



Kraków 08.04.2021

**Dr hab. Renata Wietecha-Posłuszny, Prof. UJ**  
Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

## **Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Marty Zacharczuk pt.**

Wydział Chemii

*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.  
Uczelni oraz  
promotora pomocniczego: dr n. med., mgr chemii Marcina  
Zawadzkiego  
w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej i Wydziału Lekarskiego  
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

### **Charakterystyka i znaczne podjętej problematyki badawczej**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marty Zacharczuk dotyczy bardzo istotnego zagadnienia z punktu widzenia badań toksykologiczno-sądowych. Analiza alternatywnego materiału biologicznego jest często wykorzystywana w sprawach gdzie dostęp do klasycznych materiałów jest zdecydowanie utrudniony. Jedną z największych trudności dotyczących wykonywania laboratoryjnych badań *post-mortem* jest przede wszystkim jakość materiału biologicznego z jakim mamy do czynienia. Z uwagi na różny stan przemian pośmiertnych, możliwą fragmentację ciała czy też jego zeszkieletowanie pobranie próbek do badań laboratoryjnych, zwłaszcza klasycznych materiałów może okazać się trudne lub niemożliwe. Celem dochodzenia medyczno-sądowego jest między innymi ocena tego czy zmarły

ul. Gronostajowa 2  
30-387 Kraków  
tel. +48 12 686 26 00  
fax +48 12 686 27 50  
sekretar@chemia.uj.edu.pl  
www.chemia.uj.edu.pl



w chwili śmierci znajdował się pod wpływem ksenobiotyku, a jeśli tak to czy mógł on stanowić przyczynę jego zgonu lub wpływać na zaistniałe okoliczności śmierci.

Należy podkreślić, że jedną z istotniejszych kwestii jest rzetelna interpretacja uzyskanych wyników analitycznych. Wymaga ona uwzględnienia między innymi interferencji, możliwości endogennych przemian danego związku oraz błędów tzw. fazy przedanalitycznej, ściśle związanej np. z etapem zabezpieczania i pobierania materiału biologicznego do badania. Niewątpliwie, jednym z kluczowych elementów warunkujących wiarygodny wynik badania toksykologicznego jest właściwe pobranie tak zwanej próbki reprezentatywnej materiału biologicznego. Zgodnie z rekomendacją Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii (PTMSiK) do badań toksykologicznych *ante mortem* wykorzystuje się rutynowo m.in. krew i mocz, natomiast to badań toksykologicznych *post mortem* pobierane są następujące materiały biologiczne: krew, mocz, żółć i ciało szkliste oka. Wszystkie tkanki biologiczne i płyny ustrojowe są uważane za skomplikowaną matrycę i należą do grupy w której wykrywanie oraz oznaczanie analitów jest utrudnione i wymaga tzw. narzędzi analitycznych w postaci zróżnicowanych m.in. technik ekstrakcyjnych i separacyjnych. Fakt obecności bogatej matrycy w tego typu materiałach tj. związki nieorganiczne i organiczne, np.: białka, sole, kwasy i zasady itp. Skutkuje skomplikowanymi i czasochłonnymi przygotowaniem do analizy materiału biologicznego, a szczególności alternatywnego na obecność kluczowych ksenobiotyków.

Celem badań zaplanowanych przez Doktorantkę była kompleksowa ocena przydatności materiału alternatywnego jakim jest szpik kostny w toksykologii sądowej i opiniowaniu sądowo-lekarskim, weryfikacja korelacji pomiędzy wynikami krew versus szpik kostny. Ponadto, ustalenie wartości dowodu z badań toksykologicznych szpiku kostnego oraz ocena możliwości wykorzystania wyników w formułowaniu opinii sądowo-lekarskich dotyczących okoliczności i przyczyny zgonu. Badania Autorka objęła grupę 120 przypadków, w przypadku których w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu przeprowadzono sądowo –

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



lekarską sekcję zwłok. Przyjęte kryterium włączenia do niniejszego badania było uzasadnione podejrzeniem zatrucia ksenobiotykiem oraz możliwość pobrania aspiratu szpiku kostnego i przynajmniej jednego rutynowego materiału biologicznego. Podjęte badania obejmowały analizę najistotniejszych i najtrudniejszych w analizie toksykologiczno-sądowej materiałów biologicznych stąd należy uznać, że praca była kompleksowym podejściem do bardzo trudnego zagadnienia, które niewątpliwie ma znaczenie dla reprezentowanej dziedziny oraz szerokiego grona naukowców na całym świecie.

### Układ pracy i poruszane zagadnienia

Podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Zacharczuk stanowi cykl trzech spójnych tematycznie publikacji naukowych opublikowanych m.in. w czasopismach naukowych charakteryzujących się istotnym współczynnikiem oddziaływania (ang. *Impact Factor*) oraz należą do cennych czasopism z zakresu medycyny sądowej.

1. Iskierka M., Loska O., (2015) Rutynowe i alternatywne materiały biologiczne w toksykologii sądowej. W: Olszówka M., Maciąg K. (red) Nowoczesne trendy w medycynie. Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, Lublin, s.240-254.
2. Iskierka M., Zawadzki M., Szpot P., Jurek T. (2019) Comparison of post-mortem ethanol level in blood and bone marrow. *J Forensic Legal Med.* 61:65-68.
3. Iskierka M., Zawadzki M., Szpot P., Jurek T. (2020) Detection of drugs in postmortem specimens of blood, vitreous humor and bone marrow aspirate. *J Anal Toxicol.* bkaa083, <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa083>

Wymienione wyżej czasopisma znajdują się w tzw. wykazie czasopism i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministerstwa



Nauki i Szkolnictwa Wyższego z łącznie przypisaną liczbą punktów MNiSW: 174,0. Ponadto łącznym IF: 4,815, co niewątpliwie świadczy o bardzo dobrym dorobku naukowym Doktorantki. Wszystkie załączone przez Autorkę publikacje, przedstawione w rozprawie doktorskiej są pracami oryginalnymi oraz opatrzone stosownymi oświadczeniami od współautorów zaświadczających wiodący udział Doktorantki w badaniach i opracowaniu wyników w postaci publikacji naukowych.

Praca została również zrealizowana w ramach Diamentowego Grantu przyznanego Pani mgr Marty Zacharczuk, co jest bardzo dużym wyróżnieniem dla jej osoby i pracy badawczej.

W pierwszej pracy [1] Doktorantka - Pani mgr Marta Zacharczuk przedstawiła wnikliwy przegląd literaturowy zatytułowany „Rutynowe i alternatywne materiały biologiczne w toksykologii sądowej”, który stanowi bardzo obszerny opis i charakterystykę stosowanych materiałów biologicznych w analizach toksykologiczno-sądowych. Bardzo interesującym rozdziałem jest rozdział dotyczący preanalitycznych czynności jakim materiał biologiczny jest zwykle poddawany, etap ten jest również istotny z punktu widzenia całego procesu analitycznego, bowiem ok. 60% błędów popełnianych przy np. zabezpieczaniu materiału, przechowywaniu, transportowi oraz stanu w jakim się ten materiał znajduje np. stopień odwodnienia, gnilny rozkład oraz ilość dostępnej próbki decyduje o wiarygodności uzyskanych wyników końcowych. Autorka wnikliwie charakteryzuje również tzw. alternatywne materiały t.j. szpik kostny, maź stawowa, płyn osierdziowy, włosy, paznokcie, smółka itp., materiał ten stanowi swoiste kompendium wiedzy na temat wykorzystywanych materiałów biologicznych w procesie analizy sądowo-toksykologicznej.

W kolejnych pracach m.in. w artykule, opublikowanym w *The Journal of Forensic and Legal Medicine* oraz *Journal of Analytical Toxicology*, Autorka zaprezentowała wyniki doświadczeń dotyczące szeregu prac eksperymentalnych obejmujących analizę materiałów biologicznych pobranych od 120 pacjentów, u których w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu przeprowadzono sądowo-lekarską

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



sekcję zwłok. Jak podkreśla Autorka, kryterium włączenia do badania pacjenta było uzasadnione podejrzenie zatrucia ksenobiotykiem oraz możliwość pobrania aspiratu szpiku kostnego i przynajmniej jednego rutynowego materiału biologicznego, co umożliwiło porównanie otrzymanych wyników. Pierwsza część eksperymentalna obejmowała ocenę stężenia alkoholu etylowego w materiale biologicznym, zaś druga miała na celu detekcję leków i narkotyków we krwi, moczu, cieple szklistym i szpiku kostnym oraz ich ilościowe oznaczenie. Do przedmiotowych badań toksykologicznych w miarę możliwości pobrano krew z nakłucia żyły udowej, ciało szkliste oka, mocz poprzez nakłucie pęcherza moczowego oraz szpik kostny przez aspirację lub wyłżeczkowanie z talerza kości biodrowej. W przypadku części pacjentów nie było możliwe pobranie wszystkich wymienionych materiałów biologicznych. Stężenie etanolu w materiale biologicznym oznaczono przy użyciu właściwej metody jaką jest w tym przypadku chromatografia gazowa sprzężona z detektorem FID i techniką analizy fazy nadpowierzchniowej headspace. W przypadku oznaczania wszystkich substancji psychoaktywnych wykonano badanie składające się z dwóch części. W pierwszym etapie dokonano analizy jakościowej i ujawniano poszczególne anality, a w drugim etapie oznaczono ilościowo anality. Doktorantka do oznaczeń używała certyfikowanych wzorców wewnętrznych w stężeniu 1000 ng/ml, a analizę przeprowadziła przy użyciu bardzo nowoczesnej techniki jaką jest ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem mas (UHPLC-QqQ-MS/MS), co świadczy o bardzo specjalistycznych umiejętnościach Doktorantki. Na podstawie uzyskanych wyników, głównie poprzez analizę i ocenę stężeń oraz za pomocą współczynników korelacji Pearsona określono zależność pomiędzy poziomem stężeń analitów w próbkach szpiku kostnego a poziomami stężeń oznaczonymi w pozostałych materiałach biologicznych. Na uwagę zasługuje wnikliwa interpretacja wyników mianowicie średnie stężenie alkoholu etylowego w badanych próbkach wynosiło 0,68 mg/g (w krwi), 1,09 mg/g (mocz), 1,06 mg/g (ciałku szklistym oka) i było wyższe w porównaniu do średniego stężenia etanolu w oznaczonego w próbkach pobranego szpiku,



które wynosiło średnio 0,59 mg/g. Finalnie, po wykonaniu szeregu oznaczeń w toku badań uzyskano liniowe zależności pomiędzy zawartością alkoholu w szpiku kostnym a stężeniem etanolu w pozostałych materiałach biologicznych ( $R=0,97$  krew versus szpik kostny,  $R=0,95$  mocz versus szpik kostny oraz  $R=0,8$  ciało szkliste oka versus szpik kostny). Współczynniki korelacji nie były zależne od wieku i płci badanych. Różniły się natomiast w zależności od stężenia etanolu w analizowanym materiale ( $R=0,6$  dla etanolu w stężeniu 0,1 ‰-2,0 ‰ i  $R=0,92$  dla etanolu w stężeniu powyżej 2,0 ‰). Na uwagę zasługuje fakt, że dzięki znacznemu zróżnicowaniu analizowanych przypadków w szpiku kostnym oznaczono za wyjątkiem etanolu około 46 innych ksenobiotyków z grupy substancji m.in. psychoaktywnych. W miarę możliwości określono współczynniki korelacji, które dla większości związków wskazywały na głównie, liniowe zależności. Szczególną uwagę poświęcono lekom z grupy benzodiazepin, np. obecność diazepamu odnotowano w 6 przypadkach, a uzyskany współczynnik korelacji wyników krew versus szpik kostny był niski i wynosił  $R=0,29$ . Wynikało to najprawdopodobniej z uzyskania dwóch bardzo rozbieżnych par wyników, w których stężenia diazepamu w poszczególnych materiałach znacznie różniły się od siebie. Zauważono również, że stężenie między innymi metadonu, perazyny, karwedilolu i citalopramu było wyższe w szpiku kostnym w porównaniu do pozostałych materiałów biologicznych. Odwrotną sytuację odnotowano w przypadku atropiny oraz fentanylu, stężenie tych związków było niższe w szpiku kostnym.

Wartość merytoryczna pracy Pani mgr Marty Zacharczuk oceniam bardzo wysoko. Niezależnie od tej oceny, poniżej przedstawiam kilka komentarzy i zapytań do co do treści pracy oraz diskutowanych wyników, do który Doktorantka może odnieść się podczas publicznej obrony lub w dalszych swoich pracach badawczych.

W dyskusji Doktorantka podają tezę, że w przypadku problemów interpretacyjnych zasadne wydaje się oznaczenie również glukuronidu etylu podczas oznaczania alkoholu w próbkach szpiku. Wnioski te są trafne, ponieważ równoczesne oznaczanie metabolitów etanolu i samego etanolu można pomóc zweryfikować hipotezę o ewentualnej pośmiertnej syntezie



etanolu ale teza ta wymaga rozwinięcia. Ponadto w przypadku oznaczania leków w wybranych materiałach: krew, szpik, szklista oka, poproszę o zinterpretowanie różnic w stężeniach pomiędzy wyznaczonymi stężeniami (ng/ml) w szczególności dla fluoksetyny, karbamazepiny oraz oxazepamu?

Czy w toku badań zaobserwowano znaczącą różnicę pomiędzy oznaczanymi stężeniami a rozkładem próbki w przypadkach oznaczania amfetaminy oraz atropiny? Czy w tych przypadkach były oznaczane metabolity niniejszych substancji?

Ponadto wątpliwość budzi zapis stężeń analitów zamieszczonych w tabeli 1 [2]. Z punktu widzenia chemii analitycznej wartości te powinny być przedstawione z odpowiednimi znaczącymi liczbami po przecinku oraz liczbą przeanalizowanych próbek, co oczywiście nie jest uwagą krytyczną bowiem było to w ocenie recenzentów danego czasopisma.

Poproszę ponadto o skomentowanie bardzo cennego, zamieszczonego w niniejszej dysertacji wniosku, odnoszącego się do potencjału uwzględnienia procesów farmakokinetycznych zachodzących w szpiku, które ewidentnie są pomocne w interpretacji wyników oznaczeń ksenobiotyków oraz ich metabolitów.

## Podsumowanie

Reasumując należy podkreślić, że zamierzone cele Doktorantka osiągnęła z powodzeniem, publikacje wchodzące w skład niniejszej dysertacji stanowią znaczącą pozycję naukową, a przedłożoną do oceny rozprawę cechuje niewątpliwie wysoki poziom naukowy, praktyczny i poznawczy. Sformułowane wnioski stanowią dużą wartość naukową, co przekłada się na zastosowanie badanych materiałów w praktyce eksperckiej.

Dysertacja została napisana poprawnie językowo i stylistycznie, są jedynie bardzo drobne potknięcia w postaci skrótów myślowych w dołączonym do publikacji opisie jednakże nie ma to wpływu na bardzo wysoką ocenę pracy doktorskiej. Właściwie dobrano literaturę, metody analityczne i narzędzia badawcze. Praca obejmuje trafnie postawione

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



hipotezy badawcze oraz rzetelnie zrealizowane i omówione wyniki. Przeprowadzona dyskusja wyników została oparta o źródła literaturowe i dostępną wiedzę.

Dodatkowo otrzymane wyniki stanowią bardzo cenne narzędzie i znaczący wpływ na dyscyplinę naukową reprezentowaną przez Doktorantkę. Wszystkie te uwagi składają się na wysoką ocenę niniejszej dysertacji.

### **Wniosek końcowy**

Wydział Chemii

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Zacharczuk 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.). Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Marty Zacharczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę poziom naukowy rozprawy doktorskiej, a przede wszystkim znaczenie podjętych badań i ich aspekt aplikacyjny, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Marty Zacharczuk.

Dr hab. Renata Wietecha-Posłuszny, Prof. UJ

Pracownia Chemii Sądowej Wydział Chemii UJ

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl