UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
ul. Gagarina 11, 87-100 Toruń
COLLEGIUM MEDICUM IM. LUDWIKA RYDYGIERA W BYDGOSZCZY
ul. Jagiellońska 13-15, 85-067 Bydgoszcz

KATEDRA MEDYCYNY SĄDOWEJ
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel: 52 585 35 52, fax: 52 585 35 53, email: kizmedsad@cm.umk.pl

RPW/1495/2025
Data: 2025-03-04
UMB

Recenzja rozprawy doktorskiej

Imię i nazwisko kandydatki: **mgr Agnieszka Sewastianik**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **„Polimorfizm genetyczny 27 markerów DNA chromosomu Y w próbie populacyjnej polski północno - wschodniej"**

Promotor: **prof. dr hab. Witold Pepiński**

Recenzent: **prof. dr hab. Marcin Woźniak**

1. Wartość naukowa rozprawy

Nowoczesne metody identyfikacji genetycznej, w szczególności zaś analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych na chromosomie Y, znacząco poszerzyły możliwości opiniodawcze laboratoriów kryminalistycznych wykorzystujących te metody a także przyczyniły się istotnie do przyrostu naszej wiedzy o zmienności genetycznej w obrębie ludzkich populacji oraz o pokrewieństwie pomiędzy grupami ludzkimi i szlakach migracji naszego gatunku od niemal samych jego początków.

W szczególności należy wspomnieć o nowych możliwościach, jakie zaoferowała analiza Y-STR w kontekście analiz mieszanin zawierających duży nadmiar DNA kobiety w stosunku do DNA mężczyzny, które są codziennością w badaniach śladów biologicznych zabezpieczanych w sprawach związanych z przestępstwami na tle seksualnym. Również analizy pokrewieństwa, szczególnie w przypadku dalekich krewnych w linii męskiej, znacząco zyskały na pojawieniu się narzędzi identyfikacyjnych wykorzystujących loci chromosomu Y.

Rozwój komercyjnych systemów multipleksowej amplifikacji Y-STR datuje się od początku XXI w., zatem trwa już niemal 25 lat. Pomimo stosunkowo długiego czasu, jaki upłynął od pojawienia się pierwszych takich systemów, nadal tworzone są nowe narzędzia, uwzględniające zarówno zmieniające się potrzeby laboratoriów wykorzystujących te systemy jak i przyrost wiedzy o polimorfizmie poszczególnych markerów, pozwalający zoptymalizować uzyskiwane wyniki pod kątem skuteczności ich pozyskiwania oraz informatywności.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska koncentruje się na szczegółowym opisie i analizie przydatności jednego z komercyjnych systemów multipleksowej amplifikacji układów Y-STR, jakim jest system Y Filer Plus PCR Amplification Kit produkowany przez firmę Thermofisher Scientific. Systemy takie, oprócz podlegania procedurom walidacyjnym producenta, wymagają również odpowiedniego przygotowania laboratoriów będących końcowymi użytkownikami, obejmującego walidację wewnętrzną w danym laboratorium oraz ocenę przydatności danego systemu w badaniach lokalnej populacji w kontekście identyfikacyjnym i statystycznym. Eksperymenty walidacyjne i analiza przydatności omawianego systemu w konkretnym laboratorium były przedmiotem ocenianej dysertacji.

Uzyskane przez Autorkę wyniki badań eksperymentalnych wskazują na wysoką użyteczność i przydatność ocenianego systemu w badaniach próbek DNA dla potrzeb sądowych.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Oceniana przeze mnie praca stanowi kompleksowe opracowanie stosunkowo wąskiego i specjalistycznego zagadnienia, jakim jest walidacja komercyjnego systemu multipleksowej amplifikacji układów Y-STR i ocena statystyczna generowanych przez ten system danych. Biorąc to pod uwagę należy podkreślić w pierwszej kolejności dokonane przez Autorkę umiejętne i przejrzyste wprowadzenie czytelnika w tematykę badawczą, dzięki któremu nawet osoba nie będąca specjalistą w omawianej dziedzinie łatwo zrozumie cel i potrzebę prowadzenia opisywanych w publikacji badań.

Cele prowadzonych badań zostały jasno zdefiniowane i konsekwentnie zrealizowane, co znalazło odzwierciedlenie w treści wniosków zamieszczonych na końcu pracy.

Opis eksperymentów związanych z zastosowaną przez Autorkę technologią oraz duża liczba analizowanych próbek stanowią główną wartość merytoryczną ocenianej pracy. Należy podkreślić, że Autorka prowadziła swoje badania zgodnie z rekomendacjami odpowiednich instytucji i towarzystw naukowych. Wykorzystała w nich DNA od 534 niespokrewnionych mężczyzn, co stanowi grupę więcej niż wystarczającą w tego typu badaniach. Na szczególne podkreślenie zasługuje konsekwentne dążenie Autorki do uzyskania wyników, które będą mogły mieć zastosowanie w praktycznie każdym laboratorium chcącym wykorzystać rezultaty jej badań. W szczególności dostarczenie do bazy YHRD haplotypów ponad 500 mężczyzn oznaczonych w zakresie 27 układów Y-STR istotnie wzbogaci tę bazę w zakresie próbek pochodzących z naszego regionu Europy. Należy też wspomnieć o zaawansowanych technikach analizy statystycznej, które zastosowała Autorka w trakcie opracowywania uzyskanych danych, które to pozwoliły na precyzyjną ocenę wartości dowodowej pozyskanych profili w zakresie badań kryminalistycznych i populacyjnych.

W części poświęconej dyskusji wyników Autorka wykazała się umiejętnością krytycznej analizy zarówno wyników swoich badań jak i badań opublikowanych przez innych autorów, odnosząc swoje dane do dostępnej literatury przedmiotu.

Autorka poprawnie zrealizowała założenia eksperymentalne i dokonała analizy statystycznej uzyskanych wyników, z zastosowaniem narzędzi obliczeniowych odpowiednich do postawionego sobie zadania.

Wyciągnięte przez Autorkę wnioski są jasno sformułowane oraz cechują się należytą ostrożnością, dzięki czemu dobrze podsumowują uzyskane wyniki prac eksperymentalnych.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Przedstawiona do oceny praca to przykład dysertacji cechującej się tradycyjną formą publikacji monograficznej. Praca podzielona jest na sześć głównych rozdziałów, wśród których wyróżnić można streszczenie głównych tez pracy, w języku polskim i angielskim, syntetyczny wstęp, zawierający omówienie problemu badawczego, opis celów pracy, materiałów i metod badawczych, wyników zawartych w publikacjach, dyskusję oraz podsumowanie i uwagi końcowe. Całość uzupełniono o wykaz skrótów, wykaz piśmiennictwa, spis tabel i rycin.

Układ pracy jest poprawny i przemyślany a sama praca została przygotowana w sposób dość staranny i estetyczny. W trakcie czytania zauważyłem w niej nieliczne błędy stylistyczne, czy gramatyczne. Z

recenzenckiego obowiązku muszę jednak wspomnieć o kilku uchybieniach natury redakcyjnej, które zauważyłem w recenzowanej pracy.

W pierwszej kolejności chciałbym zauważyć, że rozdział poświęcony bazom danych zawiera szereg ciekawych informacji, które zostały jednak przedstawione w chaotyczny i niezorganizowany sposób. Nie jest dla mnie jasne, według jakiego klucza zostały dobrane bazy danych, których opisy zawarto w tym rozdziale? Zawiera on zarówno informacje o bazach populacyjnych chromosomu Y jak i bazach kryminalistycznych, genealogicznych, ale również genomowych, a nawet o instytucjach prowadzących różne bazy, które same bazami jednak nie są (NCBI). Dodatkowo informacje o bazie YHRD zostały zawarte we wstępie recenzowanej publikacji w dwóch różnych miejscach (str 14-15 i 20-21) i ten podział nie jest dla mnie jasny.

Odnosząc się do opisu głównych populacji w YHRD muszę wspomnieć, że jest ich osiem a nie siedem. Autorce umknęła populacja australijskich Aborygenów, która posiada w tej bazie własną gałąź główną. Ponadto w bazie YHRD nie ma populacji afroeuroazjatyckiej. Przypuszczam, że Autorka mogła mieć na myśli populację afroazjatycką, obejmującą Afrykę Północną i Bliski Wschód.

Opisując zróżnicowanie haplogrup chromosomu Y w obrębie Europy warto dla jasności wywodu wskazać, że haplogrupy Eu18 i Eu19, omawiane na str. 64-65 to wg współczesnej klasyfikacji haplogrupy R1b* i R1a*.

Z drobnych uchybień chciałbym wskazać, że wyrażenie „ten sam haplotyp" (str. 65) w odniesieniu do dwóch próbek pochodzących od różnych mężczyzn nie ma logicznego sensu. Zdecydowanie bardziej pasowałoby tu określenie „identyczny haplotyp". Ponadto w kilku miejscach Autorka, porównując wyniki różnych analiz używa określenia „praca doktorska", nie wskazując, o jaką pracę chodzi. Z kontekstu wnioskuję, że określenie to odnosi się do pracy recenzowanej przeze mnie, zatem, aby nie wzbudzać u czytelnika konfuzji, powinno ono brzmieć „niniejsza praca doktorska", którego to zresztą wyrażenia Autorka w niektórych miejscach używa.

Opisane wyżej uchybienia nie zaburzają ogólnie pozytywnego odbioru całości prezentowanych w ocenianej pracy treści.

Pracę opatrzono obszernym spisem literatury, obejmującym 102 pozycje, niemal wyłączanie anglojęzyczne, pochodzących z recenzowanych czasopism o międzynarodowym zasięgu. Publikacje te zostały dobrane poprawnie z punktu widzenia tematyki pracy i bardzo dobrze reprezentują dostępne, aktualne piśmiennictwo naukowe w zakresie omawianych w ocenianej publikacji zagadnień.

4. **<u>Uwagi krytyczne</u>**

Autorka przedstawionej mi do oceny dysertacji nie ustrzegła się w niej pewnych niedociągnięć i niejasności.

Należy w pierwszej kolejności zauważyć, że jednym ze standardowych sposobów prezentacji danych haplotypowych jest tworzenie sieci haplotypów, pokazujących wzajemne podobieństwa i zależności między nimi oraz częstości. W recenzowanej pracy zabrakło takiej ilustracji, która pozwoliłaby lepiej ocenić złożoność i wartość uzyskanych wyników.

Z opisu prowadzonych eksperymentów wynika, że oprócz zestawu Yfiler Plus Autorka wykonywała również amplifikacje przy pomocy zestawu PowerPlex Y23. Niestety z treści pracy trudno jednoznacznie wnioskować, w jakim zakresie te analizy były wykonywane i czemu miały służyć, Ze wzmianek w sekcjach opisujących ocenę metody (str. 37) porównanie zgodności (str. 43) oraz wnioski z walidacji (strona 56) wynika, że elektroforegramy uzyskane w wyniku analiz z

wykorzystaniem systemu Power Plex Y23 były porównywane z elektroforegramami uzyskanymi w trakcie analiz z użyciem systememu Yfiler Plus. Niestety w całej pracy próżno szukać choćby jednego elektroforegramu lub tabeli ilustrujących ten element prowadzonych badań. Ponadto w sekcji opisującej metodykę badań nie zawarto informacji o warunkach amplifikacji i analizy próbek z wykorzystaniem systemu PowerPlex Y23.

Jeśli chodzi o zakres prezentowanych w recenzowanej pracy danych to w mojej ocenie zabrakło w niej nieco ilustracji w postaci elektroforegramów lub tabel pokazujących surowe wyniki, które posłużyły np. do określenia progów detekcji czy czułości analizowanego systemu. W publikacjach skupiających się na aspektach technicznych tego typu szczegółowe ilustracje są bardzo przydatne dla oceny poprawności wyciągniętych wniosków.

Odnosząc się do sekcji poświęconej analizie mieszanin męskiego i żeńskiego DNA nie znalazłem informacji, jaka była bezwzględna ilość męskiego DNA dodawanego do amplifikacji w mieszaninach, w szczególności w przypadku proporcji niższych niż 1:1000? W Tabeli 5 przedstawiono jedynie proporcje DNA w poszczególnych, przygotowanych mieszaninach, nie podając bezwzględnego stężenia DNA. *Nota bene*, chciałbym zwrócić uwagę, że w tej tabeli Autorka prawdopodobnie zamieniła miejscami opisy kolumn, gdyż wynika z niej, że w przygotowanych mieszaninach było wielokrotnie więcej męskiego DNA niż żeńskiego, co kłóci się z logiką tego eksperymentu, którego celem było, jak rozumiem, wykrywanie minimalnych ilości męskiego DNA przy nadmiarze DNA żeńskiego. Brak informacji o bezwzględnym stężeniu DNA w badanych mieszaninach jest o tyle istotny, że przy stosowanych rozcieńczeniach niemożność amplifikacji Y-STR z danej mieszaniny mogła wynikać nie z samego nadmiaru żeńskiego DNA w próbce ale ze zbyt małej ilości DNA chromosomu Y w tejże próbce, spowodowanej rozcieńczeniem żeńskim DNA.

Odnosząc się do zaprezentowanych na str. 60 i 61 wyników porównań międzypopulacyjnych zastanawia bliskość genetyczna pomiędzy populacjami Hiszpanii, Irlandii, Wielkiej Brytanii i Niderlandów, uwidoczniona na Rycinach 2 i 3, które to populacje charakteryzują się odmienną historią oraz składem haplogrupowym. W dyskusji Autorka nie skomentowała tego zjawiska w żaden sposób.

5. Ocena końcowa

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska Pani mgr Agnieszki Sewastianik jest dziełem oryginalnym i poprawnie zaplanowanym oraz zrealizowanym od strony metodologicznej. Przedstawione przez Autorkę treści, odnoszące się zarówno do doboru zagadnienia badawczego, wyboru metod, omówienia uzyskanych wyników i ich krytycznej analizy świadczą o naukowej dojrzałości Autorki oraz posiadaniu przez nią warsztatu badawczego i umiejętności analitycznych wymaganych od badaczy aspirujących do uzyskania stopnia doktora.

Ja, niżej podpisany stwierdzam niniejszym, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr Agnieszki Sewastianik** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) i wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie **mgr Agnieszki Sewastianik** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

28.07.2025
.....
data sporządzenia recenzji

.....
podpis recenzenta