

Gdańsk, 10 lipca 2023 r.

dr hab. n. med. Krzysztof Rębała  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3A  
80-210 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Pisarek  
**„Opracowanie narzędzi epigenetycznych do przewidywania wieku  
w próbkach nasienia ludzkiego”**  
sporządzona zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki biologiczne  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie  
z dnia 25.04.2023 r.

Określanie zewnętrznych cech osobniczych człowieka na podstawie badań DNA na stałe weszło do kanonu analiz kryminalistycznych, służących ustaleniu tożsamości osób niezidentyfikowanych, w szczególności sprawców przestępstw w oparciu o ślady biologiczne ujawnione po zdarzeniu. Do badań takich należy w szczególności określanie płci, cech wyglądu fizycznego oraz wieku chronologicznego, które stanowią podstawowe informacje o osobie i pozwalają często znacząco zawęzić poszukiwania. Predykcję wieku osoby w oparciu o DNA wyizolowany ze śladów biologicznych najczęściej przeprowadza się poprzez badanie metylacji miejsc CpG wykazujących zmiany w poziomie metylacji zależne od wieku. O ile opracowane pod kątem badań kryminalistycznych predyktory wieku w oparciu o poziom metylacji DNA zapewniają zadowalającą dokładność w przypadku komórek i tkanek somatycznych, o tyle w przypadku śladów nasienia jest to znacznie utrudnione. Opracowanie narzędzia umożliwiającego optymalną pod względem dokładności i liczby markerów metylacyjnych predykcję wieku chronologicznego w próbkach nasienia w aspekcie kryminalistycznym stały się tematem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

Oceniana praca stanowi klasyczną rozprawę doktorską w postaci maszynopisu i liczy 145 stron, w tym 18 stron suplementu w postaci rycin z wynikami sekwencjonowania metodą Sangera i tabel z charakterystyką i wynikami analiz poszczególnych markerów metylacyjnych. W spisie cytowanej literatury doktorantka zawarła 197 pozycji, w tym liczne prace z ostatnich lat, przedstawiające aktualny stan wiedzy w dziedzinie, której dotyczy temat pracy. Konstrukcja pracy odpowiada ogólnie przyjętym normom dla eksperymentalnych prac dyplomowych, obejmuje streszczenie w języku polskim, angielskim i w formie graficznej, wstęp, cele, materiały i metody, wyniki,

dyskusję, podsumowanie i uwagi końcowe oraz wspomniany spis literatury, a także dodatkowo spis tabel, rysunków i suplement.

Doktorantka we wstępie scharakteryzowała mechanizmy molekularne zmian i różnic w poziomie metylacji DNA w różnych komórkach i tkankach, zwracając szczególną uwagę na odmienny wzór metylacji komórek somatycznych i plemników. Następnie omówiła różne metody określania wieku epigenetycznego na podstawie oceny poziomu metylacji DNA oraz ich przydatność pod względem różnych zastosowań praktycznych, w tym do badań kryminalistycznych, podkreślając szereg zalet markerów metylacyjnych jako narzędzia do predykcji wieku chronologicznego w porównaniu do innych dostępnych metod przewidywania wieku osobniczego. W dalszej części przedstawiła rozwój badań nad predykcją wieku chronologicznego człowieka w oparciu o poziom metylacji DNA izolowanego z nasienia, w tym aktualnie dostępne narzędzia, jednocześnie zwracając uwagę na ich niedoskonałości oraz konieczność prowadzenia dalszych badań w celu opracowania nowych narzędzi do przewidywania wieku osobniczego o zadowalającej dokładności i czułości pod kątem wykorzystania w badaniach kryminalistycznych. Cały rozdział doskonale odzwierciedla obecny stan wiedzy w temacie objętym rozprawą doktorską i uzasadnia konieczność podjęcia badań zawartych w tytule pracy.

Głównym celem pracy doktorskiej mgr Aleksandry Pisarek stało się opracowanie nowego narzędzia do predykcji wieku chronologicznego w próbkach nasienia, które spełniałoby wymagania pod względem dokładności i liczby markerów metylacyjnych w aspekcie analiz kryminalistycznych. Dodatkowo autorka zdefiniowała szereg celów szczegółowych, które objęły m.in. ocenę przydatności dostępnych narzędzi do określania wieku w nasieniu na podstawie analizy metylacji DNA, identyfikację miejsc CpG wykazujących istotną statystycznie korelację z wiekiem i walidację wybranych markerów metylacyjnych, opracowanie modelu matematycznego do predykcji wieku w próbkach nasienia i ocenę wpływu technologii badania stopnia metylacji na wyniki predykcji wieku w próbkach nasienia.

W rozdziale „Materiały i metody” autorka szczegółowo przedstawiła swój pokazny warsztat badawczy, obejmujący różne metody izolacji DNA z próbek nasienia i oceny jego jakości i ilości, sekwencjonowanie DNA metodą Sangera, ocenę poziomu metylacji DNA po konwersji wodorosiarczynem sodu z wykorzystaniem mikromacierzy, minisekwencjonowania, pirosekwencjonowania i sekwencjonowania przez syntezę, poszczególne etapy optymalizacji i walidacji nowo opracowanego narzędzia do predykcji wieku osobniczego, a także analizę bioinformatyczną i statystyczną zgromadzonych danych i opracowanie modeli matematycznych do wyznaczenia wieku epigenetycznego. Wszystkie metody i doświadczenia zostały opisane na tyle dokładnie, że mogą posłużyć jako model dla przyszłych badań nad poszukiwaniem markerów metylacyjnych i ich analizy celowanej pod kątem zastosowań w medycynie i kryminalistyce. Jedyne drobne zastrzeżenie dotyczy kilku opisów składu mieszanin

reakcyjnych (m.in. na str. 37 i 41), w których zamiast końcowych stężeń starterów i nukleotydów pojawiają się informacje o dodanych objętościach roztworów o nieznanym stężeniu. Warto podkreślić jest fakt, że część badań doktorantka prowadziła w ramach współpracy naukowej z innymi ośrodkami badawczymi, zarówno krajowymi, jak i zagranicznymi.

W pierwszym etapie pracy mgr Aleksandra Pisarek poddała ocenie z użyciem próbek nasienia z populacji polskiej dwa opisane w literaturze predyktry wieku oparte na analizie metylacji DNA: zestaw 3 miejsc CpG badanych z użyciem minisekwencjonowania, zaproponowany przez Lee i wsp. (2015), oraz kalkulator wieku epigenetycznego oparty na wielkoskalowych danych metylacyjnych uzyskanych przy użyciu mikromacierzy, zaproponowany przez Jenkinsa i wsp. (2018). Wyniki badań doktorantki wykazały ograniczoną przydatność obu narzędzi do predykcji wieku w próbkach nasienia w kryminalistyce z uwagi na stosunkowo wysoki średni błąd bezwzględny na poziomie 6,05 lat w przypadku zestawu markerów z pracy Lee i wsp. oraz konieczność analizy bardzo dużej liczby markerów, wymagającej stosunkowo dużych ilości DNA, w przypadku kalkulatora z pracy Jenkinsa i wsp., potwierdzając tym samym konieczność dalszych badań w celu opracowania nowych narzędzi do predykcji wieku osobniczego w oparciu o stopień metylacji DNA izolowanego z nasienia pod kątem zastosowań w kryminalistyce.

W kolejnym etapie doktorantka w oparciu o dane zgromadzone z zastosowaniem technologii mikromacierzy i analizę celowaną z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji zidentyfikowała szereg nowych markerów metylacyjnych do predykcji wieku w próbkach nasienia, potwierdziła ich przydatność i opracowała kilka modeli predykcyjnych, uwzględniających różne, wybrane markery. Pewnym problemem przy zapoznawaniu się z różnymi zaproponowanymi przez doktorantkę zestawami markerów i kalkulatorami wieku epigenetycznego jest brak logicznego ciągu opracowywania kolejnych predyktorów. Na kolejnych stronach rozprawy doktorskiej pojawia się m.in. model opracowany dla 10 cytozyn o średnim błędzie bezwzględnym równym 1,2 lat, model predykcyjny VISAGE oparty na 6 cytozynach o średnim błędzie bezwzględnym w grupie testowej równym 5,1 lat oraz model EPIC-8CpG oparty na 8 cytozynach o średnim błędzie bezwzględnym równym 3,22 lat dla grupy testowej. Rozwiązaniem tego problemu byłoby proste wyjaśnienie, dlaczego po zaproponowaniu przez autorkę rozprawy doktorskiej danego zestawu markerów metylacyjnych jako narzędzia do predykcji wieku osobniczego doktorantka przystępuje do opracowania kolejnego modelu, wykorzystującego inne markery.

W ramach ostatniego etapu pracy mgr Aleksandra Pisarek poddała ocenie wpływ metody badania poziomu metylacji na uzyskiwane wartości wieku epigenetycznego, wykazując różnice w dokładności predykcji między danymi uzyskanymi przy użyciu mikromacierzy i sekwencjonowania nowej generacji oraz błąd systematyczny w przypadku stosowania kalkulatorów wieku epigenetycznego w oparciu o dane uzyskane z użyciem innej technologii niż ta, dla której dany kalkulator został opracowany.

W dyskusji doktorantka w sposób przekonywujący wykazała przewagę stworzonego przez siebie kompletnego narzędzia VISAGE Enhanced Tool do predykcji wieku osobniczego w próbkach nasienia z populacji polskiej nad metodami zaproponowanymi przez Lee i wsp. oraz Jenkinsa i wsp. Wykazała, że narzędzie VISAGE Enhanced Tool charakteryzowało się dokładnością i czułością na poziomie zadowalającym pod kątem zastosowań kryminalistycznych. Jako powód słabszej korelacji z wiekiem i mniejszej dokładności obu wcześniej opracowanych metod predykcji wieku osobniczego dla próbek nasienia z populacji polskiej wskazała możliwą specyficzność populacyjną markerów metylacji związanych z wiekiem, potwierdzając tym samym konieczność prowadzenia badań nad przydatnością dostępnych i nowo opracowywanych kalkulatorów wieku epigenetycznego w różnych populacjach.

W swojej rozprawie doktorskiej autorka nie wystrzegła się kilku błędów merytorycznych, wśród których wymienić należy:

- konsekwentne stosowanie w rozprawie doktorskiej pojęcia „predykcja wieku epigenetycznego”, podczas gdy celem badań kryminalistycznych jest predykcja wieku chronologicznego identyfikowanej lub poszukiwanej osoby w oparciu o wiek epigenetyczny obliczony w oparciu o opracowane modele matematyczne;
- błędne określanie jako istotność statystyczna wartości P oznaczającej prawdopodobieństwo testowe, czyli prawdopodobieństwo, że zależność, jaką zaobserwowano w losowej próbie z populacji, wystąpiła przypadkowo wskutek losowej zmienności prób;
- użycie nienotowanego w języku polskim pojęcia „nasienie natywne” o nie do końca jasnej konotacji;
- regularne stosowanie przymiotnika „bisulfitowy” pochodzącego od angielskiego słowa „*bisulfite*” oznaczającego w języku polskim wodorosiarczyny;
- błędne wyjaśnienie skrótu dNTP jako „trójfosforany deoksyrybonukleotydów” (jako że deoksyrybonukleotydy same w sobie zawierają reszty fosforanowe, skrót dNTP oznacza trifosforany nie deoksyrybonukleotydów, ale deoksyrybonukleozydów).

Zastanawia również, jaki wpływ na wzór metylacji, a tym samym dokładność predykcji wieku osobniczego z użyciem opracowanych narzędzi może mieć fakt, że badane przez doktorantkę próbki nasienia nie pochodziły od mężczyzn losowo wybranych z populacji, ale od pacjentów klinik zajmujących się leczeniem niepłodności, a zatem od mężczyzn, u których częściej obserwowane są zaburzenia parametrów nasienia, którzy częściej niż przypadkowi mężczyźni są leczeni z powodu niepłodności, częściej prowadzą zdrowy tryb życia czy których próbki nasienia dostarczane są zwykle nie losowo, ale po kilkudniowym okresie wstrzemięźliwości seksualnej.

Wszystkie wymienione braki i uwagi nie umniejszają jednak w szczególny sposób wartości pracy naukowej mgr Aleksandry Pisarek. Oceniana rozprawa stanowi oryginalną i nowatorską pracę o ogromnej wartości naukowej i praktycznej, która spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o

szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i w pełni uzasadnia nadanie mgr Aleksandrze Pisarek stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorantka przedstawiła w niej oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzając rozległą wiedzę teoretyczną w swojej dyscyplinie naukowej, umiejętność samodzielnego prowadzenia badań i znajomość wielu zaawansowanych technik laboratoryjnych i metod analizy wyników. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że część wyników zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej została opublikowana w dwóch oryginalnych artykułach, w tym w jednym z najlepszych na świecie czasopism poświęconych zagadnieniom medyczo-sądowym. W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr Aleksandry Pisarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość przedłożonej rozprawy, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o jej wyróżnienie.

10877  
dr hab. n. med. KRZYSZTOF RĘBAŁA  
*Krzysztof Rębała*  
DIAGNOSTA LABORATORYJNY  
specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej  
i laboratoryjnej genetyki sądowej