

---

## Recenzja rozprawy doktorskiej

Imię i nazwisko kandydatki: **mgr Aleksandra Pisarek**

Tytuł rozprawy doktorskiej: „**Opracowanie narzędzi epigenetycznych do przewidywania wieku w próbkach nasienia ludzkiego**”

Promotor: **prof. dr hab. Wojciech Branicki**

Recenzent: **dr hab. n. med. Marcin Woźniak, prof. UMK**

### 1. Wartość naukowa rozprawy

Rozwój nowoczesnych metod analizy genetycznej, w szczególności zaś rozwój technologii analiz na mikromacierzach oraz masowego sekwencjonowania równoległego (MPS/NGS) znacząco przyczyniły się w ostatniej dekadzie do przyrostu naszej wiedzy o mechanizmach genetycznych i epigenetycznych stojących za poszczególnymi funkcjami żywych organizmów. Wiedza gromadzona dzięki tym metodom daje podstawy do opracowania metod predykcyjnych, które mogą znacząco wzbogacić warsztat, którym dysponowała do tej pory genetyka sądowa i który opierał się głównie, z konieczności, na technikach komparatywnych. W szczególności poprawna predykcja cech fenotypowych i wieku osoby, od której pochodzi materiał genetyczny badany w laboratorium sądowym bądź kryminalistycznym, może dostarczyć kluczowych informacji w kontekście danej sprawy czy śledztwa. Ocena wieku biologicznego człowieka w oparciu o analizę poziomu metylacji DNA genomowego to jedna z najnowszych, najszybciej rozwijających się dziedzin wiedzy, przynosząca bardzo obiecujące rezultaty z punktu widzenia genetyki sądowej. Szczególnym wyzwaniem w tym kontekście jest ocena wieku osoby, od której pochodzi ślad biologiczny w postaci nasienia. O ile bowiem wzór metylacji komórek somatycznych jest pochodną zmian gromadzących się od początku życia danego osobnika, o tyle wzór metylacji DNA plemnikowego tworzony jest w większości de novo, podczas gametogenezy, w procesie imprintingu rodzicielskiego. Poszukiwanie markerów starzenia się w komórkach, w których wzór metylacji uległ zresetowaniu jest zatem zadaniem karkołomnym. Tym większe uznanie należy się autorce przedstawionej mi do recenzji pracy za podjęcie tego trudnego tematu badań.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska koncentruje się na poszukiwaniu markerów wieku biologicznego w postaci zmetylowanych cytozyn zlokalizowanych w określonych pozycjach w genomie oraz na ocenie możliwości wykorzystania tych markerów w sposób optymalny z punktu widzenia praktycznego zastosowania predykcji wieku w laboratorium kryminalistycznym/sądowym. Dobór tematyki pracy oraz zastosowanych w niej metod badawczych można uznać za oryginalny i ważny wkład Autorki w dziedzinę badań, której dotyczy oceniana praca doktorska.

Uzyskane przez Autorkę wyniki badań eksperymentalnych wskazują na wysoką przydatność wybranych markerów i metod analitycznych w określaniu wieku biologicznego mężczyzn będących dawcami nasienia w próbkach badanych dla potrzeb sądowych.

## 2. Wartość merytoryczna rozprawy

Oceniana przez mnie praca stanowi kompleksowe opracowanie stosunkowo wąskiego i specjalistycznego zagadnienia, jakim jest predykcja wieku dawcy nasienia w oparciu o analizę wzoru metylacji wybranych miejsc w DNA. Biorąc to pod uwagę należy podkreślić w pierwszej kolejności umiejętne i przejrzyste wprowadzenie czytelnika w tematykę badawczą, dzięki któremu nawet osoba nie będąca specjalistą w omawianej dziedzinie łatwo zrozumie wagę podejmowanych zagadnień i potrzebę prowadzenia badań opisywanych przez Autorkę.

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 stanowi główną wartość merytoryczną ocenianej pracy. Należy z uznaniem podkreślić, że Autorka prowadziła swoje badania z rzadko spotykanym rozmachem, wykorzystując najnowocześniejsze techniki biologii molekularnej, takie jak sekwencjonowanie MPS czy analiza metylacji na mikromacierzach, w połączeniu z technikami tradycyjnie stosowanymi i dobrze zakorzenionymi w realiach laboratoriów kryminalistycznych, takimi jak minisekwencjonowanie. Na szczególne podkreślenie zasługuje konsekwentne dążenie Autorki do uzyskania wyników, które będą mogły mieć zastosowanie w praktycznie każdym laboratorium chcącym wykorzystać rezultaty jej badań. Nie można też nie wspomnieć o zaawansowanych technikach analizy statystycznej i uczenia maszynowego, które zastosowała Autorka w trakcie opracowywania uzyskanych danych i które stanowią dodatkową wartość w ocenianej pracy.

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 szerokiego wachlarza nowoczesnych narzędzi obliczeniowych.

Wyciągnięte przez Autorkę wnioski są jasno sformułowane oraz cechują się należyłą 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, aczkolwiek część zaprezentowanych wyników została już przez Autorkę opublikowana w dwóch artykułach przyjętych do druku przez recenzowane czasopisma o zasięgu międzynarodowym. 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 rysunków oraz suplement.

Układ pracy jest poprawny i przemyślany a sama praca została przygotowana w sposób staranny i estetyczny. W trakcie czytania zauważyłem w niej jedynie nieliczne i drobne błędy stylistyczne, czy gramatyczne. Z recenzenckiego obowiązku muszę jednak wspomnieć, że podczas lektury publikacji, w części odnoszącej się do badań wykonanych przez Autorkę, odnosi się czasem wrażenie, że nie może się ona zdecydować, czy powinna pisać o uzyskanych wynikach w czasie przeszłym czy teraźniejszym. Dotyczy to np. akapitu pierwszego i drugiego na stronie 64. Ponadto Autorka ulega w niektórych miejscach powszechnej ostatnio niestety tendencji do określania analizowanego materiału jako „próbek badawczych”, podczas gdy w języku polskim przymiotnik „badawczy” odnosi się do podmiotu

wykonującego badania (np. „zespół badawczy”, „instytut badawczy”) a przedmiot podlegający badaniom określa się przymiotnikiem „badany”. Sporadycznie w pracy pojawiają się również zbędne anglicyzmy, np. słowo „targety” na str. 97. Innym błędem, który zauważyłem, jest określanie wartości procentowych zamieszczanych w tabelach słowem „liczby” (przykładowo Tabela 4 i Tabela 9). Bardziej poprawnym byłoby użycie słowa „odsetek”. Szkoda, że nie wszystkie rysunki zamieszczone w pracy są kolorowe. Przykładowo mapa cieplna na Rysunku 3 zyskałaby na czytelności, gdyby wydrukować ją w kolorze.

Opisane wyżej uchybienia nie są jednak poważne i w żaden sposób nie zaburzają bardzo pozytywnego odbioru całości prezentowanych w ocenianej pracy treści.

Pracę opatrzone obszernym spisem literatury, obejmującym 197 pozycji, niemal wyłącznie anglojęzycznych, 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. Uwagi krytyczne

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

W odniesieniu do materiału badanego Autorka opisuje podział pozyskanych próbek na kohorty, jednak nie wyjaśnia, z czego ów podział wynika. W szczególności nie jest jasne, dlaczego kohorta 5, użyta do walidacji metody NGS, charakteryzuje się średnią wieku o ok. 5 lat wyższą niż pozostałe kohorty? Biorąc pod uwagę podobną rozpiętość wiekową kohort, czy różnica średniej wieku w jednej z nich mogła wpłynąć na wyniki prowadzonych badań?

Opisując rezultaty wykonanych eksperymentów autorka bardzo skąpo omawia zagadnienia powtarzalności i odtwarzalności wyników uzyskanych dla pojedynczych próbek, skupiając się w zasadzie tylko na porównywaniu rezultatów uzyskiwanych różnymi metodami. Tymczasem istotnym elementem walidacji metody badawczej dla potrzeb laboratoriów sądowych jest określenie, czy dana metoda daje zbliżony lub identyczny wynik w kilkukrotnym badaniu tej samej próbki DNA, z zastosowaniem określonego protokołu, w jednym laboratorium oraz w różnych laboratoriach.

Opisując analizę przydatności markerów pozyskanych z danych macierzowych do predykcji wieku Autorka wspomina o zastosowaniu współczynnika transformacji potęgowej w zakresie od -4 do +4 w celu poprawy efektywności predykcji. Wartości tego współczynnika, zawarte w Tabeli S2, są indywidualnie dobrane dla każdego z badanych układów, nie jest natomiast jasne, na jakiej podstawie określona wartość współczynnika była przypisana dla konkretnego układu?

Analizując metodologiczną stronę ocenianej pracy warto zadać pytanie, czy fakt, że znacząca część próbek wykorzystanych w badaniach pochodzi od mężczyzn poddających się terapii niepłodności, mógł wpłynąć na końcowe rezultaty badań i czy wyprowadzone wnioski można bezpośrednio przełożyć na populację ogólną? Dotyczy to zarówno kwestii wieku, gdyż większość badanych mężczyzn miała znacznie powyżej 20 lat, jak i kwestii reprezentatywności badanej próbki w stosunku do populacji ogólnej w zakresie jej stanu zdrowia, a w szczególności cech nasienia. Co do kwestii wieku, Autorka sugeruje co prawda w dyskusji, że w przypadku, gdy badane nasienie pochodziłoby od młodszych mężczyzn, to możliwa byłaby interpolacja wyników, jednak warto zadać pytanie, czy taka interpolacja dałaby poprawny wynik, biorąc pod uwagę, że u mężczyzn w wieku ok. 20 lat i poniżej proces dojrzewania może ciągle jeszcze trwać, co może powodować m.in. znaczące różnice we wzorze metylacji DNA w porównaniu do starszych mężczyzn? Jeśli chodzi o reprezentatywność badanej próbki



to warto zadać pytanie, jak dobrze wzór metylacji DNA u mężczyzn borykających się z problemami z płodnością odzwierciedla wzór występujący u całej populacji męskiej?

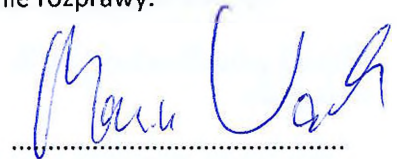
#### 5. Ocena końcowa

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska Pani mgr Aleksandry Pisarek jest dziełem oryginalnym, bardzo dobrze przemyślanym od strony metodologicznej i, w mojej ocenie, wybijającym się ponad przeciętność. 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 Aleksandry Pisarek** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **mgr Aleksandry Pisarek** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

01.07.2023

.....  
data sporządzenia recenzji



.....  
podpis recenzenta