



materiału biologicznego, które i tak nie zawsze są wystarczające do wyciągnięcia wiarygodnych wniosków ze względu na swoją niską specyficzność. Mankamenty te można, jak się wydaje, zredukować opracowując nowe metody identyfikacji polegające na zastosowaniu markerów molekularnych, w tym mRNA, miRNA, czy też metylacji DNA. Tematykę badawczą podjętą przez Panią mgr Joannę Chamier-Ciemińską należy zatem uznać za bardzo przydatną i użyteczną dla współczesnej genetyki sądowej, a metody które zdecydowała się wykorzystać w badaniach za jak najbardziej trafne.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Konstrukcja rozprawy jest standardowa dla tej formy publikacji. Po streszczeniach w języku polskim i angielskim, przedstawiono oświadczenia autorów o wkładzie pracy w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a następnie zamieszczono trzy artykuły opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym składające się na rozprawę doktorską.

Streszczenie w języku polskim, to nieco ponad 5 stron tekstu, w którym można wyodrębnić wstęp, cel pracy doktorskiej, najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej oraz informację na temat włączonych do rozprawy artykułów wraz z ich omówieniem oraz podsumowanie. Wstęp w jasny i prosty sposób wprowadza w tematykę badawczą oraz przedstawia argumenty na rzecz zasadności podjęcia tematu. Jest zwięzły, lecz zawiera wystarczające informacje by w pełni przekonać zarówno do istotności problemu jak i właściwego wyboru metod analizy. Cel pracy jest klarowny, choć można odnieść wrażenie, że bardzo ogólny, gdyż nie specyfikuje konkretnych tkanek i płynów ustrojowych, które mają być przedmiotem badań. Informacja ta pojawia się jednak zaraz przy omówieniu najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej. Formułując cel pracy zwrócono uwagę na praktyczny wymiar prowadzonych badań i zapowiedziano prace nad wdrożeniem metody w laboratorium genetyczno-sądowym. Ze streszczenia dowiadujemy się, że doktorantka opracowała dwa testy genetyczne, pierwszy do identyfikacji wydzieliny z dróg rodnych i krwi miesięczkowej, drugi do różnicowania krwi obwodowej i miesięczkowej. Testy polegają na badaniu ludzkich i bakteryjnych markerów mRNA (w sumie przetestowano 9 loci). Badania przeprowadzono korzystając z materiału pobranego dla potrzeb pracy oraz śladów biologicznych dostępnych w Zakładzie Medycyny Sądowej GUMed. Na rozprawę doktorską składają się trzy artykuły, z których najwcześniejszy o charakterze przeglądowym został opublikowany w 2011 roku

w czasopiśmie *Z Zagadnień Nauk Sądowych*, a dwa pozostałe, to oryginalne prace opublikowane w latach 2013 i 2014 w czasopiśmie *Forensic Science International: Genetics*. Krótkie omówienie artykułów w streszczeniu jest użytecznym i zasadniczo wystarczającym wprowadzeniem w zagadnienia przedstawione w tych publikacjach. Można się z niego dowiedzieć o założeniach poszczególnych publikacji, materiałach i metodach wykorzystanych w przypadku artykułów raportujących prace eksperymentalne i o wynikach badań. Streszczenie zawiera informacje o aktywnym propagowaniu wiedzy nt. opracowanych metod i ich wykorzystaniu w praktyce kryminalistycznej. W niektórych przypadkach nie udało się uniknąć niejednoznaczności, jak np. przy omówieniu artykułu z 2013 roku doktorantka informuje o pięciu markerach do identyfikacji wydzieliny z dróg rodnych i krwi menstruacyjnej i dopiero po zapoznaniu się z tą publikacją jasne staje się, że test jest testem heksapleksowym, gdyż pozostały szósty marker należy do genów metabolizmu podstawowego, jest locus referencyjnym i dlatego nie został w tym miejscu uwzględniony przez Autorkę. Tego typu drobne nieścisłości są trudne do uniknięcia przy przygotowywaniu skrótów oraz streszczeń. W podsumowaniu doktorantka podkreśliła, że opracowane metody pozwalają na wiarygodną identyfikację płynów biologicznych, co znalazło odzwierciedlenie w ich praktycznym zastosowaniu. Zgadzam się w pełni ze stwierdzeniem mgr Chamier-Ciemińskiej, że opracowanie nowych metod wpływa na jakość ekspertyz i zwiększa możliwości badawcze, co jest ważne dla wymiaru sprawiedliwości i organów ścigania. Nie jest jasne dla recenzenta dlaczego doktorantka uważa, że opracowanie nowych metod jest szczególnie użyteczne w przypadku przestępstw na tle seksualnym. Nowe metody mogą być jednakowo użyteczne w sprawach przestępstw na tle seksualnym, jak i w sprawach o innym charakterze, np. w sprawach zabójstw. Streszczenie w języku angielskim ma taką samą konstrukcję i zawiera te same informacje, które omówiono dla streszczenia w języku polskim. Jest napisane w sposób klarowny, a angielszczyzna wydaje się być poprawna.

Praca doktorantki stanowi samodzielną i wyodrębnioną część pracy zbiorowej. Dlatego, zgodnie z wymogami Ustawy, wykazano indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników przedstawionej pracy. Z informacji zamieszczonej na stronach 16-18 rozprawy doktorskiej wynika, że w przypadku wszystkich trzech publikacji wkład pracy doktorantki był zasadniczy i polegał m.in. na przeglądzie literatury, napisaniu manuskryptów, kontaktach z recenzentami i poprawie manuskryptów zgodnie z ich uwagami. W przypadku prac eksperymentalnych także na zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń. W przypadku artykułu z 2014 doktorantka dodatkowo jest autorką pomysłu

badan i aplikacji, która pozwoliła na zdobycie funduszy na ich przeprowadzenie. Nie ma zatem wątpliwości co do tego, że wymogi Ustawy z 18 marca 2011 r. zostały w tym względzie spełnione.

mgr Joanna Chamier-Ciemińska jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem do korespondencji artykułu przeglądowego z 2011 roku opublikowanego w czasopiśmie polskim o zasięgu międzynarodowym *Z Zagadnień Nauk Sądowych*. W publikacji pod tytułem: „mRNA profiling in identification of biological fluids in forensic genetics” przedstawiono słuszne argumenty przemawiające za pilną potrzebą opracowania i wdrożenia metod umożliwiających identyfikację ludzkich płynów ustrojowych metodami biologii molekularnej wskazując na mRNA, jako najbardziej obiecujący marker pozwalający na przeprowadzenie takich badań. W pracy przedstawiono metodologię analizy mRNA znajdującą zastosowanie w kontekście kryminalistycznym omawiając metody izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji, pomiaru stężenia DNA oraz genotypowania wyselekcjonowanych markerów identyfikacyjnych. Przedstawiono znane wówczas markery mRNA oraz metody ich detekcji poruszając problem ich specyficzności, czułości i użyteczności dla celów sądowych. Omówiono również problem loci referencyjnych. W podsumowaniu wśród innych możliwych metod badawczych zabrakło metody analizy metylacji DNA, która może być również specyficzna tkankowo, a tym samym dostarczać informacji na temat źródła DNA. Artykuł jest bardzo użyteczny ze względu na dużą ilość praktycznych informacji. Drobne niezgrabności językowe, jak sugerowany na str. 205 „unlimited RNA recovery” przy zastosowaniu izolacji RNA metodą organiczną, czy prawdopodobne problemy z tłumaczeniem tekstu (na str. 207 – „MUC4 was characterized by higher stability”, a na str. 213 – „MUC4 miał mniejszą stabilność”; na str. 207 – „micromatrices” zamiast microarrays), nie umniejszają dużej wartości publikacji.

mgr Joanna Chamier-Ciemińska jest pierwszym autorem artykułu oryginalnego pt. „mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification” opublikowanego w międzynarodowym czasopiśmie *Forensic Science International: Genetics*. Nie jest zadaniem recenzenta dodatkowa recenzja samej publikacji, która przeszła przez gęste sito oceny jednego z najlepszych czasopism publikujących materiały z dziedziny genetyki sądowej. Analizując artykuł w aspekcie samej rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że raportuje on w interesujący sposób wyniki ważne z punktu widzenia nauk sądowych. Układ artykułu jest standardowy, poza krótkim wstępem, który jest dobrym wprowadzeniem w zagadnienie, znajduje się w nim sekcja materiałów i metod oraz sekcja

wyników połączonych z dyskusją oraz uwagi końcowe. Artykuł zawiera dane uzupełniające w formie elektronicznej, które zostały dołączone do rozprawy doktorskiej. W podstawowym artykule znajduje się 5 tabel i 2 rysunki, zawarto w nim 22 pozycje literatury. W danych uzupełniających znajduje się dodatkowo 5 tabel i 1 rysunek. Całość w rzetelny sposób przedstawia wyniki eksperymentów, które pozwoliły na ocenę przydatności do identyfikacji wydzieliny z pochwy i krwi menstruacyjnej dla 5 markerów specyficznych i 2 loci metabolizmu podstawowego. Zbadano specyficzność markerów wykazując m.in., że locus MMP11 nie jest specyficzny wyłącznie dla krwi miesięczkowej, choć jest silnym indykatorem jej obecności. Zauważono jednak, że różnicowanie krwi miesięczkowej i wydzieliny z pochwy wydaje się być nieprzydatne w badaniach kryminalistycznych. Z dwóch testowanych loci referencyjnych wybrano G6PDH, gdyż dla RPS15 nie uzyskano pozytywnego wyniku w przypadku potu oraz krwi obwodowej. Dla recenzenta mało przekonujące jest argumentowanie, że mogło to wynikać ze zbyt długiego amplikonu, zwłaszcza w kontekście aż 12 negatywnych prób dla krwi obwodowej. Szkoda, że nie przetestowano dodatkowych starterów dla tego markera. Testy dodatkowych starterów generujących krótsze amplikony byłyby również interesujące dla MMP11 i HBD1, w kontekście degradacji mRNA w starych śladach biologicznych. Ważnym elementem tej publikacji jest opracowanie i walidacja multipleksu wykorzystującego 6 markerów, ludzkich (czterech) i bakteryjnych (dwóch), do identyfikacji wydzieliny z pochwy. Wykazano, że opracowany test genetyczny ma odpowiednią czułość (150-300 pg RNA), jest odporny na inhibicję, gdy inhibitory obecne są na etapie izolacji RNA (jest to stan odpowiadający rzeczywistości kryminalistycznej) i względnie stabilny (zważywszy, że przedmiotem badań jest RNA, a nie DNA) w przypadku śladów biologicznych. W pracy przedstawiono szereg interesujących obserwacji, np. związku obecności markerów bakteryjnych ze zdrowiem kobiety, obecności produktu dla MMP11 w pierwszych dniach cyklu kobiety, czy długości amplikonów badanych loci bakteryjnych. Stanowią one ciekawy element dyskusji i polemiczny głos w literaturze przedmiotu, mogą też być przedmiotem przyszłych badań. Na uznanie zasługuje fakt, że autorka właściwie zadbała o propagowanie własnych osiągnięć badawczych i test genetyczny będący przedmiotem tej pracy opisano w książce z cyklu: „Forensic DNA Typing Protocols” wydawanej przez wydawnictwo Springer.

mgr Joanna Chamier-Ciemińska jest pierwszym autorem artykułu oryginalnego pt. „mRNA heptaplex protocol for distinguishing between menstrual and peripheral blood” opublikowanego również w czasopiśmie *Forensic Science International: Genetics*. Artykuł ma standardową konstrukcję. Wstęp bardzo dobrze wprowadza w tematykę

badawczą wyjaśniając w jakich okolicznościach test genetyczny umożliwiający różnicowanie krwi menstruacyjnej i obwodowej może znaleźć zastosowanie. Mimo, że stwierdzono, iż w praktyce wykorzystanie metod identyfikacji tkanek, czy wydzielin ludzkich jest rzadkie i przedstawiono inne dostępne metody identyfikacji krwi miesięczkowej, w tym metody polegające na zastosowaniu analizy mRNA, praca robi krok naprzód w kierunku jakości badania. Cel pracy, zgodnie z którym, postawiono sobie zadanie odpowiedzi na pojedyncze pytanie (krew obwodowa czy menstruacyjna) osiągając jednak wysoką wiarygodność wyniku, bardzo dobrze wpisuje się w ogólną koncepcję tej pracy doktorskiej. W artykule znajduje się 6 tabel i 2 rysunki, zacytowano 30 pozycji literatury. W sekcji materiałów i metod można znaleźć kompletną procedurę pozwalającą na przeprowadzenie badań za pomocą opracowanego heptapleksowego testu genetycznego, który uzupełniono o szczegółową metodę interpretacji uzyskanych wyników. Taki system do analizy jest bez wątpienia dużym osiągnięciem badawczym. Test zawiera aż 4 markery krwi menstruacyjnej/wydzieliny z pochwy, w tym dwie metaloproteinazy, które są najlepszymi markerami pozwalającymi na identyfikację krwi miesięczkowej (potwierdzono to również w obecnych badaniach). Pozostałe trzy loci, to dwa markery krwi obwodowej i jeden gen referencyjny, którym jak w poprzedniej pracy jest G6PDH. Potwierdzono brak specyficzności markerów HBD1 i MUC4, dla których uzyskano słabo pozytywny wynik w przypadku analizy śliny oraz obu metaloproteinaz, które również dały wynik słabo pozytywny w przypadku wydzieliny z pochwy. Uzyskaną ogólną czułość testu multipleksowego należy uznać za wysoką i wystarczającą w kontekście stosowanych obecnie metod identyfikacji osobniczej stosowanych w genetyce sądowej. Poszczególne markery wykazywały różną czułość. Taki wynik jest częściowo spodziewany po analizie rysunku nr 1, w którym zauważalny jest znaczący brak zbalansowania sygnału dla kolejnych loci (różnica od ok. 400 do 2000 RFU). Czy różnice te były powtarzalne dla różnych próbek? Najbardziej wrażliwe na niskie stężenia RNA okazały się jednak loci MUC4 i G6PDH. Ten drugi wynik jest nieco zaskakujący w kontekście wyników uzyskanych w poprzedniej publikacji, w której korzystano z tych samych starterów PCR. Czy niższa czułość uzyskana w kolejnych eksperymentach wynika z specyfiki obecnej reakcji multipleksowej? Dobre wyniki pokazał eksperyment z analizą mieszanin materiału biologicznego. Ograniczenia metody pod tym względem, które rzetelnie wykazano, nie można uznać za niespodziewane, gdyż związane są z ograniczeniami samej metody PCR. Przeprowadzone eksperymenty walidacyjne opracowanego testu genetycznego, w tym analiza starych śladów biologicznych, pozwoliły na jego zastosowanie w praktyce opiniodawczej. Przedstawiony przypadek kryminalny dobrze ilustruje możliwości praktycznego wykorzystania opracowanej metody i jest ciekawym elementem publikacji.

Przedstawiona rozprawa doktorska bez wątpienia stanowi oryginalne rozwiązanie problemu identyfikacji wydzieliny z pochwy, oraz różnicowania krwi obwodowej i menstruacyjnej za pomocą nowoczesnych metod biologii molekularnej. Pani mgr Chamier-Ciemińska wykazała się dużą ogólną wiedzą teoretyczną w temacie identyfikacji płynów ustrojowych człowieka metodami biologii molekularnej, a praca przeglądowa, której jest pierwszym autorem, jest interesującym doniesieniem na ten temat. Z przedstawionych prac eksperymentalnych wynika, że doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a jej indywidualny wkład w powstanie publikacji jest zasadniczy. Jak wynika z przeszukania bazy danych Scopus (28.02.2015r.) doktorantka jest współautorem w sumie 7 prac, które zacytowano 23 razy i obliczony dla niej indeks H = 3. Ten wynik należy uznać za bardzo dobry w kontekście dyscypliny jaką jest genetyka sądowa. Warto przy tym zauważyć, że aż 8 z wspomnianych cytacji uzyskał artykuł z 2013 roku wchodzący w skład doktoratu.

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana praca doktorska mgr Joanny Chamier-Ciemińskiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki po zmianach wprowadzonych w Ustawie z dnia 18 marca 2011 r. Wobec powyższego zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Joanny Chamier-Ciemińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W uznaniu tego, że opracowane metody zostały wdrożone i są wykorzystywane w praktyce, a doktorantka zadbała również o jak najszersze propagowanie osiągnięć przygotowując dodatkową anglojęzyczną publikację książkową opracowanego protokołu badawczego, proponuję wyróżnić recenzowaną pracę doktorską.

Wojciech Branicki

dr hab. Wojciech Branicki, prof. UJ