



PRACOWNIA GENETYKI SĄDOWEJ
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Sędziowska 18a, 91-304 Łódź
tel. 0-42 654-53-88, fax 0-42 654-42-93
www.genetyka-sadowa.pl

Dr hab. n. med. Renata Jacewicz

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr MATYLDY CZOSNYKOWSKIEJ-ŁUKACKIEJ

**„Identyfikacja genetyczna grzybów halucynogennych
w badaniach sądowych”**

Przedłożona mi do oceny praca *mgr Matyldy Czosnykowskiej - Łukackiej* wykonana pod kierunkiem naukowym promotora *prof. dr hab. Tadeusza Dobosza* oraz promotora pomocniczego *dr Marka Halamy* została poddana ocenie pod kątem kolejnych, wymaganych kryteriów:

Ocena merytoryczna

Praca koncentruje się na temacie identyfikacji grzybów wytwarzających substancje psychotropowe o silnym oddziaływaniu na ośrodkowy układ nerwowy, które zagraża zdrowiu i życiu człowieka. Choć w Polsce zgodnie z *Ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii* posiadanie i handel grzybami w postaci preparatów zawierających psylocybinę i jej pochodne jest nielegalne, to jednak restrykcje nie obejmują handlu zarodnikami pozbawionymi tych substancji. Działanie narkotyczne bez przeszkód dostępnych grzybów neurotropowych może mieć też negatywne skutki społeczne związane z przejawami nasilonej przestępczości po ich spożyciu. Tym niemniej jest to rzadko poruszana problematyka badawcza. Prezentowane podejście do niej przez pryzmat identyfikacji genetycznej w aspekcie sądowym w Polsce jest podejściem oryginalnym. Opracowanie testów DNA do identyfikacji gatunkowej grzybów psychoaktywnych, jakie stawia sobie za cel autorka pracy, w oparciu o ich wcześniej przeprowadzoną prawidłową klasyfikację taksonomiczną, stanowi w ww. kontekście bardzo trafnie podjętą problematykę.

Autorka jasno i właściwie sformułowała na wstępie cele badawcze i wykazała się szeroką wiedzą w omawianiu istotnych aspektów związanych z tematem realizacji pracy. Niewątpliwie bardzo przydatny poza omówionymi zagadnieniami byłby rozdział wstępu opisujący teoretyczne aspekty związane z klasyfikacją grzybów w określone taksony czy klady. Stanowiłby on dobry punkt wyjścia do „przedstawienia” wszystkich analizowanych gatunków, nie tylko tych wykorzystanych do izolacji DNA i analizy PCR, ale również zaczerpniętych z zewnętrznych źródeł.

W kontekście braku wcześniejszego odniesienia się do zaczerpniętych z baz danych gatunków zarówno we *Wstępie*, jaki w *Materiałach i metodach*, dość zaskakujące jest pojawienie się zestawienia analizy ich sekwencji w *Aneksie* na końcu pracy oraz udział kilku z nich w zestawieniu filogenetycznym przedstawionym w części wynikowej.

Wyniki badań zostały zaprezentowane na 16 stronach, z czego 4 strony przypadają na analizę morfologiczną, 10 stron na analizę genetyczną, a 2 strony na analizę filogenetyczną. Zestawiają one zakresy przeprowadzanych analiz oraz dokumentują ich rezultaty. Dyskusja złożona z 7 stron nawiązuje do uzyskanych wyników w odniesieniu do rezultatów badań innych autorów.

Szeroko opracowane zostały wyniki badań uwzględniające pięć różnych metod izolacji, które zakończyły się konkluzją o największej przydatności jednego z testowanych protokołów. Jest to o tyle istotne, że izolacja DNA z grzybów zawierających wysoką zawartość polisacharydów stanowiła bardzo trudne zadanie badawcze. Skala trudności tego zadania była tym większa, iż ponad 90% izolacji wykonanych zostało z materiału zasuszonego.

Jak podają wiarygodne źródła, ok. 20 % sekwencji w królestwie grzybów nie posiada prawidłowej klasyfikacji taksonomicznej. Bardzo dobrze udokumentowana przynależność gatunkowa badanych grzybów to niewątpliwie niezwykle mocny element pracy *mgr Matyldy Czosnykowskiej - Łukackiej*. Na jej podstawie możliwe było prawidłowe przypisanie określonych sekwencji do właściwego gatunku, a tym samym „rzetelne” wzmocnienie istniejących baz danych sekwencji. Stanowiło to dodatkowy cel przeprowadzonych analiz genetycznych.

Głównym celem było natomiast opracowanie multipleksowego testu do szybkiego wykrycia grzybów zawierających substancje narkotyczne. Praca *mgr Matyldy Czosnykowskiej - Łukackiej* wniosła do tego istotny wkład. Autorka wykazała, iż skonstruowane startery są specyficzne dla badanych gatunków grzybów *Psilocybe* oraz dla muchomora czerwonego w obrębie gromady podstawczaków. Co ważne, nie interferują one z ludzkim DNA i nie dają produktów niespecyficznych z drożdżakami z gatunku *Candida*. W wynikach swych badań prezentuje trzy niezależne amplifikacje, każda z użyciem innej pary starterów, specyficznych dla jednego z trzech badanych gatunków grzybów neutropowych, jak również przeprowadzoną dla każdego gatunku amplifikację w oparciu o startery specyficzne dla badanej grupy taksonomicznej *Basidiomycetes*. Zabrakło jednak udokumentowania wyników opisaną w metodyce faktycznej multipleks PCR, tj. jednoczesnej amplifikacji trzech różnych matryc DNA pochodzących z trzech gatunków badanych grzybów w oparciu o zmieszane trzy pary odpowiednich starterów.

Analiza sekwencji umieszczonych na końcu pracy w kontekście planowanych badań wewnętrznego niekodującego regionu jądrowego DNA ITS1, ITS2 oraz kodującej podjednostki rybosomalnego DNA 5.8S jest zbyt ogólnikowo potraktowana zarówno w metodyce pracy, jak i dalszej jej części. Powiązanie jej z danymi sekwencyjnymi

wybranych gatunków grzybów pod względem komplementarności do wybranych dwóch par starterów specyficznych dla *Psilocybe semilanceata* i *Psilocybe subcubensis* (*cubensis*) za prezentowanych w *Aneksie* w *Tabelach II-V* wymaga zdecydowanie szerszego omówienia. Opisy starterów PSYL2F i PSY2R podane w tytułach *tabel IV i V Aneksu* nie zgadzają się z tymi, umieszczonymi wewnątrz tabel przy konkretnych sekwencjach. Zastrzeżenia budzi też niezbyt jasne zobrazowanie badanych sekwencji na *Rycinie 3*. Nie zaznaczono na niej regionów zewnętrznych jądrowego DNA: ETS1, ETS2 oraz podjednostek rybosomu 18S czy 28S, uwzględniono natomiast podjednostkę 5S, co nie znajduje odbicia w charakterystyce opisowej *ryciny 3* podanej na *str. 21*.

Dyskusja jest sprawnie, ciekawie przeprowadzona. Aczkolwiek niektóre sformułowania zaskakują. Przykładem jest zdanie na *str. 64*, którego sens trudno pojąć. „PCR w czasie rzeczywistym jest niewątpliwie bardziej czułą metodą niż klasyczny PCR, jednak w przypadku zastosowania tej metody w celu identyfikacji grzybów - nieuzasadniony, gdyż samo operowanie na sekwencjach ITS zwiększa znacznie czułość testu, ze względu na swoje liczne powtórzenia w genomie”.

Wnioski są poprawnie, czytelnie sformułowane. Brakuje jedynie w nich jasnej konkluzji, iż identyfikacja za pomocą starterów specyficznych dla gatunku *Psilocybe subcubensis* jest tożsama z identyfikacją *Psilocybe cubensis*. Zastanawiające jest w tym kontekście, czy istnieje możliwość genetycznego różnicowania tych dwu gatunków? A może jest to jeden i ten sam gatunek o dwóch nazwach? Takie wnioskowanie chwilami nasuwa się w toku analizy pracy. Kwestia ta wymaga przedyskutowania jako istotna w aspekcie prowadzonych badań.

Ocena metodologiczna

Analiza polimorfizmu DNA wykorzystywana w genetyce sądowej pozwala na identyfikację osób. Polimorfizm ten nie jest jednak unikalny dla gatunku *Homo sapiens*, a występuje powszechnie w całym świecie ożywionym. Identyfikacja określonych gatunków, zwierząt, roślin, grzybów czy bakterii może być bardzo istotna w analizach kryminalistycznych, jak choćby badania zmienności DNA konopi *Cannabis* – źródła marihuany. Założenia badawcze stawiające sobie za cel identyfikację wybranych gatunków grzybów halucynogennych w oparciu o prosty test multipleksowy były więc bardzo zasadne i zostały one poprawnie sformułowane.

Jak podaje autorka w podrozdziale *Materiał* na *str. 30*, podstawowy materiał do badań obejmował 45 prób z owocników grzybów *Basidiomycetes* oraz pojedynczą próbę grzyba z rodzaju *Candida*, czyli razem 46 prób. Nie bardzo zgadza się tutaj arytmetyka, bo *Aneksie* pracy w *Tabeli I* mającej zawierać pełną charakterystykę materiału wykorzystanego do badań liczba osobników wynosi 47. Rozbieżność tych danych wymaga wyjaśnienia.

W głównej mierze, bo aż 43 próby pochodziły z owocników wcześniej zasuszonych i zachowanych w zbiorach muzealnego Herbarium oraz z zebranych wcześniej świeżych owocników *Psilocybe semilanceata* i samodzielnie wyhodowanych *Psilocybe subcubensis*

bądź *cubensis*. Do analizy sekwencji i oceny filogenetycznej wykorzystano również inne gatunki zaczerpnięte z baz internetowych. Jak już wspomniałam w ocenie merytorycznej odnoszę wrażenie, że analiza sekwencji przeprowadzona z wykorzystaniem wsparcia zewnętrznego w oznaczeniach nie stanowi dostatecznie klarownie i czytelnie omówionego i zrealizowanego aspektu. Natomiast pozostałe procedury badawcze, które opierały się na bezpośrednim zaangażowaniu badawczym autorki zostały jasno opisane i zgodnie z tym opisem przeprowadzone. Zarówno izolacja i kolejne etapy badań genetycznych opierały się na dobrze zdefiniowanych metodach i technikach badawczych. Narzędzia badawcze zostały tutaj prawidłowo wykorzystane.

Do najciekawszych aspektów metodyki „przed genetycznej” należy opis prowadzonej przez autorkę i zakończonej sukcesem hodowli z zarodników grzyba *Psilocybe subcubensis* (*cubensis*). Kolejne jej etapy i efekty opisane są w sposób niezmiernie szczegółowy. Tak dokładny opis metody świadczy o dużej wiedzy teoretycznej i wysiłku badawczym, jaki włożyła autorka pracy celem uzyskania wzrostu tego gatunku grzyba halucynogennego. Pozostaje mieć nadzieję, że opis ten nie dostanie się w niepowołane ręce.

Bardzo ważnym metodycznie aspektem pracy była izolacja DNA z owocników grzybów. Szczególnie trudny element stanowił materiał suszony porównywalny do izolacji ze śladowej ilości materiału w genetyce sądowej. Izolację DNA autorka przeprowadzała w oparciu o pięć niezależnych protokołów badawczych, przy czym dwa bazowały na zestawach komercyjnych, a trzy opracowane były w oparciu o dane zawarte w literaturze z zastosowaniem własnych modyfikacji. Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie wniosków, co do konkretnej przydatności testowanych protokołów i wytypowanie takiego, który przyniósł największy odzysk DNA o najwyższej jego czystości.

Kolejne istotne etapy badań genetycznych przyniosły amplifikację w oparciu o uniwersalną parę starterów dla wszystkich podstawczaków oraz zaprojektowane w taki sposób trzy pary starterów, aby były specyficzne dla trzech różnych gatunków z tej gromady. Stanowiły je najbardziej rozpowszechnione i powszechnie dostępne w Polsce grzyby neurotropowe: Łysiczka lancetowata (*Psilocybe semilanceta*), *Psilocybe subcubensis* (*cubensis*) oraz trujący muchomor czerwony (*Amanita muscaria*). Opracowane reakcje PCR, każda specyficzna dla innego gatunku psychoaktywnego grzyba, dają podstawę do identyfikacji tych gatunków w aspekcie sądowym.

Bibliografia licząca 112 pozycji obejmuje pozycje literaturowe począwszy od roku 1958 (jedna pozycja jest nawet z XIX wieku), a kończąc na roku 2014. Szeroki przekrój czasowy *bibliografii* jest tu jak najbardziej uzasadniony i wskazuje na duży wysiłek przy penetrowaniu przez autorkę wszelkich dostępnych źródeł związanych z realizacją tematu pracy. Opis bibliograficzny pozycji jest dobrze wystandaryzowany i nie budzi zastrzeżeń.

Ocena formalna

Praca pod względem struktury formalnej jest starannie dopracowana. Układ rozprawy i struktura jej podziału jest prawidłowa z wyodrębnieniem: streszczenia, wstępu, założeń i celów, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków oraz piśmiennictwa. Liczy ona 92 strony i zawiera ryciny w liczbie 10 oraz tabele w liczbie 11 w tekście głównym plus dodatkowo 5 tabel tworzących *Aneks*, zawierający opis i charakterystykę materiału badawczego z podaniem miejsca zbioru i klasyfikacji taksonomicznej oraz analizę sekwencji wybranych gatunków odniesieniu do par *starterów PCUB i PSYL*. Przydatny jest również *Wykaz skrótów* umieszczony na początku pracy oraz *Spis tabel* i *Spis rycin*, umieszczone przy końcu pracy.

Autorka nie ustrzegła się w pracy niewielkich „niedoskonałości” językowych. Polegają one głównie na nadmiarze stawianych przecinków w zdaniu, jak na *str. 18, 19, 26, 31*; literówek, jak na *str. 42, 56, 60*; braku spacji, jak na *str. 38, 67, 68*; niepotrzebnych powtórzeń, jak na *str. 18, 68*. Odnotowano też błędy w nazwach łacińskich *Amanita musacia* zamiast *Amanita muscaria* na *str 41*, *Psilocybe subcubensis* zamiast *Psilocybe subcubensis* na *str. 54* oraz wspomnianą wcześniej omyłkę w tabelach *Aneksu* przy opisie starterów przedniego i wstecznego PSYL2.

Ocena końcowa

Ujawnione w toku analizy pracy „niedoskonałości” wymagają wprowadzenia korekty lub uzupełnienia przed ich dalszą publikacją. Nie wpływają jednak w sposób zasadniczy na dobry odbiór pracy. Autorka włożyła duży wkład w swoje badania, zarówno pod względem opanowania szerokiej wiedzy teoretycznej w przedmiocie klasyfikacji taksonomicznej, w zakresie metodyki badawczej dotyczącej hodowli i izolacji DNA z grzybów halucynogennych, jak również opracowania testów do identyfikacji określonych grzybów o działaniu neutropowym. Przeprowadzone badania wskazują na umiejętność właściwego postawienia hipotez oraz zaplanowania metod skutkujących realizacją wytyczonych celów badawczych.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określne w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595; z późn. zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie *mgr Matyldy Czosnykowskiej - Łukackiej* do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

KIEROWNIK
Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
dr hab. n. med. Renata Jacewicz