

**KATEDRA I ZAKŁAD MEDYCyny SĄDOWEJ WYDZIAŁU
LEKARSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W LUBLINIE**

**Pracownia Toksykologii Sądowej
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
Tel.: +48 448-64-70; Fax: +48 448-64-71**

Lublin, 10 września 2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Nowak

**pt.: „Diagnostyka hiperglikemii *post mortem* i ocena jej znaczenia
w opiniowaniu sądowo-lekarskim”**

**wykonanej pod kierunkiem
promotora: dr hab. n. med., mgr prawa Tomasza Jurka, prof. nadzw.
oraz
promotora pomocniczego: dr. n. med., mgr chemii Marcina Zawadzkiego**

**w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Wydziału Lekarskiego
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**

Przedłożona do recenzji praca doktorska porusza aktualny problem pośmiertnej diagnostyki hiperglikemii dla potrzeb sądowych.

W praktyce medyczno-sądowej sądowej dość często spotykane są przypadki podejrzenia śmierci gwałtownej na skutek hiperglikemii. Jej rozpoznanie nie jest jednak możliwe wyłącznie w oparciu o wyniki oględzin i sekcji zwłok oraz wyniki badań histopatologicznych, gdyż nie powoduje zmian strukturalnych uchwytnych makro- lub mikroskopowo. W tego typu diagnostyce zgonów czynnościowych i stanów niezwiązanych z uchwytnymi makro- lub mikroskopowo zmianami strukturalnymi swą użyteczność wykazują jednak markery biochemiczne. Z wyżej wymienionych powodów badania nad pośmiertnymi markerami biochemicznymi są intensywnie prowadzone w wielu laboratoriach powiązanych z medycyną sądową. Problematyka podjęta przez doktorantkę niewątpliwie wpisuje się w ten nurt. W swojej pracy doktorskiej mgr Karolina Nowak uzyskała przy tym szereg ciekawych i oryginalnych rezultatów dotyczących przydatności do celów medyczno-sądowych znanych z diagnostyki klinicznej najważniejszych markerów hiperglikemii.

Znajdujący się w kręgu zainteresowania doktorantki obszar badań pośmiertnych określany jest ogólnym mianem diagnostyki nekrochemicznej. Wywodzi się wprost z diagnostyki klinicznej i niejednokrotnie korzysta z tych samych metod analitycznych. Bazowanie na tych samych metodach stwarza jednak nieuniknione problemy interpretacyjne z uwagi na liczne czynniki wpływające na poziom oraz stabilność badanych markerów biochemicznych, jak np. uwalnianie produktów pośmiertnej degradacji komórek, interferencje procesów agonalnych i podejmowanych działań resuscytacyjnych, pośmiertna redystrybucja markerów, stopień pośmiertnej hemolizy krwi i możliwość uzyskania czystej surowicy oraz sposób i czas przechowywania próbki do momentu przeprowadzenia analizy. Bardzo ważna jest więc wstępna ocena ograniczeń przydatności danego markera do diagnostyki pośmiertnej oraz właściwy dobór metod analitycznych. Dlatego autorka w swojej rozprawie dokonała wstępnej selekcji przypadków, a zastosowane metody poddała ocenie pod względem przydatności w opiniowaniu medyczno-sądowym. Ponadto oceniła wpływ czasu od chwili zgonu do momentu zabezpieczenia próbki.

Markery nekrochemiczne, niezależnie od zastosowanej metody, wykazują się różną specyficznością - tzw. siłą dowodową, dlatego do oceny ich korelacji należy stosować możliwie szeroki panel markerów tanatochemicznych. Kandydatka dokonała zatem oceny całego wachlarza markerów hiperglikemii znanych z diagnostyki klinicznej, długoterminowych: glikowanej hemoglobiny i glikowanej albuminy oraz krótkoterminowych: glukozy, mleczanów, acetonu, kwasu β -hydroksymasłowego i 1,5-anhydroglucitolu. Jest to oryginalny wkład autorki, gdyż jak dotąd opublikowane badania pośmiertne w tej samej grupie badanej i kontrolnej wykonywano w kierunku co najwyżej kilku markerów i to w jednym lub dwóch mediach badawczych.

Laboratoryjna diagnostyka nekrochemiczna jest relatywnie młodym, dynamicznie rozwijającym się działem medycyny sądowej. Ponadto postęp w technikach analitycznych znacznie wyprzedza wdrażanie do rutynowej praktyki odkrywanych zależności między określonym stanem patologicznym a danym markerem. Dlatego kluczowa dla oceny przydatności nowych markerów dla celów medyczno-sądowych jest ich weryfikacja w oparciu o nowoczesną aparaturę analitycznej. Użyte przez Autorkę metody należy uznać za nowoczesne, zwłaszcza technikę ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzęgniętej z tandemową spektrometrią mas typu potrójny liniowy kwadrupol, uznawaną za referencyjną w badaniach pośmiertnych.

Diagnostykę nekrochemiczną cechuje jedna, podstawowa przewaga nad diagnostyką kliniczną - możliwość wykorzystania całego wachlarza alternatywnych środowisk badawczych

oprócz standardowo wykorzystywanej krwi lub surowicy i moczu, np. ciała szklistego gałek ocznych. Mgr Karolina Nowak markery hiperglikemii oceniła wykorzystując ten potencjał, gdyż przebadła ich stężenia zarówno we krwi i moczu, jak i w ciele szklistym oka.

Wyniki uzyskane w ramach dysertacji zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, były także prezentowane podczas zjazdu naukowego. Świadczy to o trafności i aktualności podjętej problematyki, a także o dużym zaangażowaniu doktorantki w prace badawcze.

Mając na uwadze powyższe fakty, jak również dotychczasowy dorobek publikacyjny w dziedzinie toksykologii, dokonując wyboru tematu dysertacji autorka rozprawy aktywnie włączyła się w główny nurt działalności naukowej medyków i toksykologów sądowych. W ocenie wartości podjętego tematu badawczego, przedłożoną rozprawę doktorską należy uznać za aktualną i niosącą duży potencjał zarówno naukowy, jak i praktyczny w zakresie działalności eksperckiej dla potrzeb sądowych.

Dysertacja ma formę jednotematycznego cyklu składającego się z dwóch prac naukowych. Pierwsza ukazała się w *Microchemical Journal* (IF=3,594, pkt MNiSW/KBN = 70) drugi artykuł został opublikowany w *Diagnostics* (IF=3,110, pkt MNiSW/KBN = 70). W obu artykułach doktorantka jest pierwszym autorem. W załączonej dokumentacji znajdują się oświadczenia wszystkich autorów, z których wynika, iż wkład mgr Karoliny Nowak w powstanie tych prac był dominujący. Przedstawiony cykl spełnia więc formalne wymogi ustawy o stopniach i tytułach naukowych.

Pomijając niezbędne załączniki, zasadniczą część rozprawy autorka podzieliła na kilka części: streszczenie, teksty obu publikacji, opis zagadnienia, dyskusja oraz wnioski. Pierwsza część, zatytułowana „Streszczenie” oprócz skrótowego opisu dysertacji już stanowi swego rodzaju wprowadzenie do cyklu prac, zaś szersze tło problemów ujętych w dysertacji autorka nakreśliła w rozdziale „Opis zagadnienia”, które umieściła po cyklu prac. W obu tych rozdziałach uzasadnia swoją motywację do podjęcia tematu pośmiertnej diagnostyki hiperglikemii w kontekście ustalania przyczyny zgonu dla potrzeb prokuratorskich, prezentuje założenia i cele prac oraz skrótowo przedstawia uzyskane wyniki badań. Z lektury obu rozdziałów wynika, że podstawowe cele pracy doktorskiej obejmowały:

- Wdrożenie metod umożliwiających oznaczanie glikowanej hemoglobiny i glikowanej albuminy w materiale pośmiertnym techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas typu potrójny liniowy kwadrułpol.

- Wyznaczenie granicznych stężeń w grupie kontrolnej oraz badanej we krwi pełnej lub surowicy, moczu i płynie z gałki ocznej dla ocenianych krótko- i długoterminowych markerów

hipoglikemii, tj. glukozy, mleczanów, acetonu, kwasu β -hydroksymasłowego, 1,5-anhydroglucitolu, glikowanej albuminy i glikowanej hemoglobiny.

- Wykazanie różnic między grupą badaną i kontrolną.
- Ocenę wartości diagnostycznej danych markerów i ich przydatności w opiniowaniu sądowo-lekarskim dotyczącym ustalania przyczyny zgonu w przebiegu cukrzycy.
- Ocenę korelacji pomiędzy stężeniami tego samego markera w różnych matrycach biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem płynu z gałki ocznej, oraz wzajemnych korelacji pomiędzy markerami.

Osiągnięcie powyższych celów cząstkowych stanowiło podstawę do opracowania głównego celu dysertacji, jakim jest rekomendacja dla najbardziej użytecznych dowodowo markerów hiperglikemii w sądowo-lekarskiej diagnostyce pośmiertnej.

Powyższe cele należy uznać za ambitne i wymagające dużego nakładu pracy.

Chociaż forma dysertacji oparta o cykl publikacji naukowych raczej nie zachęca do przygotowania szerszego wprowadzenia do podjętej problematyki, to jednak autorka zadbała o to, by praca doktorska posiadała także pewne walory dydaktyczne, istotne dla czytelników niezaznajomionych z prezentowaną tematyką.

Druga część rozprawy to już zasadnicza część doktoratu, którą stanowi w pełni komplementarne zestawienie dwóch publikacji naukowych zawierające oryginalne wyniki badań przeprowadzonych samodzielnie przez doktorantkę. Należy podkreślić, że obie prace ukazały się w ważnych dla analityki biochemicznej czasopismach naukowych i zostały już poddane wnikliwemu procesowi recenzowania. Poza tym, mimo iż w chwili sporządzania recenzji zostały opublikowane odpowiednio 6 oraz 4 miesiące wcześniej, to pierwsza z nich zgodnie z bazą Google Scholar już została zacytowana przez niepowiązanego autora. Obie publikacje zostały zauważone przez środowisko naukowe, co przekłada się chociażby na rezultaty użycia wyszukiwarki w portalu *ResearchGate* – międzynarodowym, bezpłatnym serwisie społecznościowym, skierowanym do naukowców wszystkich dyscyplin, wykazującym po kilkadziesiąt czytań (tzw. *reads*), co przekłada się na ponad 70% poziom zainteresowania w porównaniu z innymi publikacjami w tej dziedzinie w tym samym okresie czasu. Dlatego też szczegółowe omówienie kompletnych treści publikacji zasadniczo mija się z celem, gdyż omówienie celów prac oraz najważniejszych wyników autorka przedstawiła w rozdziale „Dyskusja”, który daje dobre rozeznanie o zawartości każdej publikacji. Natomiast celowe jest skupienie się na najciekawszych aspektach obu prac.

Pierwsza praca pod tytułem „*Postmortem determination of HbA1c and glycated albumin concentrations using the UHPLC-QqQ-MS/MS method for the purposes of*

medicolegal opinions” dotyczy badań nad markerami długoterminowymi: glikowanej hemoglobiny oraz glikowanej albuminy. Autorka postawiła sobie za cel wdrożenie metod umożliwiających oznaczanie ich w materiale pośmiertnym uznawaną za referencyjną, separacyjną techniką ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol. Następnie, za pomocą zwalidowanych metod zaplanowała przebadanie grup kontrolnych i badanych. Uzyskane wyniki poddała wnikliwej ocenie statystycznej. Separacyjne techniki sprzężone są szczególnie wskazane w medyczno-sądowych badaniach pośmiertnych, gdyż zapewniają odpowiedni poziom pewności dowodowej uzyskanego wyniku. Z powodzeniem udało się doktorantce opracować metodę oznaczania glikowanej hemoglobiny i z jej pomocą wykonać pełny cykl badań. Wykonała przy tym jej kompletną walidację, a nawet przeprowadziła wielokierunkową ocenę GAPI - wpływu procedury na środowisko. Podkreślić należy, że w medycynie sądowej raczej „nie idzie się na kompromisy”, gdyż nadrzędne znaczenie ma dowód. Dlatego praktycznie każda metoda badania materiału biologicznego oparta na technikach separacyjnych będzie „czerwona” wg GAPI - czyli istotnie wpływająca na środowisko, gdyż generuje toksyczne odpady i jest czasowo- oraz energochłonna. Mimo to autorka stawia przed sobą ambitny cel na przyszłość poprawienia metody oznaczania glikowanej hemoglobiny pod względem przyjazności dla środowiska, m.in. przez skrócenie czasu - co przy konieczności enzymatycznej hydrolizy hemoglobiny wydaje się zadaniem bardzo trudnym, oraz przez użycie mniej toksycznych odczynników, co także nie będzie łatwe. Na szczególne podkreślenie zasługuje ocena stabilności tego markera od chwili zgonu do momentu zabezpieczenia próbki, co w badaniach pośmiertnych ma istotne znaczenie. Opracowanie i wdrożenie metody oznaczania glikowanej albuminy natomiast, niestety nie powiodło się. Tzw. piki ilościowe z przejść MRM uznanych za specyficzne dla peptydu pochodzącego z hydrolizatu glikowanej albuminy miały podobną wielkość pola powierzchni zarówno w próbie „blank” jak i we wszystkich punktach kalibracji. Autorka uznała, że może być to efekt kontaminacji lub nieskutecznej hydrolizy. Poprawienie i wdrożenie tej metody zasługuje jednak na realizację przez autorkę w przyszłości, gdyż jak dotąd brak odpowiedniej dla celów medyczno-sądowych specyficznej metody oznaczania drugiego (po glikowanej hemoglobinie) markera długotrwałej hiperglikemii. Należy więc mieć nadzieję, że podczas obrony doktorantka złoży deklarację kontynuowania pracy w tym kierunku.

W drugiej publikacji pod tytułem „*Postmortem Determination of Short-Term Markers of Hyperglycemia for the Purposes of Medicolegal Opinions*” autorka przyjęła podobny schemat postępowania, czyli na tak samo (jak w pierwszej publikacji) w wyselekcjonowanych

grupach kontrolnej i badanej dokonała oceny przydatności markerów krótkoterminowych: glukozy, mleczanu, acetonu, kwasu β -hydroksymasłowego i 1,5-anhydroglucitolu. W porównaniu do pierwszej publikacji można było natomiast dodatkowo ocenić markery krótkoterminowe w mediach badawczych innych niż krew, z czego skorzystała kandydatka badając dodatkowo mocz oraz ciało szkliste oka. Badania wykazały, że średnie stężenie glukozy w surowicy w grupie kontrolnej było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z grupą badaną, natomiast odwrotną relację stwierdzono w moczu oraz płynie z gałki ocznej. W przypadku mleczanów nie zaobserwowała natomiast istotnych statystycznie różnic między grupami. Jednak w efekcie kompleksowych badań zaobserwowała występowanie dodatnich i ujemnych korelacji pomiędzy stężeniami glukozy i mleczanów oraz korelacji stężenia glukozy z innymi markerami, zarówno w grupie badanej i kontrolnej. Także i w tej publikacji na podkreślenie zasługuje przeprowadzenie oceny wpływu PMI - czasu od śmierci do pobrania próbki na poziomy glukozy, mleczanu, 1,5-anhydroglucitolu i kwasu β -hydroksymasłowego. Pod względem stabilności zdecydowanie najlepiej wypadł 1,5-anhydroglucitol w każdym rodzaju badanego materiału pośmiertnego. Autorka m.in. potwierdziła spodziewany wpływ PMI na poziom mleczanu, gdyż po śmierci dochodzi do konwersji glukozy do mleczanu. Jednak zaznaczyła, że oznaczenia glukozy i mleczanów w materiale pośmiertnym wykonała metodami enzymatycznymi - spektrofotometrycznymi, które nie pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników i być może użycie bardziej specyficznej metodyki przyniosłoby pozytywne wnioski z tych badań. W dyskusji autorka doszła do słusznej konkluzji, że suma tych wątpliwości podważa użyteczność zarówno glukozy jak i mleczanu w pośmiertnej diagnostyce hiperglikemii, co także potwierdzają wcześniejsze doniesienia literaturowe. Nasuwa się tutaj jednak pytanie, czy mimo problemów analitycznych, uzyskane wyniki oznaczeń glukozy i mleczanu nie można byłoby dodatkowo ocenić statystycznie, jako sumę stężeń obu markerów, lub wykorzystać wzór Trauba do stworzenia nowej grupy wyników. Autorka wspomina o takiej możliwości w swojej publikacji, jako o: „*combined values of glucose and lactate*” (za Karlovsek oraz Zilg et al.). Biorąc pod uwagę to, że glukoza i mleczan traktowane z osobna mają wątpliwą wagę jako marker hiperglikemii, to być może uwzględnienie sumy stężeń glukozy i „skonwertowanego” mleczanu przyniosłoby bardziej konkretne, użyteczne diagnostycznie wnioski. Należy jednak nadmienić, że powyższa kwestia to jedynie wątek do ewentualnej dyskusji podczas obrony dysertacji. Szczególnie istotnym dokonaniem są obiecujące wyniki badań nad 1,5-anhydroglucitolem, jako krótkoterminowym markerem glikemii. Autorka wykazała, że średnie stężenie 1,5-anhydroglucitolu we krwi pełnej, surowicy i płynie z gałki ocznej było istotnie statystycznie niższe w grupie badanej oraz

stwierdziła występowanie silnych zależności między stężeniami w tych matrycach biologicznych. Mimo zastosowania wysoce selektywnej metody sprzężonej LC-MS/MS z analizą MRM zaobserwowano występowanie w próbkach moczu endogennych substancji interferujących z 1,5-anhydroglucitolem i na etapie wdrażania autorka uznała, że metoda nie jest wystarczająco specyficzna i dlatego odstąpiła od wykonywania analiz w tej matrycy. Tego rodzaju informacje o braku powodzenia na określonym etapie badań zwykle nie są publikowane, ale niekiedy są interesujące dla analityków - chociażby dla uniknięcia tzw. ślepej uliczki w postępowaniu diagnostycznym.

Autorka, jako ograniczenia przeprowadzonych badań przedstawiła niewystarczające niektóre informacje dotyczące zmarłych, w części przypadków nie był możliwy do zebrania pełen komplet materiałów biologicznych, niejednorodność materiałów biologicznych oraz stosunkowo nieliczne, liczące po 50 przypadków, grupy badane i kontrolne. Są to jednak typowe dla medycyny sądowej ograniczenia wynikające z niemożliwej do uniknięcia przypadkowości w zbieraniu materiału badawczego w określonych, z reguły ograniczonych ramach czasowych.

Dyskusja została przeprowadzona kompetentnie i zwięźle w oparciu o własne wyniki pracy badawczej oraz bardzo dobrą znajomość piśmiennictwa naukowego. Ponadto uzupełniła ją o dodatkowe, aktualne piśmiennictwo naukowe.

W rozdziale „Wnioski” mgr Karolina Nowak zawarła 6 najważniejszych tez będących efektem analizy zgromadzonych wyników badań, które w pełni odpowiadają założonym celom pracy.

Na końcu, oprócz wymaganych zgód i oświadczeń, w formie dodatków doktorantka podała pełen spis swoich publikacji oraz wystąpień konferencyjnych i plakatowych.

Zwraca uwagę staranna strona edytorska, podczas lektury rozprawy nie napotkano żadnych, wartych wzmianki błędów pisarskich i językowych.

W trakcie lektury publikacji będących podstawą dysertacji dostrzeżono jedynie dwa drobne mankamenty, które umknęły uwadze podczas redagowania tekstu, jednak nie wpływają one na ogólną, pozytywną ocenę:

- W publikacji pierwszej w tabeli 4 nagłówki kilku kolumn przesunięto o jedno miejsce w lewo.

- W drugiej publikacji, w metodyce oznaczania acetonu techniką *headspace* podano objętość nastrzyku zaledwie 1μl, co w tej technice jest niespotykane, zwykle objętości te są znacznie większe - być może jest to jedynie błąd pisarski i chodziło o 1 ml fazy nadpowierzchniowej.

W podsumowaniu należy podkreślić, że zamierzone cele Doktorantka osiągnęła z powodzeniem, publikacje, na których oparła dysertację stanowią znaczącą pozycję naukową, a przedłożoną do oceny rozprawę cechują niewątpliwie wysokie walory poznawcze, praktyczne i edukacyjne. Wszystko to składa się na wysoką ocenę dysertacji.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie mgr Karoliny Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a w przypadku pomyślnego przebiegu obrony doktorskiej skłaniam się ku wnioskowi o wyróżnienie - zgodnie z procedurą obowiązująca w macierzystej Uczelni.



Lublin, 10-09-2020r.

Dr hab. n. med. Grzegorz Buszewicz