

O C E N A

pracy doktorskiej mgr Andrzeja Dońca

pt. Modyfikacja metod izolacji DNA i szacowanie współczynnika degradacji chromosomu Y jako potencjalne sposoby zwiększenia szansy uzyskania wyników badań genetycznych ze zdegradowanego materiału kostnego

Każda tkanka ludzkiego organizmu zawiera materiał genetyczny w postaci DNA, który potencjalnie może posłużyć do identyfikacji osobniczej. Wydajność i jakość otrzymanych preparatów, a stąd powodzenie analizy, zależą od rodzaju i stanu badanego materiału. Po śmierci organizmu następuje jego rozkład pod wpływem czynników endo- i egzogennych, czemu towarzyszy także degradacja, czyli fragmentowanie cząsteczki DNA. Niekorzystnie zaznacza się działanie czynników ekstremalnych jak wysoka temperatura, promieniowanie UV, czynniki utleniające, czy zanieczyszczenia biologicznie i chemiczne, ale także zespołu typowych warunków otoczenia oddziałujących w sposób długotrwały, jak np. gleba torfowa czy środowisko wodne.

Materiał kostny okazuje się szczególnie przydatny w identyfikacji genetycznej z uwagi na relatywnie dobrą konserwację zawartego w nim DNA. Kompletne szkielety bądź ich fragmenty mogą przedmiotem badań przedstawicieli co najmniej kilku dyscyplin nauki. Obecnie możliwa jest nie tylko identyfikacja osobnicza, czy ustalanie pochodzenia etnicznego lub bio-geograficznego szczątków lub artefaktów pochodzenia ludzkiego. Nowe techniki molekularne umożliwiają także predykcję wieku biologicznego i przyżyciowych cech osoby, ujawnienie przebytych chorób, infekcji, czy obciążenia schorzeniami dziedzicznymi. Informacja genetyczna zawarta w materiale kostnym stanowi zatem cenne uzupełnienie danych antropologicznych, archeologicznych i paleontologicznych.

Magister Andrzej Doniec przedłożył ocenianą pracę Uniwersytetowi Jagiellońskiemu w Krakowie, jako rozprawę na stopień doktora nauk biologicznych.

a. Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność:

W przypadku zwłok rozczłonkowanych lub będących w znacznym stanie rozkładu, gdy ocena daktyloskopijna lub odontologiczna nie jest możliwa, pozostaje jedynie ustalenie tożsamości na podstawie badań genetycznych. Zastosowanie zaawansowanych i precyzyjnych metod, opartych np. na badaniach DNA z materiału kostnego, zwiększa szansę identyfikacji ofiar katastrof masowych, ale także umożliwia rozwiązanie niewyjaśnionych dotąd spraw kryminalnych. Istnieje wiele modyfikacji technik ekstrakcji DNA wykorzystywanych w genetyce sądowej, zwykle na podstawie dostępnych na rynku w postaci gotowych zestawów. W świetle ciągłego rozwoju naukowego i technologicznego można założyć, że stosowane wcześniej, jak i wielce przydatne obecnie, metody ekstrakcji będą w niedalekiej przyszłości uzupełnione bardziej skutecznymi, dzięki czemu wzrosną potencjalne możliwości badania materiału kostnego. Tendencję taką można wyraźnie wysnuć także z dysertacji Doktoranta. Z racji tego, przechodząc do właściwej merytorycznej i formalnej oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że dobór tematu przez Autora był trafny i godny zainteresowania z punktu widzenia identyfikacji genetycznej człowieka, kryminalistyki, jak i archeologii molekularnej.

b. Poprawność formułowania problemów i hipotez (założenia badawcze):

Doktorant prawidłowo sformułował główny problem badawczy, polegający na weryfikacji możliwości podniesienia szansy identyfikacji szczątków kostnych poprzez analizę pokrewieństwa oraz modyfikację procesu ekstrakcji DNA i szacowania indeksów degradacji DNA. Hipoteza i założenia badawcze zostały sformułowane poprawnie, są precyzyjne i jednoznaczne oraz cechuje je istotność poznawcza. Pozwalają określić zadania badawcze prowadzące do rozwiązania postawionego problemu, wyrażając obszar, przedmiot i zakres studiów literaturowych oraz badań empirycznych.

c. Dobór literatury, umiejętności wykorzystania źródeł:

W liczącym pięć stron wprowadzeniu do treści rozprawy Doktorant przedstawił zarys problematyki identyfikacji szczątków ludzkich w kontekście wytycznych Interpolu oraz podkreślił znaczenie stosowania wystandaryzowanych metod badawczych w postępowaniu z DNA dowodowym pochodzącym ze zróżnicowanych próbek biologicznych. Zwrócił ponadto uwagę na zagadnienia dotyczące specyfiki DNA otrzymywanego z kości pozyskanych ze środowiska wodnego. Ta część rozprawy oparta jest na przeglądzie doniesień z piśmiennictwa i stanowi wprowadzenie czytelnika w zagadnienia, które zostały

przedstawione w CELU i zadaniach badawczych liczącym sześć punktów. PIŚMIENNICTWO zawiera 31 pozycji oraz 47 pozycji w załączonych publikacjach w przeważającej większości opublikowanych po 2000 roku. Przypuszczam, że dobór literatury wynikał z intencji Autora skupienia się precyzyjnie na problematyce rozprawy, stąd merytorycznie w większości jest prawidłowy i pozwala na realizację założeń badawczych. Jak sam stwierdził, porównanie z danymi literaturowymi jest utrudnione z powodu braku opublikowanych prac związanych z tematem dysertacji. Należy uznać, że zakres cytowanego piśmiennictwa obejmował większość aspektów związanych z tematyką rozprawy doktorskiej, a Autor wykazał się jego znajomością i dobrą prezentacją.

d. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania:

MATERIAŁY I METODYKA badań zostały opisane w rozdziale zajmującym pięć stron rozprawy oraz w scalonych z nią *Publikacjach 1 i 2*. W celu rozwiązania zadania badawczego Doktorant przeprowadził szereg badań obejmujących: walidację metody pomiaru stężenia i jakości DNA z użyciem aparatu *RotorGene Q* i zestawu dedykowanych odczynników, w celu sprawdzenia jej wydajności w badaniu materiału kostnego, oraz ocenę wpływu pH buforu lizującego na ilość DNA izolowanego z kości przebywających w wodzie słodkiej. W *Publikacji 1* opisano sposób rozwiązania problemu domniemanego ojcostwa poprzez rozbudowaną analizę genetyczną w sytuacji występowania mutacji genetycznej obejmującej znaczną część chromosomu 2, zaś w *Publikacji 2* przetestowano hipotezy związane z szacowaniem współczynnika degradacji DNA z kości o różnych okresach rozkładu w różnych warunkach środowiskowych. Opis zastosowanych metod badawczych nie budzi wątpliwości. W celu weryfikacji skuteczności testowanych rozwiązań Doktorant posłużył się metodami laboratoryjnymi gwarantującymi wysoką jakość wyników, co świadczy o dobrym przygotowaniu do zadań badawczych i rozwojowych. Oceniając fazę badawczą pracy należy uznać, że Doktorant włożył wiele wysiłku w realizację założonego celu.

e. Ocena uzyskanych wyników i ich znaczenie dla nauki i praktyki:

Konieczność identyfikacji zwłok i szczątków N.N. dyktowana jest przez względy prawne, społeczne i kulturowe oraz ma istotne znaczenie dla prowadzonych postępowań. Recenzowana praca ma charakter eksperymentalny i wdrożeniowy, dostarcza cennych wskazówek w kontekście uzyskania informacji ze szczątków kostnych. Autor słusznie podkreśla znaczenie standaryzacji metod badawczych na poziomie laboratorium, co przeprowadził samodzielnie rozszerzając zakres walidacji producenta jednostki badawczej przeznaczonej do oceny ilości i jakości DNA dowodząc, że zastosowane podejście spełnia

odpowiednie rygory metodyczne. *Publikacja nr 1* stanowi ważny etap w poznaniu wpływu rzadkiego przypadku zaburzonego dziedziczenia chromosomu 2 na interpretację wyników analizy pokrewieństwa. Wyniki niezwykle szerokiego zakresu badań genetycznych pozwoliły na jednoznaczne wyjaśnienie pozornie niemendlowskiego dziedziczenia tego chromosomu i sugerują zachowanie ostrożności w sytuacjach możliwych fałszywych wykluczeń pokrewieństwa.

Interesującym spostrzeżeniem przedstawionym w *Publikacji 2* jest to, że wyniki pomiaru indeksu degradacji tej samej próbki DNA zmieniają się zależnie od zastosowanego zestawu pomiarowego oraz że indeksy degradacji DNA autosomalnego i DNA chromosomu Y mogą się różnić. Publikacja ta ma więc istotne znaczenie w wyjaśnieniu kinetyki mechanizmu degradacji DNA oraz dostarcza wskazówek metodycznych w postępowaniu z próbkami dowodowymi.

Kontynuacją powyższego zadania badawczego była próba optymalizacji procedury ekstrakcji DNA z materiału kostnego przebywającego w warunkach naturalnych środowiska wodnego. Doktorant wykazał empirycznie wyższą skuteczność tradycyjnej metody fenolowej, którą zmodyfikował poprzez zmianę pH buforu lizującego. Uzyskane wyniki dostarczają cennych wskazówek dla postępowania z tzw. materiałem trudnym lub dostępnym w niewielkiej ilości.

f. Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna:

Manuskrypt napisany jest w sposób poprawny. Nie ma on tradycyjnego podziału na rozdziały: wstęp, metodyka, wyniki, dyskusja i jest wzbogacony o dwa wysoko punktowane artykuły oryginalne, w których Doktorant jest pierwszym autorem. W samej treści manuskryptu Autor nie ustrzegł się nielicznych błędów np. 'drugiego chromosomu' zamiast 'chromosomu 2' na str. 10, 'matrycowy DNA' zamiast 'matryca DNA' na str. 14 i 15. Brak jest także podania nazwy producenta aparatu *RotorGene Q* i zestawu *Investigator Quantiplex Pro RGQ* w opisie celu i metod badawczych. Zbędne są rozwinięcia skrótów na str. 12 i 13, gdyż zostały one wyjaśnione w wykazie skrótów na str. 10. Niedociągnięcia te nie wpływają na ocenę rozprawy.

Wniosek końcowy:

Lektura dysertacji pozwala na wysunięcie wniosku, że Doktorant posiada obszerną wiedzę praktyczną i teoretyczną w obszarze zagadnień poruszanych w dysertacji. W ocenie merytorycznej stwierdzam, że problem zawarty w przedłożonej do oceny rozprawie doktorskiej został jednoznacznie sprecyzowany i uzasadniony. Założenia pracy w relacji do stanu wiedzy były poprawne, zaś aktualność i znaczenie tych badań, zarówno poznawcze jak i praktyczne, w pełni odpowiadają aktualnym problemom współczesnej genetyki sądowej.

Z satysfakcją stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Andrzeja Dońca pt. „*Modyfikacja metod izolacji DNA i szacowanie współczynnika degradacji chromosomu Y jako potencjalne sposoby zwiększenia szansy uzyskania wyników badań genetycznych ze zdegradowanego materiału kostnego*” jest napisana w sposób dojrzały i świadczy o znajomości tematu, umiejętnym wyborze metodyki badawczej oraz stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego przez Autora. Uważam także, że rozprawa jest cenna i powinna być uznana za wyróżniającą się, gdyż nie tylko zaproponowane w niej rozwiązania są innowacyjne w kontekście dostarczenia wskazówek dotyczących postępowania z dowodowym materiałem kostnym, a także inspirują do dalszych studiów.

Reasumując, recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Mam zatem zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Andrzeja Dońca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, 05.01.2023

prof. dr hab. n. med. Witold Pepiński

STARSZY SPECJALISTA
Zakład Medycyny Sądowej

prof. dr hab. Witold Pepiński