

Warszawa, 22.02.2017

Prof. dr hab. med. Rafał Płoski

Zakład Genetyki Medycznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

lek. Rafała Wojtkiewicza

**pt. „Analiza polimorfizmu 12 regionów autosomalnego DNA systemu HDplex
w badaniach genetyczno-sądowych”**

Ocena merytoryczna

Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA oparta na reakcji łańcuchowej polimerazy i fluorescencyjnej detekcji produktów PCR stanowi obecnie podstawę badań genetycznych stosowanych w genetycznej identyfikacji człowieka dla celów medyczo-sądowych. Warunkiem skutecznego korzystania z tej technologii w konkretnym przypadku jest szczegółowa wiedza nt. populacyjnego rozkładu alleli wykorzystywanych układów, co czyni wybór tematu pracy doktorskiej trafnym, szczególnie z praktycznego punktu widzenia.

Praca koncentruje się na analizie polimorfizmu minisatelitarnych markerów jądrowego DNA wchodzących w skład multipleksowego zestawu Investigator HDplex. Analizowana grupa populacyjna z regionu łódzkiego centralnej Polski (n= 520 osób) była wystarczająco liczna w aspekcie obowiązujących wymogów w zakresie analiz sądowych, co powalało na zrealizowanie przedsięwziętych celów badawczych. Cele są jasno i właściwie sformułowane. Na podkreślenie zasługuje wieloaspektowość badań pozwalająca nie tylko na przeprowadzenie gruntownej oceny przydatności badanych markerów w sensu stricto badaniach genetyczno-sądowych, ale również w aspekcie oceny powiązań filogenetycznych i pośrednio pochodzenia biogeograficznego. Większość analizowanych markerów nie wchodzi do zestawów CODIS i ESS, wykorzystywanych powszechnie do konstrukcji kryminalistycznych baz profili DNA. Dlatego też liczba danych o tych markerach jest bardzo ograniczona, przy braku jak dotąd w Polsce badań obejmujących cały zestaw 12 markerów Investigator HDplex.

Przedłożona mi do recenzji praca stanowi pierwszą tego typu kompleksową bazę danych dla Polski przy spełnieniu obowiązujących wymogów w zakresie genetycznej analizy populacji. Ponadto analiza blisko 140 spraw dochodzenia ojcostwa w zestawieniu z analogiczną analizą dla innych multipleksów pozwoliła na ocenę kluczowych parametrów, takich jak: wskaźniki mutacyjności, wsobności, czy też nierównowagi sprzężeń, wcześniej nie badanych w tym zakresie układów STR w Polsce.

Praca stanowi też jedyną jak dotąd opublikowaną bazę danych dla całego zestawu 12 markerów w Europie środkowo-wschodniej. Z uwagi na wykazaną endogenność badanej populacji polskiej, a także z uwagi na liczącą 1060 alleli wysoką liczebność badanej próby populacyjnej, może być ona również traktowana jako reprezentatywna dla populacji Słowian kaukaskich, a tym samym wykorzystana do obliczeń częstości profilu DNA w aspekcie międzynarodowym. Oryginalne, dotąd nie prezentowane podejście stanowią opracowane na podstawie częstości alleli STR zestawienia międzypopulacyjne pozwalające na ujawnienie charakterystycznych rozkładów dla każdego z badanych markerów, przy jednoczesnych znacznych różnicach widocznych pomiędzy populacjami najdalej oddalonymi terytorialnie.

Autor pracy wykazał się szeroką wiedzą w podejmowaniu istotnych aspektów związanych z tematem pracy. Wstęp omawiający znaczenie badanych markerów w genetyce sądowej oraz w zakresie profilowania genetycznego w kryminalistyce wraz z obowiązującymi standardami, zakresami analiz, jak i aspektami prawnymi w Polsce i na świecie jest doskonałym kompendium wiedzy w tym temacie i dobrze nawiązuje do przeprowadzonych badań i realizacji wytyczonych celów badawczych. Wykaz skrótów zestawiony na końcu pracy,

wykorzystywanych we wstępie, jak i w całym opracowaniu, wraz z anglojęzycznymi nazwami jest pomocny w odbiorze pracy. Założenia badawcze stawiające sobie za cel kompleksowe badanie multipleksu Investigator HDplex zostały poprawnie sformułowane. Wpisują się one dobrze w trwający proces stałego doskonalenia i poszerzania zakresów badań DNA, stwarzających możliwości rozstrzygnięcia najtrudniejszych spraw z zakresu zarówno identyfikacji osób, jak i analiz pokrewieństwa.

Wyniki badań stanowiące najobszerniejszą część pracy zostały zaprezentowane na 35 stronach. W sposób czytelny i przejrzysty z podziałem na cztery główne rozdziały z podrozdziałami, dokumentują przeprowadzone badania ściśle wg przedłożonych na stronie 16 Celów pracy.

We właściwy sposób, szczegółowo zestawiają one zakresy przeprowadzanych analiz.

Na podkreślenie zasługują starannie wykonane ryciny w liczbie 35, oparte w większości na wynikach badań zestawionych w poprzedzających je tabelach. Z uwagi na bardzo dużą ilość rycin i tabel bardzo pomocny jest ich spis na stronie 99, co stanowi dobrą praktykę w tego typu opracowaniach.

W rozdziale Omówienie i dyskusja złożonym z 18 stron autor jasno i precyzyjnie omawia wyniki kolejnych badań z położeniem nacisku na ich najważniejsze aspekty, a następnie odnosi je do rezultatów badań innych autorów. Dyskusja przeprowadzona jest rzeczowo, sprawnie oraz ciekawie i wskazuje na bardzo szeroki zakres wiedzy w przedmiocie tematu pracy. Ma on odzwierciedlenie w adekwatnym do omawianych kwestii cytowaniu literatury i źródeł internetowych, w większości anglojęzycznych, co stanowi duży walor pracy.

Zgodnie ze zwięzłym podsumowaniem rezultatów przeprowadzonych badań przedstawionym w sekcji „Wnioski” i „Streszczenie” praca wykazała duży potencjał badanego multipleksu. Kompleksowa, wieloaspektowa analiza badanego zestawu 12 markerów, wykonana w oparciu o uzyskane rozkłady cech, obliczone wskaźniki i parametry biostatystyczne, dokumentuje wysoką przydatność zestawu Investigator HDplex w Polsce w badaniach z zakresu genetyki sądowej. Dodatkowo słusznie podkreślono przydatność zestawu również w analizie chimeryzmu po przeszczepie allogenicznym szpiku.

Istotny aspekt pracy stanowi analiza z wyznaczeniem dystansów genetycznych dzielących populację Polski od innych populacji Europy i świata wraz z analizą filogenetycznych powiązań między populacjami. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że markery mikrosatelitarne systemu Investigator HDplex mogą stanowić potencjalnie wsparcie dla ancestralnych markerów typu SNP w ustalaniu przybliżonego pokrewieństwa i przynależności do określonej grupy populacyjnej.

Ocena metodologiczna

Materiał do badań stanowił 530 prób DNA pobieranych od osób z regionu łódzkiego w Polsce Centralnej w latach 2012- 2016 uczestniczących w dochodzeniu ojcostwa na podstawie pisemnej zgody badanych oraz zgody odpowiedniej Komisji Bioetyki. Zagwarantowało to przeprowadzenie badań zgodnie z obowiązującymi zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej w oparciu o poddanie ocenie dużej bazy populacyjnej zawierającej 1060 alleli oraz 137 spraw ojcostwa, w tym zarówno spraw z potwierdzeniem, jak i wykluczeniem. Zebrany materiał badawczy stanowił wystarczający punkt wyjścia do realizacji postawionych celów, w tym głównie opracowania pierwszej w Polsce kompleksowej bazy rozkładów alleli w zakresie 12 markerów zestawu Investigator HDplex oraz przeprowadzenie oceny szeregu istotnych parametrów, decydujących o przydatności do analiz. Ważnym aspektem badań było ponadto zestawienie parametrów przydatności uzyskanych na podstawie rozkładów cech oraz analogicznych parametrów uzyskanych w praktyce badań ojcostwa. Interesujący aspekt stanowiła również porównawcza analiza oparta na genetycznej ocenie stopnia pokrewieństwa genetycznego pomiędzy badaną populacją Polski, a innymi populacjami Europy oraz świata bazująca na liczbie wspólnych przodków.

Zastosowane procedury badań opierały się na dobrze zdefiniowanych metodach i technikach badawczych stosowanych we współczesnej genetyce sądowej opisanych jasno i zwięźle w 9-stronicowym rozdziale „Materiał i metodyka”, podrozdziale „Metodyka badań”.

Najobszerniejszą część w obrębie rozdziału „Materiał i metodyka” stanowi „Analiza statystyczna”, która uzyskała rangę osobnego podrozdziału obejmującego 7 stron. Jest to uzasadnione realizacją zaplanowanych „Celów” pracy, opartych głównie o precyzyjnie obliczenia biostatystyczne. Metody obliczeń zostały starannie opisane, łącznie z wzorami i odnośnikami literaturowymi. Przeprowadzona analiza statystyczna stanowiła istotny element trudności pracy. Została zrealizowana w oparciu o niezwykle szeroki zestaw narzędzi, w tym kilka programów komputerowych, jak STATISTICA, Power Marker, GDA czy TreeView. Na podkreślenie zasługuje szczególnie skala trudności i czasochłonności związana z wykorzystaniem metody analizy opartej o skalowanie wielowymiarowe (MDS).

Wykorzystane w pracy Piśmiennictwo, na które składają się w sumie 152 pozycje obejmuje publikacje z czasopism w głównej mierze z listy filadelfijskiej, głównie z ostatnich kilku lat, w tym nierzadko ostatniego roku, specjalistyczne, głównie anglojęzyczne wydania książkowe z zakresu genetyki sądowej, jak również liczne odnośniki do źródeł internetowych. Część z nich stanowią bazy danych populacyjnych, które posłużyły do opracowania materiału porównawczego do badań. Szeroki zakres piśmiennictwa wskazuje na rozległą wiedzę i duży wkład pracy przy penetrowaniu przez autora dostępnych źródeł związanych z realizacją tematu pracy. Opis bibliograficzny jest dobrze wystandaryzowany i nie budzi zastrzeżeń.

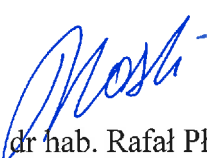
Pewien niedosyt u recenzenta wywołuje brak komentarza nt. takich technicznych aspektów analizy jak wypadanie alleli/układów, poziomy artefaktów typu „stutter”, stopień zrównoważenia wysokości pików u heterozygot, a także pomiędzy układami o krótkich i długich allelach. W zakresie wyników pracy pewną słabością jest brak nowych obserwacji i/lub hipotez dotyczących analizy filogenetycznej czy biogeograficznej badanych populacji.

Ocena formalna

Praca pod względem struktury formalnej jest starannie dopracowana. Układ rozprawy i struktura jej podziału jest prawidłowa z wyodrębnieniem: wstępu, celów pracy, materiałów i metodyki, wyników, omówienia i dyskusji, wniosków, streszczenia, oraz piśmiennictwa. Liczy ona 102 strony i zawiera tabele w liczbie 22 oraz ryciny w liczbie 35, które mają bardzo dopracowaną formę i bogatą szatę graficzną. Są one bardzo starannie, w sposób nie budzący zastrzeżeń wkomponowane w tekst pracy. Na końcu pracy umieszczony jest również starannie opracowany „Wykaz skrótów” i „Spis tabel i rycin”, znacznie ułatwiający nawigację po obszernej części, na którą składa się graficzny sposób prezentowania wyników.

Podsumowując stwierdzam, że przedmiot przeprowadzonych badań, dobór metodyki, prezentacja wyników, charakter dyskusji oraz uzyskane wnioski w pełni odpowiadają kryteriom stawianym pracom doktorskim. Wobec powyższego stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 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.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Rafała Wojtkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Warszawa, 22.02.2017


Prof. dr hab. Rafał Płoski