

Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. prof. dra Jana Sehna
w Krakowie

Kraków, dnia 6 maja 2021 roku

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Alicji Majdy pt. *Innowacyjne sposoby analizy krwi i szpiku kostnego na zawartość substancji psychoaktywnych*

Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej

Rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Majdy dotyczy opracowania nowoczesnych sposobów przygotowania różnych materiałów biologicznych do badań w kierunku zawartości substancji psychoaktywnych za pomocą zaawansowanej techniki instrumentalnej, jaką jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS).

Doktorantka badaniami objęła szeroką grupę substancji: leków z grupy pochodnych benzodiazepiny (BZD), inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI), inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRI), niebenzodiazepinowych leków nasennych (*Z-drugs*) oraz leków przeciwpadaczkowych (AED). Wymienione grupy leków należą do najczęściej badanych w laboratoriach klinicznych i sądowych w kontekście podejrzenia zatrucia.

Statystyki pokazują, że ilość przyjmowanych leków rośnie z roku na rok. Wynika to m.in. z ich dużej dostępności, będącej skutkiem coraz częstszego znoszenia ograniczeń w nabywaniu leków nawet o silnym działaniu, rosnącego przekonania wielu osób o konieczności ich zażywania – wynikającego z intensywności współczesnego życia i „braku czasu” na właściwe zadbanie o siebie, czy też sugestywnych akcji reklamowych prowadzonych przez firmy farmaceutyczne, które sugerują, że leki względnie ich suplementy są właściwym sposobem na uwolnienie się od problemów współczesnego świata. Skutkiem tego jest między innymi polipragmazja, nazywana też wielolekowością,

charakteryzująca się równoczesnym przyjmowaniem wielu leków w ciągu dnia, co prowadzi do występowania efektów ubocznych. Długotrwałe zażywanie leków skutkuje też często wytworzeniem tolerancji i wywołaniem uzależnienia. Następstwem są nierzadko zatrucia osób przyjmujących leki, w tym zatrucia śmiertelne.

Duża różnorodność leków, występowanie wielu preparatów leczniczych w formie mieszanin wieloskładnikowych, różnice w długości czasów działania i eliminacji substancji aktywnych oraz ich metabolitów, a także znaczące różnice w wielkości dawek terapeutycznych sprawiają, że analityk pracujący w laboratorium toksykologicznym staje przed bardzo trudnymi zadaniami identyfikacji i oznaczenia wielu substancji o różnym charakterze chemicznym, na różnych poziomach stężeń, w złożonych matrycach biologicznych. Zadania te są szczególnie trudne w przypadku analizy materiału pobranego pośmiertnie, ponieważ procesy tanatochemiczne prowadzą do zmian w składzie jakościowym i ilościowym płynów ustrojowych i tkanek. Dodatkowo takie zmiany mogą powodować okoliczności poprzedzające zgon, np. pożar czyli działanie wysokiej temperatury czy też fakt długotrwałego przebywania zwłok w wodzie. Z tego też względu w takich przypadkach wskazane jest wykonywanie analiz nie tylko w materiałach klasycznych, do których zalicza się krew i mocz, ale też tzw. materiałach alternatywnych, np. płynie z gałki ocznej, szpiku kostnym lub jego aspiracie.

Mając na uwadze bardzo dużą liczbę potencjalnych analitów we współczesnym laboratorium toksykologicznym, bardzo istotne jest stosowanie metod, które wykorzystują niewielkie ilości materiału biologicznego. Co więcej, standardem w laboratoriach pracujących dla celów sądowych jest pozostawienie części materiału w celu potencjalnego wykonania analizy porównawczej w innym laboratorium, gdyby wynik pierwotny był kwestionowany. Istotnym elementem jest zatem stabilność substancji w analizowanym materiale. W tym kontekście na znaczeniu zyskuje analiza suchych plam krwi (DBS) – jej odwodnienie powoduje spowolnienie lub zatrzymanie procesów metabolicznych, do których zalicza się m.in. hydrolizę, utlenienie czy redukcję. Dzięki temu skład pozostaje niezmienny zarówno podczas transportu do laboratorium, jak i podczas przechowywania. Co więcej, suche plamy krwi mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej, podczas gdy np. krew płynna podlega zamrożeniu na czas przechowywania, co w przypadku niektórych substancji jest niekorzystne (podobnie jak

odmrażanie i ponowne zamrażanie). Dlatego ten rodzaj materiału coraz bardziej zyskuje na popularności.

Mając na uwadze przedstawione powyżej argumenty należy uznać, że problematyka przedstawiona w rozprawie doktorskiej wynika z realnych potrzeb laboratoriów toksykologicznych i podjęcie się przez Doktorantkę badań w tym zakresie należy uznać za w pełni uzasadnione.

Celem wykonanej pracy było bowiem opracowanie metod przygotowania i analiz toksykologicznych krwi i aspiratu szpiku kostnego dla celów sądowych, w których oznaczane były najczęściej zażywane leki z grup BZD, SSRI, SNRI, TCA, *Z-drugs* i AED. Badania zrealizowane zostały w kilku etapach. Najpierw szczegółowo zostały scharakteryzowane plamy krwi naniesione na dedykowane karty DBS i wyznaczony został czas ich schnięcia, a także opracowano strategię przeliczania stężeń analitów w próbkach krwi i aspiratu szpiku kostnego pobranych pośmiertnie i naniesionych na karty DBS. Następnie zoptymalizowano warunki dla metody DBS/LC-MS i przeprowadzono proces jej walidacji w zastosowaniu do oznaczenia wybranych leków psychotropowych w próbkach krwi i aspiratu szpiku kostnego. Kolejnym etapem była optymalizacja warunków przygotowania próbek krwi i aspiratu szpiku kostnego za pomocą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej prowadzonej bezpośrednio z matrycy próbki i poddanych analizom techniką LC-MS oraz wyznaczenie parametrów walidacyjnych tej metody w zastosowaniu do oznaczenia wybranych leków psychotropowych. Końcowym etapem pracy było wykonanie analizy rzeczywistych próbek krwi i aspiratu szpiku kostnego pobranych pośmiertnie przez specjalistów z zakładów medycyny sądowej uniwersytetów medycznych z Krakowa, Katowic i Wrocławia.

Układ pracy i poruszane zagadnienia

Przedłożona do recenzji rozprawa liczy łącznie 146 stron. Wstęp teoretyczny, poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów, liczy 48 stron i składa się z czterech rozdziałów, poświęconych charakterystyce leków i ich metabolitów, różnego typu materiałom biologicznym, technikom izolacji analitów z materiału biologicznego oraz metodom ich analizy. Wstęp jest zatem dobrym

wprowadzeniem do poruszanych w pracy zagadnień, w którym w sposób klarowny omówiono poszczególne aspekty badań. Główny cel pracy, cele szczegółowe i etapy prowadzące do ich realizacji określono prawidłowo. Część doświadczalna została przedstawiona na 66 kartach. Najpierw zostały podane substancje wzorcowe, odczynniki i inne materiały, a także aparatura i pozostały sprzęt używane w pracy. Następnie omówiona została procedura wzbogacania próbek w anality i wzorce wewnętrzne, a także metody prowadzenia obliczeń, w tym użyte do wyznaczania parametrów walidacyjnych. Przedstawiono również kryteria akceptacji parametrów walidacyjnych dla analiz materiału biologicznego. Następnie w sposób zwarty omówiono poszczególne etapy badań obejmujące: wstępną analizę plam krwi z wykorzystaniem obrazowania hiperspektralnego, wyniki optymalizacji metody DBS/LC-MS, opracowanie i zastosowanie metody DBS/LC-MS w oznaczaniu leków psychotropowych, a także opracowanie i zastosowanie metody DI-SPME/LC-MS w oznaczaniu leków psychotropowych, w tym jej zastosowanie w analizie próbek sądowych. Uzyskane wyniki zostały podsumowane i Autorka przedstawiła wnioski końcowe z pracy. Następnie zebrane zostały bibliografia, spis rysunków, spis tabel, a także wykaz prac naukowych, w postaci publikacji naukowych oraz rozdziału w książce, w których współautorką była Doktorantka i które dotyczyły tematyki przedstawionej w dysertacji.

Warto zwrócić uwagę, że Doktorantka jest współautorką pięciu publikacji naukowych oraz rozdziału w książce. Powyższe liczby świadczą o istotności tematyki poruszanej w rozprawie i zainteresowaniu wynikami badań osiągniętych przez Doktorantkę przez różne środowiska naukowe.

Rozprawa napisana jest w sposób bardzo staranny. Należy podkreślić dbałość Doktorantki o formę graficzną pracy oraz stosowane słownictwo. Autorka rozprawy posługuje się poprawną polszczyzną, swobodnie operując nią w złożonej tematyce naukowej. Jest to trudne, ponieważ do języka polskiego przenikają obce, głównie angielskie sformułowania, a dodatkowo wiele pojęć czy nazw technik pomiarowych nie doczekało się oficjalnych polskich odpowiedników. Dzięki temu pracę czytało się z przyjemnością i zainteresowaniem.

Ocena metod badawczych, sposobu przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników

Recenzowana praca miała charakter eksperymentalny. W mojej ocenie badania zostały zaplanowane we właściwy sposób, a dobór analitów, rodzaju eksperymentów oraz aparatury badawczej, jak również sposób przeprowadzenia badań oraz interpretacja uzyskanych wyników były odpowiednie.

Badania eksperymentalne rozpoczęto od scharakteryzowania plam krwi nanoszonych na karty DBS, co pozwoliło na prawidłowe przeprowadzenie analiz ilościowych substancji psychotropowych w tej matrycy. W tym celu wykorzystano obrazowanie hiperspektralne, a do interpretacji wyników zastosowano metody chemometryczne. Wykonane badania dostarczyły informacji o dynamice zmian zachodzących podczas wysychania plam krwi i pozwoliły zidentyfikować obszary homogeniczności próbek. Dzięki temu wyznaczono optymalny czas schnięcia plamy krwi na karcie DBS w warunkach laboratoryjnych i ustalono właściwą część śladu krwi do wycinania próbek do dalszej analizy ilościowej. Kolejne dwa etapy badawcze polegały na oznaczaniu substancji psychoaktywnych z wykorzystaniem techniki LC-MS. Opracowano dwa sposoby przygotowania materiału biologicznego do analizy: technikę DBS i mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME). Dla każdego z nich przeprowadzono walidację w oparciu wytyczne międzynarodowe. Opracowane metody zastosowano w ilościowej analizie substancji psychotropowych we krwi i aspiracie szpiku kostnego pobieranych pośmiertnie w Katedrze Medycyny Sądowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Zastosowanie przez Doktorantkę techniki DBS do badania materiałów alternatywnych pobieranych pośmiertnie należy uznać za innowacyjne, bowiem dotychczas w piśmiennictwie nie opisano metod opartych o technikę suchej kropli krwi służących do oznaczania substancji psychoaktywnych w tego typu próbkach.

Istotnym zagadnieniem poruszonym w dysertacji była próba ograniczenia wpływu zmiennego hematokrytu na wynik badania. Doktorantka w autorski sposób opracowała strategię przeliczania stężenia analitów w przypadku braku informacji na temat poziomu

hematokrytu w badanych próbkach, a jej model obliczeniowy został oparty o pomiar średnic płam krwi. Prawidłowość takiego podejścia została sprawdzona poprzez analizę uprzednio przebadanych próbek krwi w innym laboratorium z użyciem odmiennych metody analitycznej.

W dalszym etapie prac badawczych Doktorantka zastosowała metodę DBS/LC-MS do oznaczania 16 leków psychotropowych, z wykorzystaniem zaproponowanej strategii przeliczania stężeń oraz po nieznacznej modyfikacji procedury przygotowania próbek. Uwagę zwraca, że do badań konieczne było użycie jedynie 50 μ l matrycy biologicznej, co ma ogromne znaczenie w ocenie przydatności opracowanej metody dla celów sądowych.

Autorka pracy podjęła się również opracowania metodologii przygotowania i analizy materiału biologicznego pobranego pośmiertnie za pomocą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej prowadzonej bezpośrednio z matrycy próbki. Użycie tej techniki wymaga przeprowadzenia szeregu prac optymalizujących warunki prowadzenia procesu. Doktorantka dobrała we właściwy sposób czas prowadzenia procesów adsorpcji i desorpcji, a także dopracowała proces czyszczenia włókien w sposób umożliwiający ich ponowne użycie do analiz. Opracowaną metodę DI-SPME/LC-MS użyła do oznaczenia 25 leków psychotropowych w próbkach aspiratu szpiku kostnego pochodzących ze spraw będących przedmiotem ekspertyz w różnych zakładach medycyny sądowej. Zebrane wyniki wskazały na możliwe zastosowanie tej metody do oznaczania wybranych leków na poziomie stężeń terapeutycznych oraz toksycznych. Autorka pracy wykazała, że opracowana metoda jest szybka i pozwala na uproszczenie pracochłonnych i skomplikowanych procesów izolacji analitów ze skomplikowanej matrycy biologicznej. Warto ponownie podkreślić, że również ta metoda wymaga małej objętości próbki (200 μ l), a poprzez odpowiednio wykonane kondycjonowanie oraz czyszczenie włókien SPME możliwe jest ich wielokrotne użycie, co jest zgodne z kryteriami zielonej chemii.

Analiza danych przedstawionych w rozprawie wskazuje jednoznacznie, że doboru metod badawczych dokonywano właściwie do zamierzonego celu. Doktorantka większość procedur analitycznych opracowała samodzielnie i poddała je procesowi walidacji, zanim przystąpiła do badań właściwych. Stosowała się w tym zakresie do wytycznych międzynarodowych towarzystw naukowych i standardów dotyczących jakości badań.

Wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Alicji Majdy oceniam jako bardzo dobrą. Niezależnie od tej oceny, poniżej przedstawiłem kilka komentarzy i uwag do treści pracy, do których Doktorantka może się odnieść podczas publicznej obrony pracy, względnie wykorzystać w dalszych pracach nad badanym zagadnieniem.

1. Wątpliwości wzbudza liczba cyfr znaczących jaką podano dla wyników walidacji, a także wyników badań próbek rzeczywistych. Na przykład w tabeli 24 wszystkie stężenia podano z dokładnością do setnej części ng/ml, podczas gdy odchylenie standardowe opisujące precyzję wynosiło przeciętnie kilka ng/ml (np. stężenie imipraminy podano jako 38,78 ng/ml gdy SD wynosiło 6,12 ng/ml). Podobnie na str. 96 napisano, że „oznaczenie alprazolamu jest możliwe z założoną precyzją dopiero od 23,68 ng/ml”, podczas gdy dopuszczalny błąd precyzji wynosił 15%.
2. Zastanawiające są duże szerokości pików chromatograficznych przedstawionych na Rysunku 28, wskazujące, że substancje wymywane były z kolumny w czasie przekraczającym 1 minutę. W szczególności niepokojący jest kształt pików pochodzącego od imipraminy w próbce 95/17. Dane zawarte w pracy nie pozwalają jednoznacznie ustalić co przedstawiono na chromatogramach, czy obejmują one bardzo szeroki zakres stosunków m/z (np. jak wskazano na stronie 71, od m/z 50 do 800), czy też „detekcja analitów prowadzona była na podstawie czasu retencji (*sic!*) i intensywności sygnałów $[M+H]^+$ w zakresie m/z 237 – 337” (strona 70). Dodatkowo zwraca uwagę, że na stronie 99 przedstawiono widmo masowe, w którym zakres m/z wynosił 250 – 300.
3. Niektóre wybrane przez Doktorantkę parametry są dość niestandardowe, np. wskazany zakres m/z 237 – 337 (str. 70) czy dodanie 16,3 μ l wzorców wewnętrznych (str. 103). Czy były one wynikiem badań optymalizacyjnych?
4. Wydaje się, że dobór próbek krwi do badania wpływu hamatokrytu mógł być lepszy – dwie z trzech próbek miały bowiem zbliżoną wartość tego parametru (45 i 47), co przełożyło się na brak statystycznie istotnych różnic w średnicy płam krwi dla tych próbek.
5. Klasyfikacja próbek w oparciu o analizę wizualną obrazu hiperspektralnego jest z założenia subiektywna, jednak na Rysunku 12 trudno zauważyć różnicę między parami próbek 16-17 a 18-19.
6. Autorka pracy nie podała wyników badania próbek aspiratu szpiku kostnego w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich

we Wrocławiu, co nie pozwala na ocenę ich zgodności z wynikami uzyskanymi przez Autorkę pracy, a przedstawionymi w Tabeli 24.

7. Czy Autorka pracy prowadziła badania z użyciem innych włókien niż SPME-LC 45µm C18, czy też wybrała je wyłącznie z uwagi na to, że jest ono „najpowszechniejszym wyborem dla zastosowań bioanalitycznych”? (str. 111).
8. Wątpliwości wzbudzają niektóre użyte przez Autorkę pracy sformułowania, np. „sprzężenie z glukoronidami” (str. 19), „z czasowym analizatorem przelotu (TOF)” (str. 70), czy „powierzchnię względną pików pochodzących od pola powierzchni pod pikiem (...)” (str. 73). W pracy zauważono też błędy literowe, np. niewłaściwa jest nazwa podtytułu 1.3 na str. 29 (i w spisie treści), nie wyjaśniono co oznacza „5-HT”, skrót „CNS” objaśniony jest jedynie w treści pracy. Braki i powtórzenia zauważono również w wykazie prac naukowych Autorki, tj. brak jest nazw części czasopism, powtórzono inicjały jednego z autorów czy nazwisko jednej z autorek.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości pracy, którą jak podałem powyżej oceniam bardzo dobrze.

Podsumowanie

Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pani mgr Alicja Majda posiada dużą wiedzę na temat leków psychotropowych i ich metabolitów, dobry warsztat analityczny, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić badania z wykorzystaniem nowoczesnej, zaawansowanej aparatury oraz zinterpretować uzyskane wyniki. W sposób właściwy odniosła wyniki badań własnych do danych literaturowych, krytycznie podchodząc do własnych odkryć i wykazując należyłą ostrożność w wyciąganiu wniosków. Uwagę zwraca szeroki wachlarz metod przygotowania próbek wykorzystany przez Doktorantkę, umiejętność doboru aparatury badawczej, optymalizacji warunków prowadzenia procesów i docieklivy sposób analizowania uzyskanych wyników.

Rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Majdy zawiera wiele elementów nowości, z których najważniejsze wydaje się użycie obrazowania hiperspektralnego wspomaganego analizą chemometryczną do analizy procesów zachodzących w krwi po jej naniesieniu na karty DBS, mające na celu określenie czasu powstania plamy krwi, a także wykazanie przydatności analizy aspiratu szpiku kostnego dla celów sądowych.

W pracy przedstawiono też wiele aspektów analitycznych dotyczących nowoczesnych metod ekstrakcji, w szczególności techniki DBS i mikroekstrakcji do fazy stałej. Wyniki przedstawione przez Doktorantkę będą z pewnością zachętą dla wielu badaczy do wykorzystywania techniki suchej kropli krwi w praktyce opiniodawczej.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej 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. z 2017 r., poz. 1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) i stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Alicji Majdy do publicznej obrony.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę poziom naukowy i jakość rozprawy doktorskiej, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Alicji Majdy.

