



dr hab. Anita Szwed, prof. UAM  
Instytut Biologii i Ewolucji Człowieka  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza

Poznań, 26 czerwca 2023 r.

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr Aleksandry Pisarek**

**pt. „Opracowanie narzędzi epigenetycznych do przewidywania wieku w próbkach nasienia ludzkiego”**

### **Podstawa opracowania recenzji**

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Zastępcy Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Pana dr. hab. Pawła Grzmila, prof. UJ z dnia 26 maja 2023 r. w sprawie powierzenia mi obowiązków recenzenta w postępowaniu doktorskim mgr Aleksandry Pisarek, ubiegającej się o nadanie stopnia naukowego doktora w *dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*. Powołanie na recenzenta w przewodzie doktorskim nastąpiło Uchwałą Rady Dyscypliny Nauki biologiczne UJ na posiedzeniu w dniu 24.04.2023 r. Jako recenzent oświadczam, że nie znajduję się w sytuacji konfliktu interesów, w szczególności nie posiadam z Ocenianą wspólnych publikacji, nie prowadzę wspólnych badań naukowych oraz nie pozostaję w zależności służbowej.

### **Ogólna charakterystyka pracy**

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Pisarek została wykonana w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych na Wydziale Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod opieką prof. dr. hab. Wojciecha Branickiego. Część eksperymentalna została wykonana w Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ.



Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane ze środków unijnego Programu Badań i Innowacji Horyzont 2020 w ramach umowy o grant nr 740580 „Visible Attributes through Genomics (VISAGE)”; Kierownik projektu w UJ: Prof. dr hab. Wojciech Branicki oraz projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju nr DOB-BIO10/06/01/2019 „Analiza epigenomu w celach dochodzeniowo-śledczych – zwiększenie możliwości identyfikacyjnych i wykrywczych badań DNA”; Kierownik projektu w UJ: dr hab. Ewelina Pośpiech.

Mgr Aleksandra Pisarek przedstawiła do oceny rozprawę doktorską w formie monografii. Jednocześnie Doktorantka zaznaczyła, że część wyników rozprawy doktorskiej została opublikowana w dwóch artykułach naukowych: 1) Pisarek A, Pośpiech E, Heidegger A, Xavier C, Papież A, Piniewska-Róg D, Kalamara V, Potabattula R, Bochenek M, Sikora-Polaczek M, Macur A, Woźniak A, Janeczko J, Phillips C, Haaf T, Polańska J, Parson W, Kayser M, Branicki W. Epigenetic age prediction in semen – marker selection and model development. *Aging (Albany NY)*. 2021 Aug 10;13(15):19145-19164; 2) Heidegger A, Pisarek A, de la Puente M, Niederstätter H, Pośpiech E, Woźniak A, Schury N, Unterländer M, Sidstedt M, Junker K, Ventayol Garcia M, Laurent FX, Ulus A, Vannier J, Bastisch I, Hedman J, Sijen T, Branicki W, Xavier C, Parson W; VISAGE Consortium. Development and inter-laboratory validation of the VISAGE enhanced tool for age estimation from semen using quantitative DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet*. 2022 Jan; 56:102596, których mgr Aleksandra Pisarek jest współautorem.

Rozprawę doktorską stanowi dobrze napisane opracowanie, zredagowane w języku polskim na 145 stronach maszynopisu, obejmujące streszczenie w języku polskim i angielskim, abstract graficzny, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i uwagi końcowe, literaturę, spis tabel i rycin oraz suplement.

### **Merytoryczna ocena pracy**

Badania metylacji DNA prowadzone są od kilkunastu lat, a ich rozwój umożliwił wyselekcjonowanie markerów metylacyjnych wykorzystywanych do oceny ryzyka rozwoju



wielu chorób oraz określania wieku epigenetycznego organizmu. Podejmowanie badań mających na celu predykcję wieku epigenetycznego osobnika ma istotne znaczenie kliniczne, a ich przydatność znajduje coraz szersze zastosowanie w badaniach kryminalistycznych oraz analizie szczątków kostnych. W tym kontekście podjęte przez mgr Aleksandrę Pisarek badania mające na celu ewaluację dostępnych markerów oraz kalkulatorów do predykcji wieku epigenetycznego oraz poszukiwanie nowych markerów estymacji wieku i opracowanie skutecznych modeli predykcyjnych dla badania prób nasienia są niezwykle istotne. Należy podkreślić, że podjęta przez Doktorantkę problematyka badawcza jest bardzo aktualna oraz nowatorska i wpisuje się w nurt badań nad poszukiwaniem markerów wieku epigenetycznego, które mogą mieć szerokie zastosowanie.

We *Wstępie* Pani mgr Aleksandra Pisarek zawarła podstawowe informacje oraz przegląd piśmiennictwa, które w doskonały sposób wprowadzają czytelnika w podjętą problematykę badawczą. Doktorantka omówiła metylację DNA w komórkach somatycznych i plemnikach, przedstawiła różnice w poziomie metylacji DNA pomiędzy komórkami somatycznymi i rozrodczymi oraz odmienne wzory metylacji DNA w różnych typach komórek somatycznych. Następnie zaprezentowała metody określania wieku epigenetycznego oraz możliwości wykorzystania danych metylacyjnych w kryminalistyce, medycynie i badaniach antropologicznych szczątków kostnych. Wstęp kończy przegląd badań i aktualny stan wiedzy w temacie markerów wieku epigenetycznego w próbkach nasienia. W mojej opinii wstęp został zredagowany z wysoką dbałością o precyzję sformułowań oraz napisany bardzo dobrym językiem. Niestety zabrakło mi wzbogacenia tego rozdziału o ryciny czy tabele, które pomogłyby czytelnikowi w zrozumieniu poruszanych zagadnień. Być może niedosyt bierze się z doskonale opracowanego abstractu graficznego.

Kolejny rozdział zawiera jasno sformułowany *Cel* badań, którym było „opracowanie narzędzia umożliwiającego optymalną pod względem dokładności i liczby markerów metylacyjnych predykcję wieku epigenetycznego w próbkach nasienia w aspekcie kryminalistycznym”. Cel badań sformułowano w sposób prawidłowy, a jego dopełnienie stanowi wyznaczenie pięciu celów szczegółowych umożliwiających realizację głównego celu



badania. Cele szczegółowe nazwałabym raczej zadaniami badawczymi, bowiem pokazują kolejne kroki postępowania badawczego Doktorantki:

1. Testowanie dostępnych narzędzi umożliwiających określenie wieku epigenetycznego na podstawie analizy metylacji DNA;
2. Przeprowadzenie wielkoskalowej analizy metylacji DNA mającej na celu identyfikację miejsc CpG wykazujących istotną statystycznie korelację z wiekiem;
3. Opracowanie protokołu tworzenia bibliotek DNA dla wybranych markerów metylacyjnych;
4. Walidacja wyselekcjonowanych miejsc CpG oraz opracowanie modelu matematycznego do predykcji wieku w próbkach nasienia o dużej dokładności i minimalnej liczbie predyktorów;
5. Ocena wpływu technologii gromadzenia danych metylacyjnych na wyniki predykcji wieku w próbkach nasienia.

Dla realizacji głównego celu pracy oraz wyznaczonych zadań badawczych Pani mgr Aleksandra Pisarek wykorzystwała materiał badawczy pochodzący od 467 mężczyzn w wieku od 19 do 60 lat. Materiał został pozyskany z trzech miejsc. 251 prób w postaci nasienia natywnego zebrano we współpracy z Kliniką Leczenia Niepłodności PARENS Kraków oraz TFP Fertility Macierzyństwo. 213 próbek nasienia zostało zgromadzonych przez Uniwersytet Juliusza Maksymiliana w Würzburgu oraz 3 zebrane przez Śląski Uniwersytet Medyczny. Na wykorzystanie materiału do badań uzyskano stosowne zgody Komisji Bioetycznych. Nasuwa się pytanie czy wszystkie próby zostały zebrane i przechowywane zgodnie z tą samą procedurą?

Do testowania dostępnych narzędzi do predykcji wieku w nasieniu, selekcji miejsc CpG z zastosowaniem technologii mikromacierzy, walidacji danych mikromacierzowych EPIC z zastosowaniem technologii pirosekwencjonowania, walidacji wyselekcjonowanych miejsc CpG z zastosowaniem technologii NGS oraz budowania modelu matematycznego,



metaanalizy markerów przewidywania wieku w nasieniu oraz analizy wpływu technologii pomiaru metylacji DNA na dokładność predykcji wieku Doktorantka wykorzystała próby nasienia z 5 kohort. Prosiłabym o wyjaśnienie, dlaczego wydzielono odrębne kohorty oraz w jaki sposób wyselekcjonowano poszczególne kohorty. Klarownie i wyczerpująco zostały opisane wszystkie metody badawcze oraz wszystkie kroki analizy danych. Zabrakło mi jedynie informacji, którą część z szeregu badań eksperymentalnych wykonała Pani mgr Aleksandra Pisarek. Analizę danych przeprowadzono z wykorzystaniem prawidłowo dobranych metod, w których stosowaniu Doktorantka wykazała dużą biegłość.

Kolejny rozdział stanowi szczegółowy opis uzyskanych wyników. Tutaj Autorka, z dużą dbałością o detale, przedstawiła wyniki przeprowadzonych analiz. Rozdział *Wyniki* stanowi zasadniczą część rozprawy, a szczegółowy opis wyników odzwierciedlający wieloetapowe prace badawcze, ich przejrzyste zaprezentowanie, staranne udokumentowanie za pomocą tabel i rycin oraz zobiektywizowanie prawidłowo dobranymi metodami statystycznymi jest niewątpliwym atutem ocenianej rozprawy. Uzyskane wyniki są wiarygodne, a ich interpretacja prawidłowa. Zawarte w suplemencie ryciny i tabele stanowią wartościowe uzupełnienie całości.

Uzyskane rezultaty badań własnych mgr Aleksandra Pisarek umiejętnie skonfrontowała z wynikami innych autorów, zajmujących się zbliżoną tematyką badawczą. Dyskusja wyników została poprowadzona wszechstronnie i ciekawie. Cytowane przez Autorkę dysertacji piśmiennictwo zawiera 197 pozycji, starannie dobranych do tematu rozprawy. Konkluzje sformułowane w rozdziale *Podsumowanie i uwagi końcowe* są klarowne i dobrze korespondują z postawionymi zadaniami badawczymi.

Na podstawie przeprowadzonych badań Pani mgr Aleksandra Pisarek:

1. Potwierdziła przydatność koreańskiego narzędzia predykcji wieku dla populacji polskiej oraz wykazała użyteczność koreańskiego narzędzia w badaniach kryminalistycznych
2. Potwierdziła przydatność kalkulatora GLA dla populacji polskiej oraz ograniczenie wykorzystania tego kalkulatora w badaniach kryminalistycznych



- wynikające z potrzeby zastosowania dużych ilości matrycowego DNA do przeprowadzania analiz mikromacierzowych.
3. Opracowała nowe kompletne narzędzie VISAGE Enhanced Tool do predykcji wieku epigenetycznego w próbkach nasienia.
  4. Opracowała optymalny model EPIC-8CpG do predykcji wieku w próbkach nasienia.

Wnioski zostały sformułowane prawidłowo i w logiczny sposób wynikają z przeprowadzonego postępowania badawczego.

Pod względem edytorskim rozprawa została przygotowana starannie i nie budzi zastrzeżeń. Manuskrypt został dobrze zredagowany, nie dopatrzyłam się istotnych uchybień stylistycznych i językowych. Zamieszczone tabele i ryciny (nazywane przez Autorkę rysunkami i to sformułowanie bym zmieniła) są estetyczne i opatrzone stosownymi podpisami.

#### **Wnioski końcowe**

Wartość naukową rozprawy oceniam bardzo wysoko i pragnę podkreślić, że projekt badawczy został starannie zaplanowany. Wykonanie wszystkich zaplanowanych zadań wymagało ogromnej wiedzy, zaangażowania oraz nawiązania współpracy z innymi badaczami. Uzyskane wyniki oraz osiągnięcia wieloetapowych prac badawczych są niezwykle wartościowe i wnoszące istotny wkład w dotychczasowy stan wiedzy. Wartym podkreślenia jest nie tylko aspekt poznawczy pracy, ale przede wszystkim jej aplikacyjny wymiar. Biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Pisarek stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego i wnosi istotny wkład w postęp wiedzy. Po zapoznaniu się z pracą mogę stwierdzić, że



Doktorantka zastosowała adekwatne metody badawcze, uzyskała wyniki, które umożliwiły realizację wyznaczonych celów, tym samym wykazała, że jest przygotowana metodycznie i metodologicznie do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

**Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Pisarek spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. Z 2018 r. Poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Aleksandry Pisarek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w *dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*.**

Prof. UAM dr hab. Anita Szwed