



31-03-2022

427/2022

**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, 14 marca 2022 r.**

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Olgi Loski

pt.: „Biochemiczna diagnostyka nagłych zgonów sercowych”

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

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

Przedłożona do recenzji praca doktorska dotyczy ciągle aktualnego problemu medyczno-sądowej diagnostyki zgonów o podłożu czynnościowym.

Tzw. zgony sercowe (sudden cardiac death, SCD) już od zarania medycyny sądowej sprawiają ogromne trudności opiniodawcze ze względu na brak możliwych do zaobserwowania makro- i mikroskopowym zmian morfologicznych. Medycy sądowi bardzo często zmagają się wówczas z problemem tzw. białej sekcji, tj. nieustalonej w drodze badań sekcyjnych przyczynie śmierci. Sytuacja ta rodzi szereg komplikacji, zarówno organom stosowania prawa, jak i rodzinom zmarłych.

Postępy współczesnej medycyny sądowej ukierunkowane są więc między innymi na wyeliminowaniu tej ewidentnie „białej plamy” w pośmiertnej diagnostyce. W ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat została zgromadzona znaczna wiedza na temat patofizjologii SCD. Postęp

dokonał się głównie dzięki zastosowaniu nowych metod diagnostyki klinicznej. Pośmiertna diagnostyka medyczno-sądowa wprawdzie znacznie różni się od klinicznej, jednak szybszy postęp skłonił do prób zaimplementowania metod wykrywania biochemicznych markerów SCD, które pojawiają się we krwi znacznie szybciej niż zmiany martwicze możliwe do wykrycia makro- lub mikroskopowego. Dotychczasowe wysiłki badawcze oparte na oznaczaniu we krwi pośmiertnej markerów SCD jednak nie przyniosły zadowalających rezultatów. Dlatego ciągle poszukiwane są sposoby bezspornego ustalenia lub przynajmniej znacznego uprawdopodobnienia pośmiertnego rozpoznania SCD na podstawie obiektywnych wyników badań.

W medycynie sądowej, a zwłaszcza w toksykologii sądowej oraz pokrewnym jej dziale tzw. tanatochemii w przypadkach, gdy rozpoznanie patomechanizmu śmierci utrudnia brak nadającej się do badań niezmięnionej pośmiertnie krwi szczególnego znaczenia nabierają materiały tzw. alternatywne, w których stężenie markerów jest proporcjonalne do stężenia we krwi. Takim „sztandarowym” przykładem w tzw. alkoholologii sądowej jest ciało szkliste oka, które dawniej traktowano jako materiał alternatywny, a obecnie stało się typowym materiałem badawczym. Badania nad dystrybucją biomarkerów SCD, w kontekście badań pośmiertnych nabierają więc szczególnego znaczenia.

W powyższą problematykę wpisuje się również recenzowana praca, w której Autorka na podstawie wyników badań krwi, ciała szklistego oraz płynu osierdziowego pobranych i zabezpieczonych podczas sekcji sądowo-lekarskich dokonała oceny wczesnych markerów uszkodzenia mięśnia sercowego, które rutynowo wykorzystywane są do diagnostyki klinicznej. Są to: izoenzym MB kinazy kreatynowej (CK-MB_{mass}), odznaczająca się wysoką kardiospecyficznością sercowa troponina I (cTnI), ludzka kopeptyna (HCPP) oraz ludzkie białko wiążące kwasy tłuszczowe typu sercowego (h-FABP).

W ocenie wartości naukowej podjętego tematu badawczego należy uznać, że mieści w głównym nurcie badań w zakresie tanatochemii medyczno-sądowej, jest aktualny i odpowiadający potrzebom diagnostycznym, gdyż wynika z oczekiwań medyków sądowych oraz organów stosowania prawa. Ma istotny walor poznawczy oraz wyraźnie określony aspekt praktyczny.

Struktura pracy doktorskiej mgr Olgi Loski to monografia z zachowaniem podziału na rozdziały i podrozdziały. Jest zgodna z powszechnie przyjętym wzorcem, obejmuje: spis treści, słownik skrótów, wstęp, cele pracy z określeniem głównych hipotez badawczych, a następnie część doświadczalną obejmującą materiały i metody badań, obszerny rozdział przedstawiający

wyniki, omówienie wyników z dyskusją oraz wnioski. Na końcu znajdują się streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz piśmiennictwa oraz spisy tabel i rycin. Praca liczy 120 stron wydruku komputerowego. Zawiera 28 tabel, 31 rycin oraz obejmuje 108 pozycji piśmiennictwa uporządkowanego w kolejności cytowania. Piśmiennictwo w zdecydowanej większości (ponad 80 pozycji) składa się z prac anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym, a także opublikowanych nie dawniej niż 10 lat temu (ponad 70 pozycji).

Praca została napisana poprawnie formalno-językowo, stylistycznie oraz interpunkcyjnie.

We wstępie liczącym 17 stron Autorka omówiła rolę sekcji zwłok jako początek szczegółowej diagnostyki zgonów o podłożu chorobowym, zwracając przy tym uwagę na paradoks, jakim niekiedy jest to, że przypadki kryminalne bywają prostsze w diagnostyce niż zgony chorobowe, ostatecznie niepowodujące implikacji procesowych.

Następnie koncentrując się na zasadniczym temacie dysertacji, tj. nagłym zgonie sercowym – w zwięzły, a zarazem przystępny sposób przedstawiła definicję, epidemiologię oraz etiologię SCD, która w krajach rozwiniętych odpowiada za około 20% wszystkich nagłych zgonów, jak również możliwości diagnostyczne nagłych zgonów sercowych w medycynie sądowej. W tej części wstępu szczególny nacisk położyła na:

- problematykę pojawiania się i ewolucji zmian makro- i mikroskopowych w martwicy mięśnia sercowego względem czasu;
- bardzo ograniczoną przydatność rutynowo wykonywanych badań mikroskopowych oraz
- potencjalną przydatność wybranych biomarkerów, w tym między innymi troponin.

Autorka omówiła następnie tanatodiagnostykę biochemiczną, jako dział współczesnej medycyny sądowej, która czerpie z dorobku diagnostyki klinicznej i jej zaplecza badawczego, w tym analizatorów biochemicznych i immunochemicznych. Wskazała przy tym na ich ograniczenia w tanatobiochemicznej diagnostyce laboratoryjnej wynikające ze zmian pośmiertnych, np. gnicia i autolizy, które zmieniają skład ilościowy i jakościowy tkanek oraz płynów ustrojowych.

W wstępie mgr Olga Loska duża uwagę poświęciła na omówienie biomarkerów kardiologicznych w diagnostyce nagłych zgonów sercowych, ze szczególnym naciskiem na te, które są przedmiotem dysertacji: troponiny sercowe, białko kinazy kreatynowej CK-MB mass, kopeptyna oraz sercowe białko wiążące kwasy tłuszczowe H-FABP. Czytelnik może

szczegółowo zapoznać się z ich pochodzeniem, funkcją biologiczną, metodami oznaczania oraz ich specyficznością i ograniczeniami diagnostycznymi.

Należy ocenić, że wstęp dysertacji został opracowany w oparciu o aktualną wiedzę, zawiera sporą dawkę szczegółowych informacji, lecz jednocześnie w ilości adekwatnej do zrozumienia istoty tematu badawczego, bez zbędnego rozszerzenia o wiedzę peryferyjną.

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

1. Oznaczenie w surowicy krwi, cieple szklistym i płynie osierdziowym, pobranych i zabezpieczonych podczas sekcji sądowo-lekarskich, izoenzymu MB kinazy kreatynowej (CK-MB mass); sercowej troponiny I (cTnI); ludzkiej kopeptyny (HCPP) oraz ludzkiego białka wiążącego kwasy tłuszczowe typu sercowego (H-FABP).

2. Określenie wartości diagnostycznej powyższych biomarkerów w przypadku podejrzenia nagłego zgonu sercowego.

3. Sprawdzenie zależności pomiędzy biomarkerami a PMI - czasu od zgonu do pobrania materiału.

4. Wykazanie korelacji pomiędzy markerami w trzech badanych materiałach biologicznych.

Wymienione cele pracy miały służyć ocenie sformułowanych przez Autorkę dwóch hipotez badawczych o wysokich walorach poznawczych: pierwsza z nich, to: „biomarkery uszkodzenia mięśnia sercowego mogą być narzędziem pomocnym w diagnostyce nagłych zgonów sercowych”, zaś druga: „wzrost markerów martwicy mięśnia sercowego jest zależny od czasu, jaki minął od zgonu do pobrania materiału”.

Cele pracy należy uznać za dobrze sprecyzowane, ich realizacja zapewniała uzyskanie danych co najmniej wystarczających do przebadania stawianych hipotez, a przy tym są ambitne, wymagające nie tylko sporego nakładu pracy i zaangażowania znacznych środków, ale przede wszystkim posiadania znacznych umiejętności w zakresie praktyki laboratoryjnej oraz wiedzy specjalistycznej z zakresu medycyny sądowej, diagnostyki medycznej oraz biostatystyki.

Oceniając część badawczą dysertacji w zakresie stosowanych metod na wstępie należy podkreślić, że w pośmiertnej diagnostyce medyczno-sądowej kluczowe znaczenie ma zastosowanie odpowiednich metod analitycznych, które charakteryzują się wysoką czułością i minimalizują wpływ matrycy. Wśród dostępnych metod oznaczania biomarkerów dostępne

są prawie wyłącznie tzw. kity, czyli zestawy aparaturowo-odczynnikowe przeznaczone do badań klinicznych, czyli przeznaczone są do badań osób żyjących. Podejmując badania pośmiertne z użyciem tych metod, Autorka jednocześnie dokonała oceny ich przydatności do celów medyczno-sądowych. Jest więc to „pośredni”, dodatkowy cel dysertacji, częściowo ujawniający się dopiero na etapie oceny wyników badań. Dla analityka związanego z medycyną sądową dostęp do takich informacji jest nie do przecenienia.

Oznaczenie w zebranych materiale biologicznym kopeptyny oraz białka wiążącego kwasy tłuszczowe typu sercowego (H-FABP) zostało wykonane przy wykorzystaniu zestawów ELISA przy użyciu czytnika absorbancji, zaś ludzkiej sercowej troponiny I oraz izoenzymu MB kinazy kreatynowej (CK-MB mass) za pomocą testu ELFA, czyli immunoenzymatycznego typu sandwich z końcowym odczytem fluorescencji, przy użyciu automatycznego, wieloparametrycznego immunoanalyzera VIDAS. W zakresie prowadzonych przez Autorkę badań są to aktualnie najbardziej zaawansowane technicznie metody, należy jednak zaznaczyć, że „fabrycznie” przeznaczone są do badań osób żyjących.

Pozytywnie należy ocenić badania statystyczne uzyskanych wyników badań. Autorka dokonała tego przy użyciu pakietu IBM SPSS wykorzystując cały potencjał pakietu programowego: testem chi-kwadrat zbadała zależności między zmiennymi nominalnymi, istotność statystyczną związków między zmiennymi zbadała za pomocą analiza korelacji Spearmana, przy użyciu testu Friedmana oceniła, czy występują istotne statystycznie różnice w zakresie poziomu analizowanych parametrów biochemicznych, czyli pomiędzy poszczególnymi rodzajami materiału biologicznego. Do porównań dwóch materiałów biologicznych zastosowała test Wilcoxon, zaś testem U Manna-Whitneya sprawdziła, czy występują istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolną w zakresie analizowanych zmiennych. W analizie zastosowała statystyki opisowe: średnią, medianę, odchylenie standardowe, minimum, maksimum, pierwszy oraz trzeci kwartył. Autorka dokonała ponadto przy użyciu języka programowania R pogłębioną analizę statystyczną za pomocą nowoczesnych statystycznych metod obliczeniowych stosowanych w tzw. medycynie opartej na faktach (evidence-based medicine). Znaczną liczbę zastosowanych metod oceny statystycznej należy uznać na pozytywną stronę tej części metodycznej, jedynie brak komentarza uzasadniającego wybór tych testów.

Stosując wymienione metody analityczne i statystyczne mgr Olga Loska zbadała próbki krwi, płynu z gałki ocznej i płynu osierdziowego pobrane od 104 osób, w tym 50 z grupy kontrolnej, zabezpieczone podczas sądowo-lekarskich sekcji zwłok wykonanych na zlecenie prokuratury. Badanie zostało pozytywnie zaopiniowane przez Komisję Bioetyczną przy

Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Zastosowała przy tym ściśle określone kryteria włączenia do grupy badanej na podstawie udokumentowanych okoliczności zgonu mogących wskazywać na ich sercowopochodną przyczynę oraz na podstawie wstępnych wyników sekcji zwłok potwierdzających możliwość wystąpienia nagłego zgonu sercowego. Kryteriami włączenia do grupy kontrolnej był także wstępny wynik sekcji zwłok oraz dołączona dokumentacja ewidentnie wskazująca na inną niż sercowopochodna przyczyna zgonu. Dysertacja zawiera szczegółową procedurę zabezpieczania i przechowywania materiału biologicznego, co pozwala na prześledzenie całego procesu analitycznego od chwili pobrania.

Zebranie według ścisłych kryteriów odpowiednio licznej grupy badanej w medycynie sądowej jest bardzo trudne do przewidzenia w określonej ramie czasowej. Autorka także musiała zmierzyć się z trudnościami w uzyskaniu jednakowych liczebności w każdym z rodzajów materiału. W tym kontekście, dobór i liczebność grup należy uznać za całkowicie spełniające kryteria prac badawczych w zakresie medycyny sądowej.

Badając wyselekcjonowane przypadki mgr Olga Loska zgromadziła różnorodne informacje począwszy od wykładników morfologicznych oraz zmian makroskopowych przewlekłego niedokrwienia i niedotlenienia mięśnia sercowego, aż po ściśle dane liczbowe na temat stężeń wybranych czterech biomarkerów w surowicy krwi, cieple szklistym i płynie osierdziowym. Prezentując wyniki badań Autorka ograniczyła się do przedstawienia ich w formie już częściowo przetworzonej w postaci statystyk opisowych, bez szczegółowych tabelarycznych danych wyjściowych dla każdego przypadku, co nie pozwala na zapoznanie się z nieprzetworzoną informacją źródłową oraz weryfikację oceny statystycznej. Biorąc pod uwagę, że całość wyników przedstawiła na 31 stronach dysertacji aż w 20 tabelach i 19 rycinach decyzję tę można jednak uznać za uzasadnioną.

Autorka za pomocą testu U nie stwierdziła istotnych statystycznie różnic w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną w zakresie analizowanych biomarkerów HCCP, H-FABP, CK-MB oraz TNI w cieple szklistym, płynie z worka osierdziowego oraz w surowicy. Największe statystycznie różnice zaobserwowała dla H-FABP w cieple szklistym oka, a po usunięciu przypadków granicznych okazało się, że w grupie badanej mediana jest istotnie statystycznie niższa. Podobny rezultat w cieple szklistym po usunięciu przypadków ekstremalnych uzyskała dla CK-MB.

Wyniki testów statystycznych dotyczące porównań tych samych biomarkerów w różnych materiałach biologicznych w obydwu grupach wykazały istotnie statystycznie wyższe średnie stężenie HCCP w grupie kontrolnej dla płynu z worka osierdziowego w porównaniu z surowicą oraz istotnie statystycznie niższe średnie stężenie H-FABP w grupie

kontrolnej dla ciała szklistego zarówno w porównaniu z płynem z worka osierdziowego, jak i z surowicą oraz między surowicą a płynem z worka osierdziowego.

Analogiczne wyniki oznaczeń H-FABP względem płynu z worka osierdziowego jak również względem surowicy oraz między surowicą a płynem osierdziowym Autorka uzyskała w grupie badanej. W zakresie TNI, ze względu na niedostateczną liczbę próbek Autorka mogła porównać jedynie surowicę z ciałem szklistym, lecz nie zaobserwowała istotnych statystycznie różnic.

W kolejnej grupie wyników mgr Olga Loska przedstawiła osobno w grupie badanej oraz kontrolnej oceny istotności statystycznych między analizowanymi parametrami biochemicznymi a wiekiem oraz czasem od zgonu do pobrania materiału. W grupie kontrolnej dla ciała szklistego wykazała, że im osoba starsza, tym wyższy wynik HCCP i H-FABP oraz, że im dłuższy czas od zgonu do pobrania materiału, tym wyższa wartość CK-MB. W grupie badanej stwierdziła zaś, że im dłuższy czas od zgonu do pobrania materiału, tym niższa wartość HCCP w płynie z worka osierdziowego.

W następnej części rozdziału Autorka zaprezentowała wyniki dotyczące wpływu różnych czynników m.in. zmian makroskopowych oraz resuscytacji na analizowane markery biochemiczne i wykazała, że:

- wśród resuscytowanych z grupy badanej średnie stężenie HCCP w płynie gałki ocznej było istotnie statystycznie niższe w porównaniu do nieresuscytowanych, zaś wśród resuscytowanych z grupy kontrolnej średnie stężenie HCCP w płynie osierdziowym było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z osobami nieresuscytowanymi;

- resuscytacja w obu grupach nie powodowała istotnych statystycznie różnic stężeń badanych biomarkerów w surowicy;

- w grupie kontrolnej, u osób ze zmianami makroskopowymi średnie stężenie HCCP w ciele szklistym oka było istotnie statystycznie wyższe;

- występowanie zmian makroskopowych w obu grupach nie powodowała istotnych statystycznie różnic stężeń badanych biomarkerów w płynie z worka osierdziowego oraz w surowicy.

Dokonując analizy korelacji między poszczególnymi parametrami biochemicznymi Autorka w grupie kontrolnej zaobserwowała istotne statystycznie powiązania: dodatnie między HCCP i CK-MB mass w ciele szklistym oka oraz ujemne między H-FABP w ciele szklistym a HCCP w płynie osierdziowym. Natomiast w grupie badanej w surowicy wykazała dodatnią korelację między HCCP a H-FABP.

Dla dwóch markerów H-FABP oraz HCCP Autorce udało się zebrać co najmniej 10 prób każdego materiału biologicznego i mogła dodatkowo ocenić proporcje między analizowanymi parametrami biochemicznymi w grupie kontrolnej i badanej, lecz nie zaobserwowała występowania istotnych statystycznie różnic między grupami. Nie zaobserwowała istotnych statystycznie różnic między grupami w zależności od czasu, jaki upłynął od zgonu do pobrania próbek.

Zastosowanie do analizy statystycznej języka programowania R zaowocowało kolejną porcją wyników w zakresie taksonomii, modelowaniu liniowym i regresji logistycznej, które Doktorantka zamieściła na 10 stronach. Za pomocą dendrogramu klasyfikacyjnego wyłoniła 5 typów morfologicznych osób ze względu na wybrane cechy badane i stwierdziła m.in., że pacjenci pierwszego typu taksonomicznego cechują się: średnim czasem pomiędzy zgonem a sekcją zwłok, najstarszym wiekiem, widocznymi zmianami makroskopowymi, niskim stężeniem CK-MB mass w cieple szklistym oka, najwyższymi wykładnikami morfologicznymi przewlekłego niedokrwienia i niedotlenienia mięśnia sercowego oraz średnimi przynależnościami do grupy badawczej – i zróżnicowanie to jest istotne statystycznie dla wszystkich analizowanych cech. Za pomocą modelowania liniowego mgr Olga Loska wykazała, że stężenie CK-MB mass w cieple szklistym oka po 2 dniach od zgonu rośnie dość dynamicznie u zmarłych, u których nie zaobserwowano zmian makroskopowych w porównaniu ze zmarłymi z widocznymi zmianami, a podobny efekt występuje w grupie kontrolnej względem badawczej. Ostatnią porcję wyników Autorka uzyskała stosując regresję logistyczną, za pomocą której ustaliła, że obecność wykładników morfologicznych przewlekłego niedokrwienia i niedotlenienia mięśnia sercowego w obrazie histopatologicznym powoduje 36-krotny wzrost prawdopodobieństwa uznania nagłego zgonu sercowego za ostateczną przyczynę zgonu w opiniowaniu sądowo-lekarskim. Powyższym testem wykazała ponadto, że zmiany makroskopowe występują w grupie badanej w porównaniu do kontrolnej, w proporcji ok. 8 do 1 oraz, że wraz z wiekiem denatów rośnie prawdopodobieństwo przynależności zmarłego do grupy badanej, a różnica ok. 10 lat generuje wzrost ryzyka o około 1/3.

Dane tabelaryczne Autorka opatrzyła szczegółowymi objaśnieniami zasad i celu stosowania poszczególnych metod statystycznych, co ułatwia ich zrozumienie. Mnogość zastosowanych metod statystycznych oraz znaczne nagromadzenie dość trudnych do interpretacji danych usieciowanych między trzema różnymi materiałami, czterema biomarkerami oraz dwoma grupami mogą jednak nieco przytłaczać czytelnika i powodują, że czytanie ze zrozumieniem tej części dysertacji wymaga znacznego natężenia uwagi.

21-stronicowe omówienie wyników z dyskusją mgr Olaga Loska podzieliła tematycznie. W pierwszych czterech podrozdziałach oceniła rezultaty oznaczeń wybranych biomarkerów wraz z wnikliwą oceną użytych metod. W omówieniu zawarła w szereg cennych, praktycznych uwag:

- Zwróciła uwagę na to, że testy różnych producentów nie są względem siebie wystandaryzowane, uzyskane rezultaty oznaczeń różnymi metodami nie mogą więc być bezpośrednio porównywane.

- Oceniała, że automatyczna metoda oznaczania ludzkiej sercowej troponiny I oraz izoenzymu MB kinazy kreatynowej (CK-MB mass) techniką ELFA za pomocą systemu VIDAS, mimo wielu zalet, w przypadku materiału pośmiertnego nie zapewnia dostatecznej liniowości detekcji.

- Doktorantka wskazała, że w przypadku badań próbek krwi metodami immunochemicznymi istotnym problemem technicznym może być hemoliza. Ten problem nie występuje w przypadku badań płynu osierdziowego, który jest też bardziej odporny na zmiany pośmiertne. Ponadto, bezpośredni kontakt z miokardium powoduje, że w tym środowisku stężenie troponin wzrasta jako pierwsze, co ułatwia diagnostykę uszkodzeń miocytów.

- W części dotyczącej oznaczeń izoenzymu MB kinazy kreatynowej we krwi doktorantka zawarła cenną wskazówkę, iż w badaniach pośmiertnych należy określać stężenie białka enzymatycznego - CK-MB mass, a nie aktywność enzymatyczną - znacznie bardziej narażoną na zakłócający wpływ przemian pośmiertnych. Zaleciła, żeby podczas lektury publikacji naukowych zwracać na to uwagę, gdyż częściej publikowane są badania z oznaczaniem aktywności, co może być przyczyną błędnych interpretacji.

Istotną część omówienia wyników mgr Olga Loska poświęciła badaniom z użyciem ciała szklistego, materiału biologicznego dotąd niewykorzystywanego do oznaczeń stężenia troponiny i bardzo słabo przebadanego pod kątem innych biomarkerów SCD. Mimo, że w swoich badaniach nie stwierdziła istotnej statystycznie różnicy stężenia troponiny między grupą badaną a kontrolną, to należy docenić to, że prezentowane wyniki są jak dotąd jedyne wśród opublikowanych. Wykazała, że nie ma istotnej statystycznie różnicy także między stężeniem CK-MB mass w grupie badanej i kontrolnej, lecz po usunięciu pojedynczych przypadków granicznych mediana stężenia CK-MB mass w ciele szklistym okazała się istotnie statystycznie niższa w grupie badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej. Ponadto wykazały, że stężenie CK-MB mass w ciele szklistym po 2 dniach od zgonu dynamicznie wzrasta w grupie kontrolnej, a każdy dodatkowy dzień od zgonu zwiększa różnicę stężenia między grupą badaną i kontrolną o ok. 30 ng/ml. Jest to bardzo cenna obserwacja, która może być przyczynkiem do

dalszych, pogłębionych badań nad obecnością tego biomarkera w ciele szklistym oka, zwłaszcza, że dotąd nie opublikowano podobnych wyników. W omówieniu Autorka nie podjęła jednak próby teoretycznego wyjaśnienia prawdopodobnych przyczyn tych zmian.

Doktorantka wykazała, że stężenia kopeptyny (HCCP) w ciele szklistym oka, płynie osierdziowym i krwi nie różnią się między grupą badaną a kontrolną, lecz wykazała, że jej stężenie w ciele szklistym w grupie kontrolnej wzrasta wraz z wiekiem, oraz, że stężenie kopeptyny w płynie z worka osierdziowego spada w grupie badanej wraz z upływem czasu od chwili zgonu (PMI). Na tej podstawie Autorka podkreśliła w dyskusji, że właściwa ocena HCCP jako pośmiertnego biomarkera SCD wymaga przeprowadzenia badań nad jego stabilnością w różnych materiałach biologicznych.

Oceniając wyniki badań nad obecnością H-FABP - białka wiążącego kwasy tłuszczowe typu sercowego doktorantka wykazała, że zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej średnie stężenie H-FABP jest najniższe w ciele szklistym, zaś najwyższe w płynie osierdziowym, a różnice stężeń między wszystkimi badanymi materiałami są istotne statystycznie. Wskazała także, że stężenie H-FABP w ciałku szklistym gałki ocznej w grupie kontrolnej było wyższe niż w grupie badanej - podobnie jak dla biomarkera CK-MB mass, oraz że w grupie kontrolnej stężenie H-FABP wzrastało z wiekiem, a podobną zależność otrzymała także dla HCCP. Autorka dostrzegła podobieństwo stężeń obu markerów również w surowicy grupy badanej, w której stężenie H-FABP jest dodatnio skorelowane z HCCP. W ocenie przydatności H-FABP uznała, że średni czas pobrania materiału od zgonu, który wynosił ponad 130 godzin nie pozwolił na sformułowanie konkretnych wniosków, gdyż H-FABP jest małym białkiem dobrze rozpuszczalnym w wodzie i należy liczyć się z tym, że znaczna jego część mogła ulec degradacji w wyniku autolizy lub gnicia. W tej części dyskusji rodzi się zatem pytanie, dlaczego Autorka nie ograniczyła ram czasowych np. do 48 - 72 godzin i nie wykluczyła z badań lub chociażby z oceny statystycznej przypadki z tak długimi okresami czasu od chwili zgonu?

Mgr Olga Loska wykazała, że resuscytacja krążeniowo-oddechowa nie wpływa na stężenia troponiny I, H-FABP oraz CK-MB, natomiast istotna statystycznie różnica występuje w przypadku kopeptyny. Podkreśliła, że w grupie kontrolnej, u osób, którym wykonano resuscytację, wykazano wysokie stężenie HCCP w płynie osierdziowym, ale z kolei w płynie gałki ocznej niższe niż u osób nieresuscytowanych. Autorka wskazała w dyskusji na kilka czynników, które mogły wpływać na tą dość zaskakującą redystrybucję biomarkera oraz zasadność dalszych badań w tym kierunku.

W dyskusji Autorka skupiła się także na problemach metodycznych, badaniach nad zależnością ocenianych biomarkerów od PMI, czyli czasu od chwili zgonu do momentu

zabezpieczenia materiału do badań, kwestii miejsca i sposobu pobrania materiału do badań tanatochemicznych, proporcji stężeń poszczególnych markerów w różnych materiałach biologicznych oraz zastosowanych statystykach opisowych. Omówienie zawiera szereg ważnych informacji oraz praktycznych wskazówek, między innymi, że:

- różnorodność metod wykorzystywanych do oznaczania markerów kardiologicznych i innych markerów pomocnych w diagnostyce nagłych zgonów sercowych może prowadzić do wielu nieporozumień, nieścisłości i braku porównywalności uzyskanych wyników różnymi technikami;

- szybkie testy kasetkowe nie nadają się do próbek zhemolizowanych, co poważnie ogranicza ich przydatność w praktyce sądowo-lekarskiej;

- pozytywny wynik testu immunochromatograficznego nie jest w żaden sposób przydatny do potwierdzenia sercowopochodnych przyczyn zgonu;

- należy liczyć się z występowaniem reakcji krzyżowych, efektu dużej dawki i wpływu hemolizy, co zawsze powinno być brane pod uwagę podczas interpretacji rutynowych wyników badań immunochemicznych;

- zaobserwowano wzrost stężenia oznaczanych markerów kardiologicznych wraz z PMI, dlatego zasadne jest pobieranie krwi do badań w jak najkrótszym czasie po zgonie;

- w przypadku markerów diagnostyki nagłych zgonów sercowych samo miejsce pobrania krwi i jego oddalenie od serca może wpłynąć na ostateczną interpretację.

Autorka wskazała, że nie ma jednoznacznych wytycznych i algorytmów postępowania dotyczących oznaczania markerów kardiologicznych w diagnostyce post mortem. Dlatego przy braku statystycznej istotności pojedynczych markerów w tym zakresie pomocne mogłyby się okazać określenie proporcji różnych markerów w różnych materiałach biologicznych. W swojej pracy podjęła taką próbę, lecz stosunki stężeń dla H-FABP oraz HCCP w kombinacji stężeń we krwi, płynie z worka osierdziowego i cieple szklanym nie wykazały istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. Natomiast wartości CK-MB mass i cTnI w znacznej liczbie prób wykraczały powyżej liniowości metod i nie było możliwe obliczenie proporcji tych markerów.

Doktorantka wskazała także na ograniczenia, z którymi spotkała się w trakcie realizacji pracy, między brak możliwości wykonania re-analzy w kierunku troponiny oraz CK-MB mass wówczas, gdy ich stężenia przekraczały górną granicę zakresu oznaczalności. Z tego powodu w obliczeniach statystycznych nie mogła uwzględnić części wyników badań. Przyczynił się do tego brak dostatecznej ilości materiału badawczego oraz ograniczenia finansowe. Pozostawia to pewien niedosyt u czytelnika, gdyż przy wdrażaniu nowych metod z reguły wcześniej

wykonywane są badania wstępne dla uniknięcia tego rodzaju ograniczeń. Zdaniem Autorki kwestia rozcieńczenia próbek w diagnostyce post mortem powinna być przedmiotem dalszych prac badawczych, jak również widzi potrzebę kontynuowania prób oznaczania troponin we krwi pobranej ze zwłok, lecz z zastosowaniem prawidłowych procedur.

Oceniając wartość naukową dyskusji w przedłożonej dysertacji należy podkreślić, że została przeprowadzona kompetentnie w oparciu o własne wyniki pracy badawczej oraz bardzo dobrą znajomość piśmiennictwa naukowego.

W rozdziale „Wnioski” mgr Olga Loska zawarła 5 najważniejszych tez będących efektem analizy zgromadzonych wyników badań, do których doprowadziły założone i konsekwentnie zrealizowane cele badawcze. Pokrótce można je sprowadzić do dwóch konkluzji, przyporządkowanych przyjętym hipotezom badawczym:

1. użyte metody oznaczania troponiny I i CK-MB mass techniką ELFA nie znajdują zastosowania w diagnostyce tanatochemicznej, a oznaczanie markerów kardiologicznych zarówno we krwi jak i innych, alternatywnych materiałach biologicznych zabezpieczonych w trakcie sekcji sądowo-lekarskiej są nieprzydatne w przypadkach, gdy sekcja zwłok dokonywana jest w realiach polskich Zakładów Medycyny Sądowej, czyli średnio po 5-6 dniach od zgonu. Mogą być natomiast użyteczne w przypadkach spełniających kryteria PMI poniżej 48 godzin - co jednak jest bardzo rzadko spotykane.

2. W ocenie zależności stężenia markerów martwicy mięśnia sercowego od PMI Autorka stwierdziła wzrost stężenia CK-MB mass w płynie z gałki oka zależny od PMI, zwłaszcza w grupie kontrolnej, jednak zauważa konieczność dalszych szczegółowych badań w tym kierunku poszczególnych markerów kardiologicznych w różnych materiałach biologicznych w celu wyeliminowania wyników fałszywie zawyżonych i możliwej błędnej interpretacji ostatecznej przyczyny zgonu.

Ponadto na podstawie oceny wyników badań kopeptyny i h-FABP we krwi i w pozostałych materiałach badanych sformułowała wniosek, że markery te potencjalnie, w przyszłości mogą być wykorzystane w laboratoryjnej tanatodiagnostyce nagłych zgonów sercowych.

Badania przeprowadzone przez mgr Olę Loskę należy uznać jako w pewnym zakresie pionierskie. Zwraca uwagę dobrze zaplanowany, przemyślany układ dysertacji oraz staranna strona edytorska. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo dobry wybór piśmiennictwa

naukowego. Podczas lektury rozprawy nie napotkano wartych wzmianki błędów pisarskich i językowych. W trakcie lektury dysertacji dopatrzone się jedynie zamiennego stosowania dwóch różnych skrótów dla troponiny sercowej I, raz jako cTnI oraz dość często jako TNI, którego brak w wykazie skrótów. Ponadto znajdujące się na stronach 37 i 62 przypisy źródłowe dla języka programowania R powinny zostać umieszczone w spisie piśmiennictwa, a umieszczony na karcie 37 link do strony www jest nieprawidłowy.

Oceniając całokształt pracy doktorskiej mgr Olgi Loski należy stwierdzić, że mimo, iż pierwsza z hipotez została w zdecydowanej większości zweryfikowana negatywnie, zaś druga częściowo pozytywnie, to jednak w medycynie sądowej ma to istotny, pozytywny wymiar. Przede wszystkim zrealizowała wszystkie zamierzone cele badawcze, a następnie na ich podstawie dokonała oceny rzeczywistej wartości dowodowej biomarkerów nagłych zgonów sercowych, co w medycynie sądowej jest nie do przecenienia. Tego rodzaju oceny „negatywne” przestrzegają biegłych przed stosowaniem niepewnych metod i wyciągania wniosków, które mogą być fałszywe i w konsekwencji doprowadzić do błędnej opinii pociągającej za sobą szereg skutków formalno-prawnych.

Uzyskane dane oraz wnioski z dyskusji są też dobrym przyczynkiem do kontynuowania prac w tym zakresie. Autorka wykorzystwała przy tym dostępny w badaniach medyczno-sądowych potencjał alternatywnych środowisk badawczych, gdyż oprócz standardowo wykorzystywanej krwi przebadala stężenia biomarkerów także w cieple szklistym oka i płynie z worka osierdziowego.

Przedłożoną do oceny rozprawę cechują istotne 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 Olgi Loski do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



PODPIS ZAUFANY

GRZEGORZ
BUSZEWICZ
28.03.2022 09:51:59 [GMT+2]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Lublin, 22-03-2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Buszewicz