

**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 Marty Zacharczuk

**pt.: „Ocena przydatności szpiku kostnego jako alternatywnego materiału
biologicznego w badaniach toksykologicznych i 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**

Tematyka przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mieści w głównym nurcie badań w zakresie toksykologii sądowej, gdyż dotyczy pośmiertnej diagnostyki zatruc w jej najtrudniejszym aspekcie, gdy dochodzi do gnilnej dekompozycji zwłok. W takich przypadkach rozpoznanie zatrucia bardzo utrudnia brak nadającej się do badań płynnej krwi, która jest podstawowym materiałem badawczym. Dla krwi ustalono bowiem zakresy stężeń ksenobiotyków oceniane jako terapeutyczne, toksyczne lub prowadzące do śmiertelnej śpiączki. Dlatego w diagnostyce toksykologicznej zwłok, które uległy znacznemu rozkładowi, np. szczątków pochodzących z ekshumacji szczególnego znaczenia nabierają materiały tzw. alternatywne, w których stężenie ksenobiotyków jest proporcjonalne do stężenia we krwi. Najlepszym tego przykładem w tzw. alkoholologii sądowej jest ciało szkliste oka, które dawniej traktowano jako materiał alternatywny, a obecnie, z biegiem lat stało się standardowym

materiałem badawczym. Badania nad dystrybucją ksenobiotyków, w kontekście badań pośmiertnych są więc prowadzone w wielu laboratoriach powiązanych z medycyną sądową.

Problematyka podjęta przez doktorantkę niewątpliwie wpisuje się w ten nurt badań i jest jak najbardziej aktualna. Ponadto, znajdujący się w kręgu zainteresowania doktorantki obszar badań pośmiertnych odpowiada potrzebom diagnostycznym, gdyż wynika z oczekiwań medyków sądowych oraz organów stosowania prawa, ma więc istotny, praktyczny aspekt.

W swojej pracy doktorskiej mgr Marta Zacharczuk zdołała uzyskać wyniki świadczące o wysokiej przydatności do celów medyczno-sądowych szpiku kostnego - materiału badawczego jak dotąd słabo rozpoznanego pod kątem toksykologicznym. Autorka wykorzystwała przy tym dostępny w badaniach medyczno-sądowych potencjał alternatywnych środowisk badawczych, gdyż oprócz ocenianego szpiku kostnego i standardowo wykorzystywanej krwi przebadła stężenia ksenobiotyków także w cieple szklistym oka.

W pośmiertnej diagnostyce toksykologicznej kluczowe znaczenie ma zastosowanie odpowiednich metod analitycznych, charakteryzujących się wysoką czułością i minimalizujących wpływ matrycy. 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.

Wyniki uzyskane w ramach dysertacji zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, część z nich doktorantka zaprezentowała podczas konferencji toksykologów sądowych. Wskazuje to na skoncentrowaniu się mgr Marty Zacharczuk na podjętej problematyce.

Mając na uwadze powyższe fakty, 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 trzech prac naukowych. Pierwsza, opublikowana w języku polskim (4 pkt Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego) ukazała się w zbiorze monografii pod wspólnym tytułem „*Nowoczesne trendy w medycynie*”. Drugi artykuł ukazał się w *Journal of Forensic and Legal Medicine* (IF=1,302, Punkty MNiSW = 100,0), zaś trzeci artykuł został opublikowany w *Journal of Analytical Toxicology* (IF=3,513, Punkty MNiSW = 70,0). We wszystkich

artykułach doktorantka jest pierwszym autorem i figuruje pod nazwiskiem rodzonym Iskierka. W załączeniu znajdują się oświadczenia wszystkich współautorów, z których wynika, iż wkład mgr Marty Zacharczuk w powstanie tych prac był dominujący oraz wszyscy wyrazili zgodę na wykorzystanie publikacji na potrzebę kontynuacji przewodu doktorskiego. Przedstawiony cykl spełnia więc formalne wymogi ustawy o stopniach i tytułach naukowych.

Rozprawę autorka podzieliła na streszczenie, wprowadzenie, teksty publikacji, dyskusję oraz wnioski. Streszczenie z wyróżnionymi akapitami zatytułowanymi wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki oraz wnioski jest zarazem przewodnikiem po dysertacji.

Podejmując badania a następnie scalając ich wyniki w postaci dysertacji, autorka postawiła sobie 4 zasadnicze cele:

- Ocenę przydatności szpiku kostnego w toksykologii sądowej i opiniowaniu sądowo-lekarskim.
- Weryfikację korelacji pomiędzy wynikami krew versus szpik kostny.
- Ustalenie wartości dowodu z badań toksykologicznych szpiku kostnego.
- Ocenę możliwości wykorzystania wyników w formułowaniu opinii sądowo-lekarskich dotyczących okoliczności i przyczyny zgonu.

Powyższe cele należy uznać za ambitne, o dużej wartości praktycznej, wymagające sporego nakładu pracy i zaangażowania znacznych środków. Było to możliwe m.in. dzięki przyznanemu na ten cel grantowi naukowemu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego – Diamentowy Grant.

Drugą, zasadniczą część rozprawy stanowi komplementarne zestawienie trzech publikacji naukowych, z których pierwsza ma charakter poglądowy, zaś dwie następne zawierają oryginalne wyniki badań przeprowadzonych samodzielnie przez doktorantkę. Obie prace badawcze ukazały się w ważnych dla toksykologii sądowej, wysoko punktowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i zostały poddane wnikliwemu procesowi recenzowania. Cele prac i omówienie wyników autorka przedstawiła w rozdziałach „Streszczenie” oraz „Dyskusja”. Ich lektura daje dobre rozeznanie o zawartości publikacji, dlatego celowe jest skupienie się jedynie na najbardziej istotnych aspektach załączonych prac.

Pierwsza praca chronologicznie najwcześniejsza o charakterze poglądowym pod tytułem: „*Rutynowe i alternatywne materiały biologiczne w toksykologii sądowej*” wskazuje na to, że doktorantka tematem dysertacji zainteresowała się dość wcześnie i konsekwentnie rozwijała zakres badań. W pracy tej omówiła szerokie tło zastosowania tzw. klasycznych i alternatywnych materiałów badawczych do celów toksykologii sądowo-lekarskiej, w tym

omówiła rolę i zadania toksykologii sądowej, wskazała na istotną rolę fazy przed-analitycznej oraz oceniła perspektywy rozwoju diagnostyki pośmiertnej opartej na badaniach materiałów alternatywnych, takich jak: szpik kostny, płyn osierdziowy, maź stawowa, włosy i paznokcie, tkanka mięśniowa i tłuszczowa oraz smółka. Lektura tej publikacji stanowi dobry wstęp do wyników badań, które zaprezentowała w kolejnych pracach.

Druga praca, i zarazem pierwsza z badawczych, pod tytułem „*Comparison of post-mortem ethanol level in blood and bone marrow*” dotyczy oceny korelacji stężenia etanolu we krwi i szpiku kostnym w grupie 100 osób zmarłych nagle z podejrzeniem intoksykacji. Mając na uwadze to, że szpik kostny wraz z wiekiem ulega przemianom, doktorantka podzieliła grupę badawczą na 5 przedziałów wiekowych. Do badań zastosowała zwalidowaną dla celów dowodowych technikę analizy fazy nadpowierzchniowej, która spełnia surowe wymogi diagnostyki toksykologiczno-sądowej. Autorka potwierdziła bardzo wysoką korelację stężenia etanolu między krwią a szpikiem kostnym. Nowością było wykazanie, iż wielkość współczynnika korelacji jest nieznacznie większa u mężczyzn i nieco wzrasta wraz z wiekiem, oraz to, że wielkość współczynnika korelacji statystycznie istotnie wzrasta dla stężeń powyżej 2 promili. Zdaniem autorki wskazuje to na ciągle niewyjaśnione aspekty toksokinetyki etanolu w szpiku kostnym.

W trzeciej publikacji pt. „*Detection of drugs in postmortem specimens of blood, vitreous humor and bone marrow aspirate.*” autorka w wyselekcjonowanej grupie badanej liczącej 120 osób zmarłych nagle z podejrzeniem intoksykacji dokonała oceny korelacji stężeń leków i narkotyków w szpiku kostnym oraz tzw. materiale rutynowym. W porównaniu do pierwszej publikacji dodatkowo oceniła korelacją wykrytych ksenobiotyków w cieple szklistym oka. Niezaprzeczalnym osiągnięciem kandydatki w tej pracy było dokonanie oceny dla wielu, ponad 40 wykrytych ksenobiotyków, wśród których aż 21 udało się wykryć w liczbach przypadków wystarczających do dokonania oceny statystycznej. Na podkreślenie zasługuje dwuetapowa metodyka z użyciem tego samego spektrometru typu potrójny liniowy kwadrupol. Spektrometry z tego rodzaju analizatorami mas są predystynowane raczej do analiz wcelowanych - ilościowych niż wielokierunkowych - przesiewowych. Jednak autorce udało się z powodzeniem wdrożyć i w pełni zwalidować do badań szpiku kostnego metodykę skryningu aż 277 ksenobiotyków w jednej procedurze. Mogła więc objąć praktycznie całą listę leków i narkotyków najczęściej spotykanych w praktyce medyczno-sądowej. Drugi etap badań, to wysoko-specyficzna analiza ilościowa wykrytych ksenobiotyków w oparciu o reakcje MRM. Badania wykazały, że dla większości z 21 substancji, które wykryto w liczbie co najmniej 3 przypadków istnieje silna korelacja między stężeniami w szpiku kostnym a krwią jak również

między stężeniami w szpiku kostnym a ciałem szklistym oka. Kandydatka potwierdziła ustalenia innych autorów, że związki z grupy benzodwuzepin korelują bardzo słabo między szpikiem kostnym a krwią, ale nowością było to, że dla diazepam i 7-aminoklonazepamu wykazała silną korelację między szpikiem a ciałem szklistym oka. Zdaniem Autorki może to wynikać z kumulacji tych związków w szpiku kostnym, lecz prawdopodobna wydaje się także jedynie wolniejsza redystrybucja tych substancji ze szpiku do krwi w fazie postabsorpcyjnej, co prowadzi do retencji ksenobiotyków w szpiku.

Wyniki uzyskane dla substancji wykrytych w pojedynczych przypadkach, dla których nie było możliwe określenie korelacji między badanymi matrycami biologicznymi zestawiono w osobnej tabeli, która niesie informacje potencjalnie istotne dla późniejszych badań.

W dyskusji mgr Marta Zacharczuk podkreśliła przydatność szpiku kostnego, jako materiału biologicznego w badaniach toksykologicznych dla celów medyczno-sądowych, zwłaszcza, gdy nie jest dostępny „rutynowy” materiał biologiczny, np. podczas badań zwłok pochodzących z ekshumacji. Wykazała, że talerz kości biodrowej jest dobrym źródłem szpiku przeznaczonego do badań toksykologicznych. Jako ograniczenia przydatności diagnostycznej szpiku kostnego w ocenie obecności alkoholu w organizmie wskazała na niedostateczną korelację z krwią przy jego stężeniach poniżej 1 promila, natomiast leki i narkotyki wymagają dalszych badań, które rozszerzą listę ksenobiotyków oraz pozwolą na bardziej kategoryczną ocenę stężeń pod kątem medyczno-sądowym.

Dyskusja zarówno w opublikowanych pracach, jak i w przedłożonej dysertacji została przeprowadzona kompetentnie i zwięźle w oparciu o własne wyniki pracy badawczej oraz dobrą znajomość piśmiennictwa naukowego. W dysertacji autorka uzupełniła ją o dodatkowe, aktualne pozycje.

W rozdziale „Wnioski” mgr Marta Zacharczuk zawarła 7 najważniejszych tez będących efektem analizy zgromadzonych wyników badań, które w pełni odpowiadają założonym celom pracy.

Oceniając merytoryczną część dysertacji należy wziąć pod uwagę także to, iż prace toksykologiczne o charakterze badawczym nad obecnością ksenobiotyków w szpiku kostnym ciągle są stosunkowo nieliczne, mimo, iż pierwszą z nich opublikowano już przeszło 30 lat temu. Dotyczy to zwłaszcza ksenobiotyków innych niż etanol, w większości są to jedynie raporty z przypadków, które nie pozwalają na ocenę korelacji. Badania przeprowadzone przez mgr Martę Zacharczuk należy więc traktować, jako w znacznym zakresie pionierskie.

Zwraca uwagę zwięzły charakter dysertacji oraz staranna strona edytorska. Podczas lektury rozprawy nie napotkano istotnych, wartych wzmianki błędów pisarskich i językowych.

W trakcie lektury publikacji będących podstawą dysertacji dostrzeżono jedynie dwa drobne mankamenty, które jednak nie wpływają na ogólną, pozytywną ocenę:

W pracy trzeciej, w drugim zdaniu rozdziału „*Results*” autorka odnotowała, iż stężenia ksenobiotyków określono także w moczu, którego jednak nie ujęto w tytule, materiałach, zestawieniu wyników i dyskusji. Ta sama pomyłka wkradła się w dyskusji dotyczącej etanolu na k. 41 oraz na k. 44 i we wniosku trzecim na k. 45. Jednak nie można tego traktować jako błąd, a jedynie przeoczenie, także przez recenzentów publikacji, gdyż cel pracy nie obejmował tego materiału.

Drugi mankament, na k. 41, to zamiana numeru piśmiennictwa przy cytowaniu jednego z autorów.

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 i praktyczne. Wszystko to składa się na pozytywną 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 Marty Zacharczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Lublin, 12-05-2020r.

Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Buszewicz