

Jastrzębiec, 19.06.2019

Prof. dr hab. Emilia Bagnicka
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
w Jastrzębcu

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Miszczak pt. „Opracowanie metod identyfikacji gatunkowej i osobniczej psów (*Canis familiaris*) w oparciu o analizę mtDNA oraz mikrosatelitarnego DNA”

wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Radko, prof. IZ PIB
w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym w Krakowie.

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z-cy Dyrektora ds. Nauki, dr hab. Piotra Wójcika, prof. IZ, z dnia 09 maja 2019 r. powołujące się na uchwałę Rady Naukowej Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie z dnia 22 listopada 2018 r. o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Miszczak.

Podstawowym celem przedłożonej pracy doktorskiej jest analiza markerów mikrosatelitarnych DNA, rekomendowanych przez ISAG w polskich populacji psów dziewięciu ras. Praca zawiera również aspekt aplikacyjny i dotyczy oceny przydatności badanego zestawu markerów do kontroli pochodzenia psów polskich populacji i ich identyfikacji osobniczej do wykorzystania m.in. w ekspertyzach sądowych.

Psy od 12 tysięcy lat towarzyszy człowiekowi w codziennym życiu, wykonując ciężką pracę dla człowieka. Przede wszystkim pomagały człowiekowi w polowaniach, pilnowały wypasanych stad zwierząt gospodarskich, czy stróżowały w obejściu. Obecnie psy postrzegane są przede wszystkim jako zwierzęta towarzyszące, jednak wiele z nich w dalszym ciągu wykorzystywane jest do pracy, chociażby jako ratownicy, przewodnicy, czy zwierzęta pociągowe, a wiele z nich jest niemalże etatowymi pracownikami służb mundurowych. Różnorodność oczekiwań człowieka w stosunku do tego gatunków zwierząt oraz zmienność środowiska ich utrzymania doprowadziła do powstania ponad 400 ras. Jak w hodowli każdego gatunku zwierzęcia udomowionego przez człowieka doskonalenie cech korzystnych z punktu widzenia hodowcy/właściciela jest celem hodowli. Podstawą pracy hodowlanej jest prawidłowa kontrola osobników, a kontrola pochodzenia umożliwia wykluczenie pomyłek, czy wręcz oszustw w zapisach. Jak i w innych gatunkach zwierząt początkowo również do kontroli pochodzenia psów wykorzystywano polimorfizm erytrocytarnych antygenów powierzchniowych i białek, co jednak nie zawsze umożliwiało

otrzymanie jednoznacznych wyników. Szybki rozwój metod genetyki molekularnej od lat osiemdziesiątych pozwolił na wykorzystanie w kontroli pochodzenia i identyfikacji osobniczej wysoce polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych, czyli krótkich, tandemowych powtórzeń (STR). Polimorfizm mikrosatelitarny wykorzystywany jest również do analizy poziomu bioróżnorodności w populacjach zwierząt i pozwala na takie planowanie kojarzeń, by zapobiec spadkowi zmienności genetycznej i nie dopuścić do nadmiernego wzrostu poziomu inbredu w populacji.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, licząca 86 strony, ma obecnie coraz częściej stosowany układ, tj. po streszczeniu w języku polskim i angielskim oraz wykazie skrótów, następuje rozdział „Wstęp”, będący przeglądem literatury, następnie Cel pracy, Materiał i metody, rozdział Wyniki i omówienie. Pracę kończą Wnioski i spis literatury. Ostatnią częścią dysertacji są materiały uzupełniające bez numeracji stron. Praca zawiera 15 rysunków i 24 tabele, przy czym numeracja tabel w głównej części pracy i Materiałach uzupełniających jest ciągła. Spis literatury zawiera 101 pozycji, w większości prac opublikowanych w renomowanych czasopiśmie o zasięgu światowym, z czego 31 powstała jeszcze w ubiegłym wieku, a najstarsza w 1908 roku. Wykorzystanie starszych prac jest uzasadnione rysem historycznym, jaki został nakreślony we wstępie pracy. Świadczy to o tym, że autorka dotarła do prac oryginalnych, nie ułatwiając sobie pracy powtarzaniem informacji historycznych za innymi autorami.

Kilkunastostronicowy wstęp podzielony został na pięć podrozdziałów, w których, po krótkim wprowadzeniu w zagadnienie, Doktorantka scharakteryzowała polimorfizm mikrosatelitarny oraz omówiła najczęstsze problemy występujące podczas procesu genotypowania i komputerowej analizy wyników. Następnie mgr M. Miszczak omówiła przydatność mitochondrialnego DNA do identyfikacji gatunków, w tym wykorzystanie w kryminalistyce. W rozdziale 1.3 Doktorantka omówiła metody statystyczne do oceny użyteczności polimorfizmów mikrosatelitarnych do badań zarówno struktury genetycznej populacji, jak i oceny zmienności genetycznej i identyfikacji osobniczej. Kolejny podrozdział Wstępu poświęcony został przypomnieniu historii wykorzystania markerów genetycznych do identyfikacji osobniczej, potwierdzenia pochodzenia, czy badania zafałszowań produktów zwierzęcych. Markery te znalazły również zastosowanie w hodowli psów. Autorka w podrozdziale tym wskazuje również na wykorzystanie markerów mikrosatelitarnych DNA przez organy ścigania i wymiar sprawiedliwości, w badaniach śladów biologicznych pozostawionych na miejscu przestępstwa, nie tylko ludzkich, ale i zwierzęcych, w tym psów jako

zwierzęcia towarzyszącego, albo ofierze, albo przestępcy. Oczywistym jest, że w sprawach kryminalnych wynik analiz nie może budzić wątpliwości, zatem każda metoda wykorzystywana w śledztwie musi być zwalidowana i muszą być wdrożone standardy wykonywania badań w zakresie oznaczania zwierzęcego DNA. Takie wytyczne wykorzystania DNA zwierząt do celów kryminalistyki zostały opracowane przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Genetyków Sądowych. Niezwykle istotnym aspektem jest ujednolicone nazewnictwo alleli. Do niedawna wykorzystywany był panel 18 markerów STR oraz *locus* amelogeniny, a obecnie ISAG rekomenduje wykorzystanie trzech dodatkowych markerów. Konieczna jest zatem walidacja rozszerzonego panelu markerów STR. W ostatnim podrozdziale Wstępu autorka omówiła parametry oceny zestawu markerów STR.

W kolejnym rozdziale autorka przedstawiła bardzo szczegółowo cele swej pracy. W pierwszym z nich wkraśl się błąd, gdyż, jak wynika z dalszej części pracy, autorka analizowała panel 18 markerów mikrosatelitarnych DNA u dziewięciu a nie pięciu ras psów, jak deklaruje w celu pracy. Podobny błąd popełniła też w rozdziale 4.1 przy omawianiu wyników polimorfizmu 18 markerów STR – tam podała, że analizowała próbki 612 osobników od siedmiu ras psów. Zwykle cele pracy poprzedzone są założoną hipotezą badawczą, jednak, niestety, Doktorantka nie podzieliła się z czytelnikami informacją co skłoniło ją do podjęcia tych analiz.

Rozdział Materiał i metody został podzielony na sześć głównych podrozdziałów. Trzy z nich (3.1, 3.3 i 3.6) podzielone są na kolejne podrozdziały, o identycznych tytułach, i które zawierają niemal identyczne informacje, dotyczące przede wszystkim metod izolacji, czy ilościowego oznaczania DNA i innych. Możliwa była nieco inna organizacja tego rozdziału, tak by uniknąć powtórzeń informacji lub odwołań w kolejnych częściach tego rozdziału do poprzednich podrozdziałów. W podrozdziale 3.5 autorka pisze, iż „Do identyfikacji gatunkowej wybrano sekwencje mtDNA rybosomalnego białka 12Sp specyficznego dla gatunku pies domowy”. Przyjmuję to za przejęzyczenie, gdyż jest to mitochondrialny gen 12S (a nie 12Sp – symbolem „p” w pracy Martina oznaczono prawdopodobnie, iż chodzi o sekwencje primera) kodujący cząsteczkę kwasu rybonukleinowego, wchodzącego w skład małej podjednostki rybosomów. Ten wysoce konserwatywny region, wraz z 6S rRNA, wchodzącego w skład dużej jednostki rybosomu, są powszechnie wykorzystywane w badaniach filogenetycznych.

Wyniki pracy zostały przedstawione i przedyskutowane w rozdziale „Wyniki i ich omówienie”, który jest podzielony na podrozdziały zgodnie z podziałem, przedstawianym w Materiałach i

metodach pracy. Otrzymane wyniki zaprezentowane są w formie czytelnych tabel i wykresów oraz omówione w tekście manuskryptu. Należy podkreślić, że jest to ich omówienie, ze zwróceniem uwagi czytelnika na najciekawsze rezultaty, a nie wyliczenie w tekście liczb przedstawionych w tabelach czy na wykresach. Ponadto, każda partia wyników opatrzona jest stosownym komentarzem autorki, wyjaśniającym omówione zjawisko. W wyniku tej części badań autorka wskazała 35 ze 196 analizowanych alleli, jako tzw. allele „prywatne”, czyli specyficzne dla danej rasy. Najwięcej alleli prywatnych znaleziono dla *locus* REN169O18, a w przypadku rasy dla owczarka niemieckiego i psów rasy golden retriever, zatem jak konkluduje Doktorantka, rasy te charakteryzują się najwyższym stopniem odrębności genetycznej. Na podstawie analizy wszystkich alleli ustalono dystans genetyczny między rasami, przedstawiony w tabeli 10, wykazując największy dystans między rasami golden retriever i labrador retriever. Jednak opis tabeli i tytuł tabeli są mylące – w tekście podano, iż tabela zawiera informacje na temat dystansu, natomiast tytuł tabeli mówi o podobieństwie genetycznym, a jak sama nazwa wskazuje są to przeciwstawne określenia, chociaż nierozzerwalnie ze sobą związane. Wyniki uzyskane przez autorkę potwierdziły dane o pochodzeniu ras.

Na stronie 55 znajduje się omówienie wskaźnika PD, czyli siły dyskryminacji dla poszczególnych alleli. Doktorantka powołuje się na dwie tabele – tabelę 12, w której ma być przedstawiona siła dyskryminacji dla poszczególnych markerów STR i tabelę 13, w której również miał być zestawiony ten współczynnik dla analizowanych markerów. Jednak w tabeli 12, umieszczonej na stronie 53 przedstawiono wprawdzie ten wskaźnik, wraz z wieloma innymi, ale dla ras, natomiast tabela 13 okazuje się być wykresem siły dyskryminacji dla analizowanych markerów.

Po analizie wszystkich parametrów statystycznych panelu 18 badanych markerów STR, autorka stwierdziła ich wysoką przydatność do identyfikacji osobniczej.

Kolejny podrozdział poświęcony był analizie walidacyjnej zestawu 21 markerów STR i *locus* amelogeniny przy wykorzystaniu materiału referencyjnego, pochodzącego z międzynarodowego testu porównawczego DNA (ISAG 2013/2014) oraz DNA trzech osobników rasy wilczarz irlandzki o znanym genotypie. ISAG obecnie zaleca rozszerzenie panelu o dodatkowe trzy markery, co powinno pozwolić na dokładniejsze analizy i wzrost siły dyskryminacji. Jednak wdrożenie nowych markerów do praktyki wymaga dokładnej analizy wielu parametrów. Analizy tej autorka dokonała w dwóch zestawach – 13-to i 9-cio markerowych. Ocenę przydatności panelu 21 markerów do identyfikacji osobniczej i weryfikacji przeprowadzono dla jednej rasy – wilczarz

irlandzki, uzasadniając wybór najniższymi wartościami analizowanych parametrów na panelu 18-markerowym. Czy jednak analiza przy wykorzystaniu przedstawicieli również innych ras nie dałaby bardziej wiarygodnej odpowiedzi?

W rozdziale 4.5, zatytułowanym „Profilowanie DNA dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości” doktorantka potwierdziła, że liczba wykorzystywanych markerów wpływa na pewność, że identyczne profile pochodzą od tego samego osobnika. Udowodniła, że panel 21 markerów STR daje niemal 100% pewności. Jednak zgodnie z definicją – im mniejsze jest prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności, tym większa jest szansa, że dwie próbki DNA pochodzą od tej samej osoby i tę definicję potwierdzają wyniki zaprezentowane w tym rozdziale. Natomiast autorka w podsumowaniu rozdziału stwierdziła, że *„Wysoki wynik prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności dla zestawu 21 markerów STR jednoznacznie sugeruje, iż proponowany przez ISAG zestaw daje blisko 100% pewność, że identyczne profile pochodzą od tego samego osobnika i z powodzeniem może być wykorzystywany do analiz dla celów sądowych.”*, co należy przyjąć za przejęczenie. Czy autorka miała na myśli prawdopodobieństwo wykluczenia?

Rozprawa doktorska zakończona jest rozdziałem „Wnioski” z 11 punktami, jednak ponieważ kilka z nich (1, 4, 6, 7) jest podsumowaniem wyników, rozdział należało zatytułować „Podsumowanie i wnioski”. Jak już podkreślałam, praca ma charakter zarówno poznawczy – dokonano analizy wielu parametrów w reprezentatywnych próbach z populacji dziewięciu ras psów utrzymywanych w Polsce, jak również aplikacyjny – wyniki tych badań mogą być wykorzystane w hodowli psów oraz kryminalistyce.

Reasumując, należy stwierdzić, że wykonane przez Doktorantkę obszerne i pracochłonne badania dostarczyły ciekawych i cennych wyników poznawczych oraz aplikacyjnych, zasługujących na pozytywną ocenę. Analizy zostały zaplanowane starannie, a metody dobrane prawidłowo. Analiza statystyczna wyników również została przeprowadzona poprawnie. Praca została napisana językiem poprawnym, bez używania wyrażen angielskich, czy kalki językowej, a przede wszystkim bez coraz powszechniejszych wpływów języka angielskiego na styl zdań (np. dominujący szyk przestawny, czy umiejscawianie czasownika na końcu zdania). Należy podkreślić wysoką, ogólną liczbę przebadanych osobników. Reprezentacja trzech ras była poniżej 50 i Doktorantka stwierdziła, iż mogło to zaważyć na frekwencji niektórych alleli. Rzeczywiście, w badaniach populacyjnych próba 50 osobników z populacji jest liczbą niewielką, jednak w badaniach z zakresu genetyki molekularnej jest to liczba wysoka. Jak Doktorantka ocenia losowość

wyboru próby z populacji? Czy badane zwierzęta były spokrewnione, co mogłoby wpłynąć na frekwencje alleli? Współczynniki inbrodu w obrębie wszystkich ras były bardzo niskie, co jednak jest często związane z brakiem danych rodowodowych, a nie z rzeczywistym brakiem zimbredowania. Czy rzeczywiście zwiększenie liczby osobników zmieniłoby frekwencję alleli?

W wyniku szczegółowej analizy rozprawy znalazłam jednak kilka nieścisłości i błędów, których autorka nie ustrzegła się przygotowując ostateczną wersję rozprawy, zatem jako recenzent zobowiązana byłam je przedstawić w formie uwag krytycznych. Większość z nich wskazałam przy omawianiu poszczególnych rozdziałów manuskryptu. Kilka uwag dotyczy całości pracy. Na przykład, Doktorantka nie ustrzegła się powtórzeń informacji z rozdziału „Wstęp”, czy „Materiał i metody” w rozdziale „Wyniki i ich omówienie”. Już sam główny rozdział „Wyników” zaczyna się od informacji przedstawionych we wstępie, a również każdy podrozdział rozpoczynany jest od informacji metodycznych. Ponadto, zasadą jest, że każda tabelka, czy wykres musi być tak dokładnie opisany i wszelkie skróty rozwinięte, aby czytelnik zrozumiał ich zawartość bez wgłębiania się w treść manuskryptu. Takiego dokładnego opisu zabrakło przy niektórych tabelkach, czy wykresach. Autorka nie ustrzegła się również błędów edytorskich. Jeden z nich dotyczy nazw ras, w tym psów, które w języku polskim piszemy małą literą, o ile w nazwie nie występuje nazwa własna, np. pies św. Huberta, czy pies pasterski z Bukowiny. Ponadto, zdań nie zaczyna się od liczb pisanych cyframi, a także wszelkie liczby poniżej 10 piszemy słownie.

Przy szczegółowej analizie piśmiennictwa znalazłam trzy potknięcia: brak w spisie literatury pozycji Van de Voorde, 2002, cytowanej w tekście oraz brak cytowania dwóch prac – 13. i 95., występujących w spisie literatury. Trzecia uwaga dotyczy cytowania pozycji 24 (trzech autorów) i 27 (pięciu autorów), obie z nazwiskiem Eichmann jako pierwszego autora i obie wydane w 2004 roku. W takim przypadku rok ich wydania powinien być oznaczony jako 2004a i 2004b.

Przedstawione uwagi krytyczne, mające w większości charakter dyskusyjny lub porządkowy nie umniejszają w żaden sposób wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej i nie mają wpływu na jej pozytywną ocenę.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Małgorzaty Miszczak pt. „Opracowanie metod identyfikacji gatunkowej i osobniczej psów (*Canis familiaris*) w oparciu o analizę mtDNA oraz mikrosatelitarnego DNA” wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Radko, prof. IZ PIB **odpowiada warunkom określonym** w Art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi

zmianami) oraz warunkom określonym w §6. Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym w Krakowie **wniosek o dopuszczenie mgr inż. Małgorzaty Miszczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jastrzębiec, 19 czerwca 2019 r.

