



Katedra i Zakład Patofizjologii
UNIwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
tel. +48 81 448 65 00

dr hab. Emilia Fornal
Katedra i Zakład Patofizjologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b
20-090 Lublin
tel. 81 448 65 09
e-mail: emilia.fornal@umlub.pl

Lublin, 27 lutego 2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Sekuły pt. „Wykorzystanie metody LC-ESI-QTOFMS do identyfikacji nowych substancji psychoaktywnych z grup syntetycznych kannabinoidów oraz pochodnych fenetyloaminy na podstawie sposobu ich fragmentacji”

Złożona rozprawa doktorska mgr Karoliny Sekuły pod promotorstwem dr hab. Dariusza Zuby ma formę zbioru dziewięciu artykułów współautorskich, spójnych tematycznie, opublikowanych w latach 2012-2018 w czasopismach posiadających współczynnik wpływu (ang. *impact factor*, IF), znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Sumaryczny IF dla tych prac wynosi 26,698 (w oparciu o IF czasopisma z roku opublikowania pracy). IF czasopism, w których opublikowano prace jest w zakresie 2,115–5,756. Pani Magister jest pierwszym autorem w trzech pracach. W pozostałych pracach jest drugim (4 prace) i trzecim autorem (2 prace). Doktorantka jest autorem korespondencyjnym w jednej pracy, publikacji opublikowanej w 2018 r. w cenionym czasopiśmie *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. Wszyscy współautorzy złożyli oświadczenia określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji. Pięć prac włączonych do rozprawy doktorskiej było uprzednio ujętych w cyklu publikacji habilitacyjnych dr hab. Zuby pt. „Identyfikacja nowych substancji o działaniu psychotropowym i odurzającym obecnych na rynku narkotykowym oraz ich zanieczyszczeń”, który obejmował siedemnaście publikacji. Po zapoznaniu się z oświadczeniami współautorów złożonych razem z rozprawą doktorską oraz oświadczeniami współautorów, które zostały złożone razem z wnioskiem habilitacyjnym stwierdzam, że wskazują one jednoznacznie, że wydzielone zagadnienie, prezentowane w rozprawie doktorskiej jest indywidualnym wkładem mgr Karoliny Sekuły.

W ostatnich latach nastąpił bardzo gwałtowny wzrost liczby nowych substancji psychoaktywnych (NPS) na rynku środków zastępczych i narkotyków rekreacyjnych, wprowadzanych do obiegu z zamiarem obejścia przepisów prawnych o dostępie do substancji psychotropowych i narkotyków. NPS są najczęściej pochodnymi związków kontrolowanych, zawierającymi w swojej strukturze ugrupowania atomów charakterystyczne dla tych substancji, do których dołączane są nowe podstawniki lub których część zastępowana jest przez nowe ugrupowania. Są one zsyntetyzowane z myślą, że mają wywoływać w organizmie efekty narkotyczny. Substancje te jak i ich mieszaniny na polskim rynku znane są pod potoczną nazwą dopalacze. NPS stanowią rosnące wyzwanie zarówno dla polityki narkotykowej jak i dla laboratoriów analitycznych i toksykologicznych. Jak wskazuje „Europejski raport narkotykowy. Tendencja i osiągnięcia. 2018” co tydzień w Europie zgłaszana jest do systemu wczesnego ostrzegania Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA) przynajmniej jedna dodatkowa nowa substancja psychoaktywna. Pomimo malejącej od 2015 liczby nowych narkotyków negatywne następstwa ich używania są nadal znaczne. Corocznie stwierdza się zatrucia oraz zgony spowodowane zażyciem NPS. Niejednokrotnie użytkownicy nie są nawet świadomi, iż przyjmują nową substancję psychoaktywną, gdyż zdarzają się przypadki mieszania NPS z innymi narkotykami czy podróbkami leków. Dużym wyzwaniem dla służby zdrowia i organów ścigania pozostaje nadal szybka detekcja i identyfikacja NPS, która jest niezbędna do skutecznej walki o zdrowie i życie użytkowników NPS i która umożliwi dostosowywanie prawnych regulacji i środków kontroli NPS do szybko zmieniającego się rynku narkotyków zagrażających zdrowiu publicznemu. Dotychczasowe metody analityczne stosowane rutynowo w laboratoriach sądowych i toksykologicznych, takie jak GC-FID, HPLC-DAD, a nawet GC-MS okazały się niewystarczające. Pani mgr Sekuła w ramach swojej pracy doktorskiej podjęła się oceny przydatności chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas wysokiej rozdzielczości do identyfikacji nowych substancji psychoaktywnych. Do badań wybrała chromatograf cieczowy sprzężony z hybrydowym analizatorem mas typu kwadrupol - analizator czasu przelotu (LC-QTOF) i skoncentrowała się na dwóch grupach nowych substancji psychoaktywnych, syntetycznych kannabinoidach oraz pochodnych fenetyloaminy, które obok syntetycznych katynonów stanowią najliczniejsze grupy NPS i są najczęściej modyfikowane. Doktorantka założyła w swojej pracy, że ustalenie przebiegu fragmentacji związków ułatwi identyfikację nowych substancji psychoaktywnych na podstawie obecności charakterystycznych jonów fragmentacyjnych w widmach LC-ESI-CID-QTOF MS.

Złożona rozprawa doktorska mgr Karoliny Sekuły została opatrzona rozbudowanym komentarzem w języku polskim (66 strony), w którym Doktorantka wyjaśniła problem badawczy opisany w publikacjach

oraz zreasumowała najważniejsze wnioski płynące z prac a także streszczeniem w języku angielskim. Doktorantka komentarz podzieliła na osiem części: streszczenie, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, cel badań, materiał badawczy, stosowana metoda badawcza, omówienie uzyskanych wyników, podsumowanie i bibliografia. Mgr Sekuła przedstawiła ogólną charakterystykę nowych substancji psychoaktywnych, analityczne problemy związane z identyfikacją nowych substancji psychoaktywnych, szczegółową charakterystykę syntetycznych kannabinoidów oraz pochodnych fenetyloaminy. Omówiła zwięźle budowę i zasadę działania spektrometru LC-QTOF oraz parametry metod LC-QTOF stosowanych podczas oznaczeń. Omówienie wyników przeprowadziła w dwóch podrozdziałach oddzielnie dla syntetycznych kannabinoidów i dla pochodnych fenetyloaminy. W podsumowaniu w komentarzu mgr Sekuła podkreśliła zalety spektrometru mas typu QTOF oraz wskazała, że przeprowadzone badania pozwoliły jej określić sposoby fragmentacji związków z obu badanych grup, a znajomość fragmentacji pozwoliła na identyfikację nowych substancji psychoaktywnych. Komentarz uzupełnia lista siedemdziesięciu jeden pozycji bibliografii. Do rozprawy dołączone są trzy załączniki - lista opublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, życiorys oraz dorobek naukowy Doktorantki. Komentarz, w mojej ocenie, ma poprawną strukturę, mgr Sekuła umiejętnie naświetliła w nim problem badawczy, poprawnie zdefiniowała cel swoich badań oraz trafnie zsumowała uzyskane wyniki oraz płynące z nich wnioski. W mojej opinii jest on jednak zbyt obszerny. Odnosi się wrażenie, że Autorka pierwotnie zamierzała przygotować rozprawę w formie monografii, poczym zmieniła zdanie i postanowiła złożyć rozprawę w formie cyklu publikacji. Doktorantka nie ustrzegła się niestety w komentarzu dość licznych błędów językowych, nieprecyzyjnych, niefortunnnych i błędnych sformułowań, nielogicznych i niegramatycznych konstrukcji zdań, skrótów myślowych i wyrażen żargonowych. Dla przykładu wymienię tylko niektóre z nich: „rynek sprzedaży” (str. 14), „procedury wprowadzania ich pod kontrolę” (str. 11), „Internet stał się czynnikiem” (str. 11), „było ciągle wykrywane” (str. 15), „izomery położenia podstawnika” (str. 15, 17), „modyfikacje wzorów strukturalnych” (str. 16), „z tego względu wynikła konieczność opracowania procedur mających na celu objęcie kontrolą tych substancji, które stwarzają zagrożenie dla zdrowia i życia, a tym samym obniżenie ryzyka związanego z przyjmowaniem nowych związków” (str. 19), „prawo indywidualne, rodzajowe i analogowe” (str. 19), „chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z hybrydowym połączeniem kwadrupola i analizatora czasu przelotu jonów (str. 5, 20), „najobszerniejszą grupę” (str. 20), „dzięki dynamicznym modyfikacjom ich struktur pojawiają się kolejne związki” (str. 20), „identyfikacja oparta jest (...) na sposobie fragmentacji tych związków (str. 28), „widma były korygowane przez równoczesny pomiar mieszaniny referencyjnej” (str. 31), „jony poddawane były dalszemu rozpadowi” (str. 33), „fragmentacja zachodzi na wiązaniach”

(str. 34) „schemat fragmentacji za pomocą metody ESI-QTOFMS” (str. 34, 53, 59), „oprogramowanie wyszukujące wzory” (str. 38), „nie wszystkie elementy struktury były rejestrowane” (str. 49), „rodnik jodowy” (str. 59). Mając na uwadze fakt, że doktorantka włożyła dużo wysiłku w przygotowanie komentarza, zachęcam ją do uważnej poprawy tekstu i opublikowanie na jego podstawie pracy przeglądowej w języku polskim. Praca taka w mojej ocenie jest potrzebna i cieszyłaby się zainteresowaniem ze strony środowiska naukowego, analityków oraz studentów.

Zapoznanie ze stanowiącymi cykl publikacjami złożonymi jako rozprawa doktorska było utrudnione. Doktorantka zdecydowała się na wydruk prac w pomniejszeniu (ok. 30%), odczytanie tekstu stało się bardzo trudne i wymusiło konieczność wydruku publikacji przez recenzentkę. Decyzja Doktorantki jest o tyle zaskakująca, że to właśnie cykl publikacji stanowi rozprawę doktorską i nie można publikacji traktować podrzędnie czy jako załączniki. Prezentacja publikacji pozostaje w dużym kontraście do sposobu prezentacji komentarza, który jest czytelny i przejrzysty.

W dziewięciu publikacjach naukowych, przedłożonych do oceny jako rozprawa doktorska, doktorantka przedstawiła wyniki badań LC-QTOF nad przebiegiem fragmentacji czterdziestu czterech syntetycznych kannabinoidów oraz dwudziestu jeden związków z grupy pochodnych fenetyloaminy. Badania prowadziła wykorzystując fragmentację badanych jonów w źródle (ang. *in-source fragmentation*) oraz fragmentację przez zderzenia z cząsteczkami gazu obojętnego (ang. *collision-induced dissociation*, CID), co pozwoliło Doktorantce uzyskać widma MS^n i ustalić ścieżki rozpadu jonów. Związki zostały sklasyfikowane w klasy o wspólnych elementach struktury. Wyróżniono siedem klas syntetycznych kannabinoidów i trzy klasy pochodnych fenetyloaminy. Dla każdej klasy Doktorantka wyprowadziła i omówiła przebieg fragmentacji oraz zidentyfikowała jony charakterystyczne. Pani mgr Sekuła przedstawiła w przejrzysty sposób ścieżki fragmentacji ESI-CID-QTOF MS/MS dla:

A. syntetycznych kannabinoidów:

- naftoilindoli,
- z pierścieniem adamantylowym,
- z pierścieniem naftalenowym,
- z pierścieniem chinolinowym,
- z grupy PINACA,
- z grupy FUBINACA,
- z grupy CHMINACA (rys. 18) oraz

B. pochodnych fenetyloaminy:

- związków z rodziny 2C,
- związków z rodziny NBOMe,
- związków z rodziny NBF.

Doktorantka zidentyfikowała i zestawiała w tabelach charakterystyczne dla poszczególnych klas związków jony fragmentacyjne, ze wskazaniem elementu struktury, z których pochodzą, dla syntetycznych kannabinoidów oraz pochodnych fenetyloaminy, które można wykorzystać jako jony diagnostyczne przy ustalaniu struktury nowych syntetycznych kannabinoidów. Należy podkreślić, że zrealizowane i opisane przez Doktorantkę badania były jednymi z pierwszych systematycznych badań nad przebiegiem fragmentacji LC-ESI-CID-QTOF MS/MS syntetycznych kannabinoidów oraz pochodnych fenetyloaminy. Zdobyta w czasie badań nad przebiegiem fragmentacji wiedzę mgr Sekuła wykorzystwała przy identyfikacji nowych związków: 2C-G, 2C-N, 25D-NBOMe, 25G-NBOMe, 25C-NBOMe, 25I-NEMD i A-834, 735 w skonfiskowanych dopalaczach. Na szczególne uwypuklenie zasługuje fakt, że publikacje Doktorantki dotyczące identyfikacji tych związków przy pomocy LC-QTOF oraz innych technik analitycznych obejmujących m.in. GC/MS, NMR i FT-IR były pierwszymi na świecie raportami opisującymi identyfikację tych związków. W swoich badaniach mgr Sekuła wykazała, że znajomość fragmentacji różnych grup substancji psychoaktywnych jest bardzo ważna w ustalaniu struktury NPS.

Recenzentka zwraca uwagę, że Doktorantka nie wyjaśniła dwóch ważnych aspektów swoich badań i warsztatu pracy. Czy w przypadku wykorzystywania fragmentacji w źródle przy badaniu przebiegu fragmentacji związków stosowano środki kontrolne (jakie?), w celu ustalenia czy obserwowany jon jest jonom fragmentacyjnym pochodzącym z analitu? Dlaczego różnice mas pomiędzy jonami Doktorantka raportowała jako nie dokładne różnice mas a wartości przybliżone np. około 10, 28, 29 Da (str. 38, 59, 120). Dokładna masa wskazuje jednoznacznie skład pierwiastkowy. Gdy wysoka dokładność pomiaru mas jonów jest zapewniona, to uzyskuje się również odpowiednią dokładność w przypadku różnicy mas pomiędzy jonami. Jakie były powody tej decyzji?

Recenzentka nie zgadza się z stwierdzeniem Doktorantki, że wykorzystanie przez nią LC-QTOF do ustalania struktury związków ma charakter nowatorski. LCQTOF wykorzystywany był i jest w badaniach detekcji i identyfikacji (ustalaniu struktury) m.in. produktów metabolizmu, zanieczyszczeń preparatów farmaceutycznych i metabolitów leków a nie wyłącznie w badaniach proteomicznych, jak wskazuje Doktorantka. Wykorzystanie LC-QTOF do identyfikacji nowych substancji psychoaktywnych jest nowym obszarem zastosowań tej techniki, a jak wskazują wyniki badań Doktorantki i innych badaczy, technika ta wydaje się być niezbędna do szybkiego zakończonego sukcesem identyfikacyjnym ustalania struktury NPS

i niewątpliwie będzie wykorzystywana coraz częściej w laboratoriach ekspertyz sądowych i toksykologicznych w trudnej walce z nowymi substancjami psychoaktywnymi.

Podsumowując, Doktorantka klarownie przedstawiła problem badawczy i poprawnie sformułowała cel badawczy. Właściwie dobrała metody badawcze i zaplanowała eksperymenty, które pozwoliły jej ustalić przebieg fragmentacji ESI-CID-QTOF MS/MS syntetycznych kannabinoidów i pochodnych fenetyloaminy, informacje płynące z badań nad fragmentacją z sukcesem wykorzystywała w identyfikacji nowych substancji psychoaktywnych metodą LC/QTOF, tym samym wykazała, że technika LC/QTOF może być z powodzeniem wykorzystywana do identyfikacji nowych substancji psychoaktywnych. Ponadto mgr Sekuła wykazała się umiejętnością przygotowania manuskryptów publikacji naukowych do druku oraz dyskusji naukowej z recenzentami manuskryptu.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe fakty i argumenty stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Sekuły pt. „Wykorzystanie metody LC-ESI-QTOFMS do identyfikacji nowych substancji psychoaktywnych z grup syntetycznych kannabinoidów oraz pochodnych fenetyloaminy na podstawie sposobu ich fragmentacji” przygotowana pod opieką dr hab. Dariusza Zuby spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. 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) i wnoszę do Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Emilia Fornal