

**Ocena**  
**pracy doktorskiej mgr Agnieszki Moos pt. „Analiza alternatywnych materiałów**  
**biologicznych na potrzeby ekspertyzy toksykologicznej”**

Przesłana mi do oceny rozprawa doktorska wykonana została pod kierunkiem Pana Profesora Pawła Kościelniaka i Pani Profesor Małgorzaty Kłys. Badania prowadzono w Pracowni Chemii Sądowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego we współpracy z Pracownią Toksykologii Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Praca posiada układ poszczególnych rozdziałów typowy dla większości prac doktorskich, tj. składa się z Części teoretycznej, Części doświadczalnej, Wyników, Dyskusji, Wniosków, Bibliografii, Streszczenia i Załączników.

Przedstawiono obszerny materiał eksperymentalny, wykonany z udziałem różnych leków psychotropowych z zastosowaniem wysokozaawansowanych, sprzężonych technik separacyjnych w alternatywnych materiałach biologicznych (w płynie z jamy ustnej i w płynie łzowym) oraz we krwi.

Praca jest obszerna (195 stron, bez załączników), przy czym napisana jest w sposób spójny, a przegląd literatury, dotyczący zastosowania MEPS i HPLC do oznaczania leków w alternatywnym materiale biologicznym, jest przedstawiony w formie tabelarycznej.

W celu pracy Pani mgr Agnieszka Moos jasno przedstawiła zakres badań dotyczących opracowania procedur analitycznych do oznaczania leków psychotropowych z grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, benzodiazepin, selektywnych inhibitorów zwrotnego wychwytu serotoniny oraz serotoniny i noradrenaliny i leków nasennych nowej generacji tzw. leków „Z”. Do wydzielania analitów zastosowała technikę mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie (MEPS), a do oznaczeń analitów techniki HPLC-UV, UHPLC-MS, LC-MS/MS oraz CE-UV. Na każdym etapie badań zaplanowała dobór warunków wydzielania i oznaczania oraz walidację opracowanych procedur.

W części pracy zatytułowanej „Wprowadzenie” omówiono leki będące przedmiotem badań, pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i działania na organizm człowieka. Omówiono również badane płyny ustrojowe, tj. płyn z jamy ustnej i płyn łzowy oraz krótko krew, którą w pracy zastosowano jako tzw. materiał odniesienia. Kolejno przedstawiono techniki izolacji leków psychotropowych z materiału biologicznego, a szczegółowo omówiono mikroekstrakcję na upakowanym sorbencie (MEPS).

Pozytywnie oceniam przedstawioną „Część teoretyczną”, chociaż w tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, że w tytułach Tabeli 1.1, Tabeli 1.6 i Tabeli 1.10 podpisano, że podane zostały maksymalne dawki leków, jednakże w wymienionych tabelach brak takich danych.

W obszernej części doświadczalnej kolejno opisano badania nad opracowaniem procedur dla oznaczania wymienionych w celu pracy leków. Autorka zaplanowała zastosowanie techniki mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie do wydzielania badanych leków z płynu z jamy ustnej i płynu łzowego. Już początkowe badania wykazały, że proces ten musi być poprzedzony wstępnym przygotowaniem próbek. Zbadano więc wpływ wirowania, filtracji, ultradźwięków na możliwości usunięcia substancji przeszkadzających z płynów z jamy ustnej (przebadano 12 procedur) oraz przebadano różne warunki wirowania w celu usunięcia interferentów z płynu łzowego.

Kolejno opracowano procedury izolacji i oznaczania:

- w płynie z jamy ustnej trzech grup leków:
  - trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (amitryptyliny, dezypraminy, doksepiny, nortryptyliny, nordoksyny i imipraminy)
  - benzodiazepin (alprazolanu, diazepam, estazolamu, klonazepam, lorazepam i tetrazepam)
  - selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego monoamin (SSRI i SNRI)
- w płynie łzowym
  - benzodiazepin
- w krwi
  - benzodiazepin
  - leków „Z”.

W procedurach ekstrakcji analitów z płynów alternatywnych najwięcej uwagi poświęcono technice mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie (MEPS). Z uwagi na mniejsze ilości materiałów do badań w porównaniu z innymi płynami ustrojowymi, takie

założenie było interesujące, wzięto również pod uwagę stronę ekonomiczną i ochronę środowiska (mniejsze zużycie rozpuszczalników). Badania prowadzono zarówno manualnie, jak również w trybie zmechanizowanym, a dla poprawy komfortu i jakości pracy zaprojektowano stół na potrzeby badań do mechanicznego zestawu ekstrakcyjnego. Badania prowadzono z zastosowaniem sorbentów, które dobierano pod kątem właściwości ekstrahowanych leków. Przebadano różne sposoby kondycjonowania złoża odpowiednimi rozpuszczalnikami lub ich mieszaninami, jak również rodzaje eluentów do wymywania analitów.

We wszystkich tych eksperymentach badano wydajność procedur ekstrakcyjnych i przy opracowywaniu sposobów wydzielenia i zateżnienia brano pod uwagę możliwość wielokrotnego zastosowania sorbentów. Takie szerokie badania różnych parametrów ekstrakcji były pracochłonne i czasochłonne, a często ta część eksperymentów jest niedoceniana gdyż z założenia nowe techniki analityczne rodzą nadzieję prostej obsługi i wysokiej efektywności.

Kolejno opracowano metody analityczne do równoczesnego oznaczania obok siebie badanych leków. W literaturze naukowej niewiele jest doniesień na temat oznaczania badanych przez Doktorantkę leków w przygotowanych mieszaninach, a dotyczą głównie oznaczeń w innych materiałach biologicznych lub inne są techniki ekstrakcji. Do oznaczania wyżej wymienionych trzech grup leków w płynie z jamy istnej opracowano metody HPLC-UV, UHPLC-MS i CE-UV. W tej ostatniej nie było potrzeby ekstrakcji analitów. Do oznaczania benzodiazepin w płynie łzowym opracowano metodę z zastosowaniem techniki UHPLC-MS, a w badaniach dwóch grup leków w krwi stosowano technikę LC-MS/MS, po uprzedniej ekstrakcji techniką SPE.

We wszystkich opracowanych metodach przeprowadzono walidację z obszerną dokumentacją wyników.

Szczególne uwagi chciałabym zwrócić na badania prowadzone na próbkach rzeczywistych, pochodzących od pacjentów lub wolontariuszy, czy z materiału sekcyjnego. W takich materiałach z pewnością dużym utrudnieniem są niskie koncentracje badanych leków, często znacznie mniejsza ilość materiału niż w badaniach próbek modelowych lub brak wiedzy na temat czasu przebywania leku w organizmie.

W rozdziale pracy doktorskiej zatytułowanym „Wyniki” przedstawiono kolejno dla badanych płynów ustrojowych metodykę opracowywanych sposobów ekstrakcji oraz oznaczeń i otrzymane wyniki wraz z ich omówieniem. Szczególnie interesujący jest sposób

prezentacji wyników badań – w kolejnych etapach pracy Doktorantka dokonuje podsumowania tych badań, co tworzy spójną całość dla danego fragmentu rozprawy.

W rozdziale „Dyskusja” przedstawiono zalety opracowanych procedur ekstrakcji i siedmiu metod oznaczania badanych leków psychotropowych na tle wyników innych badaczy. Zwrócono jednak również uwagę na konieczność dalszych badań celem poprawy efektywności i czułości niektórych oznaczeń w opracowanych przez Panią mgr Agnieszkę Moos metodach.

Jak wynika z ogromnego materiału doświadczalnego, opracowane metody umożliwiają wykorzystanie płynu z jamy ustnej i płynu łzowego dla celów ekspertyzy toksykologicznej, ale z pewnością również mogą być stosowane w analizie klinicznej. Niewielka ilość potrzebnego do badań materiału pobieranego nieinwazyjnie, stanowi bezsprzecznie zaletę w stosunku do innych metod, wymagających pobierania krwi.

O naukowej wartości pracy świadczą opracowane skuteczne metody izolowania badanych leków z próbek biologicznych techniką MEPS i nowatorskie metody ich oznaczeń. Za pomocą techniki MEPS/UHPLC-MS można oznaczyć z najlepszą czułością trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne w płynie z jamy ustnej oraz benzodiazepiny w płynie łzowym. Technika CE-UV można oznaczyć TLPD w płynach alternatywnych bez uciążliwej ekstrakcji, co z pewnością zainicjuje dalsze badania analityków, nie tylko w kraju. Aby móc porównać wyniki oznaczeń wybranych leków zarówno w krwi, jak i w płynie z jamy ustnej w próbkach rzeczywistych od pacjentów opracowano metodę oznaczania benzodiazepin i leków „Z” we krwi metodą SPE/LC-MS/MS (łącznie 23 leków). Wykorzystano opracowaną wcześniej przez innych autorów technikę SPE do ekstrakcji, natomiast Doktorantka przeprowadziła optymalizację i walidację metody LC-MS/MS. W oparciu o opracowaną procedurę SPE/LC-MS/MS przeprowadzono analizę 5 próbek krwi (2 pobranych przyżyciowo i 3 krwi sekcyjnej). Zastosowanie deuterowanych pochodnych analitów jako wzorców wewnętrznych pozwoliło rozwiązać problem efektów matrycowych podczas oznaczeń.

W oparciu o opracowane w niniejszej rozprawie metody poddano analizie również próbki krwi i próbki płynu z jamy ustnej pochodzące od tych samych pacjentów zażywających 2 leki psychotropowe (9 próbek krwi, 9 próbek płynu z jamy ustnej). W przypadku diazepamu wykazano korelację pomiędzy stężeniem tego leku w obu rodzajach badanych płynów. Stwierdzono również we krwi metabolit diazepamu. Drugi z leków, lorazepam oznaczono tylko w krwi.

Te niezwykle ciekawe badania otwierają nowe możliwości śledzenia dystrybucji i metabolizmu leku w organizmach pacjentów. Stwierdzam więc z pełnym przekonaniem, że opracowane przez Doktorantkę procedury przygotowania próbek płynów fizjologicznych, opracowane i zwalidowane nowe metody analityczne stanowią wartościowy materiał o dużym potencjale nowości naukowej.

Jednakże z obowiązku recenzent pragnę zaznaczyć uwagi pod dyskusję i w celu poprawy drobnych błędów.

1. Dlaczego w badaniach krwi stosowano technikę SPE, a nie opracowaną wcześniej i opisaną przez Zespół Pana Profesora Pawła Kościelniaka (w tym mgr Agnieszkę Moos) w Anal. Bioanal. Chem. (2012) technikę MEPS do izolacji leków psychotropowych z surowicy krwi?
2. Na stronie 115 – jest: „Punkty wykresów wyznaczono jednokrotnie”. Co to znaczy?
3. Na stronie 120 – jest „leki o charakterze zasadowym  $pK_a < 3,3$ ”  
Na stronie a 133 – jest „leki o charakterze zasadowym  $pK_a > 8,5$ ”  
Na stronie 26 – w Tabeli 1.7 „ $pK_a=1,5/10,5; 1,3/11,5$ ” – co te wartości oznaczają?
4. W pracy zauważono kilka błędów redakcyjnych, np.  $PO_4^-$  zamiast  $PO_4^{3-}$ , mamy zamiast omamy.  
W spisie skrótów jest dwukrotnie Clo – zarówno dla klomipraminy i klomazepamu.  
Brak w skrótach Nord, a jest w tekście.  
W tekście objaśniano powtórnie skróty, które wcześniej zamieszczono w wykazie skrótów.
5. Na stronie 170 jest: „... mikroekstrakcję na upakowanym sorbencie stosowano do izolacji leków z różnych grup”.  
Są tam cytowane głównie prace autorów zagranicznych, a w tym miejscu chciałabym zaprosić również do lektury prac autorów z zaprzyjaźnionej Politechniki Śląskiej:
  - a) Sylwia Magiera, Şefika Gülmez, Aleksandra Michalik, Irena Baranowska, Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed sorbent for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 2013, 1304, 1–9.
  - b) Sylwia Magiera, Irena Baranowska, A new and fast strategy based on a semi-automatic microextraction by packed sorbent followed by ultra-high performance

liquid chromatography for analysis of drugs and their metabolites in human urine, Journal of Separation Science, 2014, 37, 3314–3320.

- c) Sylwia Magiera, Fast, simultaneous quantification of three novel cardiac drugs in human urine by MEPS-UHPLC-MS/MS for therapeutic drug monitoring, Journal of Chromatography B, 2013, 938, 86–95.
- d) Sylwia Magiera, Jacek Kusa, Evaluation of a rapid method for the therapeutic drug monitoring of aliskiren, enalapril and its active metabolite in plasma and urine by UHPLC-MS/MS, Journal of Chromatography B, 2015, 980, 79–87.

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Moos, w której zrealizowano wszystkie ambitne cele przedłożone w założeniach pracy. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną, wykonała ogromną pracę eksperymentalną, omówiła wyniki badań w sposób wyjątkowo obiektywny i sprecyzowała wnioski. Część wyników opublikowała w bardzo dobrych czasopismach. Według mojej opinii przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. (Art. 13) o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Moos do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

