

**Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES**

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

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Moos pt.**

*Analiza alternatywnych materiałów biologicznych na potrzeby ekspertyzy toksykologicznej*

**Charakterystyka i znaczenie problemu naukowego**

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Moos były leki psychotropowe, takie jak trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (TLPD), benzodiazepiny (BZD), selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) oraz serotoniny i noradrenaliny (SNRI), jak również tzw. leki „Z”. Są one stosowane w leczeniu różnych zaburzeń psychicznych. Substancje z poszczególnych grup różnią się działaniem, zakresem zastosowania, a także bezpieczeństwem dla pacjenta. TLPD zostały wprowadzone do leczenia w latach pięćdziesiątych XX wieku i cechują się względnie wysoką toksycznością – dawka toksyczna jest tylko kilkukrotnie większa od maksymalnej dawki terapeutycznej. W dużych dawkach hamują działanie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), czego efektem mogą być zaburzenia funkcjonowania układu sercowo-naczyniowego. BZD są uważane za bezpieczne leki o działaniu przeciwlękowym, nasennym, rozluźniającym mięśnie, przeciwdrgawkowym i amnezyjnym, jednak ich przyjmowanie może powodować powstanie zależności psychicznej i fizycznej, a także rozwój tolerancji. Lekami psychotropowymi nowej generacji są inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny oraz serotoniny i noradrenaliny, jak również tzw. leki „Z” i są one obecnie najczęściej zapisywane pacjentom z zaburzeniami psychicznymi.

Leki psychotropowe wpływają na funkcjonowanie OUN, czego efektem są czasowe zmiany postrzegania, nastroju, świadomości i zachowania. Jest to istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa w ruchu drogowym czy w pracy. Zaburzenia sprawności psychomotorycznej mogą mieć negatywny wpływ nie tylko na kierującego czy operatora maszyny, ale pośrednio również na innych uczestników ruchu drogowego czy współpracowników. Dlatego bardzo

istotne jest badanie kierowców i pracowników pod kątem obecności w ich organizmie środków obniżających sprawność. W chwili obecnej największą uwagę poświęca się kontrolowanym środkom odurzającym i substancjom psychotropowym, zwanych powszechnie narkotykami, oraz ich niekontrolowanym pochodnym, określanym w Polsce jako dopalacze. Niemniej jednak mając na uwadze dużą i stale rosnącą liczbę osób przyjmujących leki psychotropowe, należy uznać, że praca Pani mgr Agnieszki Moos wpisuje się w aktualne, a nawet przyszłe zapotrzebowania i wyniki zawarte w rozprawie mają szansę zostać wykorzystane w praktyce do kontroli kierujących i pracowników. Ponieważ część leków psychotropowych może powodować uzależnienie psychiczne i fizyczne, a także tolerancję, istotne jest monitorowanie ich stężeń u pacjentów przyjmujących te leki ze wskazań lekarskich.

Większość metod opracowanych przez Doktorantkę przeznaczonych jest do badania materiałów alternatywnych: płynu z jamy ustnej oraz płynu łzowego. Płyn z jamy ustnej jest od kilku lat wykorzystywany w praktyce do wykrywania tzw. środków działających podobnie do alkoholu u uczestników ruchu drogowego. Dla wykazania obecności leków psychotropowych dostępne są jedynie testy dla benzodiazepin. Analizatory stosowane przez policję przy drodze wykorzystują metody immunochemiczne, a uzyskany wstępnie wynik dodatni musi być potwierdzony badaniami laboratoryjnymi ze względu na ograniczoną selektywność tego typu metod. Jedną z metod opracowanych przez Doktorantkę dotyczyła oznaczania benzodiazepin w próbkach płynu łzowego, który praktycznie nie jest stosowany w badaniach klinicznych i sądowych, a jednocześnie posiada wiele zalet, w tym nieinwazyjny charakter pobrania. Z powyższych względów, metody analityczne opracowane i przedstawione przez Doktorantkę mają duże szanse na wykorzystanie w przyszłości w praktyce diagnostycznej w laboratoriach klinicznych i sądowych.

### **Struktura pracy**

Praca została podzielona na 15 rozdziałów zawierających teoretyczne podstawy przeprowadzonych badań oraz omówienie wyników doświadczalnych, jak również wstęp, cel badań, dyskusję i wnioski. Konstrukcję pracy należy uznać za właściwą. Pierwsze cztery rozdziały są wprowadzeniem do zagadnień objętych badaniami. Omówiono w nich przedmiot badań – wybrane leki psychotropowe, rodzaje materiałów biologicznych wykorzystywanych

przez Doktorantkę, techniki ekstrakcji wybranych leków z materiału biologicznego oraz metody analityczne stosowane w analizie leków psychotropowych. Dla poszczególnych grup leków opisane zostało działanie na organizm człowieka, ich toksyczność, stężenia występujące we krwi po przyjęciu w celach terapeutycznych i stwierdzone w przypadkach zatruc, jak również metabolizm (na wybranym przykładzie). Opis materiału biologicznego zawiera szczegółowe informacje na temat składu i mechanizmu powstawania płynu z jamy ustnej i płynu łzowego oraz krwi. Przy omawianiu technik izolacji szczególną uwagę Doktorantka poświęciła mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie (MEPS), która jest nowoczesną, przyjazną środowisku techniką ekstrakcji. W tabeli 3.1 zestawiła kilkanaście przykładowych zastosowań techniki MEPS do izolacji leków z materiału biologicznego. Przy opisie metod analitycznych stosowanych w badaniach Doktorantka skupiła się na technikach separacyjnych, wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz elektroforezie kapilarnej. Następnie przedstawione zostały odczynniki, materiały, aparatura i inny sprzęt laboratoryjny, jak również wybrane metody obliczeniowe wykorzystywane w badaniach.

Wyniki badań przedstawiono z podziałem na opracowane metody analityczne. Duża część pracy została poświęcona wynikom wyboru i optymalizacji wstępnego przygotowania próbek oraz procedury ekstrakcyjnej. Następnie omówione są procedury pomiarowe, dla których podano wyniki walidacji. Dla części opracowanych metod przedstawiono wyniki analizy autentycznego materiału biologicznego.

Praca liczy 195 kart, z których 88 zajmuje wprowadzenie do tematyki badań. Zawiera ona również wykaz skrótów, spis rysunków i tabel. W pracy znajduje się aż 178 odnośników literaturowych, co świadczy o szerokim rozeznaniu tematyki badawczej przez Doktorantkę. Dobór pozycji literaturowych należy uznać za właściwy. Pracę uzupełnia 5 załączników dotyczących badań z udziałem probantów.

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

## Ocena metod badawczych, sposobu przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników

Recenzowana praca miała charakter eksperymentalny. Należy stwierdzić, że badania zostały zaplanowane w sposób przemyślany, a dobór substancji, rodzaju eksperymentów oraz aparatury badawczej, jak też sposób przeprowadzenia badań oraz analiza uzyskanych wyników były właściwe.

W ramach pracy doktorskiej opracowanych zostało siedem procedur analitycznych. Analitami były leki z kilku grup: trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny, selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny, leki z grupy benzodiazepin oraz leki „Z”. Związki te analizowano w klasycznym materiale biologicznym, tj. krwi, oraz dwóch materiałach alternatywnych: płynie z jamy ustnej i płynie łzowym. Do ekstrakcji analitów wykorzystano dwie techniki: mikroekstrakcję na upakowanym sorbencie (MEPS) oraz ekstrakcję do fazy stałej (SPE). Rozdział prowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, UHPLC) oraz elektroforezy kapilarnej (CE), a do detekcji analitów zastosowano spektrofotometr lub spektrometr mas typu kwadrupol – analizator czasu przelotu (QTOF) względnie typu potrójny kwadrupol.

Opracowanie metod Doktorantka rozpoczęła od optymalizacji sposobu wstępnego przygotowania próbek płynu z jamy ustnej do mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie. W tym celu przetestowała możliwość użycia wirowania, filtrowania, wykorzystania probówek Salivette i działania ultradźwięków, który to proces prowadziła w różnych temperaturach. Najlepsze rezultaty pod względem wydajności ekstrakcji, powtarzalności wyników i żywotności sorbentów uzyskano działając na próbki ultradźwiękami oraz wirując je w obniżonej temperaturze, dlatego stosowano tę procedurę w dalszych badaniach.

Oznaczanie TPLD w płynie z jamy ustnej prowadzono trzema metodami analitycznymi: MEPS/HPLC-UV, MEPS/UHPLC-MS oraz CE-UV. Zaletą tej ostatniej metody było ominięcie etapu ekstrakcji analitów, co znacznie uprościło tok postępowania i skróciło czas analizy. Metoda ta cechowała się jednak słabą czułością. Granice oznaczalności metody CE-UV były w zakresie 60 – 330 ng/ml, MEPS/HPLC-UV: 3,7 – 31 ng/ml, a metody MEPS/UHPLC-MS: 0,03 – 0,14 ng/ml. Metoda MEPS/HPLC-UV była więc kilkanaście, a metoda MEPS/UHPLC-MS kilkaset razy czulsza niż metoda CE-UV. Tę ostatnią metodę zastosować można zatem jedynie celem weryfikacji zatrucia, natomiast do kontroli stężeń terapeutycznych konieczne byłoby zastosowanie metod chromatograficznych. Ograniczeniem metody MEPS/UHPLC-MS

jest wąski zakres liniowości detektora, nie pokrywający w całości zakresu stężeń TLPD występujących w płynie z jamy ustnej, przez co w niektórych przypadkach konieczne byłoby zastosowanie rozcieńczenia próbki. Poprawę stosunkowo niskiej precyzji tej metody Autorka chciała dokonać poprzez automatyzację etapu przygotowania próbek z użyciem pompy strzykawkowej.

Metoda MEPS/HPLC-MS została również opracowana i zoptymalizowana do analizy ilościowej sześciu leków z grupy pochodnych benzodiazepiny w płynie z jamy ustnej. W trakcie badań testowano osiem procedur ekstrakcyjnych i dwa rodzaje sorbentów. Wyniki walidacji oraz badań próbek autentycznych potwierdziły, że metoda ta jest właściwa do zamierzonego celu i może stać się przydatnym narzędziem w analizach kliniczno-sądowych.

Również analizę ilościową leków z grup SSRI i SNRI przeprowadzono metodą MEPS/HPLC-MS. Wcześniej sprawdzono wydajność ekstrakcji przy użyciu różnych roztworów na etapach kondycjonowania i przemywania sorbentu oraz elucji analitów, jak również przetestowano dwa różne rodzaje sorbentów. Parametry walidacyjne metody były zadowalające dla większości związków z wyjątkiem sertraliny. Opracowaną metodę zastosowano do analizy autentycznych próbek pacjentów Oddziału Psychiatrii Dorosłych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, potwierdzając przydatność metody w praktyce.

Za nowatorską należy uznać opracowaną metodę MEPS/HPLC-MS oznaczania benzodiazepin w płynie łzowym. Sposób przygotowania próbek płynu łzowego do mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie okazał się znacznie prostszy i krótszy w porównaniu do metodyki przygotowywania próbek płynu z jamy ustnej i obejmował jedynie proces wirowania w obniżonej temperaturze. Procedura ekstrakcyjna MEPS, uprzednio stosowana do oznaczania benzodiazepin w płynie z jamy ustnej, została zmodyfikowana ze względu na małą objętość próbek płynu łzowego. Badania z udziałem probanta potwierdziły, że opracowana metoda jest właściwa do zamierzonego celu.

Z kolei metoda SPE/LC-MS-MS została opracowana dla największej liczby analitów – 23 leków z grupy benzodiazepin i ich metabolitów oraz leków „Z”. Dla tej metody największym problemem był wpływ matrycy, który udało się zredukować poprzez zastosowanie jako wzorce wewnętrzne deuterowanych pochodnych analitów. Metodę tę użyto z powodzeniem do badania próbek krwi nadesłanych do Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UJ CM celem wykonania ekspertyzy.

Recenzowana praca zawiera elementy nowości. Doktorantka na etapie przygotowania próbki do badań stosowała mikroekstrakcję na upakowanym sorbencie (MEPS), która została wprowadzona do użycia kilka lat temu i umożliwia zmniejszenie objętości próbki poddawanej ekstrakcji i rozpuszczalników stosowanych w procedurze ekstrakcyjnej, nie tylko w stosunku do tradycyjnej ekstrakcji ciecz – ciecz, ale również w porównaniu do ekstrakcji do fazy stałej. Przeprowadzona przez Doktorantkę mechanizacja MEPS wpłynęła korzystnie na jakość i komfort pracy analityka. Dotychczas technikę MEPS zastosowano do izolacji wybranych leków znieczulających, opioidowych leków przeciwbólowych, leków 3-adrenolitycznych, beta-blokerów, leków cytostatycznych oraz psychotropowych, przy czym analizie poddawane były głównie takie materiały jak krew i mocz. Doktorantka zaproponowała metodę oznaczania leków psychotropowych w próbkach płynu łzowego. Opracowanie metody MEPS/UHPLC-MS oznaczania benzodiazepin w próbkach płynu łzowego i jej zastosowanie do badania autentycznych próbek należy uznać za istotne osiągnięcie, ponieważ płyn łzowy jest dotychczas w niewielkim zakresie stosowany w badaniach toksykologicznych. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę winny zachęcić innych badaczy do szerszego stosowania tego materiału biologicznego w analizach prowadzonych w celu wykrycia czy potwierdzenia zatrucia lub też monitorowania stężeń leków u leczonych pacjentów.

Doktorantka analizowała próbki za pomocą czterech technik analitycznych: CE-UV, HPLC-UV, UHPLC-MS i LC-MS/MS. Elektroforeza kapilarna jest wykorzystywana w laboratoriach toksykologicznych stosunkowo rzadko. Doktorantka wykazała, że posiada ona duży potencjał w oznaczaniu leków psychotropowych, co daje nowe możliwości w porównaniu z rutynowo stosowanymi technikami chromatograficznymi. Główną zaletą zaproponowanej przez Doktorantkę procedury z wykorzystaniem metody CE-UV była jej prostota, wynikająca z braku konieczności izolacji analitów z próbek biologicznych, co dodatkowo skracało czas analizy. Doktorantka miała możliwość wykorzystania jedynie detektora spektrofotometrycznego, który cechował się stosunkowo słabą czułością i wysokimi granicami wykrywalności i oznaczalności, przez co nie było możliwe jego wykorzystanie w analizie alternatywnych materiałów biologicznych u osób, które przyjęły dawki terapeutyczne leków. W przypadku metody CE-UV możliwe jest jedynie oznaczenie analitów (trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych) w przypadku zatruc. W większości przypadków najlepsze wyniki uzyskano stosując metodą UHPLC-MS, w której wykorzystano nowoczesny spektrometr mas typu kwadrupol – analizator czasu przelotu (QTOF).

Przy wyborze procedur wstępnego przygotowania próbek do badań oraz technik izolacji Doktorantka zwracała uwagę na aspekt praktyczny, wyrażający się prostotą wykonywanych czynności, krótkim czasem procedury czy zużywaniem niewielkich ilości rozpuszczalników. To istotne elementy tzw. zielonej chemii, będącej ważnym elementem rozwoju chemii analitycznej. Wyraża się ona dbałością zarówno o środowisko naturalne, jak i analityka. Wszystkie procedury zaproponowane w pracy należy uznać za przyjazne środowisku i analitykowi.

### **Uwagi szczegółowe**

Wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Moos. Niezależnie od tego, mam kilka uwag do treści pracy, które pozwoliłem sobie przedstawić poniżej.

- Wykaz skrótów odbiega od wysokich standardów pracy. Zdarzają się w nim pomyłki (jednakowy skrót dla klomipraminy i klonazepamu), „zjedzona” część nazwy (kwas  $\gamma$ -aminomasłowy), brak polskich tłumaczeń dla części skrótów (np. SPX, MRM) czy brak skrótów nazw benzodiazepin i leków „Z”, dla których wyniki badań opisano w rozdziale 14 (kilkanaście związków), nazwy metody DART-TOF z tabeli 3.1 czy detektora QTOF stosowanego przez Autorkę pracy.
- Z opisu i zastosowanego skrótu HPLC-UV wynika, że do optymalizacji metody oznaczania TLPD w próbkach z jamy ustnej stosowano „klasyczny” wysokosprawny chromatograf cieczowy, jednak w legendzie rysunku 8.1 znajduje się informacja, że był to ultrawysokosprawny chromatograf cieczowy. Jakiej klasy był to więc chromatograf?
- W pracy podano zakresy stężeń terapeutycznych i toksycznych wybranych leków we krwi. Nie zawiera ona jednak takich danych dla materiałów alternatywnych, mimo, że w niektórych przypadkach odwoływano się do danych literaturowych na ten temat.
- Czy płyn z jamy ustnej rzeczywiście cechuje się krótszym oknem detekcji w porównaniu do krwi? (strona 36)
- W tabeli 4.1 Autorka użyła określeń „włosy postmortem” (strona 66) oraz „krew postmortem” (strona 68). W tym drugim przypadku badano również żółć i ciało szkliste oka. Czy materiały te nie były też pobrane pośmertnie?

- Electrospray (np. strona 80) ma swoją polską nazwę: rozpylanie w polu elektrycznym.
- Materiały użyte do badań, przedstawione w tabeli 8.2 (strona 84) mogły być podane alfabetycznie. Brak sortowania doprowadził do powtórzenia (próbówki Salivette).
- Definicja precyzji przedstawiona na stronie 87 jest chaotyczna; podano, że powtarzalność i odtwarzalność obliczano jako powtarzalność uzyskiwanych stężeń analitów w próbkach.
- Na rysunku 10.3 i dalszych przedstawiających wartości wydajności ekstrakcji narysowano linię poziomą będącą średnią dla wybranej procedury. Nie jest to jednak wyjaśnione ani w opisie rysunków ani w tekście.
- Czy wydajność procesu ekstrakcji przy użyciu sorbentów BIN zależała od ich zużycia? Jeśli tak, a wynika to z treści pracy (strona 96, 100), to w jaki sposób uwzględniano to w opracowaniu wyników?
- Dla metody MEPS/HPLC-UV podano (strona 98), że detekcję prowadzono przy długościach fal 210 i 254 nm. Którą długość fali stosowano w badaniach? Czy selektywność zależała od długości fali?
- Przy optymalizacji warunków rozdziału TLPD metodą CE-UV nie podano funkcji optymalizacyjnej czy innego kryterium, które służyło do porównania wyników uzyskanych w różnych warunkach.
- W pracy nie wyjaśniono w jaki sposób wybierano niski, średni i wysoki poziom stężeń do oceny precyzji metod. W niektórych przypadkach wybór niskiego poziomu budzi wątpliwości, np. dla metody MEPS/UHPLC-MS oznaczania TLPD w płynie z jamy ustnej granice oznaczalności (LOQ) były na poziomie 0,03 – 0,14 ng/ml, zakres liniowości od LOQ do 10 ng/ml, a jako niski poziom stężenia przyjęto 2,0 ng/ml.
- W niektórych przypadkach, np. tabeli 10.8 (strona 114), wątpliwość budzi liczba miejsc znaczących użytych do określenia granic oznaczalności, mając na uwadze precyzję ich wyznaczenia.
- Przy ocenie selektywności metody Autorka pracy sprawdzała, czy na wyniki badań nie wpływa matryca. W pracy nie podano natomiast czy oceniano wpływ innych związków, które mogą występować w próbkach materiału biologicznego, w szczególności inne leki oraz ich metabolity (*vide* rysunek 10.13, strona 116, gdzie zauważalna jest koelucja dezypraminy i imipraminy).



- W pracy nie przedstawiono w jaki sposób wyznaczono liniowość (np. strona 139). Czy użyte zostały w tym celu jakieś testy statystyczne? Czy określono całkowity zakres liniowości detektora czy też sprawdzano czy wykres jest liniowy w testowanym obszarze?
- Jako dolny zakres liniowości Autorka pracy określała wartość granicy oznaczalności. Czy wzorce o takich stężeniach analitów były używane na tym etapie walidacji?
- W cytowaniach bibliografii znajdują się nieliczne błędy, np. brak numerów tomu i stron dla pracy [36], brak daty odczytu w pozycji [106], różny format cytowania czasopisma *Problems of Forensic Sciences* – pozycje [140] i [144], niepotrzebne dodanie stron www względnie numeru DOI do prac o numerach [148], [163], [164] i [177].

W pracy znalazło się też kilka innych drobnych błędów (np. kwas fosforanowy(V) na stronie 97), których występowanie jest w pełni zrozumiałe, jeśli weźmie się pod uwagę dużą objętość pracy. Wskazane powyżej wątpliwości nie obniżają znacząco wartości pracy, która jak podałem powyżej jest w mojej ocenie wysoka.

## **Podsumowanie**

Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pani mgr Agnieszka Moos posiada dużą wiedzę na temat leków psychotropowych, bardzo dobry warsztat analityczny, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić badania oraz zinterpretować uzyskane wyniki. Zaproponowała nowatorskie rozwiązania procesu przygotowania próbek materiału biologicznego do badań. W sposób umiętny dobrała aparaturę badawczą i zoptymalizowała warunki prowadzenia procesów. W sposób dociekliwy analizowała uzyskane wyniki i starała się dochodzić do źródeł niejasności. Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Moos zawiera oryginalne rozwiązania, jak choćby opracowanie metody MEPS/UHPLC-MS do oznaczania benzodiazepin w próbkach płynu łzowego i jej zastosowanie do badania autentycznych próbek.

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wymagania 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.) i stawiam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Moos do publicznej obrony.



Kraków, dnia 20 sierpnia 2015 roku