

**Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES**

Instytut Ekspertyz Sądowych  
im. prof. dra Jana Sehna  
w Krakowie

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Nowak pt.  
*Diagnostyka hiperglikemii post mortem i ocena jej znaczenia  
w opiniowaniu sądowo-lekarskim***

**Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej**

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Nowak dotyczy bardzo ważnej tematyki jaką jest diagnostyka cukrzycy na podstawie wyników badań laboratoryjnych materiału biologicznego pobranego pośmiertnie, pod kątem oceny jej znaczenia w opiniowaniu sądowo-lekarskim, w szczególności w celu określenia przyczyny zgonu.

W przypadku osób żywych rozpoznanie cukrzycy nie stwarza większych problemów; wykonuje się je poprzez przeprowadzenie odpowiednich oznaczeń glukozy w osoczu. Jest to możliwe również w przypadku analizy tzw. próbek przygodnych, tj. pobranych o dowolnej porze dnia, niezależnie od czasu, jaki upłynął od spożycia ostatniego posiłku, przy czym w takim przypadku – jak wskazała Autorka pracy za Polskim Towarzystwem Diabetologicznym – jednocześnie muszą wystąpić osłabienie, polidypsja czy poliuria, co nie jest możliwe do zweryfikowania w przypadku analizy materiału dotyczącego osób zmarłych. Co więcej, diagnostyka cukrzycy jest w takim przypadku znacznie utrudniona ze względu na fakt, że po śmierci dochodzi do obniżenia stężenia glukozy w wyniku procesu glikolizy beztlenowej zachodzącej w obumierających tkankach pacjenta oraz w wyniku jej rozkładu przez bakterie. Na pośmiertne stężenie glukozy mogą mieć także wpływ zabiegi resuscytacyjne podejmowane przed śmiercią, jak też przedśmiertny wyrzut endogennej adrenaliny zachodzący szczególnie intensywnie

w przypadku sytuacji silnie stresowych (np. podczas tonięcia), skutkujący znaczącym wzrostem stężenia glukozy.

Wskazane przyczyny powodują, że w przypadku konieczności ustalenia czy osoba była chora na cukrzycę przed śmiercią, a także na ile stężenie glukozy w jej krwi w chwili zgonu było podwyższone, konieczne jest zastosowanie dużo bardziej złożonych procedur diagnostycznych.

Diagnostyka hiperglikemii jest bardzo istotna, albowiem w ostatnich dziesięcioleciach gwałtownie rośnie liczba diabetyków i według prognoz organizacji międzynarodowych wzrost ten jeszcze przybierze na sile w kolejnych latach, szczególnie w krajach rozwijających się. Z tego też względu Organizacja Narodów Zjednoczonych określiła cukrzycę mianem epidemii XXI wieku. Cukrzyca uważana jest za chorobę cywilizacyjną. W 95% przypadków diagnozowana jest cukrzyca typu II, której występowanie uwarunkowane jest czynnikami ryzyka wynikającymi z niezdrowego stylu życia, jak nieprawidłowa dieta, brak aktywności fizycznej czy palenie tytoniu. Obecnie na cukrzycę choruje ponad 270 mln osób na całym świecie, w tym ponad 2,5 mln w Polsce. Szacuje się ponadto, że nawet 25 – 30 procent przypadków jest niezdiagnozowanych, tzn. osoby te nie są świadome swojej choroby. Zatem w kolejnych latach można spodziewać się coraz większej liczby przypadków przewlekłych i ostrych powikłań cukrzycy, które mogą prowadzić do śmierci. Diagnostyka hiperglikemii jest ważna również przy wielu innych zdarzeniach analizowanych przez medyków sądowych przy określaniu przyczyny zgonu, np. znaczące podwyższenie lub obniżenie poziomu glukozy może prowadzić do wystąpienia tzw. śpiączki cukrzycowej u kierującego, co może skutkować zaśnięciem za kierownicą i w konsekwencji doprowadzić do wypadku drogowego.

Rozpoznanie hiperglikemii i jej przyczynienia się do zgonu na podstawie zewnętrznych i wewnętrznych oględzin zwłok jest niemożliwe z uwagi na brak zmian mikro- i makroskopowych w większości przypadków i dlatego konieczne jest przeprowadzenie uzupełniających badań laboratoryjnych. Niestety, jak dotychczas nie wypracowano prostego schematu postępowania w przypadku podejrzenia śmierci na skutek hiperglikemii. Jak wskazano powyżej, ze względu na specyfikę materiału biologicznego pobieranego pośmiertnie i złożone procesy przemian zachodzących po śmierci w organizmie, wykonanie oznaczeń i interpretacja wyników badań są w tym

przypadku bardzo trudne. Autorka rozprawy doktorskiej podjęła się właśnie tego złożonego i ważnego zadania.

Celem badań zaplanowanych przez Autorkę było wyznaczenie stężeń wybranych markerów hiperglikemii w różnych materiałach biologicznych pobranych podczas sekcji zwłok, a także określenie korelacji między stężeniami różnych markerów oraz określonych markerów w różnych matrycach, co w konsekwencji miało prowadzić do opracowania rekomendacji dotyczących najbardziej miarodajnych markerów hiperglikemii możliwych do oznaczenia w diagnostyce pośmiertnej. Badaniami objęto zarówno markery krótkoterminowe, takie jak sama glukoza, mleczany, aceton, kwas  $\beta$ -hydroksymasłowy (BHB), 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG), jak i długoterminowe, takie jak glikowana albumina i glikowana hemoglobina (HbA1c). Oznaczenia prowadzono w krwi pełnej lub surowicy, moczu oraz płynie z gałki ocznej pobranych od zmarłych. Mając powyższe na uwadze należy uznać, że praca była kompleksowym podejściem do bardzo trudnej problematyki badawczej, mogącej mieć znaczenie dla szerokiego grona odbiorców na całym świecie.

### **Układ pracy i poruszane zagadnienia**

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi cykl dwóch spójnych tematycznie publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych o wysokim tzw. współczynniku oddziaływania (ang. *Impact Factor*), wynoszącym powyżej 3,0, tj.:

- [1] Nowak K., Zawadzki M., Jurek T. (2020) Postmortem determination of HbA1c and glycated albumin concentrations using the UHPLC-QqQ-MS/MS method for the purposes of medicolegal opinions. *Microchemical Journal*. 155: 104733,
- [2] Nowak K., Jurek T., Zawadzki M. (2020) Postmortem determination of short-term markers of hyperglycemia for the purposes of medicolegal opinions. *Diagnostics*. 10(4): 236.

Oba czasopisma znajdują się w aktualnym wykazie czasopism i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z przypisaną liczbą 70 punktów. Obie publikacje przedstawione przez Autorkę w rozprawie doktorskiej są pracami oryginalnymi.

W pracy [1] przedstawiono badania polegające na opracowaniu metod oznaczania glikowanej hemoglobiny (HbA1c) i glikowanej albuminy w materiale pośmiertnym techniką ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol (UHPLC-QqQ-MS/MS), przy czym w przypadku drugiego z wymienionych markerów długoterminowych hiperglikemii prace analityczne zakończyły się niepowodzeniem. Doktorantka przedstawiała wyniki badań dotyczących możliwości wykorzystywania pośmiertnych oznaczeń HbA1c w diagnostyce hiperglikemii *post mortem* w opiniowaniu sądowo-lekarskim przeprowadzone na grupie 100 osób (po 50 w grupie badawczej i kontrolnej). Wykazane statystycznie istotne różnice wskazują na użyteczność tego markera w diagnostyce zaburzeń glikemicznych, jakie miały miejsce w okresie około trzech miesięcy poprzedzających zgon.

W drugim artykule, opublikowanym w czasopiśmie *Diagnostics*, zaprezentowane zostały wyniki oznaczania glukozy, mleczanów, acetonu, kwasu  $\beta$ -hydroksymasłowego oraz 1,5-anhydroglucitolu w pośmiertnym materiale biologicznym pobranym od tej samej grupy osób oraz dokonana została ocena użyteczności tych markerów w diagnostyce pośmiertnej hiperglikemii. Autorka rozprawy wykazała, że w przypadkach zgonów w przebiegu hiperglikemii najbardziej użytecznym krótkoterminowym markerem jest 1,5-anhydroglucitol. Zwróciła również uwagę na wysoką korelację pomiędzy stężeniami tego markera w różnych materiałach biologicznych i dlatego z uwagi na możliwość hemolizy próbek surowicy zaproponowała równoległe wykonywanie oznaczeń w próbkach krwi pełnej i płynu z gałki ocznej. W pracy potwierdzono również użyteczność acetonu i kwasu  $\beta$ -hydroksymasłowego w diagnostyce hiperglikemii *post mortem*, przy czym wskazano na możliwość ich stosowania jedynie jako uzupełnienia innych badań, z uwagi brak specyficzności wzrostu stężeń w przebiegu cukrzycowej kwasicy ketonowej czy zaburzeń metabolicznych w przebiegu hiperglikemii.

Przedłożona do recenzji rozprawa liczyła łącznie 87 stron. Jej zasadniczym elementem były dwie wymienione wyżej publikacje. Poprzedzone one były streszczeniami w języku polskim i angielskim, z których każdy miał objętość 6 stron, a także wykazem prac naukowych wchodzących w skład cyklu. W dalszej części rozprawy Autorka zamieściła opis zagadnień poruszanych w pracach (2 strony), dyskusję (liczącą

13 stron), a także wnioski wynikające z badań objętych cyklem publikacji. Rozprawę uzupełniła kopia zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie recenzowanych badań oraz oświadczenia współautorów o zakresie ich udziału w powstaniu publikacji będących podstawą rozprawy. Doktorantka przedstawiła również całość swojego dorobku naukowego, listę wystąpień konferencyjnych, na których zaprezentowała referaty oraz przedstawiła plakaty. Warto zwrócić uwagę, że Doktorantka jest już współautorką ośmiu publikacji naukowych, z których aż sześć zamieszczono w czasopismach międzynarodowych posiadających współczynnik cytowań. Jedna z prac stanowiła rozdział w książce. Doktorantka przedstawiła wyniki swoich badań w postaci prawie 40 wystąpień konferencyjnych, z czego większość stanowiły referaty ustne i przedstawiano w nich tematykę badań zaprezentowaną również w ramach ocenianego cyklu prezentacji. Powyższe liczby świadczą o istotności tematyki poruszanej w rozprawie i zainteresowaniu wynikami badań osiągniętych przez Doktorantkę przez różne środowiska naukowe.

Rozprawa napisana jest w sposób bardzo staranny. Należy podkreślić dbałość Doktorantki o formę graficzną pracy oraz stosowane słownictwo. Autorka rozprawy posługuje się poprawną polszczyzną, swobodnie operując nią w złożonej tematyce naukowej. Jest to trudne, ponieważ do języka polskiego przenikają obce, głównie angielskie sformułowania, a dodatkowo wiele pojęć czy nazw technik pomiarowych nie doczekało się oficjalnych polskich odpowiedników. Dzięki temu pracę czytało się z przyjemnością i zainteresowaniem. Również treść streszczenia w języku angielskim oraz przede wszystkim treść publikacji stanowiących podstawę rozprawy świadczą o swobodnym operowaniu tym językiem przez Doktorantkę i znajomością słownictwa specjalistycznego.

### **Ocena metod badawczych, sposobu przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników**

Recenzowana praca miała charakter eksperymentalny. W mojej ocenie badania zostały zaplanowane we właściwy sposób, a dobór analitów, rodzaju eksperymentów

oraz aparatury badawczej, jak również sposób przeprowadzenia badań oraz interpretacja uzyskanych wyników były odpowiednie.

Dla celów badawczych utworzone zostały dwie grupy: badana, obejmująca 50 osób (8 kobiet, 42 mężczyzn) z rozpoznaną zażyciowo cukrzycą, oraz kontrolna, złożona również z 50 osób, o takiej samej liczebności kobiet i mężczyzn, które zmarły śmiercią gwałtowną, nie zachodziło u nich podejrzenie o zgon na skutek zaburzeń glikemicznych, nie zostały poddane resuscytacji, a także uzyskano dla nich negatywne wyniki analiz toksykologicznych w kierunku obecności alkoholu etylowego w analizowanych płynach ustrojowych. Pewną niedoskonałością doboru grupy kontrolnej jest istotna statystycznie różnica w średnim wieku osób z tej grupy w odniesieniu do grupy badanej (42 lata w grupie kontrolnej i 60 lat w grupie badanej, przy odchyleniu standardowym wynoszącym 16 lat). Obie grupy różniły się również statystycznie pod względem średniego czasu, jaki upłynął od zgonu lub ujawnienia zwłok do przeprowadzenia sekcji zwłok; w przypadku grupy badanej było to średnio 7 dni, a dla grupy kontrolnej – 5,3 dnia. Jest to o tyle istotne, że poziomy stężenie niektórych markerów ulegają zmianie i ta różnica stanowi dodatkowy czynnik utrudniający interpretację. Stwierdzone przez Doktorantkę różnice nie deprecjonują oczywiście uzyskanych wyników.

Doktorantka w swoich badaniach wykorzystwała szereg metod analitycznych, z których wiele to metody zaawansowane, wymagające specjalistycznej wiedzy i umiejętności od osób ich wykorzystujących. Glukozę i mleczany w trzech różnych płynach ustrojowych Doktorantka oznaczała metodami enzymatycznymi, za pomocą analizatora biochemicznego. Aceton oraz alkohol etylowy (w krwi, moczu oraz płynie z gałki ocznej) zostały oznaczone za pomocą chromatografii gazowej z wykorzystaniem analizy fazy nadpowierzchniowej, wykonując analizy na dwóch kolumnach chromatograficznych i z dwoma detektorami płomieniowo-jonizacyjnymi (metoda *headspace* GC-FID). Kwas  $\beta$ -hydroksymasłowy (BHB) został również oznaczony w krwi, moczu oraz płynie z gałki ocznej, przy czym do analiz Doktorantka użyła chromatografu gazowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol (GC-QqQ-MS). Z kolei 1,5-anhydroglucitol w trzech różnych płynach ustrojowych i glikowana hemoglobina we krwi były badane za pomocą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol (LC-QqQ-MS). Wreszcie, do oznaczania glikowanej hemoglobiny w materiale

pośmiertnym Doktorantka zastosowała inny ultrawysokosprawny chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol (UHPLC-QqQ-MS/MS). Użycie tak różnorodnej aparatury badawczej, dopasowywanej w zależności od rodzaju analitu, świadczy o wysokim poziomie wiedzy i umiejętnościach analitycznych Doktorantki.

Analiza publikacji wchodzących w skład cyklu wskazuje jednoznacznie, że doboru metod badawczych dokonywano właściwie do zamierzonego celu. Doktorantka większość procedur analitycznych opracowała od podstaw i poddała je procesowi walidacji, zanim przystąpiła do badań właściwych. Stosowała się w tym zakresie do wytycznych międzynarodowych towarzystw naukowych i standardów dotyczących jakości badań.

Bardzo interesującym aspektem poruszonym w pierwszej z prac była próba optymalizacji warunków prowadzenia procesów z dbałością o środowisko naturalne, zgodnie z regułami tzw. zielonej chemii. I choć Doktorantka uznała w pracy, że zamierzonego celu nie udało jej się w tym zakresie zrealizować, bo w wielu elementach nie było możliwe wyeliminowanie czy znaczące ograniczenie czynników negatywnie wpływających na środowisko, to uważam, że była w tym zakresie zbyt krytyczna wobec podjętych działań. Podejście przedstawione w pracy przez Doktorantkę zasługuje na pochwałę i rozpowszechnienie wśród analityków wykonujących badania z zakresu toksykologii sądowej.

Analizy statystyczne Doktorantka wykonywała posługując się pakietem IBM SPSS Statistics 25. Dla zmiennych ilościowych podano podstawowe statystyki (średnią, odchylenie standardowe, medianę, minimum, maksimum, kwartył dolny oraz górny), w celu sprawdzenia czy porównywane grupy były równoliczne oraz do zbadania zależności między zmiennymi nominalnymi zastosowano test chi-kwadrat, do sprawdzenia czy istnieją istotne statystycznie różnice pomiędzy dwoma niezależnymi grupami wykonano analizy testem t-Studenta, a do oceny czy występuje istotny statystycznie związek między zmiennymi wykonano analizę korelacji Spearmana. Dobór metod statystycznych należy uznać za prawidłowy, przy czym w mojej ocenie do analizy uzyskanych danych możliwe było również użycie innych metod (o czym poniżej).

Wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Nowak oceniam jako bardzo dobrą. Niezależnie od tej oceny, poniżej przedstawiłem kilka komentarzy do

treści pracy, do których Doktorantka może się odnieść podczas publicznej obrony pracy, względnie wykorzystać w dalszych pracach nad badanym zagadnieniem.

W zakresie uwag szczegółowych, mam wątpliwości dlaczego przy przedstawianiu danych procentowych dotyczących liczby przypadków (np. diagram 1 w pracy [1]) uzyskiwano ułamkowe wartości (np. 26,5%), gdy liczebność grupy badanej i kontrolnej liczyła po 50 osób (gdyby wszystkie wyniki były uwzględniane, każda osoba stanowiłaby 2% całości grupy).

Dla wielu zmiennych Doktorantka uzyskała wyniki poniżej dolnej granicy oznaczalności (LLOQ) lub powyżej górnej granicy oznaczalności (ULOQ) i w konsekwencji do dalszych analiz statystycznych użyła wyłącznie danych mieszczących się między tymi wartościami. Choć takie podejście można uznać za prawidłowe, to wydaje się, że uwzględnienie wszystkich wyników (przy zastosowaniu jednego z kilku możliwych podejść stosowanych w analizie danych) mogłoby dostarczyć dodatkowych informacji. Dla przykładu, stężenia glikowanej hemoglobiny były poniżej LLOQ dla 2,0% przypadków z grupy badanej i 26,5% z grupy kontrolnej. W konsekwencji przy obliczaniu średniej Doktorantka nie uwzględniła prawdopodobnie wyniku 1 osoby z grupy badanej i aż około 13 osób z grupy kontrolnej. Wydaje się, że mając na uwadze cel pracy polegający na porównaniu wartości zmiennych w dwóch niezależnych grupach (badana, kontrolna) kluczowa jest analiza rozkładu tych zmiennych, względnie weryfikowanie hipotezy o równości median dla obu grup (z uwzględnieniem wszystkich danych). W mojej ocenie realne różnice między stężeniami HbA1c w grupie badanej i grupie kontrolnej był większe niż wskazane w tabeli 9 w pracy [1], a szczegółowa analiza danych uzyskanych przez Doktorantkę mogła by pozwolić na zaproponowanie wartości granicznej (odcinka) wskazującej na hiperglikemię. Analogiczne uwagi można przedstawić dla porównania stężeń 1,5-anhydroglucitolu w różnych płynach ustrojowych (tabela 8 w pracy [2]).

Ponadto, Doktorantka w dyskusji do wyników badań przedstawianych w pracy [2] omówiła szczegółowo wartości odcinka dla stężeń BHB w płynie z gałki ocznej dla stanów patologicznych (a także fizjologicznych i podwyższonych) zaproponowane przez innych badaczy. Z uwagi na małą liczbę wyników słusznie nie podjęła próby dokonania podziału wyników własnych na grupy. Jednak wydaje się, że warto byłoby porównać uzyskane wyniki do wartości zaproponowanych przez innych autorów, np. poprzez policzenie takich parametrów jak czułość czy specyficzność. Do oceny Doktorantki pozostawiam też



możliwość wykonania do wyżej poruszonych zagadnień tzw. analizy krzywej charakterystyki operacyjnej odbiornika (ROC — *Receiver operating characteristic*), która jest użytecznym narzędziem oceny dokładności predykcji modelu poprzez wykreślenie czułości wobec (1-swoistości) testu klasyfikacyjnego (przy progu zmieniającym się w całym zakresie wyników testu diagnostycznego).

## **Podsumowanie**

Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pani mgr Karolina Nowak posiada dużą wiedzę na temat diagnostyki hipolikiemii, bardzo dobry warsztat analityczny, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić badania z wykorzystaniem nowoczesnej, zaawansowanej aparatury oraz zinterpretować uzyskane wyniki. W sposób właściwy odniosła wyniki badań własnych do danych literaturowych, krytycznie podchodząc do własnych odkryć i wykazując należytą ostrożność w wyciąganiu wniosków. Uwagę zwraca szeroki wachlarz metod przygotowania próbek wykorzystany przez Doktorantkę, umiejętność doboru aparatury badawczej, optymalizacji warunków prowadzenia procesów i dociekliwy sposób analizowania uzyskanych wyników.

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Nowak zawiera wiele elementów nowości, z których najważniejsze wydaje się opracowanie metody oznaczania hemoglobiny glikowanej we krwi i ocena możliwości jej wykorzystania jako podstawowego narzędzia do retrospektywnej oceny zaburzeń glikemicznych. Ważnym elementem jest też opracowanie metod oznaczania krótkoterminowych markerów hiperglikemii w tanatodiagnostyce i wykazanie, że najbardziej użytecznym z nich jest 1,5-anhydroglucitol, którego poziom powinien być ustalany w dwóch materiałach biologicznych, tj. krwi pełnej i płynie z gałki ocznej.

## **Wnioski**

**Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Nowak stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.).**

**Jednocześnie, biorąc pod uwagę poziom naukowy rozprawy doktorskiej, znaczenie problematyki podjętych badań i ich aspekt aplikacyjny, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Nowak.**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Dan Włoczek', is centered on the page.

Kraków, dnia 11 września 2020 roku