



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE  
ul. Rybacka 1; 70 – 204 Szczecin

KATEDRA MEDYCZYNY SĄDOWEJ  
ZAKŁAD GENOMIKI I GENETYKI SĄDOWEJ  
al. Powstańców Wlkp. 72; 70 – 111 Szczecin

tel. +48 91 466-15-77 (18-57) e-mail: gensad@pum.edu.pl



AB 1645

dr hab. Ewelina Pośpiech, prof. PUM  
Zakład Genomiki i Genetyki Sądowej  
Katedra Medycyny Sądowej  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 06.02.2025r.

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Wojciecha Łuczaka


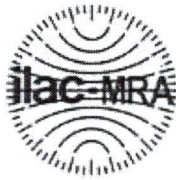

pt. „Opracowanie zestawu polimorficznych markerów STR do genotypowania ludzi oraz jego wdrożenie do analiz pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych”

### Cel i ogólna charakterystyka pracy

Rozprawa doktorska mgr Wojciecha Łuczaka została przygotowana w Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem Pani prof. UAM dr hab. Mirosławy Dabert, oraz Pani dr hab. Katarzyny Świerczyńskiej, opiekuna pomocniczego z ramienia Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed sp.j. Celem pracy było opracowanie nowej metody, opartej na analizie polimorfizmu długości sekwencji mikrosatelitarnych (ang. STR, *short tandem repeats*), do badania biologicznego pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych. Przeprowadzone badanie obejmowało selekcję wysoce informatywnych markerów z wykorzystaniem dostępnych baz danych, oszacowanie heterozygotyczności *loci* w populacji polskiej, optymalizację metody multipleks-PCR do genotypowania w zakresie wybranych *loci* oraz walidację metody poprzez jej zastosowanie w rzeczywistych badaniach biologicznego pokrewieństwa. Uzyskane przez Autora wyniki badań eksperymentalnych wskazują na bardzo wysoką przydatność opracowanej metody w trudnych i złożonych przypadkach analizy pokrewieństwa dla celów sądowych.

Praca badawcza została sfinansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i środków przedsiębiorstwa Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed sp.j. Autor nie odnosi uzyskanych wyników badań do określonych artykułów naukowych. Czy planowana jest publikacja wyników w przyszłości lub czy brak publikacji wyników związany jest z planowaną komercjalizacją?

Rozprawę doktorską stanowi dobrze przygotowane opracowanie, zredagowane na 107 stronach maszynopisu. Praca obejmuje Streszczenie w języku polskim i angielskim, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski i Bibliografię. Praca doktorska ma charakter

	<p style="text-align: center;"><b>POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY w SZCZECINIE</b> ul. Rybacka 1; 70 – 204 Szczecin</p> <p style="text-align: center;"><b>KATEDRA MEDYCZYNY SĄDOWEJ</b> <b>ZAKŁAD GENOMIKI I GENETYKI SĄDOWEJ</b> al. Powstańców Wlkp. 72; 70 – 111 Szczecin</p> <p style="text-align: center;">tel. +48 91 466-15-77 (18-57) e-mail: gensad@pum.edu.pl</p>		
---	---	---	---




wdrożeniowy, a efekty prac zostały zaimplementowane w Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed sp.j.

### **Merytoryczna ocena pracy**

Współczesna genetyka sądowa wypracowała skuteczne metody identyfikacji człowieka, które w dużej mierze oparte są na analizie sekwencji mikrosatelitarnych, czyli tzw. markerów STR, charakteryzujących się wysokim tempem mutacji, wysoką zmiennością międzyosobniczą i prostotą analizy laboratoryjnej. Metody stosowane w genetyce sądowej są jednak stale udoskonalane i wypracowywane są nowe narzędzia, które mogą być wykorzystywane, zwłaszcza w trudnych i złożonych sprawach jak analiza dalszego pokrewieństwa czy profilowanie genetyczne w sprawach kryminalnych bez materiału porównawczego. Dla możliwości rozwoju nowych metod i udoskonalania tych istniejących kluczowe znaczenie ma opracowywanie i dostęp do dużych baz danych, ogromny postęp technologii sekwencjonowania i ogólny wzrost wiedzy na temat zmienności genetycznej człowieka.

Wyzwaniem współczesnej genetyki sądowej wciąż pozostaje analiza dalekich pokrewieństw i skomplikowanych przypadków ustalania ojcostwa, w przypadku których powszechnie wykorzystywane zestawy markerów STR mogą nie zapewniać odpowiednio wysokiej mocy statystycznej. Przyczyną obserwowanych niezgodności w sprawach ojcostwa bądź niskich wartości ilorazu wiarygodności (LR) obserwowanych na etapie oceny wartości dowodowej, w przypadkach analizy dalekiego pokrewieństwa, jest wysokie tempo mutacji markerów STR. Możliwym rozwiązaniem jest rozszerzenie zestawu analizowanych markerów. Autor rozprawy doktorskiej w swojej pracy podjął wyzwanie poszukiwania optymalnego zestawu markerów STR, którego analiza znalazłaby zastosowanie w opisanych powyżej przypadkach. Nowoczesnym kierunkiem badań w genetyce sądowej jest obecnie zastosowanie w analizach dalekiego pokrewieństwa markerów typu SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu). Markery SNP wykazują niższe tempo mutacji i tym samym charakteryzują się wyższą stabilnością niż markery STR. Ze względu jednak na niższą siłę różnicującą markerów SNP, zastosowanie badania dalekiego pokrewieństwa wymaga analizy bardzo dużej ich liczby (często powyżej pół miliona) i specjalistycznej aparatury, co wiąże się również z podniesieniem kosztów badania. Choć celem pracy doktoranta było opracowanie metody, która nie wymagałaby zwiększenia kosztów analizy względem standardowej analizy markerów STR, w pracy brakuje szerszej dyskusji na temat najnowszych rozwiązań w tym temacie.

Część merytoryczną pracy otwiera abstrakt przygotowany w języku polskim i angielskim, który w sposób przejrzysty przedstawia cele pracy. Należy jednak zauważyć, że warto byłoby położyć większy nacisk w abstrakcie na opis wyników i wniosków płynących z pracy i statystyk opisujących poziom przydatności opracowanego narzędzia po implementacji. W abstrakcie

	<p style="text-align: center;"><b>POMORSKI UNIwersYTET MEDYCZNY w SZCZECINIE</b> ul. Rybacka 1; 70 – 204 Szczecin</p> <p style="text-align: center;"><b>KATEDRA MEDYCZYNY SĄDOWEJ</b> <b>ZAKŁAD GENOMIKI I GENETYKI SĄDOWEJ</b> al. Powstańców Wlkp. 72; 70 – 111 Szczecin</p> <p style="text-align: center;">tel. +48 91 466-15-77 (18-57) e-mail: gensad@pum.edu.pl</p>		
---	---	---	---

doktorant nie uniknął również sformułowań niezręcznych jak „stworzenie drabiny allelicznej”, tudzież „stworzenie odczynnika do kalibracji”, oraz sformułowań nieprecyzyjnych, jak „Projekt obejmował (...) analizę bioinformatyczną genomu ludzkiego”.

We wstępie Pan mgr Wojciech Łuczak zawarł podstawowe informacje i przegląd literatury, które w sposób umiejętny i przejrzysty wprowadzają czytelnika w podjętą tematykę badawczą. Doktorant przedstawił podstawowe właściwości markerów STR, historię opracowania ich nomenklatury, mechanizm powstawania i omówił przydatność ich analizy dla różnych obszarów nauk biologicznych. Szczegółowo omówił zastosowanie i ograniczenia analizy sekwencji mikrosatelitarnych w badaniach biologicznego pokrewieństwa. Wśród przyczyn trudności związanych z uzyskaniem jednoznacznego wyniku analizy pokrewieństwa, zwłaszcza w dalszych relacjach rodzinnych, należałoby mocniej podkreślić wysokie tempo mutacji markerów STR, a wymieniając kryteria doboru optymalnych markerów istotne byłoby odniesienie się do danych literaturowych. Należy podkreślić, że wstęp został przygotowany z wysoką dbałością o zastosowaną terminologię, a ponadto został wzbogacony o ryciny ułatwiające zrozumienie poruszanych zagadnień.

W rozdziale "Materiały i Metody" doktorant zawarł szczegółowy opis zastosowanych metod i warsztatu badawczego, obejmującego metodę izolacji DNA, projektowanie starterów, pracę z bazami danych, reakcję multipleks PCR, sekwencjonowanie DNA technologią Sangera, poszczególne etapy optymalizacji i walidacji wymienionych metod oraz analizy statystyczne. Metody, jak i następujące po nich wyniki, przedstawione są w sposób umożliwiający zrozumienie zastosowanego ciągu przyczynowo-skutkowego. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie nowatorskiej metody do szacowania heterozygotyczności *loci* na podstawie analizy puli próbek DNA, i choć początkowo jej zastosowanie może budzić wątpliwości co do wystarczającej dokładności metody, walidacja metody na znanych markerach potwierdziła jej wysoką skuteczność, dostarczając narzędzia, które zapewnia wysoką oszczędność czasu i środków, i może zostać zastosowane w przyszłości w innych badaniach podobnego rodzaju. Drobne uwagi to brak informacji na temat rodzaju tkanki wykorzystanej do izolacji DNA, brak szczegółowych informacji w jaki sposób przygotowane zostały próbki do analizy czułości reakcji multipleks-PCR (czy poprzez seryjne rozcieńczenia?) oraz czy analizy prowadzone były w powtórzeniach, i dotyczy to również analiz przeprowadzonych dla szacowania heterozygotyczności *loci* STR.

Kolejny rozdział przedstawia uzyskane wyniki badań. Pan mgr Wojciech Łuczak w pierwszej kolejności zastosował najnowszą wiedzę i bazy danych STRCatalog i WebSTR do poszukiwania wysoce polimorficznych *loci* STR. W konsekwencji badacz wybrał 183 markery spełniające pożądane kryteria, w tym kryterium możliwie najwyższej heterozygotyczności. Przydatna byłaby informacja, ile z tych markerów, to markery standardowo stosowane



POMORSKI UNIwersYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE  
ul. Rybacka 1; 70 – 204 Szczecin

KATEDRA MEDYCZYNY SĄDOWEJ  
ZAKŁAD GENOMIKI I GENETYKI SĄDOWEJ  
al. Powstańców Wlkp. 72; 70 – 111 Szczecin

tel. +48 91 466-15-77 (18-57) e-mail: gensad@pum.edu.pl






AB 1645

w znanych zestawach komercyjnych? Czy doktorant korzystał z bazy NIST/STRBase (<https://strbase.nist.gov/>), która stanowi uznane kompendium wiedzy na temat markerów STR? Zastanawia mnie bowiem, na ile konieczne było poszukiwanie nowych markerów, a na ile można było skorzystać z zestawu znanych markerów. W Tabeli nr 2 brakuje numeru chromosomu odpowiadającego poszczególnym markerom STR, i nie doszukałam się w pracy informacji na temat analizy LD (ang. linkage disequilibrium) wytypowanych markerów. Zależne dziedziczenie markerów może bowiem prowadzić do nieuprawnionego stosowania reguły mnożenia w obliczeniach ilorazu wiarygodności.

W rozdziale 4.1 znajduje się odniesienie do złej tabeli, a Tabela nr 2 powinna zawierać informacje, które pozwoliłyby rozróżnić te markery, które zostały wybrane na podstawie analizy baz danych od markerów wyselekcjonowanych innymi metodami. W następnej kolejności doktorant zaprojektował startery do reakcji PCR niezbędne do przeprowadzenia badań przesiewowych wyselekcjonowanych *loci*. Zastanawiam się, czy przynajmniej dla części z analizowanych *loci* nie można było wykorzystać sekwencji starterów dostępnych w literaturze, co mogłoby zaoszczędzić czas pracy doktoranta. W kolejnym kroku badacz przeprowadził szacowanie heterozygotyczności wybranych *loci* w populacji polskiej poprzez zastosowanie autorskiej metody analizy połączonych próbek pochodzących od 50 osób, ich genotypowania i następnie oceny heterozygotyczności na podstawie stosunku powierzchni poszczególnych pików. Analizując Ryc. 4, która prezentuje wyniki elektroforezy na etapie badań przesiewowych *loci*, zastanawia fakt, czy możliwy był precyzyjny pomiar pola powierzchni pod pikiem dla niektórych pików, dla których uzyskano zbyt mocny sygnał.

Badania przesiewowe umożliwiły autorowi selekcję 50 najbardziej polimorficznych *loci* w populacji polskiej (ze średnią heterozygotycznością na poziomie 0,88), które posłużyły do opracowania ostatecznej metody Kinfinder. W następnym kroku doktorant z sukcesem opracował i zoptymalizował dwie reakcje PCR typu multipleks do kompleksowej analizy wszystkich wybranych 50 *loci*. Co istotne, w opracowaniu wyników brakuje wykazu ostatecznych sekwencji starterów dla dwóch reakcji PCR typu multipleks, gdyż część z nich uległa modyfikacji po etapie badań przesiewowych, uniemożliwiając odtworzenie tego etapu badań. Analizując czułość metody Kinfinder, autor uzyskał pozytywne wyniki tj. pełen profil genetyczny przy najmniejszej testowanej ilości wejściowej tj. 0.125 ng ludzkiego DNA, co potwierdziło wysoką czułość opracowanej metody. Jednakże w celu precyzyjnej oceny czułości metody, i oceny powstawania artefaktów w postaci pojawiania się alleli typu drop-out i drop-in, badacz powinien zastosować szerszy zakres seryjnych rozcieńczeń, a sama analiza powinna zostać przeprowadzona dla większej liczby próbek badanych. Dodatkowo, z punktu widzenia planowanej komercjalizacji opracowanej metody najważniejszym ograniczeniem przedstawionych wyników badań wydaje się być brak przeprowadzonej walidacji zgodnie z powszechnie stosowanymi zasadami

	<p style="text-align: center;"><b>POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY w SZCZECINIE</b> ul. Rybacka 1; 70 – 204 Szczecin</p> <p style="text-align: center;"><b>KATEDRA MEDYCZYNY SĄDOWEJ</b> <b>ZAKŁAD GENOMIKI I GENETYKI SĄDOWEJ</b> al. Powstańców Wlkp. 72; 70 – 111 Szczecin</p> <p style="text-align: center;">tel. +48 91 466-15-77 (18-57) e-mail: gensad@pum.edu.pl</p>		 <p style="text-align: center;"><b>AB 1645</b></p>
---	---	---	---

SWGDM (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods; <https://www.swgdam.org/>). Korzystna byłaby również walidacja na aparatach nowszych niż ABI3130XL, serii 3500.


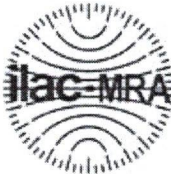
Główną wartość merytoryczną ocenianej pracy stanowi wykazanie użyteczności opracowanej metody w badaniach pokrewieństwa. Analiza informatywności metody Kinfinder symulowanych wyników badań wykazała znaczący wzrost mediany wartości LR dla analizy biologicznego pokrewieństwa pierwszego i drugiego stopnia, i nieznaczące usprawnienie wyników analiz dla relacji trzeciego stopnia. Nowo opracowana metoda Kinfinder została wdrożona do rutynowej pracy Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed i zgodnie z informacjami przedstawionymi przez doktoranta do dnia 30.09.2024 r. została wykorzystana w ok. 30 badaniach biologicznego pokrewieństwa, w tym głównie w badaniach relacji drugiego stopnia, za każdym razem pozwalając na uzyskanie rozstrzygającego wyniku analiz. Nasuwa się pytanie, czy metoda może zostać zastosowana, gdyby osobą badaną była osoba spoza populacji polskiej? Czy badacz brał pod uwagę zebranie szerszych danych populacyjnych?

Pan mgr Wojciech Łuczak opisuje trzy wybrane, bardziej skomplikowane i nietypowe przykłady spraw. W opisie sprawy nr 1 (Rozdział 4.9.1) wskazane byłoby poszerzenie informacji w jakim stopniu markery wyselekcjonowane przez doktoranta przyczyniły się do pozytywnego rozwiązania sprawy względem innych markerów oraz korzystna byłaby również prezentacja wyników w formie graficznej bądź tabelarycznej. W opisie sprawy nr 2 (Rozdział 4.9.2) brakuje informacji na temat wartości LR w relacji pokrewieństwa trzeciego stopnia przy założeniu, że wykorzystano jedynie markery ze standardowo stosowanego zestawu markerów STR, ponownie, żeby w sposób rzetelny ocenić w jaki sposób zastosowanie zestawu Kinfinder przyczyniło się do postawienia hipotezy o wystąpieniu przypadku rodzeństwa przyrodniego i tym samym ostatecznie doprowadziło do rozwiązania tej konkretnej sprawy.

Rozdział "Dyskusja" został podzielony na podrozdziały, w których dyskutowane są wyniki poszczególnych etapów badań doktoranta i zakończony został wnioskami płynącymi z pracy. Pan mgr Łuczak umiejętnie dyskutuje założone kryteria wyboru markerów, wyniki analiz wybranych markerów w badaniach przesiewowych i przeprowadzone badania heterozygotyczności wybranych *loci* STR. Doktorant podkreśla praktyczne zastosowanie nowo opracowanej metody, jej wykorzystanie w badaniach świadczonych zarówno na rzecz klientów indywidualnych, jak i w sprawach sądowych. Jak wskazuje doktorant badania z wykorzystaniem tej metody są oferowane przez podmioty zewnętrzne, w tym przez spółkę Diagnostyka S.A. i Zdrowegeny.pl. sp. z o.o.

### **Poprawność redakcyjna rozprawy**

Układ pracy jest poprawny i przemyślany, a praca przygotowana z wysoką dbałością o estetykę. Zauważyć można nieliczne błędy stylistyczne czy gramatyczne. Przykładowo niekonsekwentnie

	<p align="center"> <b>POMORSKI UNIwersYTET MEDYCZNY w SZCZECINIE</b>          ul. Rybacka 1; 70 – 204 Szczecin   <b>KATEDRA MEDYCZYNY SĄDOWEJ</b>  <b>ZAKŁAD GENOMIKI I GENETYKI SĄDOWEJ</b>          al. Powstańców Wlkp. 72; 70 – 111 Szczecin           tel. +48 91 466-15-77 (18-57) e-mail: gensad@pum.edu.pl       </p>		
---	---	---	---

pisana jest nazwa metody (KinFinder vs. Kinfinder), niekonsekwentnie stosowany jest cudzośćłów („1000 Genomes” vs 1000 Genomes) i zaobserwować można niską jakością niektórych figur (np. Fig. 4). Zauważyć można również niekonsekwencje stosowania pojęć typu rozpiętość i zwartość alleli, a definicja rozpiętości pojawia się dopiero w rozdziale Dyskusja. Opisane uwagi nie są jednak poważne i nie zmniejszają wartości merytorycznej pracy.

### Ocena końcowa

Przedstawiona do oceny praca jest dziełem oryginalnym i ma charakter dysertacji o klasycznej formie monografii. Praca jest dobrze przemyślana i ma precyzyjnie sformułowane cele, które zostały przez doktoranta osiągnięte poprzez zastosowanie precyzyjnie dobranej metodologii i strategii działania. Wartość merytoryczną pracy oceniam wysoko, którą dodatkowo podnoszą praktyczne znaczenie opracowanej metody i wdrożenie do laboratorium. Doktorant wykazał się w swojej pracy szerokim warszatem badawczym, a realizacja wyznaczonych celów świadczy o naukowej dojrzałości i wskazuje na przygotowanie do samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr Wojciecha Łuczaka spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018r. Poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr Wojciecha Łuczaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Z wyrazami szacunku,

*Ewelina Pośpiech*

dr hab. Ewelina Pośpiech, prof. PUM