

O C E N A

pracy doktorskiej mgr Dominiki Pluta pt. *Nowa metoda izolacji DNA z materiału biologicznego*

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, różnią się jednak w zależności 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 również działanie warunków środowiskowych, często ekstremalnych, jak wysoka temperatura, promieniowanie UV, czynniki utleniające, czy zanieczyszczenia biologiczne i chemiczne.

Szczałki biologiczne mogą przedmiotem badań przedstawicieli co najmniej kilku dyscyplin nauki, w tym od niedawna biologów molekularnych, stąd powstanie określenia dla tego kierunku - archeologia molekularna. 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 zawarta w starym DNA stanowi zatem cenne uzupełnienie danych antropologicznych, archeologicznych i paleontologicznych.

W większości próbek archiwalnych zawartość DNA jest bardzo mała. Najczęściej wybieranym materiałem dla analizy DNA szczątków ludzkich pozostają zatem kości i zęby, jako najtrwalsze i najtrudniej poddające się rozkładowi. Szczególnie istotna staje się w tej sytuacji eliminacja substancji obcych, które mogłyby utrudniać dalsze etapy prowadzonych badań. Należą do nich różnego rodzaju zanieczyszczenia, ale także DNA innych osób naniesiony w czasie do momentu podjęcia identyfikacji genetycznej, szczególnie na etapach poszukiwania, wydobywania i zabezpieczania materiału kopalnego.

Magister Dominika Pluta przedłożyła ocenianą pracę Uniwersytetowi Medycznemu we Wrocławiu jako rozprawę na stopień doktora nauk medycznych.

1) Ocena merytoryczna:

a. Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność:

Istnieje wiele modyfikacji technik ekstrakcji DNA wykorzystywanych szczególnie w genetyce sądowej, zwykle na podstawie dostępnych na rynku w postaci gotowych zestawów. Ogromna większość, jeżeli nie wszystkie, stosowanych dotąd metody ekstrakcji historycznego DNA z eksponatów muzealnych wiąże się z ich uszkodzeniem. Jest oczywiste, że przy stosowaniu takich metod cenne obiekty nie są chętnie lub wcale udostępniane do badań. W świetle ciągłego rozwoju naukowego i technologicznego można założyć, że stosowane wcześniej, jaki i wielce przydatne obecnie, metody ekstrakcji będą w niedalekiej przyszłości uzupełnione bardziej skutecznymi. Dzięki temu wzrosną potencjalne możliwości badania historycznego DNA. Tendencję taką można wyraźnie wysnuć także z dysertacji Doktorantki. Z racji tego, przechodząc do właściwej merytorycznej i formalnej oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że dobór tematu przez Autorkę był trafny i godny zainteresowania z punktu widzenia identyfikacji genetycznej człowieka i archeologii molekularnej.

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

Zespoły zajmujące się historycznym DNA pochodzenia ludzkiego mają często charakter interdyscyplinarny łącząc specjalistów z biologii molekularnej, biologii ewolucyjnej, antropologii, archeologii, paleontologii czy genetyki sądowej. Doktorantka ekstrakcję DNA z materiału kostnego przeprowadziła samodzielnie opracowaną, innowacyjną metodą nieniszczącą, co ma niewątpliwe znaczenie w kontekście uzyskania informacji ukrytych w obiektach cennych z uwagi na walory historyczne, religijne, czy emocjonalne. Autorka słusznie podkreśla, że zastosowana metoda spełnienia odpowiednie rygory metodyczne w sposób zasadniczy omijając problem kontaminacji powierzchni obiektu, gdyż materiał genetyczny jest wyplukiwany od wewnątrz kości.

c. Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna:

Manuskrypt napisany jest w sposób poprawny. Autorka nie ustrzegła się nielicznych błędów literowych np. 'kwas dezoksyrybonukleinowy' zamiast 'kwas deoksyrybonukleinowy' na str. 8, które nie wpływają na wysoką ocenę rozprawy, jednak powinny zostać usunięte przed jej ewentualnym przygotowaniem do publikacji. Jako że weryfikacja ilościowa i jakościowa uzyskanych izolatów DNA prowadzone były z użyciem tych samych metod i odczynników

(*Quantifiler*, *NGM Select*) dla każdego z testowanych systemów ekstrakcji, sugeruję jednorazowe zaznaczenie tych czynności w opisie metod, zamiast powtarzania w kolejnych podrozdziałach. W tytułach tabel 3 i 7 oraz niektórych podrozdziałów wyraz 'wyniki' jest niepotrzebny, jako że wiadomo o ich zawartości z tytułu rozdziału 'WYNIKI'. Zwracam również uwagę na ujednoczenie stosowania odmiany przez rodzaje skrótu DNA sugerując pozostawienie formy *ten* DNA (rodzaj męski), nie *to* DNA (rodzaj nijaki), jako że kilka razy pojawiają się one na przemian.

2) Ocena metodologiczna:

a. *Dobór literatury, umiejętności wykorzystania źródeł:*

We WSTĘPIE rozprawy, liczącym dziewięć stron, Doktorantka szczegółowo opisała zagadnienia związane z historią odkrycia DNA, jego klasyfikacją i budową, zawartością w tkankach, degradacją i problemem kontaminacji materiału badawczego. Oprócz tego dokonała przeglądu rutynowych technik izolacji DNA zwracając uwagę na metody klasyczne, niszczące oraz nowe, nieniszczące. Ta część rozprawy oparta jest na przeglądzie doniesień z piśmiennictwa i stanowi wprowadzenie czytelnika w zagadnienia, które zostały przedstawione w CELACH pracy. W DYSKUSJI Doktorantka przedstawiła własne spostrzeżenia i uwagi do przeprowadzonych eksperymentów, pozbawione jednak konfrontacji i polemiki z wynikami i poglądami innych badaczy. Jak sama stwierdziła, porównanie z danymi literaturowymi nie jest możliwe z powodu braku opublikowanych prac opisujących zagadnienia poruszone w jej dysertacji. W efekcie PIŚMIENNICTWIO liczy skromne 88 pozycji, wśród których najnowsze, pojedyncze cytowanie pochodzi z 2018 roku, dwa kolejne chronologicznie z 2016 roku. Przypuszczam, że dobór literatury wynikał z intencji Autorki skupienia się wyłącznie na problematyce rozprawy, stąd merytorycznie w większości jest prawidłowy i pozwala na realizację założeń badawczych. Jednak w moim przekonaniu szerzej powinna być uwzględniona i referowana najnowsza literatura z zakresu metodologii postępowania z DNA historycznym. W sumie jednak zakres cytowanego piśmiennictwa obejmował większość aspektów związanych z tematyką rozprawy doktorskiej, a Autorka wykazała się jego znajomością i dobrą prezentacją. Sugeruję przy okazji ujednoczenie formy spisu piśmiennictwa w zakresie czasopism: rok wydania, numer rocznika, ewentualnie numer zeszytu, strona początkowa – strona końcowa.

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

Doktorantka prawidłowo sformułowała główny problem badawczy, polegający na opracowaniu i sprawdzeniu metody dostarczającej próbek DNA do analizy identyfikacyjnej, nie pozostawiającej przy tym widocznych śladów preparacji na badanym materiale oraz udowodnieniu, że jest możliwe uzyskanie takiego samego profilu genetycznego, o porównywalnej jakości, jaki uprzednio otrzymano stosując standardową, niszczącą procedurę. 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. Uważam, że niekompletna jest przytoczona na stronie 13 rozprawy teza, iż wyższa trwałość, a stąd efektywność badania mitochondrialnego DNA pomimo upływu czasu, wynika z jego budowy. Wielu badaczy tłumaczy bowiem ten fakt występowaniem w komórce licznych kopii mtDNA w porównaniu z DNA jądrowym.

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

MATERIAŁY I METODYKA badań zostały opisane szczegółowo w rozdziale zajmującym 12 stron rozprawy. W celu rozwiązania zadania badawczego Doktorantka opracowała i zweryfikowała prototyp laboratoryjnego systemu do nieniszczącej ekstrakcji DNA z materiału kostnego, dodatkowo eliminujący wpływ kontaminacji. Czynności laboratoryjne zostały opisane szczegółowo i dodatkowo zilustrowane za pomocą fotografii. Opis zastosowanych metod badawczych nie budzi wątpliwości. Wszystkie procedury były prowadzone na specjalnie przygotowanych i wyposażonych stanowiskach badawczych w celu zabezpieczenia przed kontaminacją próbek, co jest kluczowe w badaniu znikomych ilości zdegradowanego DNA. Każdy z poniżej opisanych eksperymentów był prowadzony od trzech do 21 razy, aby zapewnić powtarzalność wyników. Autorka opisała i udokumentowała wprowadzenie licznych modyfikacji i usprawnień w trakcie opracowywania metody. W celu weryfikacji skuteczności testowanych rozwiązań Doktorantka posłużyła się sprawdzonymi metodami analizy ilościowej oraz jakościowej, gwarantującymi wysoką jakość wyników. Podejście takie świadczy o dobrym przygotowaniu do zadań badawczych i rozwojowych. Oceniając fazę badawczą pracy należy uznać, że Doktorantka włożyła wiele wysiłku w realizację założonego celu.

d. Poprawność układu rozprawy i struktury podziału treści:

Przedstawiona do oceny rozprawa nie jest obszerna, gdyż liczy łącznie 74 strony, na których znalazły się 23 ryciny (głównie w postaci fotografii dokumentujących wykonywane eksperymenty) i osiem tabel. Treść kończy się siedmioma wnioskami odpowiadającymi postawionym CELOM. Rozprawa jest napisana w sposób interesujący i zrozumiały i formalnie posiada właściwy układ rozdziałów, typowy dla rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Proporcje między teoretyczną i praktyczną warstwą pracy uważam za wyważone, jednakże o ile kwestie metodologiczne i techniczne zostały opisane i zilustrowane szczegółowo, to zastrzeżenie moje budzi nadmiernie minimalistyczny sposób przedstawienia wyników badań, polegający na zamieszczeniu tabel i obrazów elektroforetycznych, przy braku choćby lakonicznego omówienia i analizy. Takie zaniechanie pozostawia czytającemu pracę li tylko własną interpretację. Czytelne tabele i ryciny mają za zadanie ułatwienie merytorycznej interpretacji warstwy tekstowej i dodatkowo dokumentują przygotowanie do działalności naukowej. Należy tutaj wspomnieć, że podstawą pozytywnej oceny pracy jest wykazanie przez doktoranta umiejętności wykorzystania w praktyce zdobytej wiedzy, opanowania warsztatu badawczego, wykorzystywania narzędzi badawczych i wyciągania wniosków.

W Aneksie do rozprawy znalazły się opisy prób identyfikacji genetycznej domniemanych szczątków kostnych zakonnika Alojzego Ligudy, zaplamień prawdopodobnie pochodzących od Tadeusza Kościuszki, ujawnionych na fragmencie tkaniny (tzw. 'Ręczniku') z Muzeum Miejskiego w Poznaniu oraz zaplamień prawdopodobnie pochodzących od Maksymiliana Kolbe, ujawnionych na pasiaku obozowym z Muzeum w Niepokalanowie. Na podstawie przedstawionych wyników wydaje się jednak, że niepowodzenie identyfikacji jest bardziej skutkiem niskiej jakości DNA, wyrażonej uzyskaniem szczątkowych profili STR, a nie braku odpowiednich materiałów porównawczych, na co wskazuje Autorka.

e. Wniosek końcowy, konkluzja:

Lektura powyższych rozdziałów pozwala na wysunięcie wniosku, że Doktorantka 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 Dominiki Pluta pt. *Nowa metoda izolacji DNA z materiału biologicznego* jest napisana w sposób dojrzały i świadczy o znajomości tematu, umiejętnym wyborze metodyki badawczej oraz stanowi samodzielne rozwiązanie przez Autorkę problemu naukowego. Uważam także, że rozprawa jest cenna i powinna być uznana za wyróżniającą się, gdyż nie tylko zaproponowane w niej rozwiązania są innowacyjne w kontekście wdrożenia nowych, niedestrukcyjnych możliwości ekstrakcji DNA z cennych lub unikalnych materiałów biologicznych, ale 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. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Mam zatem zaszczyt przedstawić Senatowi Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Dominiki Pluta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. n. med. Witold Pepiński

STARSZY SPECJALISTA
Zakład Medycyny Sądowej

prof. dr hab. Witold Pepiński

19.03.2022