* jest obniżony w próbach gruczołów nowotworowych...” (strona 12, pierwszy akapit od góry). Niejasnym jest też, czy chodziło o próbę jako serię próbek z populacji, czy jednak było to błędne nazwanie próbek pobranych do analiz genetycznych „próbami”. Należy również zauważyć, że jeżeli mówimy, iż istnieje związek między zmienną niezależną a zależną oznacza to, że zależność została przeanalizowana statystycznie i nie ma potrzeby dodawania informacji, iż związek jest istotny statystycznie (strona 13, akapit drugi). W tabeli 1, zamieszczonej w rozdziale Materiał i metody zabrakło informacji w jakiej jednostce podano wiek badanych psów (strona 18). Przy omawianiu wyników również wkraść się skrót myślowy w wyrażeniu „Po raz pierwszy w światowej literaturze dokonano resekwencjonowania genomu...” (strona 19, akapit pierwszy). W zdaniu „...zaś zmiana p.Met1Val miała szkodliwy efekt na białko NDL4 zgodnie z klasyfikacją SIFT” Doktorant stworzył kalkę z języka angielskiego słowa „effect” oraz nie wyjaśnił co oznacza skrót SIFT i jakie są zasady klasyfikacji zmian niesynonimicznych (strona 21). Wynik SIFT przedstawiony został również w tabeli 4 i 5 bez wyjaśnienia tych zasad.

#### **Wymienione powyżej uwagi nie umniejszają wartości naukowej pracy.**

W podsumowaniu stwierdzam, rozprawa doktorska mgr. Krzysztofa Aleksandra Kowala pt. „Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Brygidy Ślaskiej - Promotora w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo, na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie, Wydziale Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, w Instytucie Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej stanowi ważny wkład w badania nad nowotworami psów, będących jednocześnie modelem do badań nad nowotworami ludzi. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż są to, jak do tej pory, jedyne w Polsce i jedne z pierwszych na świecie badania dotyczące tych zagadnień. Prezentowana praca wskazuje na dobre przygotowanie teoretyczne Doktoranta, znajomość metod genetyki molekularnej oraz przede wszystkim narzędzi bioinformatycznych, umiejętność planowania i przeprowadzania badań naukowych, analizowania wyników i ich interpretacji oraz przygotowywania manuskryptów do publikacji.

**Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022 r. poz. 574) i zwracam się do Rady Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. Krzysztofa Aleksandra Kowala do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, ze względu na **nowatorską tematykę badawczą i wysoką wartość naukową** niniejszej rozprawy, potwierdzoną opublikowaniem uzyskanych wyników w renomowanych czasopismach naukowych z listy JCR oraz możliwością wykorzystania w przyszłości wyników przy typowaniu biomarkerów kancerogenezy u psów, **wnioskuje o wyróżnienie ocenianej pracy**. Jak już wspomniałam podobne badania są nieliczne w świecie i jedyne w Polsce. Po raz pierwszy zsekwencjonowano cały genom mitochondrialny, łącznie z całym regionem niekodującym przy użyciu metody NGS. Również po raz pierwszy opisano różnice między dwoma guzami tego samego typu histopatologicznego u jednego psa na poziomie molekularnym. Dowiedziono, że mutacje punktowe mtDNA mogą wpływać na więcej niż jeden gen. Ponadto wykazano, że mutacje w obszarze VNTR pętli D, mimo niekodującego charakteru tego obszaru, odgrywają istotną rolę w procesie transformacji nowotworowej, gdyż region ten jest związany z niestabilnością genetyczną komórek nowotworowych. Wyniki badań mogą przyczynić się do określenia położenia niekodującej części mtDNA, tj. pętli D w mitochondrialnym genomie.

Jastrzębiec, 08.05.2023

Prof. dr hab. Emilia Bagnicka

