



Kraków 30.10.2023

Dr hab. Renata Wietecha-Posłuszny, Prof. UJ

Wydział Chemii, Pracownia Chemii Sądowej,
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Chemii

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Sonii Zięby

pt.

Szacowanie czasu zgonu na podstawie oznaczenia stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka dla potrzeb medycyny sądowej

wykonanej pod kierunkiem
promotora: dr hab. n. farm. Marka Wiergowskiego
w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Wydziału Lekarskiego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Charakterystyka i znaczne podjętej problematyki badawczej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Sonii Zięby dotyczy bardzo ważnego zagadnienia, z punktu widzenia badań medyczno-sądowych, w zakresie szeroko pojętego szacowania czasu zgonu z wykorzystaniem analizy ciała szklistego oka, jako materiału alternatywnego. Zazwyczaj analiza alternatywnego materiału biologicznego jest stosowana w sprawach sądowych tam, gdzie dostęp do klasycznych materiałów jest zdecydowanie utrudniony lub czasami niemożliwy. Jednakże analiza ciała szklistego oka jest bardzo często wykorzystywana w ekspertyzie sądowej, zwłaszcza w toksykologii sądowej m.in w oznaczaniu poziomu alkoholu etylowego i in. Jedną z największych trudności analitycznych dotyczących wykonywania laboratoryjnych badań *post-mortem* jest przede wszystkim

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



jakość materiału biologicznego z jakim mamy do czynienia. Jak wiadomo z badań oraz doniesień literaturowych, z uwagi na różny stan przemian pośmiertnych, możliwą fragmentację ciała czy też jego zeszkietowanie pobranie próbek do badań laboratoryjnych, zwłaszcza klasycznych materiałów może okazać się trudne lub niemożliwe, wówczas posługujemy się materiałami alternatywnymi typu: cało szkliste, maź, szpik kostny itp.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było stworzenie algorytmu postępowania umożliwiającego oszacowanie czasu zgonu na podstawie oznaczania stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka z uwzględnieniem niepewności pomiarowej dla potrzeb medycyny sądowej. Praca ta została zrealizowana w ramach projektu POWR.03.02.00-00-I026/17-00 współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020.

Należy podkreślić, że w badaniach analitycznych, tak jak w niniejszej dysertacji przy oznaczaniu analitu w próbce, jedną z ważniejszych kwestii jest rzetelna interpretacja uzyskanych wyników analitycznych. W niniejszej pracy doktorskiej poświęcono bardzo dużo uwagi, zagadnieniom związanym z obliczaniem wartości niepewności pomiaru analitycznego, co należy bardzo docenić. Praca doktorska Pani mgr Sonii Zięby ma klasyczny układ i jest związana z tematyką z zakresu medycyny sądowej oraz chemii analitycznej. Zawiera zwięzłe wprowadzenie czytelnika w zagadnienia i sposoby oceny szacowania czasu, a w zasadzie przedziału czasu jaki upłynął od zgonu. We wprowadzeniu Doktorantka opisuje metody klasyczne, najczęściej stosowane przez medyków sądowych, w tym: metody termiczne, ocenę plam opadowych oraz ocenę stężenia pośmiertnego podkreślając ich wady i zalety. Ponadto w części literaturowej zamieszczono zestawienie prac naukowych opisujących powyższe zagadnienie w latach 1960-2021 oraz uzupełnienie z lat 2022-2023. Doktorantka przy przeglądzie literaturowym skupiła również swoją uwagę na najczęściej oznaczanych analitach przy szacowaniu PMI (*post-mortem interval*). Na szczególną uwagę zasługuje tabela 1.5, w której zestawiono metody analityczne oznaczania markerów PMI w różnych

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



matrycach biologicznych, tabela zawiera cenne informacje dotyczące procedur postępowania przy przygotowaniu ciała szklanego oka, płynu maziowego, a także liczne warunki eksperymentalne dotyczące oznaczeń metodami: potencjometrycznymi, elektrochemicznymi, elektroforetycznymi, kolorymetrycznymi, chromatograficznymi itp. Obszerny rozdział poświęcono również układowi pomiarowemu, gdzie w opinii recenzenta-analityka można było nieco skrócić opis budowy i zasady działania elektrody jonoselektywnej, która jest powszechnie znana, a jedynie dodać odnośnik do stosownej literatury. Ciekawym i nowym aspektem jest wykorzystanie metody optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą indukowaną mikrofalowo (MIP-OES). Gdzie Pani Doktorantka podkreśla zalety tej metody m.in. możliwość analizy wielopierwiastkowej stąd od razu nasuwa się pytanie czy planowano oznaczać większą grupę pierwiastków?

Wydział Chemii

W części doświadczalnej Doktorantka przedstawiała cel swojej pracy oraz etapy badawcze m.in.: przegląd literaturowy, pobieranie materiału badawczego, optymalizacja i walidacja parametrów procedury pobierania i przechowywania ciała szklanego oka (etap przedanalizacyjny) oraz analizy instrumentalnej (etap analityczny) metodą ISE, oszacowanie niepewności pomiarowej typu A i B dla wyników oznaczania stężenia jonów potasu w ciele szklanym oka metodą potencjometryczną z wykorzystaniem elektrody jonoselektywnej (ISE) oraz metodą optycznej spektrometrii emisyjnej z atomizacją w plazmie indukowanej mikrofalowo i finalnie próba oszacowania zależności PMI w funkcji stężenia jonów potasu w ciele szklanym oka dla zgromadzonych przypadków zgonów (opisanych szczegółowo w tabeli 3.1.) dla różnych kategorii: płci, wieku oraz prawdopodobnej przyczyny zgonu.

W badaniach eksperymentalnych wykonano analizę 94 próbek ciała szklanego oka pobranego w trakcie sądowo-lekarskich sekcji zwłok przeprowadzanych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) w latach 2020-2023 za zgodą komisji bioetycznej (Uchwała nr NKBBN/18/2020 Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych GUMed). Zastosowano dwie metodyki przygotowania próbek oraz dwie metody analityczne, oszacowano

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



niepewność A i B dla obu metodyk, dla różnych poziomów stężeń potasu odpowiadających realnym poziomom spotykanych w badanych przypadkach sekcyjnych. Choć, chciałam podkreślić, że mnie jako analitykowi trudno odnieść się do praktycznej interpretacji poziomów potasu w ekspertyzie sądowo-lekarskiej bowiem w literaturze przedmiotu spotyka się bardzo szerokie zakresy stężeń zatem lepiej zostanie to zweryfikowane przez recenzentów niniejszego doktoratu z zakresu medycyny sądowej. W przeprowadzonych badaniach otrzymano bardzo dobre wartości precyzji, jak również dokładności metody analitycznej, dla roztworów wzorcowych średnio poniżej 1%. Wyznaczono bardzo szeroki zakres roboczy dla obu metod analitycznych, a szczególnie dla MIP-OES – do 40 mg/l. W analizowanej puli próbek był jeden przypadek na granicy zakresu roboczego. Czy w tym przypadku wykonywano rozcieńczenie – tabela 4.6? Cenne zestawienie stanowi tabela 4.7 gdzie w tak dużej liczbie przypadków można zauważyć bardzo dobrą precyzję oznaczeń, w dwóch seriach pomiarowych metodą ISE, oraz wartości RSD na poziomie do ok. 10%, co wg. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology jest wynikiem bardzo dobrym. Poproszę o wyjaśnienie jaką przyczynę mogą mieć nieco wyższe wartości RSD dla przypadków: 474/20, 614/22, 134/22, 405/20 oraz dokładnie z jakiego powodu odrzucono testem Dixona wartości otrzymane dla przypadku 375/20. W tekście dysertacji jedynie napisano, że wyniki odbiegające zostały odrzucone, niestety nie dodano komentarza. W dysertacji zamieszczono szereg krzywych korelacyjnych i współczynników determinacji R^2 opisujących czynniki tj. grupy wiekowe, okoliczności zdarzenia w funkcji stężenia jonów K^+ , jednakże wiele z tych przypadków nie jest zbliżone do jedności, tego rodzaju wyniki są również publikowane w literaturze przedmiotu.

Reasumując, wyniki przedstawione w niniejszej dysertacji zostały już opublikowane przez Doktorantkę, gdzie przeszły formalną i merytoryczną recenzję w dwóch publikacjach naukowych: S. Zięba, M. Wiergowski, M. Krzyżanowska, T. Gos, and I. Sołtyszewski, "Time of death estimation based on the analysis of tanathochemical processes in forensic medicine,"

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



Romanian Journal of Legal Medicine, vol. 29, no. 3, pp. 261–271, Sep. 2021, oraz S. Zięba, M. Wiergowski, B.M. Cieślík, J. S. Anand, M Krzyżanowska, Uncertainty of Postmortem Time Estimation Based on Potassium Ion Determination in Vitreous Humor Using Potentiometric Ion-Selective Electrode and Microwave-Induced Plasma with Optical Emission Spectrometry Methods. Separations 2023, 10, 201. Oba czasopisma znajdują się w tzw. wykazie czasopism i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z łącznie przypisaną liczbą punktów MNiSW: 60, IF = 2.9. Pani mgr Sonia Zięba jest w nich pierwszym autorem, do dokumentacji dołączono również oświadczenia współautorów Pani S. Zięby, określających ich wkład w cyklu publikacji stąd nasuwa się pytanie dlaczego nie złożono niniejszej pracy w formie cyklu publikacji, tym bardziej, że ryciny i tabele są z nich zaczerpnięte, po tłumaczeniu na język polski. W tekście dysertacji należałoby w takiej sytuacji dodać obowiązkowo odnośnik literaturowy do publikacji w czasopiśmie Separations chyba, że publikacja ukazała się później niż powstał ostateczny tekst pracy doktorskiej.

Wydział Chemii

Ponadto z obowiązku recenzenta, poniżej przedstawiam kilka komentarzy i zapytań co do treści pracy oraz diskutowanych wyników, do który Doktorantka może odnieść się podczas publicznej obrony, a także może je wykorzystać w dalszych swoich pracach badawczych.

- Poproszę o wyjaśnienie tezy, która została umieszczona przez Doktorantkę w części literaturowej odnośnie sposobu szacowania PMI, gdzie szacowanie czasu PMI powinno odbywać się na podstawie kilku parametrów, czy samo oznaczenie stężenia potasu w materiale biologicznym byłoby wystarczające?

- Poproszę o wyjaśnienie czy dane w tabeli 5.2 są danymi literaturowymi czy badanymi przez Doktorantkę, jak takie badania przeprowadzono, w nagłówku tabeli nie ma odnośnika literaturowego?

- Poproszę o podanie dokładnego sposobu przeliczenia rozcieńczenia i finalnego stężenia dla próbek badanych metodą ISE oraz wyjaśnienie etapu nr: 6 – tabela 3.3 pt 6.

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



- Poproszę o doprecyzowanie czym kierowano się przy wyborze próbek do badań w grupie osób zmarłych w wyniku powieszenia? Czy jest to czynnik zmieniający poziomy m.in. potasu w ciele szklistym oka?

- Poproszę o uzupełnienie wykresu 4.3. pt. Składowe niepewności pomiarowej mające wpływ na oznaczane stężenie jonów potasu w VH metodą ISE, o poszczególne składowe.

- Poproszę o doprecyzowanie najistotniejszego etapu w opracowanym algorytmie postępowania umożliwiającego oszacowanie czasu zgonu na podstawie oznaczania stężenia jonów potasu w ciele szklistym oka z uwzględnieniem niepewności pomiarowej dla potrzeb medycyny sądowej.

- w tekście dysertacji brakuje m.in. wyjaśnienia skrótu CSF wykorzystanego w pracy str. 27 i czy faktycznie taki miał być skrót?

- w tekście dysertacji pojawiają się błędy edycyjne, co może wynikać z przekładu tekstu z języka angielskiego z publikacji własnych, jednakże w dysertacji powinno być zweryfikowane m.in. str. 29, brak znaków interpunkcyjnych w rozdziale 1.3.4, str. 59, „...jonów w potasu w ciele...”, str. 86 „...granica oznaczalności (LOQ) nie są tak dobre jak inne techniki, ponadto słowo ilość w aspekcie policzalnych przedmiotów jest błędnie używane, powinno być: „... liczba...” itp.

- Część wniosków ma charakter podsumowania. Dobrze byłoby wyciągnąć wnioski ogóle z przeprowadzonych badań i skupić się na aspektach nowości.

Podsumowanie

Reasumując należy podkreślić, że zamierzone trudne cele Doktorantka osiągnęła, a przedłożoną do oceny rozprawę cechuje niewątpliwie dobry poziom praktyczny i poznawczy. Wykorzystanie, szczególnie metody MIP-OSE stanowi nową wartość naukową, co przekłada się na potencjalne zastosowanie zaproponowanych metod analitycznych w praktyce eksperckiej.

Dysertacja została napisana poprawnie językowo i stylistycznie, są potknięcia w postaci skrótów myślowych w opisie wyników badań, jednakże nie ma to znaczącego wpływu na finalną ocenę pracy doktorskiej. Właściwie



dobrano literaturę, wykorzystano w tym zakresie badawczym zarówno proste jak i zaawansowane metody analityczne i narzędzia badawcze. Przeprowadzona analiza i syntetyczna dyskusja wyników została oparta o źródła literaturowe i dostępną wiedzę.

Dodatkowo otrzymane wyniki badań w zakresie wykorzystania technik instrumentalnych w oznaczaniu potasu w materiale biologicznym mogą stanowić w przyszłości nowe, cenne narzędzia i tym samym mogą mieć znaczący wpływ na dyscyplinę naukową reprezentowaną przez Doktorantkę.

Wydział Chemii

Wniosek końcowy

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Sonii Zięby stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (j.t. Dz. U z dnia 2020r. poz. 85, z póź.zm.) W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Sonii Zięby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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