

Uniwersytet Medyczny  
w Białymstoku  
Zakład Medycyny Sądowej  
ul. Waszyngtona 13  
15-269 Białystok  
tel. 085 748-59-50,  
tel/fax 085 748-59-85



Medical University  
of Białystok  
Department of Forensic Medicine  
Waszyngtona street 13  
15-269 Białystok  
tel. +48 85748-59-50,  
tel/fax +48 85748-59-85

Prof. dr hab. Anna Niemcunowicz-Janica  
Kierownik Zakładu Medycyny Sądowej  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Białystok dnia 12.11.2024

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Tomasz Kułdo  
„Biostatystyczna analiza mieszanin DNA pochodzącego od dwóch osób  
z wykorzystaniem autorskiego programu komputerowego”**

Decyzją Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi została mi powierzona ocena pracy doktorskiej mgr inż. Tomasz Kułdo **„Biostatystyczna analiza mieszanin DNA pochodzącego od dwóch osób z wykorzystaniem autorskiego programu komputerowego”** przygotowanej pod opieką prof. dr hab. Jarosława Berenta z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi .

Analiza śladów, które zawierają DNA pochodzące od więcej niż jednej osoby stanowi jedno z najtrudniejszych wyzwań biegłego z zakresu genetyki sądowej. Takie badania oprócz specjalistycznej wiedzy i wyrafinowanego warsztatu badawczego wymagają szczególnej ostrożności przy formułowaniu wniosków. Rolą biegłego jest prawidłowe oszacowanie wartości dowodu z badań, przedstawienie wyniku w sposób logiczny i prosty, ale przede wszystkim zgodny ze światowymi standardami.

Zgodnie ze stanowiskiem ISFG właściwą metodą oceny wartości dowodu z badań DNA jest metoda probabilistyczna oparta na ilorazie wiarygodności, która pozwala oszacować siłę dowodową uzyskanego wyniku oraz ocenić stosunek szans między konkurencyjnymi

hipotezami, dotyczącymi pochodzenia profilu lub mieszaniny DNA. Stąd też dokładne poznanie i zrozumienie zasad działania oraz ograniczeń narzędzi wykorzystywanych do statystycznej interpretacji wyników badań śladów biologicznych w kryminalistyce jest kluczowym etapem poprzedzającym formułowanie wniosków płynących z tych analiz.

Dlatego też podjęcie badań dotyczących biostatystycznej analizy mieszanin DNA pochodzącego od dwóch osób z wykorzystaniem autorskiego programu komputerowego uważam za bardzo cenne.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja liczy 75 stron i składa się z 10 rozdziałów w typowym układzie. W tekście pracy umieszczono 22 rycin i 39 tabel. Są one starannie opracowane i szczegółowe. W opisie tabel i rycin zastosowano odpowiednie tytuły, a także objaśnienia znaków i symboli. Tabele i ryciny stanowią istotne wzbogacenie treści pracy. W końcowej części pracy umieszczono spis piśmiennictwa liczący 40 pozycje oraz streszczenia w języku polskim i angielskim

We wstępie Autor opisał metody analizy DNA, identyfikację mieszanin DNA, w tym etapy ich interpretacji, podał matematyczne podstawy do obliczenia proporcji mieszaniny  $M_x$  i stosunku mieszaniny  $M_r$  dla mieszaniny od dwóch osób, czy też możliwe genotypy składników mieszaniny DNA od dwóch osób. Przedstawił także klasyfikację mieszanin zgodnie z wytycznymi Niemieckiej Komisji ds. Śladów.

Na potrzeby autorskiego programu komputerowego BIO-Q-MIX Doktorant zaadoptował podział na typy mieszanin ABC klasyfikując je według wzorów w oparciu o proporcję  $M_x$  i stosunek  $M_r$  mieszaniny DNA, a także przedstawił wzory do obliczenia ilorazu wiarygodności LR dla przyjętych hipotez.

**Cel pracy** przedstawiono syntetycznie jako wprowadzenie metody jednoczesnej analizy jakościowej i ilościowej wyniku badania mieszaniny DNA pochodzącej od dwóch osób z wykorzystaniem autorskiego programu komputerowego BIO-Q-MIX oraz przeanalizowanie wpływu analizy ilościowej na wartość dowodową opinii.

**Materiałem** do badań były próbki w postaci wymazów z nabłonka śluzówki jamy ustnej pobrane bezinwazyjnie od czterech osób, z których wykonano 57 mieszanin w różnych kombinacjach i proporcjach, a następnie oznaczono profile DNA przy użyciu zestawu odczynników AmpFISTR® NGM™ firmy Applied Biosystems

Na wykorzystanie materiału badawczego i wyników do przeprowadzenia badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Doktorant w rozdziale **metody** szczegółowo opisał metodę przygotowania mieszanin przedstawiając kombinacje i proporcje mieszanin DNA ujęte tabelarycznie, metodę izolacji DNA, ocenę ilości DNA w oparciu o reakcję PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR) oraz amplifikację fragmentów DNA przy użyciu zestawu AmpFISTR® NGM™. Detekcja produktów reakcji PCR została przeprowadzona przy użyciu elektroforezy kapilarnej przy użyciu sekwenatora Genetic Analyser 3500 firmy Applied Biosystems.

Analizę wyników badań przeprowadzono przy użyciu programu GeneMapper® ID-X Software v1.6. w którym automatycznie przypisano allele do danego locus. Elektroforegramy z wynikami badań DNA zapisano w formacie PDF. Dane zawierające oznaczone numer próbki, loci STR, oznaczone allele i ich wartość RFU eksportowano w formacie TXT.

Kolejnym etapem było opisanie zasady działania autorskiego programu komputerowego BIO-Q-MIX będącego częścią systemu eksperckiego BIO-Q\_SQL. W tej części Doktorant szczegółowo przekazał wszystkie etapy obsługi programu, w tym wprowadzenie danych dotyczących materiałów i próbek, zaimportowanie danych z pliku TXT zawierających oznaczone numery próbek, loci STR, oznaczone allele i ich wartość RFU z następową akceptacją alleli. Za ważny element tego programu uważam fakt, że każdy przyjęty do analizy allel jest wyświetlany w formie graficznej piku na osi X, zawierającej dane populacyjne (loci, allel, częstość allela), które zostały zaimportowane ze strony internetowej <https://strider.online>. Dzięki temu w programie BIO-Q-MIX sprawdzana jest zgodność wprowadzonego allela z wewnętrzną bazą populacyjną zawierającą loci, allel i częstość występowania w danej populacji i tylko takie allele są poddawane dalszej analizie

Program BIO-Q-MIX przeprowadza analizę mieszaniny DNA od dwóch osób w oparciu o balans heterozygotyczny (Hb), proporcję/stosunek mieszaniny Mx/Mr, typ mieszaniny, iloraz wiarygodności dla wybranego ilościowo większego i mniejszego składnika mieszaniny. Jednak ostatecznie to biegły dokonuje wyboru którą możliwą kombinację przyjmuje do dalszej interpretacji. Natomiast raport końcowy analizy mieszaniny DNA może zawierać tylko wybrane kombinacje genotypów lub wszystkie dostępne genotypy ilościowo większego i mniejszego składnika mieszaniny, co Doktorant szczegółowo opisał w tej części obficie ilustrując to odpowiednimi rycinami i tabelami.

Najistotniejszy z praktycznego punktu widzenia rozdział dotyczący **Wyników** został opracowany bardzo starannie w tabelach od 10-39. W 29 tabelach przedstawiono obszerne wyniki analizy każdej z badanych mieszanin DNA w autorskim programie komputerowym BIO-Q-MIX w zestawieniu z wynikami uzyskanymi w L Rmix Studio wersja 2.1.5.

Sposób prezentacji wyników jest przejrzysty i stanowi wartościową i obszerną część pracy. Kryteria podziału, są adekwatne do założonych celów.

Doktorant w oparciu o program komputerowy dokonał weryfikacji zgodności wprowadzonych alleli z bazą populacyjną wraz z przypisaniem do allela jego częstości występowania w populacji, zaproponował kombinację wszystkich możliwych genotypów osób w mieszaninie DNA, sprawdził balans heterozygotycznego wyznaczonych genotypów, w przypadku wystąpienia efektu stochastycznego wprowadził genotyp aF, w celu wyeliminowania „fałszywej” homozygoty, wyznaczył proporcję/stosunek  $M_x/M_r$  oraz typ mieszaniny wraz z informacją o ewentualnym przekroczeniu dopuszczalnego zakresu, wskazał możliwe błędy interpretacyjne takie jak błąd balansu heterozygotycznego Hb oraz błędy proporcji/stosunku  $M_x/M_r$ , obliczył iloraz wiarygodności dla potwierdzonych przez eksperta genotypów ilościowo większego i mniejszego składnika mieszaniny, w tym cząstkowego dla każdego loci.

Analiza wyników programu wykazała zjawisko wypadania alleli (drop-out), czy też wypadania alleli powyżej progu limitu detekcji (LOD) oznaczonego na poziomie 150 RFU, najczęściej w przypadku loci THO1 9.3 i 10. Jednocześnie analiza wyników przy użyciu programu BIO-Q-MIX wykazała brak zachowania proporcji/stosunku  $M_r/M_x$  mieszanin DNA w 89 przypadkach na 912 wszystkich przeprowadzonych analiz oraz różnych klasyfikacji w obrębie mieszaniny - najczęściej w przypadku mieszanin typu C zawierających ilościowo znacznie mniejszy składnik i z widocznym efektem stochastycznym, kolejnym zjawiskiem zidentyfikowanym automatycznie przez BIO-Q-MIX był błąd balansu heterozygot Hb co ma istotny wpływ na ocenę wartości wyniku dowodu z badań DNA.

**Dyskusja i opis uzyskanych wyników** stanowi istotną część pracy dowodzącą dojrzałości naukowej Doktoranta. Kolejność prezentacji wyników jest jasna, logiczna i stanowi odpowiedź na założenia pracy, a uzyskane wyniki są podstawą do wyciągnięcia stosownych wniosków.

W tym miejscu należy wskazać, że analiza przeprowadzona za pomocą modeli probabilistycznych jest naukowo akceptowanym i logicznie uzasadnionym sposobem prezentacji wniosków z badań genetycznych. Natomiast analiza matematyczna po sformułowaniu hipotez jest bardzo złożona i można ją wykonać za pomocą skomplikowanego oprogramowania.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorant przeprowadził badania w dziedzinie mającej dotąd niewielką liczbę opracowań dostępnych w literaturze. Przeprowadzona przez Doktoranta w dysertacji dyskusja wykazała, iż posiada umiejętność krytycznej i wyważonej

oceny uzyskanych wyników oraz formułowania wniosków końcowych, zwłaszcza w sytuacji braku możliwości skonfrontowania ich z licznymi danymi z piśmiennictwa. Rozprawa stanowi logiczną całość, świadczy o dobrym przygotowaniu Autora do prowadzenia badań naukowych.

**Wnioski** w liczbie 3 znajdują dobre uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach, odpowiadają postawionym celom pracy. Za szczególnie wartościowy uważam wniosek, że pominięcie analizy ilościowej może prowadzić do błędów w opiniowaniu, skutkujących niezasadnym zawyżeniem wartości dowodowej opinii.

Natomiast wartością dodaną jest generacja raportów, które mogą być bezpośrednio wykorzystane do opiniowania dla potrzeb organów ścigania i jednostek wymiaru sprawiedliwości. **Piśmiennictwo** jest właściwie dobrane i obejmuje zarówno pozycje nowe jak i historyczne. Potwierdza dobrą znajomość literatury tematu poruszanego w rozprawie. Zostało umiejętnie wykorzystane w całym tekście.

Rozprawa doktorska została napisana poprawną polszczyzną, z dobrym zrozumieniem zakresu poruszanych problemów. Wybór tematu pracy doktorskiej uważam za trafny i uzasadniony. Temat pracy nawiązuje do niekwestionowanych osiągnięć Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej w Łodzi. Rozprawa została przygotowana starannie z dbałością o szczegóły graficzne i estetyczne.

W ocenie merytorycznej stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy ważnego problemu naukowego i stanowi jego oryginalne rozwiązanie, dowodzi posiadania wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki medycyny oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Mam zaszczyt przedstawić **Wysokiej Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** wniosek o dopuszczenie mgr inż. Tomasz Kułdo do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Zakładu Medycyny Sądowej  
  
Prof. dr hab. Anna Niemcunowicz-Jamir