

Dr hab. Marcin Jan Kamiński
Muzeum i Instytut Zoologii PAN
Wilcza 64, 00-679, Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Dominiki Pluty
pt. „Nowa metoda izolacji DNA z materiału biologicznego”**

Rozprawa doktorska Pani mgr. Dominiki Pluty przygotowana została kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Dobosza w Zakładzie Technik Molekularnych na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Praca opisuje proces i wnioski dotyczące rozwoju nowej, nieinwazyjnej metody izolacji DNA z kości.

I. Ocena merytoryczna:

a) Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Problematyka badawcza podjęta w rozprawie jest trafna i wpisuje się w najnowsze trendy biologii molekularnej. Obecnie, w skali globalnej, obserwowany jest wzrost zainteresowania badaczy różnych dziedzin analizą DNA pochodzącego z materiałów muzealnych, archeologicznych czy paleontologicznych. Ma to odzwierciedlenie w licznych publikacjach ukazujących się w najlepszych światowych czasopismach, takich jak Nature czy Science, każdego tygodnia. Zapotrzebowanie na „nieinwazyjne” metody pobierania próbek do izolacji DNA będzie prawdopodobnie rosło wraz z rozwojem innych technik molekularnych (np. prace nad zwiększeniem wydajności buforów ekstrakcyjnych). Dlatego też problematyka podjęta przez Kandydatkę wydaje się być istotna.

Zaproponowana metoda izolacji DNA z kości nie była wcześniej wykorzystywana przez innych badaczy. Polega ona na przepompowywaniu buforu trawiącego przez kość z wykorzystaniem kilku, w niektórych sytuacjach jedynie dwóch, odwiertów o małej średnicy. W pracy zasugerowano również, że pewne modyfikacje rozwijanej metody mogą zostać wykorzystane do izolacji DNA z plam krwi pozostawionych na fragmentach tkanin czy papieru. Otwiera to potencjalnie dostęp do całego spektrum nowych materiałów – szczególnie tych o dużej wartości historycznej.

b) Ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki i praktyki

O ile oryginalność proponowanej metody może zostać łatwo wykazana na podstawie przeglądu literatury, o tyle ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenia dla nauki jest skomplikowana. Największym tego inhibitorem jest brak danych dotyczących przebadanego przez Kandydatkę materiału. W sekcji „Materiał i metody” podano co prawda liczbę przeanalizowanych kości, ale brak jest informacji na temat okoliczności w jakich zostały one pozyskane przez prokuraturę. Nie wiadomo przykładowo ile czasu minęło od śmierci osób, których kości były analizowane. Zgodnie z Tabelą 3 ogólny sukces rozwijanej metody był dość niski i wyniósł około 28% (otrzymano 15 profili genetycznych na 54 przeprowadzone próby). W zależności od specyfiki analizowanego materiału (np. okoliczności śmierci) taki wskaźnik sukcesu można uznać jako zadowalający lub nie. Autorka pracy twierdzi, że rozwijana metoda ma potencjalne zastosowanie w muzealnictwie. Jednak nie zostało sprecyzowane czy jakiegokolwiek próby muzealne (np. kilkudziesięcioletnie) zostały przebadane.

Kolejnym czynnikiem utrudniającym ocenę wyników jest sposób ich przedstawienia. Całą sekcję wyników tworzy jedynie 12 zdań. Ponadto część z nich, dokładnie dwa, stanowią opis zastosowanych metod, np. „Za każdym razem w otrzymanych eluatach sprawdzano zawartość ludzkiego DNA stosując Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific)”. Pozostałe zdania głównie kierują do załączonych tabel i rycin, np. „Średnie otrzymane stężenia przedstawia poniższa tabela”, zaś te cechują się bardzo

lakonicznymi opisami na podstawie, których ciężko jest wyciągnąć jakiegokolwiek wnioski, np. „Tabela 2. Średnie uzyskane stężenia”. W przytoczonym przypadku nie jest wiadomo jak obliczono wartości średnie. Czy dla wariantu opisanego jako „pompa strzykawkowa z zastosowaniem żywicy i silikonu” wzięto pod uwagę wszystkie 21 wykonanych prób? Czy jedynie trzy, dla których uzyskano profile genetyczne? Ponadto w omawianej tabeli, mimo opisu, do ilustracji wydajności metody destrukcyjnej wykorzystano przedział zmienności a nie wartość średnią. W tym miejscu warto zwrócić uwagę, że brak porównań bezpośrednich wartości uzyskanych stężeń DNA dla poszczególnych kości w aspekcie metoda destrukcyjna-niedstrukcyjna jest uchybieniem. Istotą przeprowadzanego eksperymentu było przecież porównanie wyników uzyskanych oboma tymi typami analiz. Takie przedstawienie sprawy uniemożliwia ocenę wydajności metody w kontekście otrzymywanych stężeń, co jest jednym z istotniejszych czynników wpływających na dobór późniejszej metody sekwencjonowania.

Warto również zwrócić uwagę, że najbardziej wartościowa pod względem merytorycznym Tabela 3 nie została zacytowana w tekście rozprawy i zagadkowo pojawia się w podsekcji wyników o enigmatycznym tytule „Ilościowe przedstawienie wyników”. Największym mankamentem tej tabeli wydaje się być brak sprecyzowania co oznacza stwierdzenie „otrzymanie profilu”. Dokładnie kiedy Kandydatka uznała profil za otrzymany? Czy w tej kategorii mieści się np. profil przedstawiony dla kości „Kr. 51-14” w Tabeli 5, dla którego otrzymano informację o dwóch z 17 analizowanych markerów? Ponadto, naprzemienne użycie terminów „dwa tunele” i „dwa kanały” w nagłówku tabeli trzeciej utrudnia odbiorcy interpretację przedstawionych wyników.

Wspomniana już lakoniczność tytułów tabel i rycin w kontekście braku opisu wyników nakazuje odbiorcy ostrożność w interpretowaniu dokonań Kandydatki. Dla przykładu, Tabela 4 prawdopodobnie prezentująca profile genetyczne wybranych próbek (brak specyfikacji) opatrzona jest następującym opisem: „Tabela 4. Kolumny ze złożem krzemionkowym zestaw *QIAquick PCR Purification Kit Qiagen*”. Taki zapis nie precyzuje dokładnie, o który wariant eksperymentu chodzi. Czy omawiana jest tutaj wersja z zastosowaniem silikonu i żywicy? Czy bez? A może obie jednocześnie? Ponadto, w sekcji „Analiza genetyczna” wprowadzone zostały kody przebadanych kości, które nigdzie indziej nie znajdują odniesienia. Brak wykazu przeanalizowanych fragmentów kostnych i ich kodów znacznie ogranicza możliwość falsyfikacji danych przedstawianych w rozprawie.

Ostatecznym czynnikiem utrudniającym ocenę uzyskanych rezultatów oraz ich znaczenia dla nauki jest wybiórczość z jaką przedstawione zostały wyniki. Dla przykładu prezentowane w sekcji „Analiza genetyczna” tabele 4-6 oraz Ryc. 9-12 opatrzone są następującym komentarzem: „Poniższe tabele i przykładowe elektroferogramy prezentują uzyskane wyniki”. Na jakiej podstawie dokonano wyboru prezentowanych elektroferogramów?

c) Poprawność formalno - językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Pod względem formalno-językowym rozprawa napisana jest poprawnie. Największym mankamentem pracy w tym aspekcie jest nadużywanie przez Kandydatkę kolokwializmów. Dla przykładu: „Stężenie DNA najlepsze było przy próbach z silikonem”, lub „Najlepsze wyniki uzyskano wymywając DNA w czasie od 8 do 10 godzin”. W obu tych przypadkach słowo „najlepsze” powinno zostać zastąpione bardziej adekwatnym wyrazem.

Pewne wyrażenia zawarte w rozprawie wydają się być tendencje. Jak na przykład następujące twierdzenie zawarte we wnioskach: „Metoda obiegu buforu trawiącego z zastosowaniem pompy perystaltycznej dała najgorsze efekty”. Z Tabeli 3 wywnioskować możemy, że wspomniana przez Kandydatkę metoda nie dała żadnych mierzalnych rezultatów. W tym samym kontekście niezręczne wydaje się stwierdzenie: „... odrzucono powszechnie stosowaną do izolacji z kości metodę ze szkodliwym dla zdrowia roztworem fenol-chloroform i zastąpiono ją zestawami ze złożem krzemionkowym i kulkami magnetycznymi”. W pracy nie przedstawiono argumentów za odrzuceniem tej metody. Kandydatka co prawda nie uzyskała profili genetycznych metodą fenolowo-chloroformową dla trzech przebadanych przez siebie prób, jednak wydaje się to być niewystarczającym powodem do odrzucenia tej metody w całości. W celu jednoznacznego zdyskredytowania danego protokołu ten sam izolat/izolaty winien być procedowany różnymi sposobami i jedynie w przypadku powtarzających się niepowodzeń w obrębie jednej metody można by wyciągnąć odpowiednie wnioski. Ewentualnie można by dokonać tego poprzez analizę literatury i korelację niskiej wydajności metody „fenolowej” dla prób o niskich stężeniach DNA. Jednakże, w pracy Kandydatka nie przedstawiła stężeń dla

poszczególnych izolatów. W tym miejscu należy zaznaczyć, że metoda „fenolowa” jest z powodzeniem stosowana w badaniach antycznego DNA (np. do izolacji DNA bakterii z próbek datowanych na ok. 2000 lat wstecz; Barbieri et al. 2020; <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66917-7>)

Pewne sentencje zawarte w rozprawie wydają się niezrozumiałe. Dla przykładu: „*Rudolf Singer podczas jednego z wykładów zaproponował zainteresowanym otrzymanie próbek DNA*”. Zdanie to wydaje się być nie opatrzone wystarczającym kontekstem. Podobnie jak następujące stwierdzenie: „*[Mitochondrialne DNA] Przekazywane jest tylko w linii żeńskiej, w związku z czym jest spore prawdopodobieństwo dowodzenia istnienia Mitochondrialnej Ewy – kobiety, od której pochodzą współcześni ludzie (poza Afryką)*”. Co oznacza „spore prawdopodobieństwo dowodzenia istnienia Mitochondrialnej Ewy”? Kolejne zdanie ma charakter antropocentryczny: „*Wprawdzie analizy dotyczyły zwierzęcia, a mianowicie Zebry kwaggi, to jednak był to ogromny krok do dalszego rozwoju i doskonalenia technik genetycznych*”. Człowiek również jest zwierzęciem, zaś badania gatunków innych niż *Homo sapiens* często znacznie wyprzedzają swoimi osiągnięciami prace antropologiczne. Dla przykładu, najstarsze potwierdzone antyczne DNA, datowane na ok. milion lat wstecz, zostało wyizolowane z ciosów mamuta (van de Valk et al. 2021: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03224-9>).

Inne mniejsze nieścisłości formalno-językowe dotyczyły braku zdefiniowania skrótów „SNP” i „miniSTR” przy pierwszym ich użyciu; wykorzystaniu terminu „hemi-niedestrukcyjne” zamiast np. częściowo destrukcyjne; oraz niepoprawnej odmiany wyrazu „rodzina” w następującym zdaniu: „*Już w roku 2009 ukazała się praca dotycząca ekstrakcji DNA z 3 rodziny owadów*”. Tu wkradła się również literówka w wyrazie „ekstrakcja”.

II. Ocena metodologiczna:

a) Dobór literatury, umiejętności, wykorzystania źródeł

Biorąc pod uwagę dynamiczny rozwój biologii molekularnej uznać należy, że cytowana w rozprawie literatura jest relatywnie stara. Na 88 przytoczonych źródeł tylko 13 to pozycje opublikowane po 2010 roku, natomiast tylko dwie z nich ukazały się po 2015 roku. Wiele z przytaczanych prac ma charakter lokalny – opracowania w języku polskim nie będące oryginalnymi pracami badawczymi a jedynie syntezą prac zagranicznych. Brak jest cytacji odnośnie największych odkryć dotyczących badań kości ostatnich lat, np. praca opisująca sekwencje antycznego DNA uzyskane z ciosów mamucich datowanych na około milion lat wstecz (van de Valk et al. 2021: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03224-9>), oraz maszynopis przedstawiający część skalistą kości skroniowej jako kość o największym stężeniu endogenego DNA (Gamba et al. 2014: <https://doi.org/10.1038/ncomms6257>). W kontekście pierwszej z przytoczonych powyżej prac, następujące stwierdzenie zawarte w rozprawie wydaje się anachroniczne i ukazuje poziom rozwoju jaki dokonał się w biologii molekularnej w ciągu ostatnich 12 lat: „*Natomiast w 2010 roku dzięki pracy zbiorowej wielu autorów udało się opublikować badania dotyczące udanego sekwencjonowania, DNA wyizolowanego z włosów zachowanych w wiecznej zmarzlinie i liczących 4000 lat*”.

Biorąc pod uwagę merytoryczny aspekt pracy niedopatrzaniem wydaje się być pominięcie w dyskusji niedawno opublikowanej pracy, której autorzy testowali konkurencyjny do rozwijanego przez Kandydatkę nieinwazyjny sposób izolacji DNA z zębów (Harney et al. 2021: <https://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.267534.120>). Zgodnie z przedstawionym w publikacji opisem protokół ten umożliwi późniejsze radiodatowanie analizowanej próbki, co było pokrótce dyskutowane przez Kandydatkę w jej rozprawie.

Oceniając umiejętność wykorzystania źródeł przez Kandydatkę należy zauważyć, że pewne stosunkowo duże części pracy zawierają wiele stwierdzeń nie popartych cytacjami. Jest to szczególnie widoczne w sekcji „Metody izolacji DNA”, gdzie autorka opisuje wybrane metody izolacji DNA bez odwoływania się do jakichkolwiek źródeł. Z tego względu nie jest jasne czy metody „kulek magnetycznych” i „fenol-chloroform” stanowią oryginalne osiągnięcie Kandydatki, czy też zostały rozwinięte przez innych badaczy. Podobną sytuację zaobserwować można w dyskusji gdzie, na przykład, następujące zdanie nie zostało wsparte cytacjami: „*Biorąc pod uwagę konieczność zastosowania różnorodnych roztworów aby oczyścić próbkę badaną przez analizę, a następnie wprowadzania kolejnych, agresywnych buforów do wymycia DNA, coraz powszechniej poddaje się w wątpliwość niedestrukcyjność dotychczas opublikowanych metod*”.

Nadużyciem dotyczącym niepoprawnego wykorzystania źródeł jest sposób w jaki Kandydatka odniosła się do istniejących już prac opisujących alternatywne protokoły niedestrukcyjnego izolowania DNA. W „Dyskusji” rozprawy znaleźć możemy następujące stwierdzenie: „*Najbardziej bliskie założeniom niniejszej pracy są badania nad zębami czy kośćciami opisane we wstępie (^{74,75,78,79}, Cobb, Rohland, Hervella, Gomes i in) i traktujące, a czasami nawet wręcz nazywające wprowadzone metody jako niedestrukcyjne. Jednak, moim zdaniem, są one mimo wszystko niszczące, a w najlepszym razie hemi-niedestrukcyjne.* Konkludując Kandydatka zwróciła uwagę na istotny wpływ omawianych metod na badane obiekty: „Wygląd kości czy też zębów zamieszczonych w omawianych pracach znacząco różni się od wyglądu przed procedurami”. Jedną z opisywanych tu prac jest publikacja autorstwa Rohland et al. (2004), którą to Kandydatka przedstawiła we wstępie następująco: „*Kolejne badania nieinwazyjne również dotyczyły zębów tym razem zwierzęcych i zostały opublikowane w 2004 roku przez Rohlanda i współautorów⁷⁵. Protokół polegał na wymywaniu DNA z powierzchni próbek, dzięki płukaniu ich w roztworze trawiącym. Pionierzy zapewniają (co również zostało wykazane na fotografiach załączonych w publikacji), że nie dochodziło do żadnych zmian morfologicznych na badanym materiale nawet przy pięciu ekstrakcjach. Wykazano jedynie, że zęby uległy znacznemu oczyszczeniu*”. Przeglądając pracę Rohland et al. (2004) należy zgodzić się z twierdzeniem, że wygląd zewnętrzny przebadanych próbek nie różnił się znacząco przed i po ekstrakcji DNA. Ukazuje to pewną stronniczość Kandydatki przy prezentowaniu swoich wyników i wykorzystywaniu źródeł.

Warto również zwrócić uwagę na przytaczanie przez Kandydatkę faktów zupełnie niezwiązanych z analizowanym przez siebie tematem. Widoczne jest to szczególnie we wstępie, w którym przedstawiona została dokładna historia odkrycia struktury DNA. Jakkolwiek, część ta może ukazywać akademicki kunszt Kandydatki i ogólną znajomość podstaw genetyki, tak ciężko zrozumieć stosowność prezentowania w pracy sześciu form dwuniciowego DNA. Informacje te nie znajdują zastosowania w dalszych częściach pracy.

Tym niemniej, biorąc pod uwagę całokształt pracy należy stwierdzić, że wykorzystane przez Kandydatkę źródła ukazują jej ogólną znajomość analizowanego zagadnienia i są wystarczające do sformułowania i dyskusji aspektów merytorycznych prezentowanych w rozprawie.

b) Poprawność formułowania problemów i hipotez (założenia badawcze)

Z kontekstu pracy jasno wywnioskować można problemy badawcze podjęte przez Kandydatkę. Natomiast ich sformalizowany zapis wprowadza nieścisłości, które wymagają dalszych uzupełnień. Cel pracy został sformułowany następująco: „*Celem pracy było opracowanie i sprawdzenie metody, która dostarcza pełnowartościowy DNA, ale nie pozostawia widocznych śladów preparacji na badanym materiale oraz udowodnienie, że jest możliwe uzyskanie takiego samego profilu genetycznego, o porównywalnej jakości, jaki uprzednio otrzymano stosując standardową, niszczącą procedurę*”. Do oceny czy postawione w rozprawie założenia zostały zrealizowane niezbędne jest zdefiniowanie pojęcia „*pełnowartościowy DNA*”. Czy jest to określone stężenie DNA w izolacie? Czy jest to izolat, który po zsekwencjonowaniu dostarczy danych odnośnie badanych profili genetycznych? Jeśli w przyszłości badane będą inne *loci*, czy będzie to miało znaczenie dla powtórnej oceny „wartościowości” ekstraktu?

Druga część przytoczonego powyżej celu zdaje się klarować pewne z tych nieścisłości. Jednocześnie ukazując, że zarówno merytorycznie jak i stylistycznie postawione założenie jest zbyt skomplikowane. Ponadto, z punktu widzenia filozofii nauki zawarcie w celach pracy chęci udowodnienia z góry założonego stwierdzenia wydaje się być niepoprawne. Celem pracy naukowej jest testowanie hipotez, a nie bezpośrednia chęć ich udowodnienia. Merytorycznie druga część celu postawionego przez Kandydatkę nie precyzuje jak pełne profile winny być otrzymane i ile profili niezbędnych jest aby zrealizować cel. Czy w przypadku otrzymania jednego pełnego profilu na 54 wykonane próby można by uznać że założenia rozprawy zostały zrealizowane?

Pewną niejasność do rozprawy wprowadza również jej tytuł, który precyzuje że rozwijana metoda dotyczy „*materiału biologicznego*”. W tym miejscu należy zapytać czy możliwa jest izolacja DNA z materiałów niebiologicznych? Przedstawiona do oceny praca w całości koncentruje się na izolacji DNA z kości. Zarysowana w aneksie modyfikacja proponowanej metody, przeznaczona do ekstrakcji DNA z tkanin i papieru, była jedynie pobieżnie testowana przez promotora Kandydatki. Ze względu na brak materiałów porównawczych (tj. wyników uzyskanych metodą destrukcyjną) oraz inne wyszczególnione przez Kandydatkę przyczyny

opisywana modyfikacja nie znalazła się w głównym ciele rozprawy. W tym kontekście należy uznać, że tytuł pracy powinien odzwierciedlać ten stan rzeczy.

c) Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania

Ten aspekt pracy jest trudny do jednoznacznej oceny. Z jednej strony główne założenie zaplanowanych eksperymentów jest poprawne metodycznie, tj. porównywanie wyników otrzymanych metodą destrukcyjną i niedestrukcyjną dla poszczególnych próbek. Z drugiej strony, informacje zawarte w sekcji „Materiał i metody” są niepełne i pozostawiają odbiorcę w strefie domysłu.

Nie podano technicznego ani medycznego opisu przebadanych kości (np. masa, wymiary, typ kości). Ponadto z opisu wynika, że przeanalizowano 43 kości (strona 21). Jednakże sumaryczna liczba przeanalizowanych prób zgodnie z tabelą trzecią wynosi 54. Kolejnym mankamentem jest brak szczegółowych informacji odnośnie przeprowadzonych reakcji PCR (np. profile termocyklera, startery, stężenia izolatów i odczynników). Najważniejszą informacją w tym kontekście byłoby sprecyzowane jakie objętości otrzymanych ekstraktów wykorzystano w procesie amplifikacji. Jest to szczególnie istotne w przypadku analizy kości z relikwiarza Alojzego Ligudy. Niewykorzystany ekstrakt, o ile istnieje, mógłby zostać użyty do przygotowania bibliotek, które następnie mogłyby zostać zsekwencjonowane z wykorzystaniem wysokopręstowych metod. W wielu przypadkach takie rozwiązanie może dostarczyć danych odnośnie relatywnie krótkich sekwencji (>24 par zasad) co jest niemożliwe z wykorzystaniem sekwencjonowania „Sangerowskiego” (Gansauge i Meyer 2013; <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.038>).

Odnoszę wrażenie, że Kandydatka nie oddzieliła od siebie fazy rozwijania swojej metody od fazy jej testowania. Narracja zawarta w sekcji „Materiał i metody” obrazuje głównie to jak nowa technika była projektowana. Nie jest jasne czy pierwsze nie do końca udane podejścia zostały zaliczone do całkowitej liczby wykonanych prób (Tabela 3). W tym kontekście dziwi nadreprezentacja prób opisanych jako „*Silikon i żywica - pompa*”. W tym wariantcie eksperymentu wykonano 21 powtórzeń, zaś w innych jedynie trzy lub sześć.

Zastanawiające jest również dlaczego Kandydatka zdecydowała się na porównywanie ze sobą aż czterech różnych typów protokołów izolacji DNA, tj. zestawy QIAquick PCR i QIAamp DNA, metoda fenol-chloroform, oraz kit z wykorzystaniem kulek magnetycznych. Takie podejście komplikuje eksperyment wprowadzając dodatkowy poziom zmiennych. Utrudnia to wyciąganie wniosków na temat skuteczności odwiertów. Ponadto, testowane metody izolacji są powszechnie wykorzystywane w badaniach antycznego DNA. Z tego względu ich „weryfikacja” na podstawie kilku powtórzeń (3-6) wydaje się być nie na miejscu. Kandydatka sama wybiórczo marginalizuje wyniki tej części eksperymentu nie aplikując ich do swojej praktyki. Zgodnie z Tabelą 3 zastosowanie zestawu QIAquick PCR zawsze skutkowało niską wydajnością otrzymywania profili genetycznych, tj. wariant „*Silikon i żywica - pompa*”: 14% sukcesu; „*bez silikonu i żywicy - pompa*”: 0% sukcesu. Znacznie wydajniejsze wydaje się za zastosowanie kitu QIAamp (100% sukcesu). Jednakże, kości z relikwiarza Alojzego Ligudy zostały przeanalizowane z wykorzystaniem kitu QIAquick PCR, nie zaś QIAamp.

W pracy brak jest szczegółowych informacji odnośnie wykorzystywanych kontroli. Jak dokładnie wyglądały kontrole pozytywne i negatywne? Na jakich etapach były one wprowadzane? Czy kontrolę negatywną z etapu izolacji DNA przeprowadzano przez cały proces analizy genetycznej? Jak sprawdzano stopień kontaminacji próbek egzogennym DNA? Nie wiadomo również jak dokładnie oceniono wpływ wykorzystanej żywicy na proces PCR.

Z wniosków zawartych w rozprawie wynikają kolejne nieścisłości. W tej, niemalże terminalnej, części pracy odbiorca dowiadyuje się że „*w niektórych przypadkach otrzymano profile, które nie odpowiadały wynikom z metody destrukcyjnej, były mieszaniną profili*”. Nie wiadomo dokładnie jakiej liczby uzyskanych profili dotyczy to zjawisko oraz czy te nie do końca tożsame profile zostały zaklasyfikowane jako „otrzymane” w Tabeli 3? Ponadto, w dyskusji Kandydatka zawarła następujący wniosek: „*Opracowana procedurami ma następujące zalety: ... -przy metodzie dotyczącej zębów umożliwia badanie płytki nazębnej po zastosowaniu metody ...*”. Pomijając stylistykę tego zdania, pozostaje pytanie jak Kandydatka ustaliła poprawność tego stwierdzenia gdy analizie nie poddane zostały żadne zęby?

d) Poprawność układu pracy i struktury podziału treści

Układ ocenianej rozprawy jest tradycyjny. Maszynopis zawiera streszczenie, wstęp z wyszczególnionymi celami, materiał i metody oraz wyniki podzielone na podsekcje, dyskusję, wnioski, wykaz literatury oraz dodatkowe elementy takie jak aneks czy spis ilustracji. W skali ogólnej praca ułożona jest prawidłowo. Jednakże w szczegółach znaleźć można pewne uchybienia, które opisano poniżej.

Głównym zarzutem do ocenionej pracy jest lakoniczne przedstawienie sekcji wyników, na które składają się wklejone, często bez komentarza, tabele i ryciny. Jak już wspomniałem wyniki opisuje jedynie 12 zdań, co jest z pewnością niewystarczające do klarownego przedstawienia wszystkich osiągnięć Kandydatki. Ponadto w dyskusji pracy nie zaprezentowano odniesień do poszczególnych rycin i tabel przedstawionych w wynikach, co utrudnia weryfikację hipotez omawianych w tej sekcji.

Oprócz wspomnianych już powyżej uchybień sekcji „Materiał i metody” wydaje mi się że rozdział ten powinien zawierać schemat ilustrujący wszystkie warianty przeprowadzonego eksperymentu. Ułatwiłoby to odbiorcy nawigację – szczególnie osobom jedynie przeglądającym rozprawę. Ponadto, sama klarowność sekcji powinna zostać zwiększona poprzez eliminację licznie występujących tu powtórzeń. Dla przykładu, zdania „Analizę genetyczną wykonywano stosując elektroforezę kapilarną na aparacie ABI PRISM® 310” oraz „Zawartość ludzkiego DNA sprawdzano stosując Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific)” powtórzone zostały w rozprawie dwukrotnie.

Oceniając streszczenie należy zauważyć, że dużą jego część stanowi niepotrzebny i relatywnie szczegółowy opis procedury izolacji DNA i późniejszego amplifikowanego wybranych fragmentów metodą PCR. Jest to zastanawiające ze względu na brak jakichkolwiek informacji dotyczących prowadzonych wariantów opisywanego w rozprawie eksperymentu. Ponadto, na 4244 znaki stanowiące streszczenie jedynie następujące 63 wykorzystano do opisu wyników i wniosków: „Wyniki i wnioski zawarto w prezentowanej rozprawie doktorskiej”. Dlatego też należy stwierdzić, że streszczenie nie reprezentuje osiągnięć i metodyki zawartej w rozprawie. Ponadto, w streszczeniu zawarto odniesienia do cytacji (dwie pozycje) co jest zabiegiem niestandardowym i niepotrzebnym.

Omawiając układ pracy należy wspomnieć, że podpisy do zawartych w rozprawie rycin i tabel są lakoniczne i niejednoznaczne. Na przykład, „Rycina 2. Wstawienie igieł”. Opisy te powinny być kompletne i zawierać wszelkie informacje niezbędne do ich interpretacji. Dla przykładu, podpis ryciny 13 - „Kość po metodzie niedestrukcyjnej. Obok zdjęty silikonowy kokon” – nie precyzuje wariantu eksperymentu jaki został użyty to izolacji DNA oraz poprzez brak kodu zobrazowanej kości nie wiadomo czy izolacja zakończona została sukcesem.

Wniosek końcowy

Pomimo uwag wyszczególnionych powyżej uznać należy, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim było zaprojektowanie minimalnie inwazyjnej metody izolacji DNA z kości. Z treści pracy wywnioskować można, że Kandydatka posiada ogólną wiedzę teoretyczną i umiejętności praktyczne z zakresu reprezentowanej przez siebie dyscypliny, co umożliwia jej samodzielne prowadzenie prac badawczych.

Konkludując, 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. Nr 65, poz. 595, z późn. zm).

Warszawa, 14.02.2022

Dr hab. Marcin Jan Kamiński

