

Poznań, 4. maja 2023

Prof. dr hab. Tomasz Szwaczkowski
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

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
w Instytucie Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
na Wydziale Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Podstawą wykonania recenzji jest pismo nr NE.5200.3.2.2023 Zastępcy Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 5. kwietnia 2023 r.. Opracowana opinia ma strukturę zgodną z pkt 6 umowy, z dnia 5 kwietnia 2023 r., zawartej między Rektorem UP w Lublinie a recenzentem.

1. Informacja o ocenianej rozprawie doktorskiej

Przedłożony do oceny maszynopis składa się z następujących części: oświadczenia promotora oraz autora pracy, wykazu publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów o ich udziale w powstaniu publikacji, streszczeń polsko- i anglojęzycznego (oraz słowami kluczowymi), omówienia rozprawy doktorskiej w języku polskim (obejmujące następuje rozdziały: wstęp, hipotezy badawcze, cel pracy, materiał i metody, omówienie wyników, dyskusja, podsumowanie i wnioski, bibliografię, wykaz skrótów i akronimów, wykaz skrótów w genomie mitochondrialnym), oświadczeń współautorów oraz kopii trzech publikacji.

Dysertacja doktorska powstała w ramach realizacji projektu badawczego (kierownik: prof. dr hab. Brygida Ślaska) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, w konkursie OPUS. Jest to niewątpliwie wskaźnikiem wartości naukowej prowadzonych badań, zważywszy na złożone i dogłębne procedury ewaluacji aplikowanych wniosków o granty.

Podstawą przygotowania rozprawy były trzy następujące opublikowane oryginalne prace twórcze:

- **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.
- **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.
- **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.

Prace wchodzące w skład dysertacji doktorskiej opublikowane zostały w czasopismach indeksowanych w *Journal Citation Reports*, o łącznej liczbie 440 punktów (według obecnie obowiązującej klasyfikacji Ministerstwa Edukacji i Nauki) oraz sumarycznej wartości czynnika wpływu (*impact factor*) równej 6.624. Udział pretendenta do stopnia doktora w powstaniu prac oryginalnych twórczych wynosi co najmniej 60%, na który składa się uczestnictwo w powstaniu koncepcji pracy i opracowaniu założeń metodycznych oraz wykonanie analiz laboratoryjnych, opis i interpretacja wyników badań, przeprowadzenie analiz bioinformatycznych, redagowanie manuskryptu, a także udział w korekcie tekstów po recenzjach. We wszystkich publikacjach doktorant jest pierwszym autorem. Prace te pomyślnie przeszły przez procedury ewaluacyjne w redakcjach.

W moim przekonaniu, stanowi to podstawę do uznania w/w cyklu publikacji powiązanych tematycznie jako dysertacji doktorskiej mgr. Krzysztofa Kowala.

2. Ocena układu rozprawy doktorskiej

Układ pracy w pełni koresponduje z wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim. Streszczenia w językach polskim i angielskim, mimo że niepozbawione drobnych uchybień redakcyjnych, syntetycznie eksponują najważniejsze elementy dysertacji.

We wstępie znajdujemy przekonujące umotywowanie celu badań, na tle przeglądu literatury specjalistycznej. Badania przeprowadzono na 14 psach (13 samicach i jednym samcu) 13 ras i jednego nierasowego, u których zdiagnozowano nowotwory złośliwe gruczołu mlekowego.

Przeprowadzane procedury badawcze zostały zaakceptowane przez II Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie. Zarówno w publikacjach anglojęzycznych jak i polskojęzycznym omówieniu, wyniki zostały zaprezentowane w komunikatywny sposób. Z kolei ich dyskusja wskazuje, że Doktorant dobrze porusza się po omawianych zagadnieniach. Rozdział „Podsumowanie i wnioski” koresponduje z uzyskanymi rezultatami.

3. Ocena zastosowanego piśmiennictwa w ramach rozprawy doktorskiej

W omówieniu rozprawy doktorskiej w języku polskim autor odwołał się do 78 pozycji literaturowych, z czego 39 opublikowanych zostało w ostatnich dziesięciu latach. Wszystkie cytowane prace są bezpośrednio powiązane z tematyką ocenianej dysertacji. Autor nie ustrzegł się jednak usterek o charakterze edytorskim.

4. Wskazanie oraz ocena celu pracy

Doktorant sformułował trzy hipotezy badawcze. Pierwsza z nich dotyczy „równomierności” występowania mutacji, polimorfizmów i heteroplazmii w mtDNA w tkankach nowotworu gruczołu mlekowego psów. Druga hipoteza badawcza eksponuje zależności między wyżej wymienionymi defektami mtDNA a transformacją nowotworową. Ostatnia z postawionych hipotez odnosi się do wpływu zmian w mitochondrialnym DNA na procesy karcenogenezy.

Na tej podstawie sformułowane zostały trafnie cele badawcze rozprawy, ukierunkowane na identyfikację powiązań defektów w mtDNA w gruczole mlekowym psa.

5. Wskazanie oraz ocena zastosowanych metod badawczych

Autor dysertacji doktorskiej zastosował metody badawcze, które mogą być postrzegane jako aktualne standardy światowe. Mikroskopowej analizy guzów dokonano zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia. Natomiast ocenę stopnia złośliwości guzów gruczołu mlekowego przeprowadzono na podstawie

trzystopniowej standardowej metodyki. Zastosowano tzw. sekwencjonowanie nowej generacji DNA. Ważnym elementem pracy są analizy bioinformatyczne.

6. Ocena części rozprawy doktorskiej dotyczącej omówienia wyników badań

Analizy genomowe przeprowadzono w ramach dwóch grup wyodrębnionych na podstawie stopnia złośliwości nowotworów (G2 i G1).

Całościowe resekwencjonowanie mitochondrialnego genomu psa z nowotworem cewkowo-brodawkowym (G2) doprowadziło do identyfikacji 32 polimorfizmów (w tym 10 w obszarze niekodującym) oraz 15 mutacji (z czego 14 o podłożu heteroplazmicznym). Generalnie, wykryto zmiany aż w 10 spośród 13 genów.

Natomiast dla mniej złośliwych nowotworów (G1) złożonych gruczołu mlekowego i cewkowo-brodawkowym zidentyfikowano 32 polimorfizmy, 5 mutacji (w tym jedna typu indel) oraz 137 heteroplazmii.

Cennym uzupełnieniem tych badań były, wspomniane już, analizy bioinformatyczne, ukierunkowane na poszukiwanie związków przyczynowo-skutkowych zidentyfikowanych polimorfizmów z funkcjami genów, w których są one zlokalizowane..

Wyniki badań przedstawiono w sposób komunikatywny w czterech tabelach i jednej rycinie.

7. Informacje dotyczące praktycznego zastosowania uzyskanych wyników badań

Wysoko oceniam przeprowadzoną analizę porównawczą między mitochondrialnym genomem psa i genomem człowieka. Jej rezultatem są zidentyfikowane analogiczne sekwencje. Z pewnością wyniki te (mimo zróżnicowania) mogą być wykorzystywane w terapii nowotworowej zarówno psa jak i człowieka.

8. Informacja o ewentualnych nieprawidłowościach, które pojawiły się w rozprawie doktorskiej

Mam świadomość, że analiza genetycznego uwarunkowania chorób (w tym nowotworów), w przeciwieństwie do badań cech użytkowych zwierząt (szczególnie podlegających rutynowej ocenie), jest o wiele bardziej złożona. W tym przypadku nie ma możliwości wyboru reprezentatywnej próby, wyrównanego materiału itp. Mimo tego,

nie sposób nie zauważyć, że materiał badawczy jest bardzo zróżnicowany, znacznie utrudniający dokonywanie uogólnień. W pracy nie pojawia się informacja z jakiego okresu pochodziło 14 psów. Czy było to ostatnich 10 lat (jak sugeruje data uchwały 6/2013 II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie)? Czy podjęto próbę dotarcia do bardziej wyrównanego genetycznie materiału?

Pewien niedosyt pozostawia opis rozprawy doktorskiej w języku polskim. Ta część dysertacji jest autorstwa doktoranta, w przeciwieństwie do wieloautorskich publikacji (abstrahując od ich indywidualnych udziałów). Zredukowana została prezentacja metod i wyników bioinformatycznych (np. tabela 5 w publikacji Kowala i in. 2019). Notabene, program komputerowy nie jest metodą.

Jeśli obszarem badań był genom mitochondrialny, to zważywszy na publiczne procedury związane z nadaniem stopnia doktora, pożądaną byłaby szersza refleksja wprowadzająca, dotycząca charakterystyki mitochondriów, eksponująca z jednej strony ich konserwatyzm genetyczny (wykraczający poza specyfikę gatunków zwierząt), a z drugiej strony mniej efektywny, w porównaniu z jądrowym DNA, mechanizm naprawy mutacji.

Pożądanym byłoby także większe odniesienie się w dyskusji wyników do relacji zidentyfikowanych regionów mtDNA z poznanymi genami, zlokalizowanymi w jądrowym DNA (np. *BRCA2*). Przydałby się także szerszy komentarz do obserwowanej redukcji kopii mitochondrialnego DNA w tkankach nowotworowych.

Mam pewne wątpliwości dotyczące tytułu rozprawy, który byłby bardziej adekwatny do książki czy artykułu przeglądowego aniżeli do pracy o charakterze eksperymentalnym. Mam świadomość, że tytuł dysertacji podlega weryfikacji przez gremia opiniująco-zatwierdzające. Czy nie byłoby lepiej skorzystanie z propozycji zredukowanego tytułu projektu badawczego?

Kolejna uwaga dotyczy kwalifikacji podsumowań najważniejszych wyników prezentowanych jako wnioski. Wprawdzie tytuł rozdziału brzmi: „Podsumowanie i wnioski”, jednak w pierwszym zdaniu tego rozdziału mowa jest tylko o wnioskach.

Występują uchybienia w wykazie literatury cytowanej w polskojęzycznej części pracy. Dotyczą one pisowni nazw czasopism, ich numerów i stron. Niekiedy dane bibliograficzne są niekompletne.

9. Ocena, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego

Niewątpliwym atutem ocenianej dysertacji jest pionierskie wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji. Pozwoliło to na wskazanie regionów genomu mitochondrialnego wykazujących asocjacje z karcenogenezą.

10. Ocena, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie zootechnika i rybactwo oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

Mając na uwadze udział mgr. K. Kowala w powstaniu publikacji, można domniemywać, że opanował techniki badawcze, pozwalające na prowadzenie prac z zakresu genomiki zwierząt. Nie sposób nie dostrzec, że kandydat prowadził badania we współpracy z uznanymi uczonymi, co dla młodego adepta nauki jest swoistą wartością dodaną w przyszłej karierze naukowej.

11. Najważniejsze osiągnięcia

Wykazano istotne asocjacje wybranych regionów mtDNA z transformacją nowotworową. Jednak z drugiej strony zaobserwowano znaczące zróżnicowanie między osobnikami, co wynika z przynależności do ras.

Wysoko oceniam analizy porównawcze genomu mitochondrialnego psa i człowieka, a szczególnie identyfikację polimorfizmów m.2683G>A w tRNA-Leu psa i sekwencji analogicznej człowieka (m.3243A>G) związanej z zespołem MELAS, co może wskazywać na nowe podłoża nowotworzenia.

Ważnym wynikiem jest także stwierdzenie powiązania heteroplazmii w mitochondriach psów z występowaniem złośliwych guzów gruczołu mlekowego.

Ponadto, jak trafnie zauważa autor, różnice na poziomie molekularnym w obszarze pętli D między dwoma guzami tego samego typu histopatologicznego u jednego osobnika, że mimo niekodującego charakteru, obszar ten może odgrywać ważną rolę w procesie transformacji nowotworowej. Hipoteza ta z pewnością wymaga potwierdzenia na bardziej liczbnym materiale.

12. Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska stanowi wyodrębnioną część pracy zbiorowej, złożonej z trzech publikacji, w których jednoznacznie wskazany został indywidualny znaczący wkład kandydata w opracowanie koncepcji badań, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników, co pozostaje w pełnej zgodności z art. 187. ust. 2. ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

W moim przekonaniu, oceniana rozprawa doktorska jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego. Doktorant wykazał się dobrą wiedzą z zakresu genetyki molekularnej oraz umiejętnościami samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, co pozostaje w zgodności z art. 187 ust. 1. wyżej wymienionej ustawy.

Mając powyższe na uwadze, z głębokim przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Aleksandra Kowala do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Tomasz Swoboda