

Prof. dr hab. Barbara Kosowska
Uniwersytet Przyrodniczy
We Wrocławiu

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu Wrocław, 7. 04. 2015 r
ZBIERANKA WYDZIAŁU LEKARSKIEGO

pt. dn. 22 KWI. 2015

nr. DL/1237/15
zak sprawy DL-

*Wider
M. S. Dobosza
22.06.15*

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Katarzyny Bonar
pt.: „Nieniszczące izolacje kopalnego DNA”, wykonanej w Zakładzie Technik
Molekularnych Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu,
pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Dobosza.

Kopalny DNA został wyizolowany po raz pierwszy w roku 1984, w rok po stworzeniu metody PCR przez Kary'go Mullisa, który za opracowanie tej techniki w roku 1993 otrzymał Nagrodę Nobla. Metoda PCR zrewolucjonizowała nauki biologiczne oraz zapoczątkowała rozwój paleobiologii molekularnej opartej o analizę DNA. Już pod koniec lat 80. XX wieku badania kopalnego DNA nabrały tempa. Główną trudnością było uzyskiwanie jedynie krótkich, zdegradowanych fragmentów DNA, uszkodzonych przez różne i zmienne w czasie warunki, w których przebywały szczątki zwierzęce bądź ludzkie. Oprócz kopalnego DNA pozyskiwanego bezpośrednio ze stanowisk archeologicznych, starożytne DNA jest dostępne do badań także pod postacią różnych form eksponatów zebranych w wielu kolekcjach muzealnych. Niestety, wykorzystywane bywa rzadko, głównie z obawy przed uszkodzeniem cennych zbiorów.

Autorka w założeniach i celach swej dysertacji doktorskiej wyszła naprzeciw opisywanym przesłankom związanym z ryzykiem uszkodzenia cennych obiektów bądź przedmiotów badań. Postanowiła opracować metody ekstrakcji DNA, które nie będą powodowały niszczenia starych tkanek lub podłoża, a ponadto zaplanowała stworzenie zestawu eliminującego możliwość kontaminacji, optymalizację warunków i czasu izolacji, a także sprawdzenie stabilności starego DNA.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska zawiera 66 stron tekstu, 132 pozycje piśmiennictwa, 6 tabel i 14 rysunków (w tym fotografii). Ponadto, w aneksie zamieszczonym na końcu pracy zamieszczono 8 tabel w formie fotografii opisu dokumentów oraz wyników izolacji badanych eksponatów oraz 2 duże ryciny ilustrujące wyniki analizy polimorfizmów STR obecnych w badanych próbach.

Tytuł pracy „Nieniszczące izolacje kopalnego DNA” nie jest zbyt fortunny, bowiem sugeruje, że celem pracy było opisanie istniejących już nieniszczących izolacji kopalnego DNA. W istocie, głównym celem pracy jak ujęła to Autorka na stronie 25, było opracowanie nowej metody izolacji starego DNA. Kolejna zawarta w tytule znacząca nieścisłość, dotyczy kategorii badanego DNA. W ocenianej pracy doktorskiej nie izolowano DNA z materiału kopalnego, bowiem za materiał kopalny sama Autorka rozprawy na stronie 7 uznaje: „materiał pochodzący od organizmów już wymarłych, znanych tylko z zapisu paleontologicznego”. Według tych kryteriów żaden z badanych w pracy obiektów nie jest „kopalnym”. Tak więc, rozprawa powinna mieć np. tytuł: „Nowe metody izolacji starego DNA, oszczędzające (lub chroniące) cenne obiekty badań” lub „Nowe, niedestrukcyjne metody izolacji starego DNA”.

Wstęp rozprawy jest interesujący, choć w stosunku do całości pracy zbyt długi, zaburzający proporcje wewnętrzne pracy. Przegląd piśmiennictwa stopniowo wprowadza czytelnika w analizowane zagadnienia, którymi są: problemy z nomenklaturą różnych kategorii starego DNA, trudności z izolacją starego DNA spowodowane jego uszkodzeniami i zanieczyszczeniami, istniejące metody pozyskiwania starego DNA metodami klasycznymi oraz nieliczne opisane dotychczas „nieniszczące” metody izolacji starego DNA. Autorka w rozdziale 1. *Kategorie starego DNA* - proponuje nową nomenklaturę stosującą kategoryzację starego DNA. Jednakże w następnych rozdziałach nie zastosowała się ani razu do własnej propozycji. Słabością tego rozdziału są obiecujące lecz nie kontynuowane interpretacje wyników cytowanych pozycji piśmiennictwa. Na przykład, na str. 7, akapit 12 od góry: „Interpretacja wyników badania takiego DNA jest znacznie trudniejsza”. Tu i w innych miejscach Autorka zaniechała opisu interesujących dla każdego badacza trudności, a szkoda, gdyż praca doktorska jest idealnym polem do tego typu dociekań, przede wszystkim z powodu wykazania umiejętności interpretowania niejasnych wyników. Takie próby, w dogodnych dla Autora

warunkach braku ograniczeń co do objętości rozprawy, byłyby jak najbardziej na miejscu. Ponadto, czytelnik w tekście wstępu napotyka niepotrzebne i nieklarowne uproszczenia. Na przykład na str. 8, cyt.:', Material genetyczny zachowuje się również przypadkowo'. Nie przystaje ono do późniejszego tekstu, bowiem zachowanie „przypadkowe” (losowe) nie odnosi się do omawianego konkretnego „przypadku”.

Ogólnie, rozdział „Wstęp” napisany został raczej językiem popularno-naukowym, unikającym głębszego analizowania wyników cytowanych autorów.

Założenia i cele pracy napisane zostały poprawnie, choć jak wspomniano wyżej nie są w pełni adekwatne do tytułu pracy.

Rozdział „Materiał i metody” liczy 14 stron. Materiał badawczy stanowiły 3 kategorie obiektów: pierwsze, to stare książki i dokumenty (w sumie 7 obiektów liczących od kilkudziesięciu do ponad 100 lat), na których istniały plamy krwi pochodzące od ludzi, lecz o nieustalonym czasie ich powstania, a także pobrane i utrwalone na papierze świeże plamy krwi, które stanowiły „kontrolę” umożliwiającą w obu przypadkach testowanie skuteczności opracowanej nowej metody. Drugą kategorię badanych 7 obiektów, stanowiły mokre preparaty anatomiczne z kolekcji własnej Muzeum Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, które pozyskiwano do badań przy okazji rekonserwacji. Trzecim rodzajem badanych obiektów były suche tkanki, jak np. zęby oraz tkanki miękkie człowieka ale zmumifikowane. Te ostatnie (w sumie 10 obiektów), pochodziły z różnych epok – od neolitu do I połowy XX wieku. W tym przypadku, izolację DNA ze zmumifikowanych tkanek Autorka przeprowadziła wg opracowanej własnej metody, natomiast izolację DNA z zębów – wg już opisanej metody oszczędzającej badany preparat, jednak z własnymi modyfikacjami dotyczącymi zmian w stężeniu stosowanych odczynników. W podrozdziale poświęconym zastosowanym metodom, Autorka opisała aparat do izolacji starego DNA z plam krwi, który został skonstruowany we współpracy z Wydziałowym Zakładem Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej. Konstrukcja aparatu była projektem inżynierskim inż. Jana Pawła Macioszczyka. Autorka nie pisze, czy aparat ten był skonstruowany specjalnie dla potrzeb opisywanych badań i czy był już w innych badaniach testowany.

Wszystkie zastosowane procedury (staranne przygotowanie stanowiska w celu uniknięcia kontaminacji) oraz wykorzystane metody badawcze, były kluczowe dla osiągnięcia pozytywnych wyników izolacji starego DNA, który następnie miał

zostać zwizualizowany i zarchiwizowany. W celu zwiększenia prawdopodobieństwa udanej izolacji DNA ze starych preparatów, Autorka na wielu etapach badań dokonywała różnych modyfikacji i usprawnień. Następnie testowała skuteczność zastosowanych, nieniszczących technik izolacji starego DNA z wykorzystaniem analizy ilościowej oraz jakościowej.

Główne wyniki dotyczące realizacji celu pracy w postaci izolacji starego DNA z badanych obiektów - zestawiono w tabeli 5. Na 7 badanych plam krwi pochodzących ze starych papierowych dokumentów, których wiek szacowano na kilkadziesiąt lat, wyniki pozytywne uzyskano w 5 przypadkach, co stanowi 70% sukcesu. Negatywne 2 wyniki uzyskano z preparatów mających stały, bezpośredni kontakt ze środowiskiem zewnętrznym. Wyniki izolacji DNA ze świeżej plamy krwi pozwoliły na uzyskanie czystego profilu DNA.

W przypadku próby izolacji DNA z sączków z osadem pochodzącym z 7 starych preparatów anatomicznych z początku XX wieku, sukcesem zakończyła się izolacja z 4 obiektów, co stanowiło 57% udanych izolacji. To najslabsze wyniki spośród badanych różnych kategorii obiektów. Przyczyn niepowodzenia Autorka upatruje w środowisku w jakim były przechowywane preparaty (formalina oraz styczność z elementami metalowymi).

Trzecia kategoria obiektów – izolacja DNA ze zmumifikowanych tkanek miękkich oraz z zębów zakończyła się pełnym sukcesem – ze wszystkich obiektów udało się uzyskać izolat.

Ważne uwagi dotyczące wartości uzyskanych wyników dotyczą stężenia starego DNA, które było niskie (poniżej 100 ng/mikrol), ale jednak wystarczające do dalszych analiz i zastosowania analizy jakościowej w postaci identyfikacji STR. Z kolei, zastosowanie skutecznej metody ekstrakcji DNA z plam krwi na papierze, pozwoliło na zachowanie podłoża papierowego w stanie fizyko-chemicznym niezmienionym. W przypadku 3 mokrych preparatów anatomicznych konserwowanych płynem alkoholowo-formalinowym nie udało się uzyskać izolatów DNA z powodu silnego zakwaszenia w środowisku wodnym przez kwas mrówkowy, co doprowadziło do całkowitej degradacji DNA. Tu Autorka popełniła błąd w ocenie liczby własnych nieudanych prób, bowiem pisze (str.45, drugi akapit pod ryc.12) cyt.: „Z większości preparatów konserwowanych płynem alkoholowo-formalinowym nie można było wyizolować DNA...”, podczas gdy wyniki zawarte w tab.5 wskazują, iż nie uzyskano izolatu z mniejszości, czyli z 3 na 7 badanych obiektów.

Na końcu Autorka podkreśla, iż w przypadku pełnego sukcesu w postaci wyizolowania DNA ze zmumifikowanych tkanek i zębów, miały znaczenie – opracowanie własnej nieniszczącej metody izolacji DNA ze szczątków biologicznych oraz modyfikacja nieniszczącej metody opracowanej przez Pilecką (2009).

Podsumowując „Wyniki”, Autorka podkreśliła, iż bardzo ważnym elementem całości eksperymentu była niska trwałość wyizolowanego DNA, którego stężenie w badanych obiektach sprawdziła w oddzielnym eksperymencie. W przypadku płam krwi na papierze oraz mokrych preparatów anatomicznych po 96h od izolacji stężenie DNA wynosiło 0. Jedynie w przypadku zębów po 96 h, stężenie DNA wynosiło 25% wartości wyjściowej. Zatem, potencjalnie najlepszym materiałem do izolacji DNA okazała się tkanka zębowa.

W „Dyskusji” Autorka rozprawy podkreśla, iż uzyskane własne wyniki eksperymentu są pionierskie, a zastosowane metody umożliwiają minimalizację kosztów, aparatury oraz czasu, a także spełniają wszelkie warunki przydatności do standardowych analiz stosowanych w paleobiologii molekularnej. Opisywane zalety pracy nie zostały jednak właściwie przedyskutowane na tle wyników badań innych autorów i przez to, bez wymaganej w dyskusji starannej ich weryfikacji, rażą swą deklaratywnością.

W ocenie recenzenta w „Dyskusji” zabrakło pogłębionych analiz wyników z cytowanych bardzo wielu prac innych autorów. Autorka jednym tchem cytuje prace licznych autorów jakby wyłącznie w celu dołożenia ich do spisu publikacji, nie dyskutując w ogóle ich wyników, a jedynie informując, iż zajmowali się określonym tematem (np. str. 49, w kilku akapitach, czy str.50). Cytuje się wyniki innych autorów nie tylko w celu odnotowania, iż ktoś badał jakieś zagadnienie, lecz przede wszystkim w celu przeanalizowania wszelkich nasuwających się wątpliwości co do uzyskanych wyników. Dyskusja ukazuje dojrzałość badacza oraz weryfikuje faktyczną jego wiedzę umożliwiającą uprawianie wybranego pola naukowego. W tej dziedzinie Autorka bardzo powierzchownie potraktowała „Dyskusję” i na tym polu ma jeszcze sporo do zrobienia.

Zawarte w powyższej ocenie pracy doktorskiej uwagi i zalecenia nie umniejszają jednak znaczenia oraz wartości rozprawy, stanowią jedynie życzliwe wskazówki do dalszego doskonalenia warsztatu naukowego Autorki.

Reasumując, sądzę że opracowanie nowych metod izolacji DNA z wybranych różnych starych obiektów, uzyskanie pozytywnych wyników izolacji ze zdecydowanej większości źródeł trudnych do tego rodzaju badań, dowodzi osiągnięcia sukcesu naukowego i tym samym przesądza o realizacji założonych celów badań. Zastosowane w badaniach nowe podejście do zagadnienia analizy starego DNA, umożliwi badanie w przyszłości różnych wartościowych historycznie i naukowo obiektów biologicznych bez obawy o ich trwałe uszkodzenie. Tak więc, uzyskane wyniki mają walory zarówno poznawcze jak i aplikacyjne.

Konkludując, stwierdzam że przedstawiona mi do oceny dysertacja spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie mgr Małgorzaty Katarzyny Bonar do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Barbara Kosowska