

Prof. dr hab. Brygida Ślaska

Lublin, dn. 04.02.2026 r.

Zakład Genetyki Ogólnej i Molekularnej
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Anny Roszkowskiej

pt.: *Mutacje genu TP53 w nowotworach gruczołu mlekowego u suk*

wykonanej pod kierunkiem naukowym promotor dr hab. Sylwii Flis, prof. SGGW

w Katedrze Nauk Przedklinicznych Instytutu Medycyny Weterynaryjnej

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Podstawa prawna i ocena formalna

Ocenę rozprawy wykonano na prośbę dra hab. Tomasza Sadkowskiego, prof. SGGW, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, zgodnie z wymogami określonymi w Ustawie z dn. 20 lipca 2021 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). Przedstawiona do oceny praca spełnia warunki formalne określone w ww. Ustawie. Materiały zostały przygotowane w sposób umożliwiający właściwą ocenę oraz zapoznanie się z istotą rozprawy doktorskiej.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Oceniana praca została przygotowana w formie nieopublikowanej monografii naukowej. Liczy ona 136 stron, na których zawarto 27 tabel (wraz z załącznikiem) i 32 ryciny. Opracowanie jest eksperymentalną rozprawą doktorską i składa się z sześciu głównych rozdziałów: *Wstęp i przegląd literatury*, *Hipoteza badawcza*, *Cel pracy*, *Materiał i metody*, *Wyniki i analiza statystyczna*, *Omówienie wyników i dyskusja* oraz *Wnioski końcowe*. W pracy zawarto również załącznik, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz cytowanego piśmiennictwa źródłowego (181 pozycji) i wykaz skrótów.

W układzie typowym dla rozpraw doktorskich z reguły występują rozdziały: *Wyniki* oraz *Dyskusja*, albo *Wyniki i dyskusja*, które sprawiają, że praca jest klarowna. W ocenianej pracy część wyników znajduje się w rozdziale *Wyniki i analiza statystyczna*, a część w *Omówieniu wyników i dyskusji*. W rozdziale *Wyniki i analiza statystyczna* znajdują się

podrozdziały 5.1 oraz 5.1.1. i w części dużej części treści podrozdziału 5.2., które powinny znaleźć się w rozdziale *Materiał i metody*, ponieważ opisują materiał wykorzystany w badaniach. Na etapie wstępnej oceny praca ma niestandardowy układ i wydaje się być nieusystematyzowana, jednak po zgłębieniu jej treści można przypuszczać, że układ pracy wynika z jej podziału na dwie zasadnicze części: pierwsza opisuje wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę w laboratorium, które związane są z eksperymentami na tkankach nowotworów psów – stąd rozdział – *Wyniki i analiza statystyczna*, natomiast druga jej część – *Omówienie wyników i dyskusja* skupia się na analizach z zakresu modelu translacyjnego, wraz z ogólnie opisanymi metodami badań *in silico*, które *de facto* powinny być uszczegółowione i znaleźć się w rozdziale *Materiał i metody*. Powyższe sugestie powinny zostać uwzględnione podczas przygotowywania pracy do druku i sądzę, że nie będzie z tym problemu, ponieważ układ artykułów naukowych wymusi prawidłowe podanie poszczególnych informacji w konkretnych rozdziałach.

Tytuł rozprawy nie jest adekwatny do jej treści, ponieważ nie uwzględnia badań translacyjnych, które są znaczącym atutem pracy. Jednak tytuł ma swoje uzasadnienie. Badania stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, co należy podkreślić, powstały w ramach projektu badawczego finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki *Preludium* nr 2019/33/N/NZ4/02773 pt. *Mutacje w genie TP53 w guzie sutka u psów i ich znaczenie kliniczne*, którego kierownikiem była mgr inż. Katarzyna Roszkowska. Dodatkowo fakt ten wskazuje na wysoki poziom naukowy i nowatorski charakter realizowanych badań.

We *Wstępie* opisano problematykę ściśle związaną z hipotezą badawczą i założonymi w pracy celami badań. *Wstęp* został prawidłowo podzielony na podrozdziały, w których mgr inż. Katarzyna Roszkowska, z wykorzystaniem aktualnych i właściwie dobranych artykułów naukowych, przedstawiła zagadnienia ściśle związane z przeprowadzonymi badaniami. Doktorantka w syntetyczny sposób opisała problem występowania oraz charakterystykę i klasyfikację nowotworów gruczołu mlekowego, przybliżyła informacje dotyczące białka p53 oraz mutacji w sekwencji genu *TP53*. Wyczerpująco opisała też psa, jako zwierzę modelowe w badaniach nad nowotworami człowieka oraz zasadnie porównała gen *TP53* i białko p53 u obu gatunków. Uzasadnione było również przedstawienie metod diagnostycznych i możliwości terapeutycznych w leczeniu nowotworów gruczołu mlekowego suk. Potrzebny był również opis modeli komórkowych wykorzystywanych w badaniach nowotworów. W rozdziale tym Doktorantka wykazała się dobrą orientacją w problematyce związanej z podjętymi badaniami. Informacje przedstawione we wstępie rozprawy świadczą o jej dużej wiedzy i umiejętności przedstawienia trudnych zagadnień w zrozumiały sposób, co pozwala na stwierdzenie, że Doktorantka dogłębnie zapoznała się z piśmiennictwem związanym z przeprowadzonymi badaniami.

Znajomość tematyki z zakresu podjętych badań oraz właściwy dobór pozycji piśmiennictwa pozwolił Doktorantce prawidłowo sformułować hipotezę badawczą i wytyczyć właściwie sformułowany *Cel pracy*. Celem badań była ocena, czy spektrum mutacji w genie *TP53* w nowotworach gruczołu mlekowego u suk wykazuje podobieństwo do tego obserwowanego w raku piersi u kobiet, a także czy obecność tych mutacji jest związana z parametrami klinicznymi i molekularnymi. Pani mgr inż. Katarzyna Roszkowska sformułowała też szczegółowe zadania badawcze, które są zgodne z założeniami pracy. Warto

wspomnieć, że cel pracy powinien znajdować się również w streszczeniu, w którym go zabrakło.

W rozdziale *Materiał i metody* Doktorantka przedstawiła materiał i techniki badań, na podstawie których przeprowadziła eksperymenty dotyczące nowotworów psów. Materiał stanowiło 50 guzów nowotworowych gruczołu mlekowego, pobranych od 37 suk podczas terapeutycznej mastektomii. Zebrano informacje kliniczne pacjentek przed zabiegiem, jak i w okresie od 6 miesięcy do roku po operacji. Należy podkreślić, że Doktorantka zebrała bardzo wartościowy materiał badawczy, który może zostać wykorzystany do kolejnych badań. Na szczególną uwagę zasługują przypadki występowania kilku guzów u jednej suki, jak również wznowy. Badań na poziomie molekularnym z tym związanych jest mało, więc można dostrzec w nich duży potencjał badawczy na przyszłość. Guzy poddano prawidłowej analizie histopatologicznej i molekularnej, a z 32 guzów, z wykorzystaniem właściwych metod, wyprowadzono linie komórkowe, które zasadnie wykorzystano w badaniach *in vitro*. Zarówno liczebność, postępowanie z materiałem biologicznym, jak i rozpoznanie histopatologiczne było prawidłowe i gwarantujące otrzymanie wiarygodnych wyników badań. Mgr inż. Katarzyna Roszkowska prawidłowo zaplanowała i wykonała część doświadczalną pracy. Wybór metod do przeprowadzenia analiz nowotworów psów wykorzystanych w pracy został przedstawiony szczegółowo i w sposób możliwy do powtórzenia. Metody badawcze przedstawione w tym rozdziale są właściwie dobrane i zastosowane.

Warto podkreślić bogaty warsztat metodyczny wykorzystany w przeprowadzonych badaniach laboratoryjnych, a skrupulatny opis metodyki świadczy o właściwym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki i znajomości podjętego w pracy tematu badań. Natomiast zakres analizowanych parametrów i metody badawcze są właściwe w kontekście przyjętego celu badawczego.

Do tego rozdziału mam pytanie: jakiej długości fragment genu *TP53* analizowano i jaką on miał lokalizację w sekwencji genu *TP53*? Czym się kierowano przy wyborze tego konkretnego fragmentu genu?

W rozdziale pt. *Wyniki i analiza statystyczna* Doktorantka przedstawiła uzyskane rezultaty w konsekwentny i przystępny sposób. Wyniki zestawiono w 10 tabelach, na chromatogramie (który jest wynikiem graficznym i powinien być opisany jako rysunek, a nie tabela) oraz na 15 rycinach i zaprezentowano w logiczny sposób. Układ tabel i rycin jest przejrzysty i komunikatywny.

W początkowej części rozdziału *Omówienie wyników i dyskusja* solidnie przedyskutowano dane statystyczne dotyczące epidemiologii nowotworów gruczołu mlekowego suk przedstawiając też informacje dotyczące możliwości wykorzystania psa jako modelu zwierzęcego w badaniach translacyjnych nad ludzkim rakiem piersi. W dalszej części rozdziału Doktorantka skupiła się na charakterystyce mutacji genu *TP53* w kontekście modelu translacyjnego. Badania molekularne wykazały występowanie mutacji w sekwencji genu *TP53* w przypadku 7 z 47 guzów, co stanowi niemal 15% nowotworów objętych badaniami. Każda wykryta mutacja była innego typu. Na uwagę zasługuje fakt, że w ramach pracy powstała baza danych obejmująca wyniki kliniczne, histopatologiczne i molekularne psów związana z diagnostyką raka piersi u kobiet (panel PAM50) oraz unikalne, stabilne linie komórkowe,

szczegółowo scharakteryzowane pod względem parametrów złośliwości. Za wartościowe wyniki należy uznać opisanie pewnych tendencji pomiędzy obecnością mutacji w genie *TP53*, a typem histopatologicznym guza oraz stwierdzenie różnicy w zdolności do migracji komórek pomiędzy rakiem o typie mieszanym, a rakiem litym. Ważne są również wyniki badań dotyczące odpowiedzi komórek na różne chemioterapeutyki, które wykazały różnice w zależności od rodzaju mutacji obecnej w danym guzie. Istotne są wyniki analizy poziomu ekspresji genów, które wskazały na różnice pomiędzy poziomem ekspresji genów w guzach z mutacją *TP53* (*MUTp53*) a poziomem ekspresji genów w guzach z dzikim typem tego genu (*WTp53*) (w przypadku genów: *ESR1*, *MLPH* oraz *MYBL2*). Wartościowe są również rezultaty, które wskazały na fakt, że stopień złośliwości guzów był związany z ekspresją pięciu genów (*ESR1*, *FOXA1*, *MLPH*, *MYBL2* i *CDH3*).

Do tego rozdziału mam pytanie i kilka uwag:

- Skąd Doktorantka wie, że określiła mutacje, a nie polimorfizmy?
- Doktorantka w pracy nie używa opisów mutacji zgodnie z przyjętymi standardami, a robi to tylko opisowo. Mutacje w sekwencjach DNA opisuje się według standardu opracowanego przez *Human Genome Variation Society (HGVS)*. System ten wykorzystuje ujednoliconą nomenklaturę do precyzyjnego określania zmian na poziomie DNA, RNA i białek, umożliwiając jednoznaczną identyfikację mutacji w genomie.
- Mgr inż. Katarzyna Roszkowska wykorzystuje test chi-kwadrat do testowania grup o zbyt małych liczebnościach. Sama Doktorantka w streszczeniu podaje: *Niestety, heterogenność badanej grupy zwierząt uniemożliwiła uzyskanie wyników o odpowiedniej mocy statystycznej*, z czym się zgadzam. Wyniki powinny być opisane, jednak przy małych liczebnościach Doktorantka powinna zrezygnować ze wskazywania istotności różnic pomiędzy grupami, a tylko opisać zauważone tendencje.
- W tym samym rozdziale Doktorantka stwierdza: *Badania molekularne wykazały występowanie mutacji u 7 z 47 zsekwencjonowanych guzów* – mutacje występują w sekwencji genu, a nie w zsekwencjonowanych guzach. Sekwencjonuje się produkt PCR, więc przytoczone wyrażenie jest dużym skrótem myślowym.
- Na str. 71 nieprawidłowo użyte zostało określenie *gruczoł mleczny*, powinno być – *gruczoł mlekowy*.
- Ponadto w pięciu miejscach w pracy Doktorantka używa określenia *mieszance*, które tyczy się psów. To określenie jest potoczne, a w pracy naukowej powinno się używać określenia *psy nierasowe*.

W rozdziale pt. *Omówienie wyników i dyskusja* mgr inż. Katarzyna Roszkowska przedstawiła wyniki i informacje w dwóch tabelach. W tym rozdziale Doktorantka zaprezentowała charakterystykę mutacji w sekwencji genu *TP53* w kontekście modelu translacyjnego i przedstawiła zmiany aminokwasowe w białku p53 w guzach sutka suk w porównaniu z ludzkimi odpowiednikami.

W rozprawie mgr inż. Katarzyna Roszkowska nie posługuje się prawidłowymi oznaczeniami mutacji. Za mutację w wielu miejscach pracy, w tym np. w tabeli 26 uznaje zmianę aminokwasową, co nie jest podejściem prawidłowym.

Pomimo uwag, które być może ułatwią przygotowywanie manuskryptu do druku, zapoznanie się z treścią dwóch powyższych rozdziałów skłania do stwierdzenia, że Doktorantka rozwiązała postawione problemy badawcze i otrzymała interesujące, w dużej części pionierskie wyniki. Dodać należy, co podkreśliła sama Doktorantka, że badania powinny być kontynuowane na ujednoliconym i liczniejszym materiale badawczym, co w przypadku nowotworów psów nie jest proste z uwagi na występowanie obecnie ponad 350 ras psów aktualnie uznanych przez Międzynarodową Federację Kynologiczną (FCI) i istnienie wielu typów nowotworów. Dlatego pomimo małej liczby obserwacji w niektórych grupach eksperymentalnych należy uznać przeprowadzone badania i otrzymane rezultaty jako wartościowe. Mogą one zostać wykorzystane jako wyniki nadające kierunek dalszym badaniom.

Interpretacja wyników świadczy o umiejętności mgr inż. Katarzyny Roszkowskiej kompleksowego podejścia do dużej liczby otrzymanych rezultatów i ich opisu, czyli należytem przygotowaniu Doktorantki do problemu badawczego podjętego w pracy doktorskiej. Informacje zawarte w dwóch powyższych rozdziałach pozwalają na stwierdzenie, że Doktorantka odpowiedziała na postawione problemy badawcze.

Rozprawę kończy rozdział pt. *Wnioski końcowe*, który powinien zostać standardowo nazwany jako *Wnioski*, albo *Podsumowanie i wnioski*.

W tym rozdziale ostatni, siódmy wniosek został sformułowany zbyt jednoznacznie i kategorycznie: *Model nowotworów gruczołu mlekowego suk posiada istotną wartość translacyjną w badaniach nad rakiem piersi u ludzi (...)*, tym bardziej, że w streszczeniu rozprawy Doktorantka zawarła wyważoną, prawidłowo sformułowaną tezę : *Na podstawie uzyskanych danych nie można jednoznacznie stwierdzić, czy pies stanowi adekwatny model do badań nad rakiem piersi u człowieka, jednakże uzyskane analizy świadczą o potencjalnej istotnej wartości translacyjnej*. To zdanie ze streszczenia powinno stanowić ostatni, podsumowujący wniosek.

Wnioski są naukowo ważne, wyczerpują założone cele dysertacji. Świadczą one o dużej zdolności Doktorantki do syntetycznej analizy wyników uzyskanych w pracy i ich prawidłowej interpretacji.

Podkreślić należy, że sugestie i uwagi, które zawarłam w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Roszkowskiej.

W mojej opinii praca doktorska prezentuje dobry poziom merytoryczny. W uzasadnieniu podkreślić należy oryginalność badań, ich szeroki, wielowątkowy zakres i fakt, że praca wnosi nowe wartości poznawcze, które poszerzyły wiedzę z zakresu nauk weterynaryjnych. Mgr inż. Katarzyna Roszkowska wykazała się dobrą znajomością planowania i przeprowadzenia eksperymentu badawczego oraz potwierdziła umiejętność oryginalnego rozwiązania problemu naukowego poprzez analizę uzyskanych wyników i formułowanie

wniosków. Dysertacja wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie weterynaria oraz na umiejętność samodzielnego prowadzenia przez nią pracy naukowej.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Anny Roszkowskiej pt.: *Mutacje genu TP53 w nowotworach gruczołu mlekowego u suk* spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dn. 20 lipca 2021 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.), natomiast Doktorantka wykazała wszelkie umiejętności niezbędne dla otrzymania stopnia doktora nauk, a niniejsza rozprawa może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk weterynaryjnych, dyscyplinie weterynaria. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie **wniosek o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Anny Roszkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



phosphoric anhydride