

Poznań, dnia 01.09.2016 r.

dr hab. n. med. Czesław Żaba
Kierownik Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Ocena
rozprawy doktorskiej
mgr Matyldy Czosnykowskiej-Łukackiej
na temat:
„IDENTYFIKACJA GENETYCZNA GRZYBÓW
HALUCYNOGENNYCH W BADANIACH SĄDOWYCH”
pod kierunkiem
prof. dr hab. Tadeusza Dobosza i dr. Marka Halamy

W codziennej praktyce medycyny sądowej, a zwłaszcza genetyce sądowej i kryminalistyce identyfikacja roślin i grzybów jest coraz częściej prowadzona. Jest to spowodowane m.in. nielegalnym handlem i rozpowszechnianiem zakazanych gatunków roślin, w tym zawierających substancje narkotyczne. Także identyfikacja gatunkowa roślin i grzybów zabezpieczonych na miejscu przestępstwa wymaga precyzyjnych i pewnych metod diagnostycznych. Wśród nich grzyby halucynogenne cieszą się szczególnym zainteresowaniem ze względu na dużą częstość występowania w Polsce, ich łatwy dostęp i niski koszt. Tradycyjna diagnostyka mikologiczna oparta na metodach oceny morfologicznej, hodowlanej i enzymatycznej aktywności jest niewystarczająca w przypadku grzybów o działaniu neurotropowym i toksycznym. Z punktu widzenia klinicznego, a także postępowania karnego prawidłowa identyfikacja taksonomiczna grzybów o działaniu neurotropowym ma istotne znaczenie.

Grzyby, to słabo poznana grupa, zarówno pod względem różnicowania gatunkowego, jak i wiedzy na temat sekwencji nukleotydowych taksonów już poznanych. W tym kontekście wykorzystanie badań genetycznych wydaje się atrakcyjną alternatywą dla analiz morfologicznych i toksykologicznych.

Z tego względu opracowanie swoistego testu do szybkiego i bezpośredniego wykrycia grzybów odurzających opartego na specyficzną detekcję regionu DNA jest interesującym eksperymentem, którego rezultaty będą miały praktyczne zastosowanie w laboratoriach genetyki sądowej. Dlatego podjęcie badań przez mgr Matyldę Czosnykowską-Łukacką mających za cel m.in. opracowanie specyficznego i szybkiego testu do bezpośredniego wykrycia grzybów zawierających substancje neurotropowe z wykorzystaniem

metod biologii molekularnej jest ambitnym i godnym podkreślenia zadaniem naukowym. Rozprawa doktorska mgr Matyldy Czosnykowskiej-Łukackiej szeroko przedstawia ww. aspekty.

Przedstawiona do oceny praca jest starannie oprawionym wydrukiem liczącym 92 karty. Układ pracy jest typowy z podziałem na rozdziały i podrozdziały. Praca składa się z części teoretycznej ze wstępem, założeń i celem pracy oraz części doświadczalnej składającej się z materiału i metod badań, wyników, dyskusji i wnioski oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

W pracy autorka zamieściła 112 pozycji piśmiennictwa, a ponadto 4 załączniki, 10 rycin, 16 tabel oraz wykaz skrótów.

Część teoretyczna do rozprawy jest 26 stronicowym rozdziałem omawiającym zagadnienia dotyczące aspektów grzybów o działaniu neurotropowym, a więc grzybów psylocybinowych o działaniu halucynogennym, grzybów o działaniu atropinopodobnym, identyfikacji grzybów neurotropowych wymieniając analizę morfologiczną, analizę toksykologiczną i analizę genetyczną. Doktorantka przedstawiła w nim także zagadnienia identyfikacji gatunkowej grzybów w aspekcie genetyki sądowej oraz regulacje prawne dotyczące postępowania z określonymi grzybami zawierającymi psylocybinę i psylocynę. We wstępie mgr Matylda Czosnykowska-Łukacka opisuje także historyczne aspekty związane z grzybami halucynogennymi. Wstęp pracy przemawia za bardzo dobrą znajomością tematu i doskonałym przygotowaniem merytorycznym. Rozdział jest ciekawie i starannie napisanym tekstem, zawierającym dużo istotnych informacji opartych na przeglądzie piśmiennictwa. W pracy są odniesienia do obszernych materiałów źródłowych dotyczących grzybów o działaniu neurotropowym. Tekst jest napisany profesjonalnym, a jednocześnie zrozumiałym językiem i stanowi doskonale wprowadzenie w dalsze części pracy.

Założenia i cele pracy zostały jasno sprecyzowane; szczegółowo i całościowo obejmują zagadnienia, które dotyczą przedstawionej rozprawy. Stanowią one logiczną kontynuację wstępu.

Celem pracy było: - opracowywanie testu opartego na technice multipleks PCR do szybkiej i bezpośredniej identyfikacji wybranych gatunków grzybów zawierających substancje narkotyczne (*Psilocybe semilanceata*, *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe subcubensis*, *Amanita muscaria*); - optymalizacja metody izolacji DNA z wybranych gatunków grzybów podstawkowych (*Basidiomycetes*), zarówno ze świeżych owocników, jak

i suszu grzybowego pochodzącego ze zbiorów zielnikowych herbarium; - analiza sekwencji wewnętrznych niekodujących regionów ITS rDNA oraz kodującej podjednostki 5.8: ITS1-5.8-ITS2 wybranych gatunków grzybów podstawkowych pod względem zgodności, obecności polimorfizmów i podobieństwa filogenetycznego oraz uzupełnienia baz danych (GenBank, Unite) o uzyskane sekwencje.

Realizacja tych zadań wymagała od Doktorantki przeprowadzenia badań laboratoryjnych. Materiałem do badań stanowił 45 próbek pozyskanych z owocników 26 gatunków grzybów podstawkowych należących do 6 gatunków. Dodatkowo badano DNA kolonii grzyba workowatego z rodzaju *Candida*.

Grzyby są trudnym materiałem do izolacji DNA ze względu na dużą ilość polisacharydów oraz inne związki metaboliczne, a metody izolacji DNA nie do końca dostarczają oczekiwane rezultaty. Autorka szczegółowo przedstawiła metodykę zastosowanych badań, w tym morfologię owocników, charakterystykę hodowli grzybów, jak i metody przygotowania właściwego substratu do ww. hodowli. Doktorantka opisuje w sposób bardzo obszerny metody do izolacji DNA, wykorzystując różne zestawy kolumnkowe oraz metody organiczne. W rozdziale tym zauważono, że Autorka wprowadziła szereg zmian w procedurach izolacji DNA. Wydaje się, że wskazane byłoby przeprowadzenie szczegółowej walidacji zastosowanych metod, przede wszystkim w obszarze metodyki, który został zmieniony.

Wyniki badań poddano rzetelnej weryfikacji i ocenie. Doktorantka uzyskała interesujące wyniki uwzględniające metody badań laboratoryjnych, które przedstawiła w formie opisu, tabel oraz zdjęć, które ułatwiają merytoryczną ich interpretację. Rezultatem przeprowadzonych badań jest opracowany test oparty na technice multipleks PCR do szybkiej identyfikacji grzybów zawierających substancje neurotropowe; opracowany proces izolacji DNA, który pozwala na uzyskanie materiału genetycznego nadającego się do bezpośrednich analiz z bardzo niewielkiej ilości materiału. Doktorantka uzyskała także szereg sekwencji nukleotydowych uznając je za specyficzne gatunkowo, które będą umieszczone w banku sekwencji GenBank, a kilka z nich zostanie zdeponowanych po raz pierwszy.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania poszerzyły wiedzę na temat bioróżnorodności grzybów, dostarczając nowych danych z zakresu genetyki grzybów.

Rozprawa kończy się dyskusją i wnioskami, które są sformułowane czytelnie i zrozumiale.

W dyskusji Doktorantka umiejętnie przedstawiła własne spostrzeżenia z poglądami innych autorów posługując się dużym, bo liczącym 112 pozycji piśmiennictwa, które jest aktualne i dobrze dobrane. W tym rozdziale bazując na przedstawionym piśmiennictwie oraz na uzyskanych wynikach badań własnych – Doktorantka analizuje pięć protokołów izolacji DNA z grzybów. Wszystkie protokoły dawały pozytywne rezultaty w przypadku świeżego materiału. Natomiast DNA wyizolowany ze zbiorów muzealnych jest mało trwały i z upływem czasu ulega stopniowej degradacji. Z uwagi na nietrwałość DNA należy niezwłocznie po izolacji przeprowadzić dalsze analizy molekularne, a zwłaszcza gdy otrzymano niskie stężenie DNA. W pracy dokonano analizy regionów ITS1-5.8-ITS2 pod względem zgodności, obecności polimorfizmów i podobieństwa filogenetycznego. Analiza porównawcza ww. sekwencji potwierdziła zgodność uzyskanych sekwencji z umieszczonymi sekwencjami w bazie GenBank na poziomie 97-98%. W bazie danych ciągle brakuje informacji z zakresu genetyki molekularnej grzybów podstawkowych.

Praca ma walory interdyscyplinarne, ponieważ poza aspektem genetyczno-sądowym, poprzez stworzenie swoistego testu do identyfikacji i opracowaniem metodyki, poszerza wiedzę na temat różnorodności grzybów, a także dostarcza nowych informacji z zakresu genetyki grzybów możliwych do wykorzystania w taksonomii grzybów.

W wnioskach Doktorantka podała, że wyizolowany materiał genetyczny należy poddać niezwłocznie dalszym analizom genetycznym z powodu możliwości degradacji lub na możliwość powstawania modyfikacji DNA podczas przechowywania. Opracowany test do identyfikacji grzybów zawierających związki neurotropowe uznano za specyficzny i wysoce czuły. Zaproponowany test oparty na technice multipleks PCR może być wykorzystany w praktyce genetycznych badań sądowych. Szereg sekwencji nukleotydowych uzyskanych z próbek grzybów zawierających związki neurotropowe uzupełnią bazę danych GenBank o brakujące dane odnośnie tych gatunków.

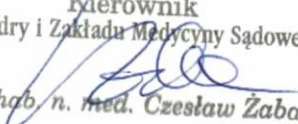
Podczas analizy tekstu nasuwają się drobne uwagi. W pracy występują błędy interpunkcyjne, zwłaszcza w rozdziale dyskusja. Mając na uwadze wartość merytoryczną pracy, którą można w przyszłości wykorzystać podczas wykonywania badań w dziedzinie genetyczno-sądowej, wskazane byłoby poszerzyć analizę o większą ilość próbek, a przede wszystkim przeprowadzić walidację wprowadzonych zmian w procedurach badawczych. Wskazane wyżej uwagi w żaden sposób nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej pracy.

Praca jest napisana przejrzysto, w sposób dojrzały i świadczy o dobrej znajomości zagadnienia oraz umiejętności ujęcia własnych badań w dyskusji z innymi badaczami. Doktorantka zachowała ostrożność i poczucie odpowiedzialności w formułowaniu końcowych ocen.

Reasumując stwierdzam, że opracowanie mgr Matyldy Czosnykowskiej-Łukackiej jest interesującym doniesieniem naukowym, posiadającym wartości poznawcze, a przede wszystkim walory praktyczne. Praca może przyczynić się do przybliżenia genetykom sądowym, lekarzom medycyny sądowej, ale także toksykologom i biologom, wielu zagadnień związanych z identyfikacją grzybów zawierających substancje odurzające.

Z satysfakcją stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Matyldy Czosnykowskiej-Łukackiej pt.: „IDENTYFIKACJA GENETYCZNA GRZYBÓW HALUCYNOGENNYCH W BADANIACH SĄDOWYCH” spełnia wymogi pracy doktorskiej i warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Zwracam się do Pani Dziekan i Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie mgr Matyldy Czosnykowskiej-Łukackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej

Dr hab. n. med. Czesław Żaba