

### Recenzja

#### **rozprawy doktorskiej Pana mgr Krzysztofa Kowala pt. „Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)”.**

Choroby cywilizacyjne, a zwłaszcza nowotwory, są obecnie głównym problemem w patologii nie tylko ludzi, ale także zwierząt towarzyszących człowiekowi – psów i kotów. Częstość występowania chorób nowotworowych u psów wydaje się wciąż wzrastać, co po części związane jest z faktem dokładniejszej diagnostyki, statystycznego wydłużenia życia zwierząt trzymanyh w domu, a także prawdopodobnie, jak to jest u ludzi, wiąże się z narażeniem na większą ilość czynników o działaniu rakotwórczym. Nowotwory gruczołu sutkowego psów stanowią ponad 13% wszystkich zmian nowotworowych rozpoznawanych u tego gatunku i zajmują drugie miejsce, po nowotworach skóry, pod względem częstości występowania.

Z tego punktu widzenia, z dużym uznaniem należy ocenić wybór tematyki pracy doktorskiej. Wpisuje się on bowiem w bardzo atrakcyjny problem naukowy, ponadto może także w przyszłości znaleźć zastosowanie aplikacyjne.

Za główny cel swoich badań Doktorant postawił sobie 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 psa metodą NGS oraz przy użyciu narzędzi bioinformatycznych. Badania te zostały przeprowadzone na materiale biologicznym, który stanowiły próby nowotworów oraz krew obwodowa pobrana od 14 psów, u których zdiagnozowano nowotwory złośliwe gruczołu mlekowego. Generalnie, oceniono występowanie mutacji w genomie mitochondrialnym psów z rakiem cewkowo-brodawkowatym G2 oraz u psów z guzami gruczołu mlekowego o złośliwości G1. W pracy zastosowano nowoczesne metody biologii molekularnej oraz analizy bioinformatyczne. Na uwagę zasługuje pionierskie zastosowanie Sekwencjonowania Następnej Generacji do analizy całego genomu mitochondrialnego, w tym całego regionu niekodującego, co w przyszłości może pozwolić na określenie położenia pętli D w genomie mitochondrialnym psa.

Oceniana rozprawa doktorska ma formę jednotematycznego cyklu trzech publikacji pod wspólnym tytułem „Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)”, uzupełnionym 37 stronicowym autoreferatem. Prace powyższego cyklu zostały opublikowane w renomowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych: *Annals of Animal Science* (2019 rok - MEiN = 100; IF' 2019 = 1,572 oraz 2022 rok - MEiN = 140; IF' 2021 = 2,667) jak również *Veterinary and Comparative Oncology* (2022 rok - MEiN = 200; IF' 2021 = 2,385). Publikacje te są wieloautorskie, przy czym udział Doktoranta w każdej z nich jest wiodący, został zadeklarowany na 60 - 70%, jest on również pierwszym autorem każdej z tych prac, co podkreśla jego wiodący udział w ich powstawaniu.

Towarzyszące publikacjom opracowanie, stanowi podsumowanie prowadzonych badań i zawiera wprowadzenie w badaną problematykę, zaprezentowanie hipotez badawczych, celu, materiału i metod, uzyskanych wyników oraz ich krótkie omówienie wraz z podsumowaniem i wnioskami oraz bibliografie. Uważam, że rozprawa doktorska w opisanym kształcie wraz z dokumentacją jest dobrze przygotowana, klarowna i zgodna z aktualnymi wymaganiami ustawowymi. Prace oryginalne stanowiące podstawę cyklu, w trakcie ich publikacji w renomowanych czasopismach, były poddane wnikliwym recenzjom wysokiej klasy recenzentów wydawniczych. Uważam, że fakt ten pozwala mi na pominięcie szczegółowego opisu i oceny tych eksperymentów a podsumowanie ich jako wartościowe i atrakcyjne opracowania naukowe.

Równie wysoko oceniam przedstawioną rozprawę doktorską jako całość, pragnąc przy tym podkreślić jej następujące walory:

- dobór tematyki badawczej oraz uzyskane wyniki cechujące się dużą oryginalnością naukową i wypełniające lukę w dotychczasowej literaturze światowej,
- złożoność metodyczna i zaawansowanie laboratoryjne prowadzonych badań, w których użyto nowoczesne wysokoprzepustowe techniki badawcze oraz analizy bioinformatyczne, niezbędne do uzyskania założonych celów badawczych,
- głębokie, naukowe znaczenie tych badań w aspekcie pionierskiego wykorzystanie technologii NGS w analizie zmian w całych genomach mitochondrialnych psów z nowotworami złośliwymi gruczołu mlekowego, co pozwoliło na określenie związku polimorfizmów, mutacji i heteroplazmii w mitochondrialnym DNA z transformacją nowotworową,
- poprawnie i zwięźle napisany autoreferat uzupełniający załączone publikacje, dobrze odzwierciedlający umiejętność i swobodne poruszanie się Doktoranta w obrębie badanej

problematyki naukowej z uwzględnieniem badań własnych oraz dotychczas opublikowanych prac,

- umiejętność pracy zespołowej, czego dowodem są wieloautorskie publikacje z zespołem z macierzystej jednostki, jak i z jednostek zewnętrznych,
- wspomniane wcześniej, opublikowanie wyników badań własnych w dobrych czasopismach naukowych, dopełnia ogólnego dobrego wrażenia i wysokiej oceny rozprawy doktorskiej. Dowodzi także odwagi naukowej i dążenia do konfrontowania swoich badań z szerokimi gremiami międzynarodowymi.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska bez wątpienia spełnia wymogi merytoryczne i formalne, stawiane tego typu opracowaniom. Stanowi bowiem oryginalny i istotny wkład do nauki, poszerzając wiedzę o genomie nowotworów, zwłaszcza w obszarze mutacji mitochondrialnego DNA. Rozprawa ta charakteryzuje się ciekawą i pionierską tematyką naukową, nowoczesną metodyką i poprawną realizacją, a także ciekawymi wynikami. Podkreślić należy, że w pracy dominują wątki poznawcze wnoszące nowe informacje naukowe o mutacjach mtDNA w nowotworach złośliwych gruczołu mlekowego u psów uzyskane na podstawie podań genomicznych.

Na szczególne uznanie zasługuje pionierskie wykorzystanie technologii NGS w analizie zmian w całych genomach mitochondrialnych psów z nowotworami złośliwymi gruczołu mlekowego, co pozwoliło na określenie związku polimorfizmów, mutacji i heteroplazmii w mitochondrialnym DNA z transformacją nowotworową oraz wykazanie iż regionem charakteryzującym się najwyższym poziomem mutacji oraz heteroplazmii w genomach mitochondrialnych psów ze złośliwym guzem gruczołu mlekowego był obszar zmiennej liczby powtórzeń tandemowych regionu niekodującego, który w przyszłości może być brany pod uwagę w typowaniu biomarkerów kancerogenezy u psów.

Jednakże pomimo tak wysokiej oceny niniejszej rozprawy doktorskiej, pragnę zadać kilka pytań na które nie znalazłam odpowiedzi w przedstawionym autoreferacie:

- w tabeli nr 1 opisującej charakterystykę psów i nowotworów uwzględnionych w dysertacji zawarto szczegółowe informacje dotyczące nie tylko rasy i typu nowotworu ale również wiek, wielkość i płeć psa; czy podjęto próbę zweryfikowania otrzymanych wyników z tymi danymi?
- w opisie materiału można znaleźć informację: „próby nowotworów były poddawane analizie histopatologicznej mającej na celu określenie typu nowotworu oraz stopnia jego złośliwości. Mikroskopowa analiza guzów została przeprowadzona zgodnie z histologiczną klasyfikacją WHO (Hendrick, 1998). W celu określenia stopnia złośliwości guzów gruczołu mlekowego

posłużono się 3-stopniową skalą zgodnie z metodyką Goldschmidt i in. (2011).” Nie znalazłam jednak informacji o jednorodności badanych prób nowotworów. Czy oznaczenia heterogenności zostały wykonane?

Podsumowując całość, uważam, że oceniana rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Kowala oparta o jednotematyczny cykl publikacji w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 18 lipca 2018 r. (t.j. Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora, w postępowaniu o nadanie stopnia doktora wszczętym w dniu 03 kwietnia 2023 r., w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie mgr Krzysztofa Kowala do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek dodatkowy

Biorąc pod uwagę ponadprzeciętny poziom badań opisanych w rozprawie, aktualność problematyki badawczej, zastosowane współczesne, interdyscyplinarne metody badawcze i kompleksowość opracowania oraz ponadprzeciętny charakter rozprawy, składam wniosek do Wysokiej Rady Dyscyplina Zootechnika i Rybactwo, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Krzysztofa Kowala stosowną nagrodą.

*Monika Zagawa-Pawlikowska*