

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY



Joanna Dawidowska

**Estry etylowe kwasów tłuszczowych jako wskaźniki nadużywania alkoholu
etylowego oraz ocena ich przydatności w medycynie sądowej**

Praca wykonana
w Zakładzie Biofarmacji i Farmakokinetiki
Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki
oraz
w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej

Promotorzy:
Prof. dr hab. Michał Jan Markuszewski
Prof. dr hab. Michał Kaliszan

Gdańsk 2024

Praca doktorska finansowana była ze środków:

- projektu POWR.03.02.00-00-I014/17-00 współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE	8
ABSTRACT	10
CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	11
1. CHOROBA ALKOHOLOWA.....	11
1.1. ALKOHOLIZM JAKO CHOROBA CYWILIZACYJNA.....	11
1.2. CHOROBA ALKOHOLOWA WYZWANIEM MEDYCYNY SĄDOWEJ.....	13
2. RODZAJE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO ANALIZOWANEGO W BADANIACH TOKSYKOLOGICZNYCH	13
3. ESTRY ETYLOWE KWASÓW TŁUSZCZOWYCH JAKO WSKAŹNIKI SPOŻYWANIA ALKOHOLU ETYLOWEGO	18
4. ANALIZY METABOLOMICZNE.....	21
4.1. PODEJŚCIA BADAWCZE W METABOLOMICE	21
4.2. TECHNIKI POMIAROWE W ANALIZIE METABOLOMU	23
4.3. ZNACZENIE ANALIZ METABOLOMICZNYCH W MEDYCYNIE SĄDOWEJ	24
5. QUALITY BY DESIGN.....	27
5.1. DESIGN OF EXPERIMENTS	27
5.2. ELASTYCZNOŚĆ METODY	29
CEL PRACY.....	30
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	31
6. MATERIAŁY I METODY.....	31
6.1. APARATURA.....	31
6.2. MATERIAŁY ZUŻYWALNE I ODCZYNNIKI	32
6.2.1. MATERIAŁY ZUŻYWALNE	32
6.2.2. ODCZYNNIKI.....	32
6.2.3. ROZTWORY.....	33
6.3. MATERIAŁ BIOLOGICZNY	33

6.4. PROCEDURA PRZYGOTOWANIA PRÓBEK OSOCZA DO OZNACZEŃ ANALITYCZNYCH	39
6.4.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK OSOCZA DO ANALIZ TECHNIKĄ GC-QQQ/MS	39
6.4.2. PRZETWARZANIE DANYCH POMIAROWYCH UZYSKANYCH Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI GC-QQQ/MS	43
6.5. OPTYMALIZACJA.....	44
6.6. WALIDACJA.....	46
6.6.1. SELEKTYWNOŚĆ I SPECYFICZNOŚĆ	47
6.6.2. KRZYWA KALIBRACYJNA.....	48
6.6.3. GRANICE WYKRYWALNOŚCI I OZNACZALNOŚCI	48
6.6.4. DOKŁADNOŚĆ I PRECYZJA.....	49
6.6.5. EFEKT MATRYCY	49
6.6.6. STABILNOŚĆ	50
6.6.7. ELASTYCZNOŚĆ METODY ANALITYCZNEJ.....	51
6.6.8. PONOWNNA ANALIZA PRÓBKII	54
6.7. PRZYGOTOWANIE I ANALIZA DANYCH	54
7. WYNIKI.....	56
7.1. WYNIKI WALIDACJI UZYSKANE Z ZASTOSOWANIEM TECHNIKI GC-QQQ/MS.....	56
7.1.1. SELEKTYWNOŚĆ I SPECYFICZNOŚĆ	56
7.1.2. LINIOWOŚĆ.....	58
7.1.3. GRANICA WYKRYWALNOŚCI I OZNACZALNOŚCI	60
7.1.4. DOKŁADNOŚĆ I PRECYZJA.....	60
7.1.5. EFEKT MATRYCY	62
7.1.6. STABILNOŚĆ	63
7.1.7. ELASTYCZNOŚĆ METODY ANALITYCZNEJ.....	66
7.1.8. PONOWNNA ANALIZA PRÓBKII	69
7.2. WYNIKI OZNACZEŃ PRÓBEK OSOCZA	69
7.3. ANALIZA DANYCH	76
7.4. WYNIKI NIECELOWANYCH ANALIZ METABOLOMICZNYCH	83
8. DYSKUSJA	88
9. WNIOSKI.....	95
WYKAZ RYCIN	96
WYKAZ TABEL.....	98

BIBLIOGRAFIA 100

WYKAZ SKRÓTÓW

ACC	ang. <i>accuracy</i> , dokładność
AUC	ang. <i>area under the curve</i> , pole powierzchni pod krzywą
BMI	ang. <i>body mass index</i> , wskaźnik masy ciała w stosunku do wzrostu
CoA	ang. <i>coenzyme A</i> , koenzym A
CV	ang. <i>coefficient of variation</i> , współczynnik zmienności
DSM	ang. <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> , Diagnostyczny i statystyczny podręcznik zaburzeń psychiatrycznych
EMA	ang. <i>European Medicines Agency</i> , Europejska Agencja Leków
EtG	ang. <i>ethyl glucuronide</i> , glukuronid etylu
EtS	ang. <i>ethyl sulfate</i> , siarczan etylu
FA	ang. <i>fatty acids</i> , kwasy tłuszczowe
FAEE	ang. <i>fatty acid ethyl esters</i> , estry etylowe kwasów tłuszczowych
FIA	ang. <i>flow injection analysis</i> , analiza wstrzykowa
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i> , Agencja Żywności i Leków
GC	ang. <i>gas chromatography</i> , chromatografia gazowa
GC-EI- QqQ/MS	ang. <i>gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry with an electron impact ionization source</i> , chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrem mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol z jonizacją elektronami
HILIC	ang. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> , chromatografia oddziaływań hydrofilowych
HPLC	ang. <i>high performance liquid chromatography</i> , wysokosprawna chromatografia cieczowa
HQC	ang. <i>high quality control</i> , próbka kontrolna o wysokim stężeniu
IS	ang. <i>internal standard</i> , wzorzec wewnętrzny
ISR	ang. <i>incurred sample reanalysis</i> , ponowna analiza próbki

IT	ang. <i>ion trap</i> , analizator typu pułapka jonowa
KiZMS	Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
LLOQ	ang. <i>lower limit of quantification</i> , dolna granica oznaczalności
LQC	ang. <i>low quality control</i> , próbka kontrolna o niskim stężeniu
MF	ang. <i>matrix factor</i> , współczynnik matrycy
MS	ang. <i>mass spectrometry</i> , spektrometria mas
MQC	ang. <i>medium quality control</i> , próbka kontrolna o średnim stężeniu
MRM	ang. <i>multiple reaction monitoring</i> , monitorowanie reakcji wielokrotnych
NMR	ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> , spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
QCs	ang. <i>quality control samples</i> , próbki kontrolne
QqQ	ang. <i>triple quadrupole analyzer</i> , analizator typu potrójny kwadrupol
QTOF	ang. <i>quadrupole and time-of-flight analyzer</i> , analizator czasu przelotu sprzężony z analizatorem kwadrupolowym
PEth	ang. <i>phosphatidylethanol</i> , fosfatydyloetanol
PMI	ang. <i>post-mortem interval</i> , interwał pośmiertny
RP	ang. <i>reversed phase</i> , odwrócony układ faz
RSD	ang. <i>relative standard deviation</i> , względne odchylenie standardowe
SIM	ang. <i>single ion monitoring</i> , monitorowanie wybranych jonów
SPME	ang. <i>solid phase microextraction</i> , mikroekstrakcja do fazy stałej
SRM	ang. <i>selected reaction monitoring</i> , monitorowanie wybranych reakcji
TOF	ang. <i>time-of-flight analyzer</i> , analizator czasu przelotu
tr	ang. <i>retention time</i> , czas retencji
UHPLC	ang. <i>ultra-high performance liquid chromatography</i> , ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa
ULOQ	ang. <i>upper limit of quantification</i> , górna granica oznaczalności
WHO	ang. <i>World Health Organization</i> , Światowa Organizacja Zdrowia

Streszczenie

Nadużywanie alkoholu etylowego jest problemem zdrowotnym szeroko rozpowszechnionym na całym świecie. Osoby nadużywające alkoholu często doświadczają różnorodnych skutków zdrowotnych, które mogą prowadzić do poważnych konsekwencji w kontekście ich stanu fizycznego i psychicznego. Według raportu statystycznego Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO), corocznie nadmierne spożycie alkoholu etylowego (etanolu) jest wskazywane jako przyczyna śmierci ponad 3 milionów ludzi na całym świecie, a średnie spożycie czystego alkoholu etylowego na osobę powyżej 15. roku życia wynosi ponad 6 litrów w ciągu roku.

W praktyce lekarskiej istnieje potrzeba skutecznego określenia przyczyny oraz mechanizmu nadużywania alkoholu, aby zapewnić odpowiednie leczenie i wsparcie pacjentom dotkniętym tym problemem. W wielu przypadkach ustalenie dokładnej przyczyny zgonu jest istotne dla opiniowania sądowo-lekarskiego, a okoliczności śmierci nie zawsze pozwalają na jednoznaczną i prawidłową ocenę wpływu alkoholu etylowego na zgon i patomechanizm śmierci. Jedynie oznaczenie stężenia alkoholu etylowego we krwi na odpowiednio wysokim poziomie pozwala stwierdzić, że zgon nastąpił w wyniku ostrego zatrucia alkoholem.

Niniejsza praca doktorska dotyczy wykorzystania celowanej analizy metabolomicznej estrów etylowych kwasów tłuszczowych jako potencjalnych wskaźników nadmiernego spożycia alkoholu będącego przyczyną śmierci. W ramach przeprowadzonych badań analizie poddano próbki osocza pochodzące od zmarłych, których ciała zostały skierowane do Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Materiał biologiczny pobierany był od zmarłych w dwóch punktach czasowych: (1) w ciągu 24 h od domniemanego czasu zgonu, pobrany przez powłoki ciała po dostarczeniu ciała zmarłego do prosektorium oraz (2) podczas sądowo-lekarskich sekcji zwłok w czasie do 96 h od śmierci. W celu oceny różnic w poziomach stężeń oraz znaczenia estrów etylowych wybranych kwasów tłuszczowych w diagnostyce pośmiertnej wykorzystano technikę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol (ang. *gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry detection*, GC-QqQ/MS). W wyniku przeprowadzonych analiz oznaczono poziomy stężenia pięciu wybranych estrów etylowych kwasów tłuszczowych w grupie badanej (n=15) oraz kontrolnej (n=16). Uzyskane wyniki oznaczeń metabolicznych skorelowano z dostępną dokumentacją medyczną oraz wynikami pośmiertnych badań toksykologicznych.

Na podstawie przeprowadzonych analiz wyciągnięto wnioski o użyteczności monitorowania stężeń estrów etylowych wybranych kwasów tłuszczowych w organizmie jako wskaźników pomagających określić okoliczności zgonu, tj. czy zgon poprzedzony był nadmiernym spożyciem alkoholu.

Abstract

Ethyl alcohol abuse is a health problem that is widespread throughout the world. People who abuse alcohol often experience various of health effects that can lead to severe consequences for their physical and mental condition. According to a World Health Organization (WHO) statistical report, each year, excessive consumption of ethyl alcohol (ethanol) is considered a cause of death for more than 3 million people worldwide and the average consumption of pure ethanol per person over the age of 15 is more than 6 litres per year.

In daily medical practice, there is a need to effectively determine the cause and mechanism of alcohol abuse in order to provide appropriate treatment and support to affected patients. In many cases, determining the exact cause of death is essential for forensic medical opinions, and the circumstances of death do not always allow a clear and correct assessment of the effect of ethanol on the occurrence of death or the pathomechanism of death. Only the determination of the concentration of ethanol in the blood at a sufficiently high level makes it possible to conclude that death occurred due to acute alcohol intoxication.

This dissertation deals with using a targeted metabolomic analysis in cases of death associated with excessive ethanol consumption. Plasma samples analyzed in the study were obtained from the deceased bodies referred to the Department of Forensic Medicine at the Medical University of Gdansk. Biological material was collected from the deceased at two-time points: (1) within 24 hours of the presumed time of death, collected through body shells after the deceased's body was delivered to the dissecting room, and (2) during scheduled forensic autopsies.

Gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (GC-QqQ/MS) was used to assess the differences in concentration levels and relevance of ethyl esters of selected five fatty acids in post-mortem diagnosis. The obtained results of the metabolic determinations were correlated with available medical records and the results of post-mortem toxicological tests.

Based on the analyses, conclusions were drawn about the usefulness of information on the ethyl ester concentration of selected fatty acids in the body as indicators of the possible mechanism of death and a factor determining the circumstances of death, i.e. whether death was preceded by ongoing alcohol abuse as a cause of death and the helpful factor to determine the circumstances of death.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Choroba alkoholowa

1.1. Alkoholizm jako choroba cywilizacyjna

Szacuje się, że w 2016 roku nadmierne spożycie alkoholu spowodowało 3 miliony zgonów (5,3 % wszystkich zgonów) na całym świecie.

Co istotne, wpływ nadmiernego spożywania alkoholu na umieralność jest większy niż wpływ gruźlicy (2,3 %), HIV/AIDS (1,8 %), cukrzycy (2,8 %), nadciśnienia (1,6 %), chorób układu pokarmowego (4,5 %), urazów drogowych (2,5 %) i przemocy (0,8 %), które to w opinii społecznej stanowią większe zagrożenie dla człowieka [1].

Istnieją znaczne różnice między płciami w odsetku zgonów na świecie spowodowanych nadmiernym spożyciem alkoholu. Według danych z roku 2012, aż 7,6 % zgonów wśród mężczyzn było przypisywanych alkoholowi, podczas gdy dla kobiet wskaźnik ten był prawie dwukrotnie niższy (4,0 % zgonów wśród kobiet). W wielu z tych przypadków określenie dokładnej przyczyny zgonu jest istotne dla opiniowania sądowo-lekarskiego, a okoliczności śmierci nie zawsze pozwalają na jednoznaczną i prawidłową ocenę wpływu alkoholu etylowego na jej wystąpienie. Jedynie rutynowa analiza toksykologiczna materiału biologicznego pobranego śródsekcyjnie i określenie dzięki niej stężenia alkoholu etylowego we krwi na odpowiednio wysokim poziomie (około 4‰ (g/L)) pozwala stwierdzić, że zgon nastąpił w wyniku ostrego zatrucia alkoholem [2].

Ryzyko rozwoju alkoholizmu zależy od wielu czynników, takich jak środowisko, model wychowawczy, czy status społeczny. Osoby z rodzinną historią alkoholizmu są bardziej narażone na jego rozwój [3], jednakże istnieje wiele przypadków alkoholików bez wywiadu nadużywania alkoholu w rodzinie. Dostępność alkoholu i postawy wobec niego w najbliższym środowisku danej osoby wpływają na prawdopodobieństwo rozwoju choroby. Obecne dowody wskazują, że zarówno u mężczyzn jak i u kobiet, alkoholizm jest w 50-60 % uwarunkowany genetycznie, pozostawiając 40-50 % na wpływy środowiskowe.

Co ciekawe, kraje o wysokich dochodach cechuje najwyższe spożycie alkoholu w przeliczeniu na mieszkańca i najwyższe rozpowszechnienie intensywnego picia epizodycznego wśród osób pijących (zdefiniowane jako 60 lub więcej gramów czystego

alkoholu etylowego przy co najmniej jednej okazji, co najmniej raz w miesiącu). Dodatkowo, w takich krajach, konsumpcji alkoholu sprzyjają szeroko rozpowszechnione reklamy oraz akcje promocyjne. Niestety często też zdarza się, że osoby deklarujące niespożywanie alkoholu są stygmatyzowane i wykluczane z niektórych grup społecznych, co negatywnie wpływa na ich relacje interpersonalne, a co za tym idzie na samopoczucie i stan zdrowia psychicznego.

W 2004 roku Światowa Organizacja Zdrowia opublikowała szczegółowy raport na temat alkoholu i innych substancji psychoaktywnych zatytułowany "*Neuroscience of psychoactive substance use and dependence*" [4]. Stwierdzono, że była to "pierwsza próba" WHO zapewnienia kompleksowego przeglądu czynników biologicznych związanych z używaniem substancji i uzależnieniem poprzez podsumowanie ogromnej ilości wiedzy zdobytej w ciągu ostatnich 20-30 lat. Raport podkreśla aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów działania różnych rodzajów substancji psychoaktywnych i wyjaśnia, w jaki sposób używanie tych substancji może prowadzić do rozwoju zespołu uzależnienia. W raporcie stwierdzono, że "uzależnienie nie było wcześniej uznawane za zaburzenie mózgu, w taki sam sposób, w jaki choroby psychiczne nie były wcześniej postrzegane jako wynik zaburzenia mózgu. Jednak wraz z ostatnimi postęпами w neuronauce stało się jasne, że uzależnienie jest w takim samym stopniu zaburzeniem mózgu, jak każda inna choroba neurologiczna lub psychiatryczna".

Od prawie dwóch stuleci alkoholizm uznawany jest za jednostkę chorobową. Pragnienie spożycia alkoholu, które odczuwa osoba uzależniona, może być tak silne, jak potrzeba jedzenia lub zaspokojenie pragnienia. Osoba chora będzie kontynuowała picie pomimo poważnych problemów rodzinnych, zdrowotnych lub prawnych. Podobnie jak wiele innych chorób, alkoholizm jest przewlekły, co oznacza, że trwa przez całe życie, zwykle ma przewidywalny przebieg, a w przypadku braku dostępu do alkoholu występują objawy odstawienne, takie jak: upośledzenie samokontroli, w tym zdolności powstrzymania się od picia, drżenie mięśni, nadciśnienie tętnicze, wymioty i biegunka, zaburzenia snu oraz zwiększona tolerancja alkoholu, czyli potrzeba spożywania coraz większych dawek w celu osiągnięcia oczekiwanego efektu.

W codziennej diagnostyce pacjentów z problemem alkoholowym wykorzystywane są kryteria opublikowane przez Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne w Diagnostycznym i statystycznym podręczniku zaburzeń psychiatrycznych (ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM). Aktualnie obowiązującą wersją jest wydanie piąte [5].

1.2. Choroba alkoholowa wyzwaniem medycyny sądowej

W medycynie sądowej wskaźniki diagnostyczne spożycia alkoholu są ważne nie tylko w kontekście kryminalistycznym – gdy szukamy przyczyny zgonu i wpływu alkoholu na zgon, ale także w postępowaniach dotyczących kierowania pojazdem lub też opieki nad osobami małoletnimi mechanicznym pod wpływem alkoholu etylowego. Parametry biochemiczne krwi są również coraz częściej wykorzystywane w medycynie klinicznej do weryfikacji abstynencji lub wykluczenia szkodliwego wpływu alkoholu na zdrowie.

Ocena, czy osoby kierujące pojazdami są pod wpływem alkoholu, często opiera się na pomiarach i obliczeniach opartych na metodach obarczonych błędem wynikającym z niewłaściwego użycia urządzenia pomiarowego lub zniekształconej wersji wydarzeń przedstawionej przez uczestnika zdarzenia. Takie osoby często także podają nieprawdziwe informacje, że spożywały alkohol po spowodowaniu wypadku drogowego, co zmusza organy ścigania lub wymiar sprawiedliwości do zasięgnięcia opinii biegłego i dokonania obliczeń retrospektywnych.

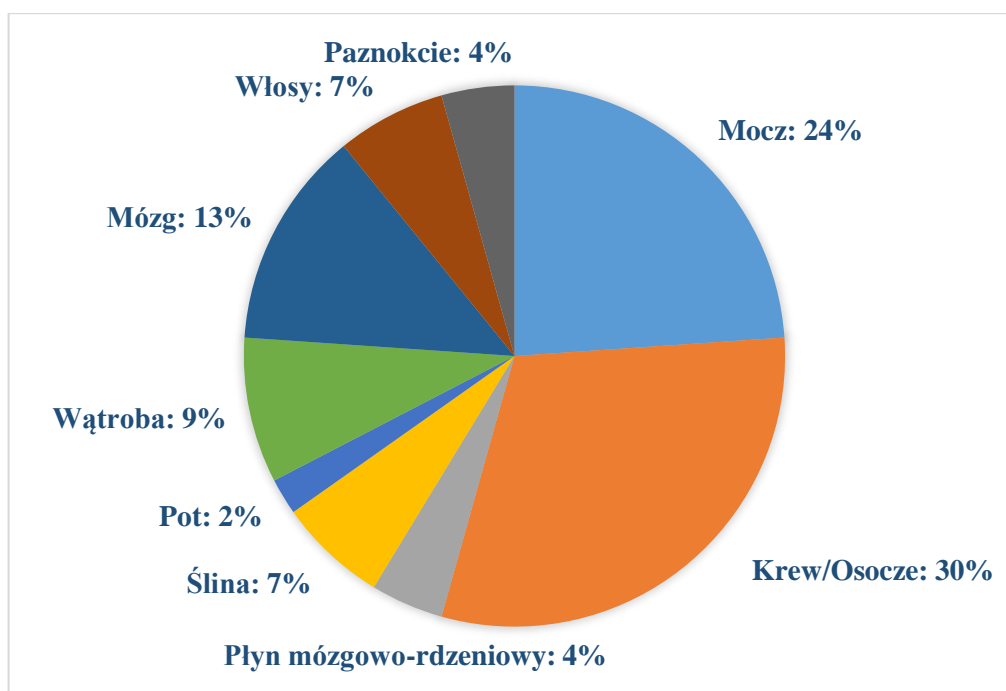
2. Rodzaje materiału biologicznego analizowanego w badaniach toksykologicznych

Podczas sekcji zwłok obducent ma możliwość pobrania do badań dodatkowych różnorodnego materiału biologicznego w postaci płynów ustrojowych i tkanek. Ze względu na to, że do analiz dostępnych jest więcej niż jeden potencjalny materiał biologiczny, patolodzy i analitycy mogą wybrać najbardziej odpowiedni dla potrzeb przeprowadzonego badania [6]. Wycinki narządów do badań histopatologicznych są rutynowo zabezpieczane w zbuforowanym 10 % roztworze formaliny. Niemniej jednak, ze względu na wpływ formaliny na skład chemiczny i właściwości biochemiczne tkanek ludzkich, zabezpieczone w ten sposób tkanki nie dają możliwości przeprowadzenia analiz metabolomicznych. Dlatego też, skupiając się na analizach toksykologicznych, większość literatury wskazuje na najczęstsze wykorzystanie krwi i moczu (czasem ciała szklistego oka) głównie ze względu na ich dostępność, łatwość pobierania próbek i obecność szerokiego zakresu metabolitów.

Ważnym etapem zaplanowanych badań jest dobranie odpowiedniego materiału biologicznego. Następnie opracowywane są procedury mające na celu ograniczenie pojawiającej się na tym etapie zmienności [7].

Wybór odpowiedniej metody analitycznej jest niezbędny do uzyskania wiarygodnych wyników. Użyteczność i dostępność matrycy biologicznej ma największy wpływ na wybór rodzaju próbki. Ze względu na szeroko zakrojone badania różnorodnych próbek biologicznych i płynów ustrojowych, próbki krwi i moczu są powszechnie wybierane do rutynowych analiz laboratoryjnych, co przedstawiono na rycinie 1.

Dobór grup badanych sprowadza się do określenia kryteriów, zarówno włączenia jak i wyłączenia, na podstawie których dokonuje się kwalifikacji do badania. Ujednoczenie grup badanych ma na celu ograniczenie wpływu zmienności biologicznej na pomiary dotyczące oznaczanych analitów. Kryteria te obejmują najczęściej: wiek [8], płeć [9], masę ciała lub wskaźnik BMI [10], choroby towarzyszące wpływające na metabolizm [11,12], przyjmowane leki czy używki [13–15] oraz rodzaj stosowanej diety [16]. Zredukowanie wpływu wymienionych czynników na uzyskane wyniki pozwala sądzić, że zaobserwowane zmiany w analizowanych próbkach wynikają głównie z mechanizmów patofizjologicznych zachodzących w badanych organizmach.



Rycina 1. Procentowy udział materiałów biologicznych wykorzystywanych w badaniach toksykologicznych w medycynie sądowej na podstawie przeglądu artykułów oryginalnych z lat 1997-2020 [17].

Niektóre rodzaje płynów ustrojowych są wykorzystywane w analizie kryminalistycznej ze względu na ich skład (sprawiający, że proces przygotowania próbki nie jest zbyt czasochłonny) i dostępność materiału do pobrania. Cechy te charakteryzują wspomniane próbki krwi i moczu. Dzięki dogłębnemu poznaniu reakcji katabolicznych i anabolicznych zachodzących w ludzkim ciele, można skutecznie określić poziomy różnych substancji i ich metabolitów [18].

Krew, wraz z jej frakcjami, jest najczęściej wykorzystywanym materiałem biologicznym w analizach metabolomicznych. Według Coe i wsp. [19] krew, która transportuje większość substancji chemicznych w organizmie, była częściej wykorzystywana jako próbka biologiczna niż inne próbki, takie jak np. ciało szkliste oka, ponieważ te wymagają bardziej złożonych procedur przygotowania. Odsetek każdej frakcji składników obecnych we krwi zależy od wieku, płci i czynników środowiskowych [20]. Należy jednak pamiętać, że skład krwi i jej właściwości fizykochemiczne różnią się między próbkami pobranymi przed i po śmierci. W wyniku procesów rozpadu, pH krwi obniża się do wartości około 5-5,5 w porównaniu do warunków fizjologicznych, co wpływa na każdy kolejny etap analizy, ponieważ obniżone pH aktywuje enzymy, które zapobiegają krzepnięciu krwi [21].

Mocz jest zazwyczaj pobierany w stosunkowo dużych ilościach, nie tylko do rutynowych badań laboratoryjnych, ale także do analiz toksykologiczno-sądowych wykonywanych po śmierci. Pobieranie próbek jest łatwe, a proces przygotowania materiału biologicznego nieskomplikowany. Niskie stężenie białek w znaczny sposób upraszcza procedurę przygotowania próbki. Z drugiej strony, mocz może zawierać więcej związków sprzężonych, takich jak produkty reakcji metabolizmu leków oraz produkty innych reakcji katabolicznych zachodzących w organizmie. Z badań przeprowadzonych przez Álvarez-Sánchez i wsp. [6], wynika, że próbki moczu, podobnie jak próbki krwi, mogą dostarczyć informacji o ogólnym stanie zdrowia pacjenta. Jednak skład moczu dostarcza uśrednionych lub opóźnionych informacji na temat niedawnych zmian wewnętrznych i skutków środowiskowych, podczas gdy krew jest uważana za źródło aktualnych danych o stanie organizmu w momencie pobierania próbki. Ważnym etapem podczas pobierania próbek moczu jest uwzględnienie jego objętości, ponieważ skład molekularny i stężenia są z nią silnie skorelowane [22,23]. Dlatego też, jedną ze standardowych procedur analizy danych pochodzących z oznaczeń próbek moczu jest przeprowadzenie normalizacji stężeń analitów względem stężenia kreatyniny, osmolarności lub ciężaru właściwego [24]. W kontekście danych literaturowych, przeprowadzono kilka testów przesiewowych z wykorzystaniem próbek moczu pod kątem obecności narkotyków przy użyciu podejścia metabolomicznego.

Wykorzystując technikę UHPLC-QTOF/MS potwierdzono obecność 62 leków i ich metabolitów w moczu, co stanowiło obiecujący początek bazy danych. Ponadto, Tsai i wsp. [25] uprościli metodę przygotowania próbki zachowując wysoką selektywność, czułość i precyzję oznaczeń.

Włosy, które są uważane za produkt różnicowania komórek z ludzkiej tkanki skórnej, zawsze były szczególnie interesujące dla naukowców pracujących nad testami chemicznymi w celu zdiagnozowania długotrwałego używania narkotyków [26]. Mocno podkreślane przez Kintza i wsp. [27,28] zalety próbek włosów dla związków, które mogą mieć wydłużone okna detekcji (skorelowane z długością włosów) i wiążą się z nieinwazyjnym pobieraniem próbek. Znaczenie i zainteresowanie zastosowaniem "omik" (głównie genomiki) w analizie włosów znacznie wzrosło w ciągu ostatnich kilku lat, ponieważ nastąpił dynamiczny rozwój bardziej szczegółowych i precyzyjnych metod badawczych [29]. Badania w kierunku zatrucia metalami ciężkimi były zlecane już 50 lat temu w celu weryfikacji przewlekłego zatrucia. Jednak wpływ czynników środowiskowych na strukturę włosa i poziom inkorporacji substancji chemicznych pochodzenia endo- i egzogenego pozostaje dyskusyjny. Dodatkowo, testy genetyczne mogą dostarczyć znaczących dowodów w sprawach dotyczących napaści na tle seksualnym, gdy alternatywne materiały dowodowe są niedostępne [29]. Jednak dla niektórych testów ilość obecnego DNA bywa niewystarczająca i może różnić się w poszczególnych przypadkach ze względu na cechy osobnicze. Niemniej jednak, DNA może stanowić wysoce pomocne źródło informacji. Jedną z oczywistych korzyści z wykorzystania próbek włosów jest dłuższe okno wykrywania niektórych metabolitów niż w przypadku próbek krwi lub moczu, co daje możliwość zbadania historii leczenia farmakologicznego pacjenta [30,31]. Co więcej, badanie różnych fragmentów włosów może dostarczyć informacji na temat chronologii przyjmowania leków, biorąc pod uwagę, że włosy rosną około 1 cm na miesiąc. Ponadto osoby, które przeżyły napaść czy np. próbę samobójczą, chętniej poddają się mniej skomplikowanym procedurom pobrania próbek toksykologicznych, m.in. pobraniu próbki włosa [32,33].

Nie tylko tkanki łączne lub wydzieliny mogą być uważane za cenne źródła informacji. W pośmiertnych analizach kryminalistycznych łatwa procedura pobierania próbek nie jest priorytetem, a próbki można uzyskać z różnych narządów ciała.

Analizy próbek tkanki wątroby wykazały, że ten rodzaj materiału może dostarczyć cennych informacji na temat przebytego leczenia oraz stanów patofizjologicznych [34,35]. Podobnie jak nerki, tkanka wątroby również narażona jest na szkodliwy wpływ substancji dostarczanych organizmowi przez całe życie. Obecność niektórych metabolitów może

wskazywać na poważną niewydolność wątroby spowodowaną przedawkowaniem substancji odurzających lub/i leczniczych [36,37], a wyniki mogą pomóc w ustaleniu historii medycznej pacjenta. Co interesujące, pośmiertnie pobrane próbki wątroby wykazały mniej zmian metabolicznych niż próbki pobrane przedśmiertnie. Starannie dobrane metody analityczne powinny zminimalizować prawdopodobieństwo zakłóceń i zwiększyć prawdopodobieństwo znalezienia podobieństw lub różnic metabolicznych między próbkami.

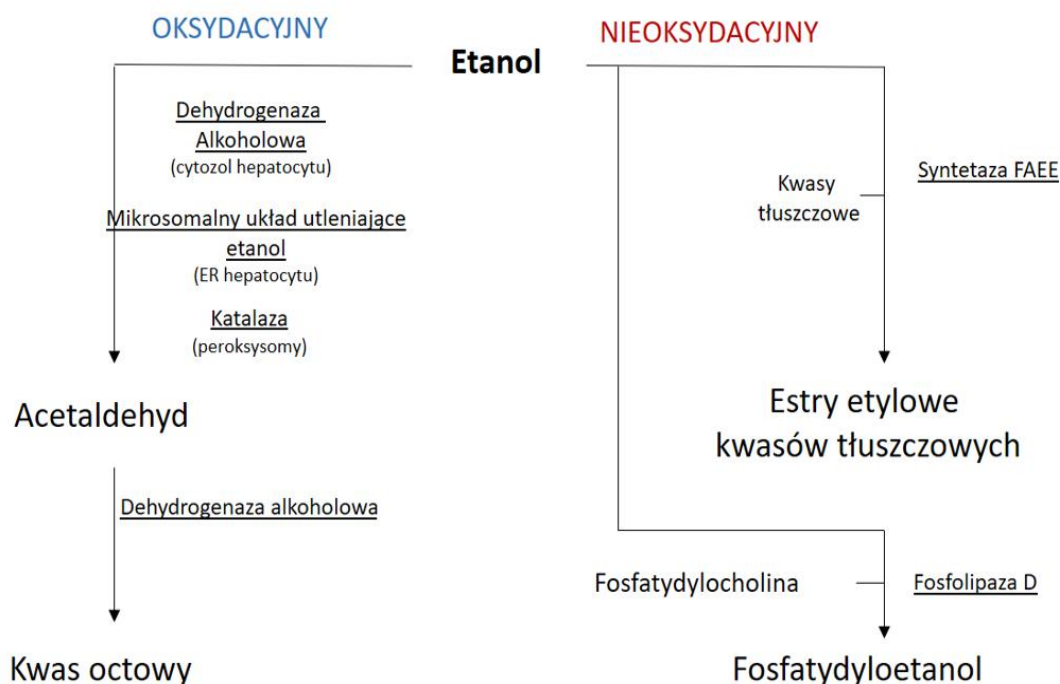
W eksperymencie przeprowadzonym przez Haradę i wsp. [34] autorzy analizowali próbki osocza mężczyzn pobrane na czczo, aby zweryfikować wpływ spożycia alkoholu na metabolom krwi i ocenić potencjalne biomarkery uszkodzenia wątroby zależnego od alkoholu. W rezultacie zidentyfikowano grupę metabolitów, m.in. treoninę, bursztynian guanidyny i glutaminę, które mogą być związane z nadmiernym dziennym spożyciem etanolu. Inna grupa badaczy, Griffin i wsp. [38], podjęła próbę opracowania modelu zwierzęcego, który najlepiej odzwierciedlałby wczesne zmiany metaboliczne w stłuszczeniowej chorobie wątroby u ludzi (ang. *fatty liver disease*). Autorzy wykazali różnice między ostatecznymi procesami metabolicznymi w tkance wątroby a podłożem genetycznym. Rozbieżność ta wydaje się być w dużej mierze odpowiedzialna za wystąpienie choroby.

Większość badań, których wyniki zostały opublikowane w ostatnich latach, dotyczyła analiz płynów biologicznych, takich jak osocze lub mocz, ponieważ zapewniają one szerszy wgląd we wszystkie procesy metaboliczne, a dostępność tkanki mózgowej jest ograniczona do próbek pochodzenia zwierzęcego lub badań pośmiertnych ludzkiego mózgu. W momencie śmierci, wysokie zapotrzebowanie mózgu na tlen powoduje szybką degradację wielu związków, prowadząc tym samym do utraty licznych kluczowych metabolitów, takich jak m.in. glikogen, glukoza [39,40]. Warto zauważyć, że jedną z kluczowych różnic między mózgiem a resztą narządów jest bariera krew-mózg. W konsekwencji, tylko kilka rodzajów cząsteczek jest w stanie przeniknąć przez tę wysoce selektywną barierę ludzkiego ciała. Ze względu na złożoność tkanki mózgowej, wyodrębnienie i oznaczenie wszystkich metabolitów będących przedmiotem zainteresowania jest prawie niemożliwe. Te substancje chemiczne charakteryzują się różnymi właściwościami, a na ich ostateczne stężenia w próbce wpływają na wybór i proporcje użytych rozpuszczalników, metod ekstrakcji oraz czułość metody analitycznej. Jak przedstawili Naz i wsp. [41], różne czynniki wpływają na wybór ostatecznej metody analizy tkanki mózgowej. Należą do nich m.in. otrzymanie szerokich, powtarzalnych oraz zawierających zidentyfikowane metabolity profili. Ponadto,

strategie i procedury związane z analizą tkanki mózgowej są obarczone dużą zmiennością wynikającą z czynników, takich jak niejednorodność tkanki mózgu lub niestabilność w czasie przechowywania [42].

3. Estry etylowe kwasów tłuszczowych jako wskaźniki spożycia alkoholu etylowego

Dominującym szlakiem metabolizmu alkoholu etylowego u ludzi jest utlenianie w wątrobie, które eliminuje ponad 90 % spożytego etanolu. Pierwszym etapem szlaku utleniania jest konwersja etanolu do aldehydu octowego katalizowana przez cytozolową dehydrogenazę alkoholową i w mniejszym stopniu przez mikrosomalny izoenzym cytochromu P450, izoformy cytochromu P450 (zwłaszcza CYP2E1) i katalazę. W drugim etapie dehydrogenaza aldehydu octowego utlenia aldehyd octowy do octanu, który jest głównie wydzielany do krążenia i przekształcany w acetylo-koenzym A (CoA) przez tkanki pozawątrobowe, takie jak mięśnie, serce i mózg. Oprócz utleniania, opisano kilka nieutleniających szlaków metabolizmu etanolu, które skutkują enzymatycznym sprzężaniem etanolu z endogennymi metabolitami, takimi jak kwas glukuronowy, siarczan, fosfolipidy i kwasy tłuszczowe (FA). Powstałe metabolity są określane jako glukuronid etylu (EtG), siarczan etylu (EtS), fosfatydyloetanol (PEth) i estry etylowe kwasu tłuszczowego (ang. *fatty acid ethyl ester*, FAEE) (rycina 2).



Rycina 2. Schemat metabolizmu alkoholu etylowego w organizmie ludzkim.

Pod względem ilościowym szlaki nieutleniające stanowią niewielką część (od 1 % u osoby spożywającej alkohol sporadycznie do około 5 % u przewlekle pijących) całkowitego metabolizmu etanolu. Jednakże, ze względu na wolniejsze tempo eliminacji, nieutleniające metabolity etanolu, takie jak estry etylowe kwasów tłuszczowych, utrzymują się w płynach ustrojowych i tkankach znacznie dłużej niż sam etanol. Ta cecha sprawia, że nieutleniające metabolity etanolu umożliwiają retrospektywną ocenę jego spożycia, nawet gdy sam etanol nie jest już obecny w organizmie [43,44]. Dzięki temu stanowią one potencjalne biomarkery oceny spożycia etanolu mogące mieć zastosowania w ocenie stanu zdrowia, ale też w badaniach pośmiertnych [45].

Estry etylowe kwasów tłuszczowych (FAEE) są jednymi z metabolitów nieoksydacyjnej drogi eliminacji etanolu, które zostały uznane za mediatory uszkodzeń narządów wywołanych alkoholem. FAEE są wykrywalne we krwi po spożyciu etanolu i na tej podstawie stanowią markery jego spożycia. FAEE zostały również oznaczone ilościowo w ludzkiej wątrobie i tkance tłuszczowej i wykazano, że mogą być pośmiertnymi markerami spożycia etanolu [46]. Stwierdzono znaczną różnicę w stężeniu FAEE w wątrobie i tkance tłuszczowej pacjentów z pośmiertnym stężeniem alkoholu we krwi na poziomie powyżej progu oznaczalności, porównując z pacjentami, u których pośmiertnie nie

potwierdzono obecności etanolu we krwi, a którzy byli albo alkoholikami albo osobami spożywającymi alkohol okazjonalnie. Należy podkreślić, iż większość obecnie znanych markerów diagnostycznych przewlekłego alkoholizmu ma ograniczoną użyteczność kliniczną. Odróżnienie osoby przewlekle nadużywającej alkoholu od osoby spożywającej duże ilości etanolu epizodycznie (ang. *binge drinker*) jest możliwe określając rodzaj lub wartości stężenia FAEE w próbkach krwi pobranych w dwóch punktach czasowych (przy wystąpieniu maksymalnego stężenia etanolu we krwi oraz około 24 godziny po jego odstawieniu). Stężenia FAEE we krwi i/lub w tkankach stanowią zatem markery spożycia etanolu i mogą być przydatne w odróżnianiu alkoholików od osób, które okazjonalnie przyjmują dużą dawkę alkoholu.

Dodatkowo, FAEE mogą być także oznaczane w smółce, co potwierdza ich ogromną użyteczność w stwierdzaniu przewlekłego nadużywania alkoholu etylowego w przypadku kobiet ciężarnych.

Na podstawie danych literaturowych wytypowano siedem estrów etylowych kwasów tłuszczowych, które stały się przedmiotem niniejszej pracy (tabela 1.). Podstawą do ich wyboru była ich specyficzność dla grupy badanej, częstość występowania oraz wysokość oznaczanych stężeń [47,48].

Tabela 1. Estry etylowe kwasów tłuszczowych wytypowane do analiz.

Oznaczany związek	Akronim	Wzór sumaryczny	Masa molowa [g/mol]
Laurynian etylu	EE 12:0	$C_{14}H_{28}O_2$	228,209
Mirystynian etylu	EE 14:0	$C_{16}H_{32}O_2$	256,420
Palmitynian etylu	EE 16:0	$C_{18}H_{36}O_2$	284,272
Heptadekanian etylu	EE 17:0	$C_{19}H_{38}O_2$	298,500
Linoleinian etylu	EE 18:3	$C_{20}H_{36}O_2$	308,272
Oleinian etylu	EE 18:1	$C_{20}H_{38}O_2$	310,287
Stearynian etylu	EE 18:0	$C_{20}H_{40}O_2$	312,303

4. Analizy metabolomiczne

4.1. Podejścia badawcze w metabolomice

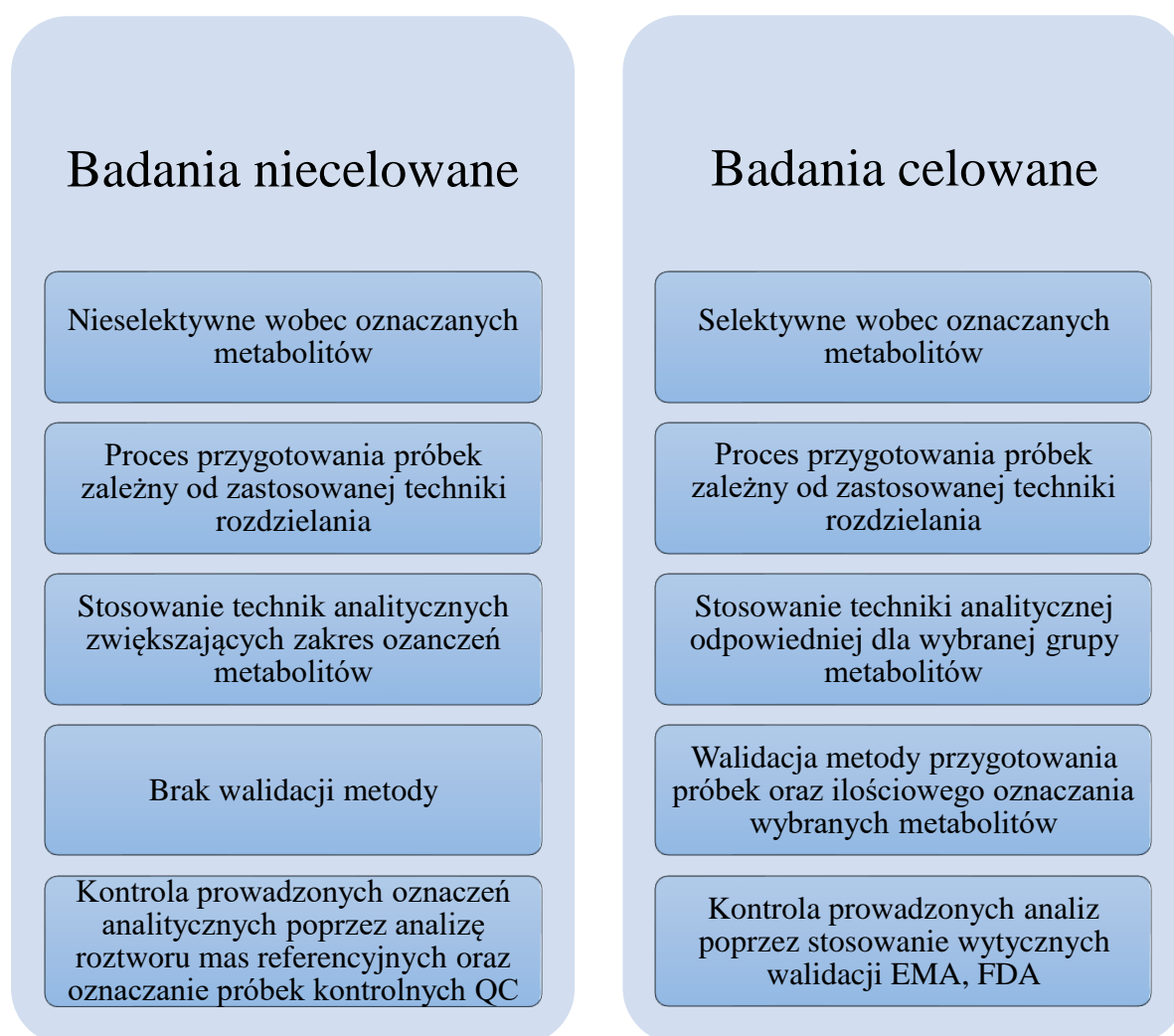
Metabolomika, jako część biologii systemowej, koncentruje się na analizie związków o niskiej masie cząsteczkowej (<1,5 kDa), które są obecne w pojedynczych komórkach lub tkankach organizmu. Analizy metabolomiczne są przydatne do opisywania interakcji między różnymi procesami fizjologicznymi oraz farmakokinetycznymi przy jednoczesnej ocenie stanu organizmu [49–52]. Celem badań metabolomicznych jest jakościowa i/lub ilościowa analiza metabolitów drobnocząsteczkowych w różnych próbkach biologicznych, których skład (zarówno jakościowy, jak i ilościowy) może się różnić w zależności od czynników środowiskowych, modyfikacji genetycznych i stosowanych substancji farmakologicznych oraz diety [53,54]. Ponadto, zmiany na poziomie metabolomu, czyli zestawu wszystkich metabolitów komórkowych, odzwierciedlają aktualny stan badanego układu biologicznego, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych.

W badaniach metabolomicznych wyróżnia się dwie główne strategie badawcze: analizy niecelowane i celowane. Niecelowana analiza metabolomiczna skupia się na kompleksowym, półilościowym oznaczeniu możliwie jak największej liczby metabolitów występujących w badanych próbkach biologicznych, w tym także nieidentyfikowanych wcześniej związków chemicznych. W tym podejściu badawczym nie ma wstępnych założeń co do zakresu oznaczanych analitów. Dlatego też, ze względu na zróżnicowane właściwości fizykochemiczne oraz poziomy stężenie endogennych związków niskocząsteczkowych obecnych w materiałach biologicznych, nie ma jednej techniki analitycznej, która byłaby odpowiednia do precyzyjnych i dokładnych oznaczeń wszystkich metabolitów obecnych w badanych próbkach. Z tego względu, w niecelowanych analizach metabolomicznych często konieczne jest zastosowanie kilku, wzajemnie komplementarnych technik pomiarowych.

Celowana analiza metabolomiczna skupia się z kolei na oznaczaniu scharakteryzowanych chemicznie oraz biochemicznie grup metabolitów. Dzięki zastosowaniu substancji wzorcowych (standardów wewnętrznych i/lub zewnętrznych) analizy takie można prowadzić w sposób półilościowy albo ilościowy. W celowanych analizach metabolomicznych przeprowadza się zazwyczaj pełną walidację procedury przygotowania próbek biologicznych oraz metody analitycznej według wytycznych zatwierdzonych przez

FDA (ang. *Food and Drug Administration*) i EMA (ang. *European Medicines Agency*). Porównanie schematów badawczych w niecelowanych i celowanych analizach metabolomicznych przedstawiono na rycinie 3.

Odpowiednie zaplanowanie poszczególnych etapów realizowanego projektu opiera się głównie na dostępnych danych literaturowych oraz doświadczeniu badaczy. Dobór odpowiedniej wielkości grupy badanej zależy m.in. od częstości występowania danej jednostki chorobowej, czy też zjawiska społecznego oraz od typu podejścia badawczego w analizach metabolomicznych [55].



Rycina 3. Porównanie schematów badawczych stosowanych w niecelowanych i celowanych analizach metabolomicznych.

4.2. Techniki pomiarowe w analizie metabolomu

Aparatura kontrolno-pomiarowa stosowana w chemii analitycznej uległa ogromnym zmianom pod kątem jej złożoności i ulepszeń w ciągu ostatnich dziesięcioleci. Aktualnie, w prowadzonych analizach metabolomicznych dostępny jest szeroki zakres technik pomiarowych zapewniający czułe, precyzyjne i dokładne oznaczenia analityczne. Do najbardziej popularnych należą zaawansowane techniki separacyjne połączone z spektrometrią mas (ang. *mass spectrometry*, MS) oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR) [56,57]. Technika NMR może być stosowana zarówno do oznaczeń ilościowych, jak i jakościowych, o czym świadczą wysoce powtarzalne wyniki i stosunkowo proste oraz niedestrukcyjne procedury przygotowania próbek [58]. Technika ta jest często wykorzystywana do identyfikacji oznaczanych analitów, zwłaszcza do potwierdzenia ich struktury chemicznej. Jej dużą wadą jest jednak niska czułość oznaczeń analitycznych. Dlatego też, w ostatnich latach stosowane są przede wszystkim zaawansowane techniki separacyjne wykorzystujące technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) lub ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej, (ang. *ultra-high-performance liquid chromatography*, UHPLC), chromatografii gazowej (ang. *gas chromatography*, GC), czy elektroforezy kapilarnej (ang. *capillary electrophoresis*, CE) połączone z odpowiednimi spektrometrami mas. Techniki te odznaczają się szerokim zakresem pomiarowym oraz powtarzalnością oznaczeń. Dodatkowo, zastosowanie wysokorozdzielczych spektrometrów mas pozwala na dużą dokładność pomiaru (<0,5 ppm), a zastosowanie tandemowego spektrometru mas, np. z analizatorem typu potrójny kwadrupol (ang. *triple quadrupole*, QqQ), zapewnia wysoką czułość oznaczeń (rzędu femtomoli) [59]. GC-MS jest techniką z wyboru dla związków lotnych lub takich, które można łatwo przekształcić w lotne pochodne za pomocą procedury konwersji chemicznej (upochadniania). Dzięki temu możliwe jest oznaczenie szerokiego panelu związków, głównie kwasów organicznych, aminokwasów, kwasów tłuszczowych czy cukrów. HPLC-MS oraz UHPLC-MS, wykorzystujące różnorodne fazy stacjonarne, tj. RP (ang. *reversed phase*, odwrócony układ faz) czy HILIC (ang. *hydrophilic interaction liquid chromatography*, chromatografia oddziaływań hydrofilowych) stosowane są do oznaczeń analitycznych nielotnych, termicznie niestabilnych związków chemicznych o szerokim zakresie zarówno masy cząsteczkowej, jak i polarności [60]. Z kolei za pomocą techniki CE-MS można przeprowadzić oznaczenia analityczne związków o różnej masie cząsteczkowej (metabolity, peptydy, białka), obdarzonych ładunkiem bądź też obojętnych lub charakteryzujących się

dużą polarnością. Dlatego też, zastosowanie komplementarnych technik analitycznych często jest konieczne w niecelowanych analizach metabolomicznych zwłaszcza próbek biologicznych o złożonym składzie matrycy. W celowanych analizach metabolomicznych, przeprowadza się ilościowe oznaczenia wybranych związków często poprzez pomiar wyselekcjonowanych wartości masy do ładunku m/z w trybie SIM (ang. *single ion monitoring*) lub pomiar przejść (ang. *transitions*) jonu prekursorowego (ang. *precursor ion*) do jonów potomnych (ang. *product ions*) w trybie monitorowania reakcji wielokrotnych (ang. *multiple reaction monitoring*, MRM).

4.3. Znaczenie analiz metabolomicznych w medycynie sądowej

Dotychczas większość prób zastosowania podejścia metabolomicznego dotyczyła badań na materiale biologicznym pozyskanym za życia. W niniejszej pracy skupiono się na materiale biologicznym pobranym pośmiertnie, co spowodowało szereg trudności związanych z procesami zachodzącymi w organizmie po śmierci. Analizy takie wymagają specjalnego traktowania związanego z pobieraniem próbek, przygotowaniem ich i kolejnymi etapami prac laboratoryjnych [61].

W porównaniu z innymi podejściami badawczymi, metabolomika wydaje się być nowym, użytecznym i opłacalnym narzędziem w analizie kryminalistycznej. Do zalet takiego podejścia należy: (1) możliwość analizowania próbek biologicznych o zróżnicowanym składzie matrycy, (2) niski koszt analizy w porównaniu do innych podejść omicznych. Ponadto, Castillo-Peinado i wsp. [20] podkreślili wpływ nieuchronnie rozwijającego się aspektu rosnącej ilości danych dostarczanych przy użyciu wielu, często wzajemnie komplementarnych technik pomiarowych. Co więcej, metabolomika może być wykorzystywana do identyfikacji potencjalnych biomarkerów wielu różnych stanów patofizjologicznych. Metabolomika, z zaawansowanymi technikami analitycznymi, dostarcza niejednokrotnie cennych informacji o potencjalnych patomechanizmach różnych jednostek chorobowych, w tym zaburzeń psychicznych [62]. Pang i wsp. [63] przedstawili przegląd podkreślający ogromne znaczenie metabolomiki w przyszłości farmakologii klinicznej, skupiając się na przewidywaniu odpowiedzi organizmu na podane leki, interpretowaniu mechanizmów działania leków, co prowadzi do możliwości precyzyjnego leczenia pacjentów (ang. *personalized medicine*).

Tanatometabolomika jest uważana za obiecujące podejście badawcze w medycynie i toksykologii sądowej. Umożliwia ona rozszerzenie zakresu niskocząsteczkowych związków, które można zidentyfikować i oznaczyć ilościowo w analizowanej próbce biologicznej. Ponadto, tanatometabolomika pozwala na przeprowadzenie analiz podczas których można zweryfikować farmakokinetykę, farmakodynamikę oraz mechanizmy występujące w organizmie po zażyciu leku lub spożyciu alkoholu etylowego. Uważa się, że toksykogenetyka ma kluczowe znaczenie w badaniach kryminalistycznych i może dostarczyć cennych informacji na temat genotypów, fenotypów i możliwych specyficznych zmian, jakie zachodzą w ludzkim organizmie po śmierci [64–67].

Ponadto, podejście metabolomiczne jako narzędzie do określania pośmiertnych zmian interwałowych w metabolomie organizmu jest obecnie obiektem zainteresowania wielu badaczy. Ponieważ tradycyjne metody nie są wystarczające do uzyskania wiarygodnych wyników z powodu biologicznych fluktuacji zachodzących w organizmie, metabolomika wykazuje ogromny potencjał w tej dziedzinie nauki [68].

Istnieje wiele metod umożliwiających określenie czasu zgonu. Do najczęściej stosowanych metod zaliczają się:

➤ Pomiar temperatury ciała

Pomiar temperatury ciała jest aktualnie najlepszą metodą stosowaną do oznaczania czasu śmierci. Po śmierci temperatura ciała zaczyna stopniowo obniżać się, co jest znane jako ochłodzenie pośmiertne. Lekarze mogą zmierzyć temperaturę ciała zmarłego i odnieść ją do opracowanych eksperymentalnie wartości temperatury ciała w różnych okresach po śmierci w celu oszacowania czasu, który minął od zgonu [69].

➤ *Livor mortis*

Livor mortis, czyli plamy opadowe, to wynik procesu, w którym krew opada grawitacyjnie do powłok ciała znajdujących się najniżej. Po kilku godzinach od zgonu plamy opadowe utralają się w postaci sinoczerwonego zabarwienia powłok ciała zmarłego. Lekarze mogą ocenić intensywność i rozmieszczenie oraz przemieszczalność plam opadowych, aby oszacować czas zgonu.

➤ *Rigor mortis*

Rigor mortis, inaczej stężenie pośmiertne, jest procesem, w którym mięśnie ciała stają się sztywne i twarde. Zazwyczaj rozpoczyna się od mięśni szczęki i żuchwy, a następnie stopniowo rozprzestrzenia się na resztę ciała. Proces ten zależy od wielu czynników, takich

jak temperatura otoczenia, aktywność fizyczna przed śmiercią itp. Ocena rozwinięcia i ustępowania stężenia pośmiertnego może dostarczyć wskazówek co do czasu śmierci.

➤ Rozkład ciała

Rozkład ciała, to proces, w którym ciało po śmierci zaczyna ulegać rozkładowi biologicznemu (gniciu). Często można zauważyć zmiany w kolorze, zapachu, a także obecność owadów i larw na zwłokach. Ocena stopnia rozkładu może dostarczyć informacji na temat czasu, jaki upłynął od śmierci w późniejszym okresie od zgonu.

Kolejnym z możliwych zastosowań wyników badań metabolomicznych, poza definiowaniem przyczyny zgonu, jest określanie czasu śmierci. Podejrzewać można, iż dzięki korelacji wyników analiz metabolomicznych z domniemanym czasem zgonu można uzyskać cenny dowód potwierdzający okres jaki upłynął od śmierci do momentu przeprowadzenia sekcji zwłok i pobrania próbek materiału biologicznego.

Odnosząc się do medycyny i toksykologii sądowej należy podkreślić ich multidyscyplinarny charakter. W ostatnich latach nastąpił rozwój metod diagnostycznych stosowanych w codziennej praktyce laboratoryjnej. Zapotrzebowanie na specyficzne i bardzo czułe metody analityczne nadal bardzo szybko rośnie. Zapewnienie dokładnych wyników ma kluczowe znaczenie na przykład przy rozważaniu testów pokrewieństwa, określaniu przyczyny śmierci i orzekaniu o winie w przypadku przestępstwa. Sugeruje się, że ocena zmian metabolicznych zachodzących w organizmie jest bardzo cenna w tych przypadkach. Ogromna ilość danych uzyskanych podczas wyżej wymienionych badań wymaga kompleksowych i zaawansowanych strategii analitycznych [70].

Obiecujący potencjał metabolomiki został już potwierdzony w ramach badań toksyczności leków, diagnostyki różnicowej chorób i modelowania profili metabolomicznych. W przypadku medycyny sądowej, należy wziąć pod uwagę wstępne przygotowanie próbki, ponieważ właściwości chemiczne i fizyczne materiału pośmiertnego mogą mieć kluczowy wpływ na wyniki przeprowadzonych oznaczeń analitycznych. W ostatnim badaniu przeprowadzonym przez Akcana i wsp. [71] zaobserwowano znacznie rosnącą popularność „omik” wśród specjalistów z zakresu medycyny sądowej. Poprzez kompleksowy przegląd dostępnej literatury, autorzy wyciągnęli wnioski na temat korzystnego wpływu „omik”, biorąc pod uwagę ilość uzyskiwanych informacji. Metabolomika ma ogromny potencjał w zakresie identyfikacji i charakterystyki ewentualnych biomarkerów nadużywania substancji psychoaktywnych i narkotyków. Przy wielu nowo zsyntetyzowanych związkach psychoaktywnych pojawiających się na rynku każdego roku, analizy metabolomiczne dają

możliwość na szybszą i dokładniejszą ocenę ich wpływu na funkcjonowanie organizmu oraz procesy biochemiczne w nim zachodzące [72].

5. Quality by Design

Koncepcja quality by design (QbD) zakłada systematyczne wdrażanie programu zarządzania jakością poprzez lepszą znajomość i zrozumienie parametrów procesu. Według założeń QbD, każdy projekt powinno się rozpocząć od dogłębnego poznania problemu/procesu

i zdefiniowania celów badania, a jakość procesu powinna być kontrolowana także przed rozpoczęciem produkcji, a nie tylko po jej zakończeniu [73,74]. Koncepcja ta została doceniona przez różne organy regulacyjne na całym świecie, w szczególności przez EMA i organy takie jak Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ang. *International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH).

Wykorzystując koncepcję QbD do opracowania metody analitycznej, oceniany jest wpływ wszystkich parametrów metody na jej wydajność. Korzystając z podejścia QbD oraz planując szereg eksperymentów można zweryfikować np. najbardziej optymalne warunki do przeprowadzenia oznaczeń analitycznych lub uzyskania największej wydajności.

5.1. Design of Experiments

Techniki planowania doświadczeń (ang. *Design of Experiments*, DoE) to metody planowania i przeprowadzania eksperymentów w celu uzyskania jak największej ilości informacji przy jak najmniejszym nakładzie pracy laboratoryjnej. DoE polega na ocenie wpływu różnych czynników na wynik eksperymentu, np. podczas optymalizacji procesów badawczych. Kluczowym celem jest stworzenie planu eksperymentalnego, który pozwoli na dokładne zrozumienie związków między czynnikami wejściowymi (parametrami procesu) a czynnikami wyjściowymi (wynikami eksperymentu). Doświadczenia, które jednocześnie badają wpływ kilku aspektów na wynik analiz nazywamy wieloczynnikowymi. Jeśli czynnik jest kontrolowany przez osobę przeprowadzającą eksperyment, to nazywamy go czynnikiem

stałym. Jeśli pozostaje on niezależny, nie może być kontrolowany, ale może wpływać na wyniki eksperymentu – jest to czynnik losowy.

Podejście DoE charakteryzuje się szeregiem zalet w kontekście analiz laboratoryjnych, tj.:

- (1) redukcja zakłóceń: DoE pozwala na kontrolowanie i redukcję wpływu czynników zakłócających, co przekłada się na bardziej wiarygodne wyniki eksperymentu;
- (2) oszczędność czasu i zasobów: dzięki dokładnemu zaplanowaniu eksperymentu, unikamy zbędnych badań i testów, co pozwala zaoszczędzić czas i odczynniki laboratoryjne;
- (3) optymalizacja procesów: DoE pozwala na znalezienie optymalnych ustawień czynników wejściowych, co może znacząco poprawić efektywność procesu badawczego;
- (4) badanie interakcji: metoda ta pozwala na zrozumienie, jak różne czynniki wzajemnie oddziałują ze sobą i wpływają na wyniki eksperymentu [75,76].

Pierwszym krokiem w zastosowaniu DoE w analizach laboratoryjnych jest precyzyjne określenie celów i problemów badawczych. Od tego zależy, jakie zmienne wejściowe i wyjściowe (wynik) będą oceniane.

Następnym krokiem jest wybór odpowiedniego planu eksperymentalnego. Istnieje wiele różnych planów, takich jak np. plan pełny, plan frakcyjny, plan Taguchiego itp. Wybór zależy więc od konkretnego problemu i dostępnych zasobów (np. dostępność materiału biologicznego, odczynników, czas potrzebny na przeprowadzenie pojedynczego eksperymentu itd.).

W trzecim kroku przeprowadzany jest eksperyment zgodnie z ustalonym planem. Ważne jest, aby dokładnie rejestrować wszystkie dane i w miarę możliwości kontrolować zmienne zakłócające.

Po zakończeniu eksperymentu następuje analiza zebranych danych. DoE pozwala na stosowanie różnorodnych metod statystycznych do identyfikacji istotnych czynników, analizy interakcji i optymalizacji procesów np. pobierania materiału biologicznego czy poszczególnych etapów przygotowania próbek do analiz laboratoryjnych. Na podstawie analizy danych wyciągane są wnioski i podejmowane odpowiednie działania. Często wyniki eksperymentu pozwalają na wprowadzenie zmian w procesach badawczych lub optymalizację parametrów procesu [77].

5.2. Elastyczność metody

Elastyczność metody analitycznej odnosi się do zdolności tej metody do dostosowywania się do zmieniających się warunków przeprowadzania procedury analitycznej. Jest to cecha istotna, ponieważ pozwala na efektywne wykorzystanie metody. Elastyczność jest kluczowym czynnikiem sukcesu, zarówno w badaniach naukowych, jak i w przemyśle.

Jednym z planów eksperymentalnych stosowanych w celu weryfikacji elastyczności jest plan Placketta-Burmana. Jest on używany do identyfikacji kluczowych czynników wpływających na wyniki procesu przy minimalnym nakładzie pracy i odczynników chemicznych. Plan ten jest także przydatny w fazie projektowania procesu, gdzie istnieje wiele czynników wpływających na wynik, a celem badania jest zidentyfikowanie tych, które mają największy wpływ na rezultat (odpowiedź).

Głównymi zastosowaniami planu Placketta-Burmana są optymalizacja procesów chemicznych oraz poprawa ich wydajności. Służy on do analizy eksperymentów, gdzie ilość zmiennych jest podzielna przez 4, a ewentualne brakujące zmienne zastępowane są zmiennymi sztucznymi (ang. *dummy factor*), które służą weryfikacji poprawności przeprowadzania analiz [78]. W przypadku, gdy zmienna sztuczna okaże się być istotna statystycznie należy podjąć działania mające na celu wyjaśnienie takiego stanu rzeczy.

Plan Placketta-Burmana jest często używany także jako początkowy etap w procesie optymalizacji. Pomaga zidentyfikować najważniejsze czynniki wpływające na proces. Wpływ tych czynników można ocenić w dalszych eksperymentach, takich jak plany odpowiedzi czy plany czynnikowe. Jest to więc narzędzie przydatne dla inżynierów i naukowców zajmujących się doskonaleniem procesów produkcyjnych i chemicznych, a także weryfikujących elastyczność metody analitycznej.

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena zmian metabolicznych wynikających z nadużywania alkoholu etylowego prowadzącego do śmierci. Cel pracy zrealizowano poprzez przeprowadzenie celowanej analizy metabolomicznej estrów etylowych kwasów tłuszczowych w próbkach osocza pochodzących od osób zmarłych, których ciała zostały skierowane do Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w celu przeprowadzenia sekcji zwłok.

Cel pracy został osiągnięty poprzez realizację poniższych etapów badań:

- a. zebranie materiału badawczego pod względem określonych kryteriów włączenia do badania,
- b. opracowanie i walidacja metody ilościowego oznaczania siedmiu estrów etylowych kwasów tłuszczowych z próbek osocza z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol (GC-QqQ/MS) w trybie MRM,
- c. zastosowanie opracowanej metody ilościowego oznaczania do analizy 62 próbek osocza pobranych od zmarłych w dwóch punktach czasowych – do 24 oraz 96 godzin od śmierci,
- d. integracja danych pomiarowych oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników,
- e. interpretacja biochemiczna uzyskanych wyników analitycznych w odniesieniu do dostępnej dokumentacji medycznej oraz wyników przeprowadzonej sekcji zwłok.

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

6. Materiały i metody

6.1. Aparatura

- chromatograf gazowy połączony ze spektrometrem mas z jonizacją elektronami (EI) oraz analizatorem typu potrójny kwadrupol, GCMS-TQ8030 (Shimadzu, Japonia);
- komputery osobiste z systemem operacyjnym Windows z oprogramowaniem: GC/MS Solution Software (Shimadzu, Japonia); Statistica (TIBCO Software Inc., Stany Zjednoczone); Microsoft Excel (Microsoft, Stany Zjednoczone); JMP (JMP Statistical Discovery LLC, Stany Zjednoczone);
- lodówka z zamrażarką Electrolux EJ2800AOW (Electrolux, Polska);
- łaźnia ultradźwiękowa (Polsonic, Polska);
- pipety automatyczne (Eppendorf, Niemcy; Socorex, Szwajcaria);
- system filtrów Milli-RO i Milli-QPLUS (Millipore, Austria);
- wirówka próżniowa z pułapką mrożącą i możliwością jednoczesnego odparowywania próbek, Quatro MiVac Concentration (GeneVac, Wielka Brytania);
- wirówka laboratoryjna z chłodzeniem MPW-260 R (MPW MED. Instruments Spółdzielnia Pracy, Polska);
- wirówka laboratoryjna z chłodzeniem Eppendorf 5415 R (Eppendorf, Niemcy);
- wytrząsarka laboratoryjna, MS 3 basic (IKA, Stany Zjednoczone);
- zamrażarka Glacier Blue NU 966-8E (NuAire, Stany Zjednoczone);
- waga laboratoryjna Radwag XA/60/220/X (Radwag, Polska).

6.2. Materiały zużywalne i odczynniki

6.2.1. Materiały zużywalne

- kolumna chromatograficzna Zebron ZB-5MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 μm (Phenomenex, Stany Zjednoczone);
- fiołki do GC ze szkła borokrzemowego, poj. 2 ml (Agilent Technologies, Niemcy);
- inserty szklane do fiołek do GD, poj. 200 μl (Cronus, Wielka Brytania);
- zakrętki do fiołek (Agilent Technologies, Stany Zjednoczone);
- końcówki do pipet (Eppendorf, Niemcy);
- korki uniwersalne z polietylenu do probówek, bezbarwne (Medlab, Raszyn, Polska);
- probówki szklane, okrągłodenne, poj. 10 ml (Medlab, Raszyn, Polska);
- igły ze stali szlachetnej z przyłączem Luer-Lock - długie - śr. 2,0 mm - dł. 150 mm (Bionovo, Polska);
- próbówki typu Eppendorf, poj. 2 ml (Eppendorf, Niemcy);
- septy do portu nastrzykowego (Phenomenex, Niemcy);
- inserty szklane z watą (Phenomenex, Niemcy).

6.2.2. Odczynniki

- woda dejonizowana otrzymywana z wykorzystaniem aparatów Milli-RO i Milli-QPLUS (Millipore, Austria);
- mieszanina wzorców alkanów do analiz GC (Restek, Szwajcaria);
- metanol do GC-MS (J.T. Baker, Holandia);
- heptan do GC-MS (J.T. Baker, Wielka Brytania);
- izopropanol do LC-MS (J.T. Baker, Niemcy);
- laurynian etylu (Sigma Aldrich, Niemcy);
- mirystynian etylu (Sigma Aldrich, Niemcy);
- palmitynian etylu (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone);

- heptadekan etylu (Sigma Aldrich,, Stany Zjednoczone);
- linoleinian etylu (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone);
- oleinian etylu (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone);
- stearynian etylu (Sigma Aldrich, Szwajcaria).

6.2.3. Roztwory

- mieszanina alkanów o stężeniu 50 mg/l – przygotowana poprzez dodanie 2 kropli standardowej mieszaniny alkanów do analiz GC (gęstość 0,684 g/ml) do 900 µl heptanu w temperaturze pokojowej. Mieszanina została wykorzystana do późniejszego wyliczenia indeksów retencji oznaczanych analitów na etapie procesowania danych pomiarowych uzyskanych za pomocą techniki GC-QqQ/MS;
- roztwór perfluorotributyloaminy (ang. *perfluorotributylamine*, PFTBA) – służący do kalibracji GC-MS;
- roztwór wzorca wewnętrznego – estru etylowego kwasu heptadekanowego o stężeniu 5 µg/ml, przygotowany przez rozpuszczenie odpowiedniej naważki w metanolu.

6.3. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny do badań pozyskano z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (nr NKBBN/143/2019).

Ze względu na specyfikę analizowanego materiału oraz okoliczności pobrania, przyjęto ściśle określone kryteria włączenia i wyłączenia (tabela 2.). Zarówno grupa badana, jak i kontrolna zostały dobrane pod względem wieku (kobiety oraz mężczyźni pomiędzy 18 a 65 rokiem życia) oraz czasu autolizy (nie dłuższy niż 96 godzin). Za główny czynnik różnicujący obie grupy przyjęto wartość pośmiertnego stężenia alkoholu we krwi pełnej, gdzie w grupie kontrolnej jego poziom był poniżej granicy oznaczalności, natomiast w grupie badanej był równy lub wyższy od 0,2‰.

Do przeprowadzenia oznaczeń wynikających z walidacji metody analitycznej wykorzystano mieszaninę sześciu niezależnych próbek osocza pobranych od pacjentów zdrowych w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku.

Tabela 2. Kryteria włączenia i wyłączenia.

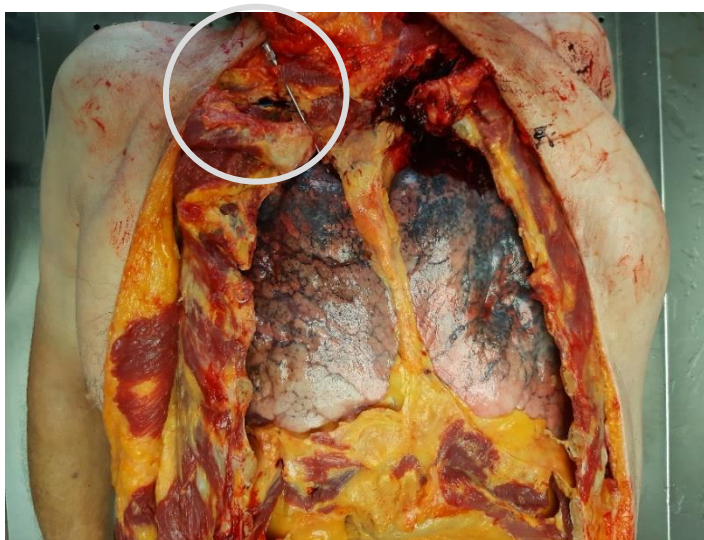
	Grupa badana	Grupa kontrolna
Wiek [lata]	$18 < x < 65$	
Czas autolizy [h]	< 96	
Wyniki toksykologii śródsekcyjnej (zawartość alkoholu etylowego we krwi)	$\geq 0,2\%$	poniżej granicy oznaczalności
Jednostki chorobowe wykluczające	Zaburzenia psychiczne lub choroby organiczne o podłożu neurodegeneracyjnym i psychicznym	
	Zmiany organiczne w narządach wewnętrznych o etiologii zakaźnej, onkologicznej i skrajnie zakaźnej	
Okoliczności wykluczające	Śmierć w trakcie spożywania alkoholu	

Po wstępnym zakwalifikowaniu zmarłego do prowadzonych badań rozpoczynano procedurę zabezpieczenia materiału biologicznego. W przypadku pacjentów zakwalifikowanych do przedstawianego projektu zabezpieczano rutynowo próbki osocza, wątroby oraz czterech regionów mózgu w obydwu półkulach na potrzeby kolejnych projektów badawczych.

Do zabezpieczania gromadzonego materiału biologicznego korzystano z materiałów zużywalnych stosowanych w codziennej praktyce Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej. Przygotowywane one są rutynowo przechodząc proces autoklawowania, który ma umożliwić późniejsze zastosowanie zgromadzonych próbek biologicznych do m.in. analiz genetycznych. Po przeprowadzeniu pierwszych analiz za pomocą chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas z metodą jonizacji przez elektrorozpylanie

zamieniono wyżej wymienione materiały zużywalne na materiały niejałowe, niepoddawane procesowi autoklawowania przed użyciem w warunkach prosektoryjnych.

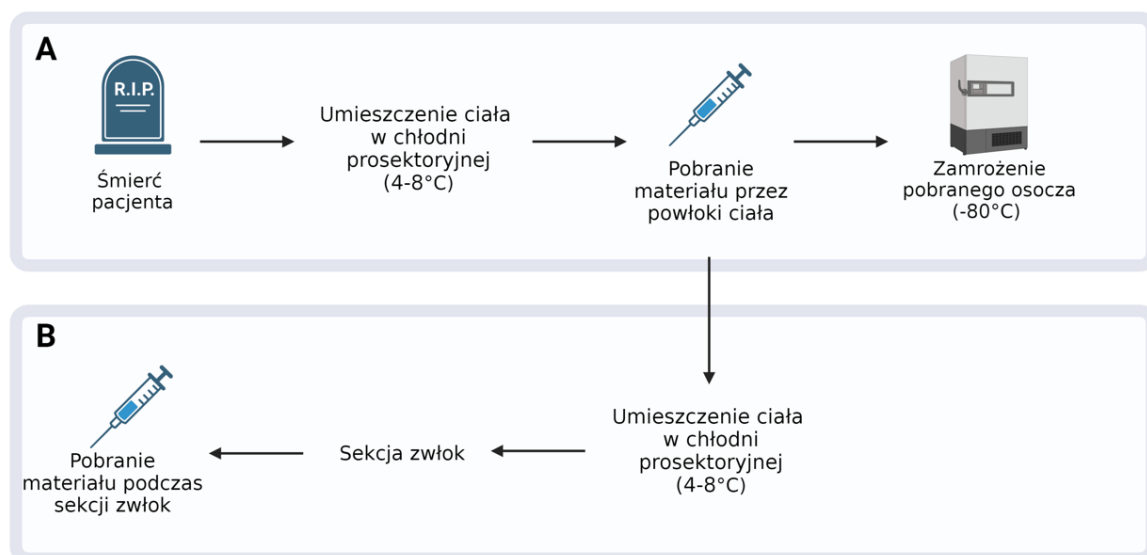
Próbki osocza przeznaczone do badań pobierano w dwóch punktach czasowych. Pierwsze pobranie osocza miało miejsce w ciągu 24 godzin od domniemanego czasu zgonu, w momencie kiedy ciało zostało przetransportowane do chłodni (temperatura 4-8°C) w budynku KiZMS GUMed i pozostawało w oczekiwaniu na przeprowadzenie sekcji zwłok. Ciało zmarłego wyciągane było z chłodni na czas pobrania materiału. Przy pomocy piętnastocentymetrowej igły z chromowanego mosiądzu przebijano się przez powłoki skórne na wysokości dołu nadobojczykowego. Krew pobierano na antykoagulant – heparynę i odwirowywano przez 15 minut w temperaturze 4°C. Uzyskane osocze (pobierane z nad osadu elementów morfotycznych) przenoszono do probówek typu *Eppendorf* i zamrażano w temperaturze -80°C. Igłę po pobraniu pozostawiano w ciele zmarłego. Nasadę igły zabezpieczano przylepcem medycznym w taki sposób, aby uniknąć przypadkowego wysunięcia się igły podczas późniejszych procedur przeprowadzanych podczas sekcji zwłok. Sposób pobrania materiału biologicznego zaprezentowano na rycinie 4.



Rycina 4. Sposób pobierania próbek krwi przez powłoki ciała.

Drugie pobranie osocza od tego samego pacjenta miało miejsce podczas zaplanowanej sekcji zwłok. Aby uniknąć dużej zmienności w grupie badanej ze względu na czas pobrania materiału, sekcje zwłok zakwalifikowanych pacjentów planowane były w czasie do 96

godzin od domniemanego momentu zgonu. Materiał do badań pobierano śródsekcyjnie po otwarciu powłok ciała, bezpośrednio z lewej komory serca. Jednocześnie sprawdzano miejsce wkłucia do pobierania materiału przez powłoki ciała (aby zweryfikować czy pierwsze pobranie było dokonane z komór serca, aorty czy np. z worka osierdziowego).



Rycina 5. Schemat przedstawiający dwa etapy pobierania materiału biologicznego do oznaczeń; (A) pierwsze pobranie w czasie do 24 h po śmierci; (B) drugie pobranie w czasie do 96 godzin od zgonu.

Charakterystykę pacjentów zakwalifikowanych do badania przedstawiono w tabeli 3. oraz tabeli 4.

Tabela 3. Charakterystyka grupy pacjentów zakwalifikowanych do badania.

Grupa	Liczebność (mężczyźni/kobiety)	Wiek [lata]	BMI
		Średnia (± odchylenie standardowe)	
Grupa kontrolna	16 (12/4)	48,6 (± 15,2)	22,68 (± 3,98)
Grupa badana	15 (11/4)	48,7 (± 12,6)	24,83 (± 3,62)

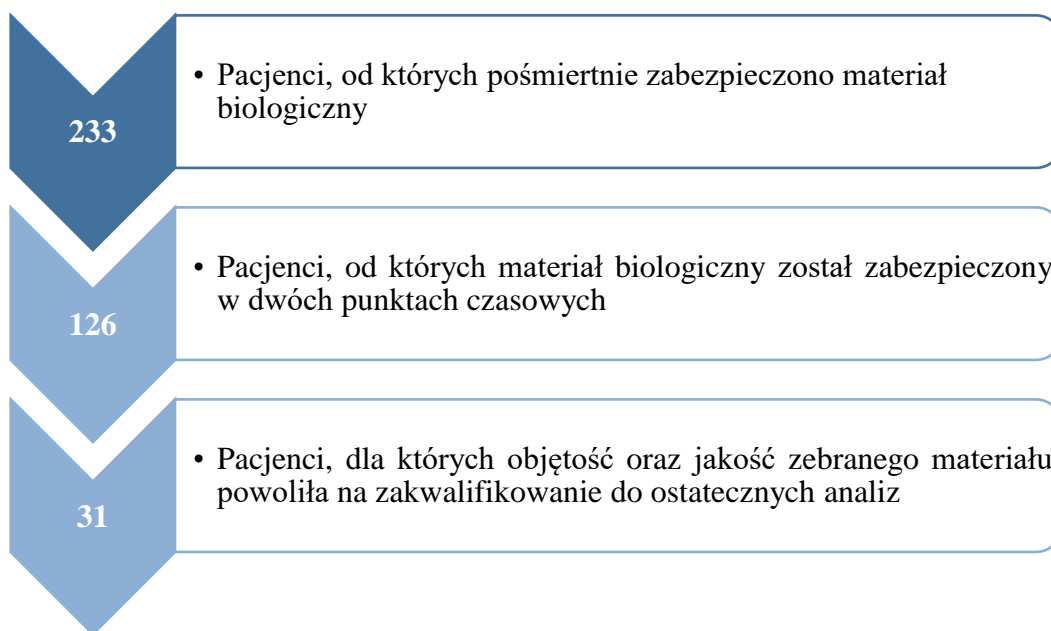
Tabela 4. Podział pacjentów z grupy badanej na podgrupy według stężenia alkoholu etylowego stwierdzonego pośmiertnie we krwi pobranej śródsekcyjnie.

Stężenie alkoholu [‰]	Liczebność grupy (mężczyźni/kobiety)
≤ 0,25	1 (1/0)
0,26 - 1,00	2 (2/0)
1,01 – 2,00	2 (1/1)
2,01 – 3,00	3 (2/1)
3,01 ≤	7 (5/2)

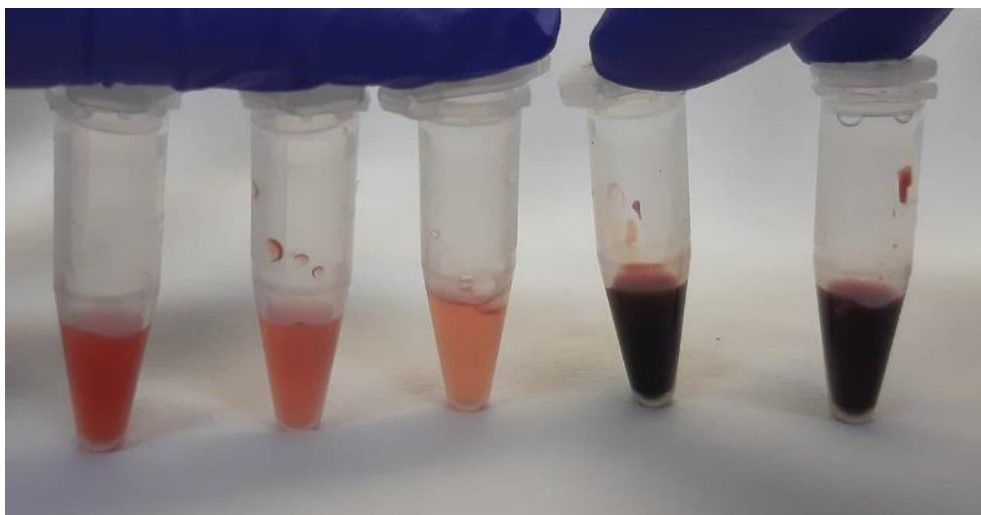
Ze względu na unikatowość wykorzystywanego materiału biologicznego, jak i brak możliwości przewidzenia dostępności, objętości i jakości pobieranych próbek osocza, koniecznym było znaczne ograniczenie liczebności zarówno grupy badanej, jak i kontrolnej w stosunku do pierwotnie planowanej liczby analizowanych przypadków.

Nie zauważono wyraźnych zależności pomiędzy jakością pobieranego materiału biologicznego a charakterystyką pacjenta, dlatego oszacowanie finalnej liczebności grupy kontrolnej oraz badanej było trudne. W toku prowadzenia eksperymentu zabezpieczono materiał biologiczny zebrany podczas 233 sekcji zwłok, w tym w 126 przypadkach w dwóch punktach czasowych. Głównym ograniczeniem w procesie pobierania próbek był obserwowany znaczny stopień hemolizy krwi, który

zaszedł w organizmie zanim ciało zmarłego trafiło do chłodni prosektoryjnej. Spowodowało to zmniejszenie liczby badanych pacjentów z obydwu grup, co przedstawiono na rycinie 6. Ilość elementów morfotycznych krwi, które w różnym stopniu uległy degradacji, znacząco różniła się między pobranymi przypadkami. Sam kolor osocza oddzielonego z próbki krwi był wskazówką, czy dany przypadek zakwalifikuje się do kolejnych etapów analizy. Różnorodność pod względem zabarwienia osocza przedstawiono na rycinie 7. W każdym z zaprezentowanych przypadków osocze zostało oddzielone od elementów morfotycznych krwi zaraz po pobraniu materiału biologicznego od zmarłego. Wirowanie pobranej krwi trwało 10 minut, w temperaturze 4°C, z przyspieszeniem $2000 \times g$.



Rycina 6. Zakres liczby pobieranych próbek i ostateczna liczebność grupy wybranej do oznaczeń analitycznych.



Rycina 7. Prezentacja pięciu próbek osocza pochodzących od pięciu różnych pacjentów.

6.4. Procedura przygotowania próbek osocza do oznaczeń analitycznych

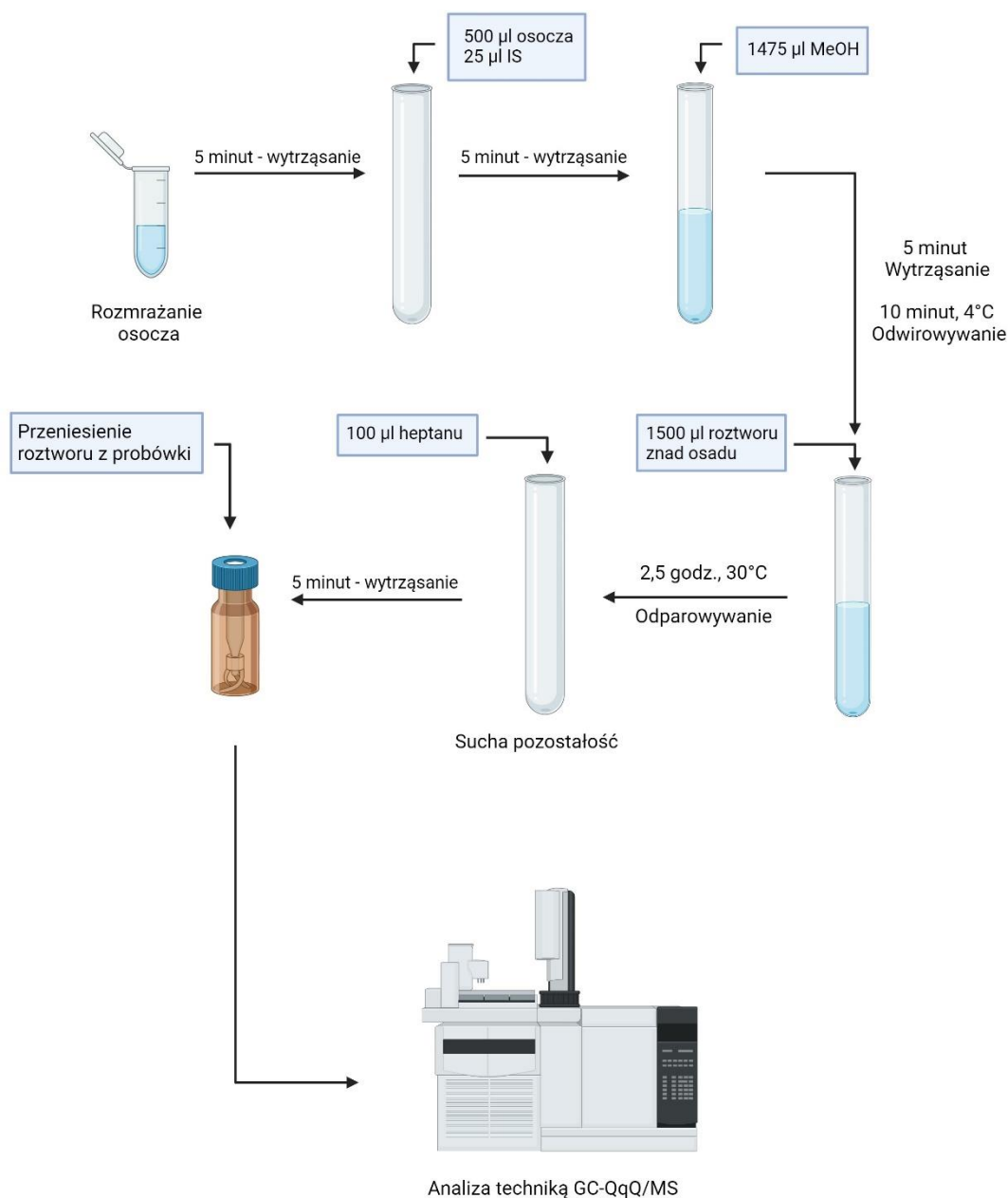
W pierwszej kolejności podjęto się przygotowania materiału biologicznego w celu przeprowadzenia celowanych analiz metabolomicznych. Pozostały materiał ponownie umieszczono w temperaturze -80°C . Ponowne rozmrożenie miało miejsce w momencie przygotowywania niecelowanych analiz metabolomicznych. Ze względu na ograniczoną objętość dostępnego osocza nie wszystkie zabezpieczone próbki zostały poddane dwóm rodzajom analiz – celowanej oraz niecelowanej.

6.4.1. Przygotowanie próbek osocza do analiz techniką GC-QqQ/MS

➤ Przygotowanie materiału biologicznego do celowanych analiz metabolomicznych

W pierwszym etapie rozmrożone w temperaturze pokojowej próbki osocza poddano mieszaniu przez 5 minut w wytrząsarce laboratoryjnej. Następnie, 500 μl osocza przeniesiono do szklanych probówek o pojemności 10 ml i dodano 25 μl przygotowanego wcześniej roztworu wzorca wewnętrznego (ester etylowy kwasu heptadekanowego) w metanolu (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Powstałą mieszaninę wytrząsano kolejne 5 minut, po czym do każdej próbki dodano 1475 μl zimnego metanolu (przechowywanego przez 30 minut w temperaturze -80°C). Próbki mieszano przez 5 minut w wytrząsarce laboratoryjnej,

a następnie wirowano przez 15 minut ($2469 \times g$) w temperaturze 4°C . W kolejnym etapie przeniesiono $1500 \mu\text{l}$ otrzymanego roztworu z nad osadu do nowych szklanych probówek o poj. 10 ml i odparowywano do sucha w wirówce próżniowej z pułapką mrozącą z możliwością odparowywania próbek, w temperaturze 30°C przez $2,5$ godziny. Do suchej pozostałości dodano $100 \mu\text{l}$ heptanu i mieszano przez 5 minut przy użyciu wytrząsarki laboratoryjnej. Uzyskane roztwory przeniesiono w całości do insertów szklanych o poj. $200 \mu\text{l}$ umieszczonych w fiolkach o pojemności 2 ml . Tak przygotowane próbki umieszczono w termostatowanym (11°C) automatycznym podajniku próbek i poddano analizie za pomocą techniki GC-QqQ/MS. Całą procedurę przedstawiono na rycinie 8.



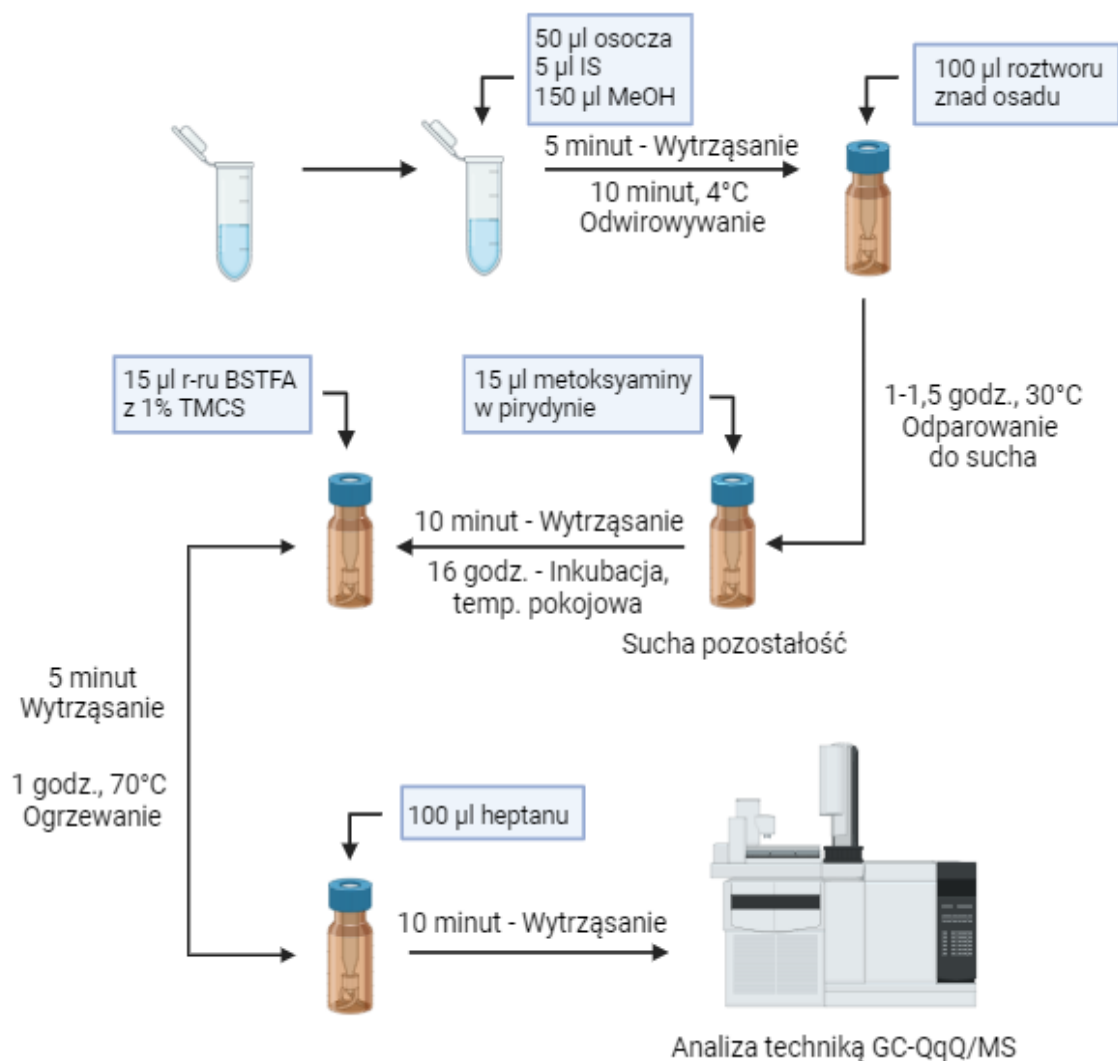
Rycina 8. Procedura przygotowania próbek osocza do celowanych analiz metabolomicznych.

➤ Przygotowanie materiału biologicznego do niecelowanych analiz metabolomicznych

W pierwszym etapie rozmrożone na lodzie próbki osocza poddano mieszaniu przez 5 minut w wytrząsarce laboratoryjnej. Następnie, 50 µl osocza przeniesiono do plastikowej próbki typu Eppendorf o pojemności 2 ml i dodano 5 µl roztworu kwasu pentadekanowego (będącego wzorcem wewnętrznym, IS) oraz 150 µl zimnego metanolu.

Materiał biologiczny do próbek QC powstał poprzez pobranie 20 μl osocza z każdej z analizowanych próbek oraz ich zmieszanie. Kolejne etapy były analogiczne jak w procesie przygotowywania próbek biologicznych.

Tak przygotowane próbki wytrząsano przez 5 minut (2000 rpm) oraz odwirowywano przez 10 minut ($12900 \times g$) w temperaturze 4°C . Otrzymany roztwór z nad osadu w objętości równej 100 μl przeniesiono do szklanego insertu umieszczonego w bursztynowej fiołce chromatograficznej. W kolejnym etapie odparowano roztwór w insertach do sucha, w temperaturze 30°C przez czas około 1-1,5 godziny. Do suchej pozostałości dodano 15 μl roztworu metoksyaminy w pirydynie (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) i poddano wytrząsaniu przez 10 minut (2000 rpm). Tak przygotowane próbki poddano procesowi inkubacji na 16 h, w zaciemnionym miejscu i w temperaturze pokojowej. Następnie do każdej z próbek dodano 15 μl roztworu BSTFA z 1 % TMCS i poddano wytrząsaniu przez 5 minut (2000 rpm). Następnie wszystkie próbki umieszczono w piecu grzewczym i ogrzewano przez godzinę w temperaturze 70°C . Ostatnim etapem było dodanie do wszystkich próbek 100 μl roztworu heptanu, wytrząsanie przez 10 minut (2000 rpm). Tak przygotowane próbki umieszczono w automatycznym podajniku próbek i poddano analizie za pomocą techniki GC-QqQ/MS. Procedurę przygotowania próbek osocza oraz próbek QC przedstawiono graficznie na rycinie 9.



Rycina 9. Procedura przygotowania próbek osocza do niecelowanych analiz metabolomicznych.

6.4.2. Przetwarzanie danych pomiarowych uzyskanych z wykorzystaniem techniki GC-QqQ/MS

Dane pomiarowe uzyskane w wyniku niecelowanych analiz metabolomicznych za pomocą techniki GC-QqQ/MS poddano etapom dekonwolucji oraz identyfikacji z zastosowaniem programu AMDIS (ang. *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) z wykorzystaniem biblioteki widm NIST11 (*National Institute of Standards and Technology*, Stany Zjednoczone). Pierwszym krokiem było obliczenie indeksów retencji (ang. *retention index*, RI) analitów obecnych w analizowanych próbkach osocza na podstawie znanych wartości RI oraz czasów retencji

przeanalizowanej próbki mieszaniny alkanów. W drugiej kolejności wyrównano czasy retencji badanych związków zakładając maksymalny zakres przesunięcia równy 0,1 minuty. Identyfikacja metabolitów została opracowana w oparciu o wartości R_I , t_R oraz poprzez porównanie danych eksperymentalnych z widmem mas zawartym w bibliotece widm. Filtrowanie zmiennych przeprowadzono przy użyciu programu Mass Profiler Professional B. 02.01 (MPP, Agilent Technologies, Niemcy). Dalsze analizy prowadzono na zmiennych obecnych w minimum 50 % próbek kontrolnych, których współczynnik CV nie przekraczał 30 %. Dane przefiltrowano następnie pod kątem obecności w minimum 80 % próbek w jednej z badanych grup (osób trzeźwych i osób pod wpływem alkoholu). Przygotowaną macierz danych poddano jedno- i wielowymiarowym analizom statystycznym.

6.5. Optymalizacja

Oznaczenia analityczne przygotowanych próbek osocza przeprowadzono z zastosowaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol z jonizacją elektronami (GC-EI-QqQ/MS) w trybie MRM. Rozdzielenie oznaczanych związków przeprowadzono z zastosowaniem kolumny chromatograficznej Zebron ZB-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 μm; Phenomenex, Stany Zjednoczone). Program gradientu temperatury przedstawiono w tabeli 5. Mając na uwadze charakter fizyko-chemiczny oznaczanych analitów przetestowano szeroki zakres wartości temperatur i gradientu ich zmian, na podstawie których dokonano optymalizacji parametrów metody oznaczania siedmiu estrów etylowych kwasów tłuszczowych w badanej matrycy biologicznej. Zaczynając od procesu przygotowania próbki, w którym kluczowym etapem jest odparowanie rozpuszczalnika po ekstrakcji – sprawdzano odzysk analitów. Stwierdzono, iż mimo dłuższego czasu całego procesu w porównaniu do wyższych temperatur, największy odzysk uzyskuje się przy odparowywaniu w temperaturze 30°C. Kolejnym optymalizowanym parametrem był stosunek objętości odczynnika organicznego do matrycy biologicznej podczas strącania białek (odbiałczania) obecnych w próbkach osocza. Najkorzystniejszym (dającym najlepszą odpowiedź sprzętu pomiarowego) okazał się stosunek objętości osocze:metanol 1:3 (v/v). Czas trwania pojedynczej analizy wyniósł 57 minut i 10 sekund. Na tym etapie porównywano otrzymane sygnały pod względem intensywności i powtarzalności. Parametry zoptymalizowanej metody analitycznej zostały przedstawione w tabeli 6.

Tabela 5. Gradient temperaturowy podczas oznaczeń GC-QqQ/MS.

Szybkość zmiany temperatury [°C/min]	Temperatura końcowa [°C]	Czas utrzymywania temperatury [min]
-	60	1,0
10,0	130	0,0
4,0	180	0,0
3,0	250	0,0
6,0	300	5,0

Tabela 6. Pozostałe parametry opracowanej metody analitycznej GC-QqQ/MS.

Parametr	Wartość parametru
Objętość wprowadzanej próbki	1 µl
Tryb wprowadzania próbki	dozowanie bez podziału próbki (ang. <i>splitless</i>)
Temperatura portu nastrzykowego	250°C
Gaz nośny	hel
Całkowity przepływ gazu nośnego	10 ml/min
Ciśnienie gazu nośnego	53,5 kPa
Napięcie źródła jonów	70 eV
Temperatura źródła jonów	200°C
Gaz w celi kolizyjnej (ang. <i>CID gas</i>)	argon

Przed przystąpieniem do przeprowadzenia analiz, w celu zapewnienia odpowiedniej jakości uzyskanych wyników, wykonano kalibrację aparatu analitycznego z zastosowaniem roztworu perfluorotributyloaminy (ang. *perfluorotributylamine*, PFTBA).

Podczas optymalizacji metody oznaczeń ilościowych wybrano charakterystyczne m/z , czyli stosunki masy do ładunku jonów fragmentacyjnych dla oznaczanych analitów, które są różnicowane przez detektor spektrometru (tabela 7.).

Tabela 7. Wybrane wartości przejść m/z oraz energii kolizji (ang. *collision energy*, CE).

Oznaczany analit	Rodzaj przejścia	Wartości przejść m/z	CE [V]
Laurynian etylu	ilościowe	185,20 → 87,10	12
	jakościowe	185,20 → 157,20	6
Mirystynian etylu	ilościowe	213,20 → 87,10	12
	jakościowe	213,20 → 185,20	6
Palmitynian etylu	ilościowe	241,25 → 87,10	12
	jakościowe	213,25 → 87,10	24
Linoleinian etylu	ilościowe	263,10 → 67,10	27
	jakościowe	263,10 → 81,00	18
Oleinian etylu	ilościowe	222,40 → 67,10	27
	jakościowe	180,40 → 67,10	24
Stearynian etylu	ilościowe	269,35 → 87,10	12
	jakościowe	312,00 → 87,10	24

6.6. Walidacja

Walidacja metody to systematyczna ocena postępowania analitycznego, której celem jest udowodnienie, że jest ono naukowo prawidłowe w warunkach, w których ma być zastosowane.

Opracowana metoda analityczna została zwalidowana zgodnie z wytycznymi FDA oraz EMA w zakresie parametrów analitycznych takich jak: liniowość, granica wykrywalności

(ang. *limit of detection*, LOD) i oznaczalności (ang. *limit of quantification*, LOQ), precyzja, precyzja pośrednia, dokładność (ang. *accuracy*, ACC) oraz efekt matrycy [79].

Podczas walidacji metody analitycznej próbka ślepa (matryca biologiczna niezawierająca oznaczanych analitów) wzbogacana jest o oznaczane anality przy użyciu roztworów wzorców odniesienia w celu przygotowania wzorców kalibracyjnych oraz próbek kontrolnych (ang. *quality control*, QC). Roztwory podstawowe każdego z analitów powstały przez rozpuszczenie odpowiedniej naważki w metanolu, uzyskując stężenie 1 mg/ml. Z tak przygotowanych roztworów przygotowano roztwory robocze każdego z analitów. Przy ich pomocy przygotowano próbki w zakresie stężeń od 0,015 µg/ml do 10 µg/ml. Wzorce kalibracyjne i QC zostały przygotowane z oddzielnych rozcieńczeń. Dodatkowo, dobrano odpowiedni wzorec wewnętrzny – ester etylowy kwasy heptadekanowego, który jest związkiem niewystępującym fizjologicznie w organizmie. Był on dodawany do każdej z badanych próbek w objętości 25 µl (roztwór o stężeniu 100 µg/ml).

Podczas przeprowadzanych analiz, w sekwencji próbek materiału biologicznego znajdowały się próbki QC, których poziomy stężenie znajdowały się w zakresie liniowości metody. Procedura przygotowania próbek kontrolnych, będących roztworami oznaczanych związków na trzech poziomach stężeń, była analogiczna do procedury przygotowania próbek osocza pacjentów. Zastosowanie próbek QC miało na celu monitorowanie poprawności i stabilności oznaczeń podczas przeprowadzania analiz.

6.6.1. Selektywność i specyficzność

Selektywność jest zdolnością metody analitycznej do rozróżniania i pomiaru analitu w obecności innych substancji potencjalnie zakłócających przeprowadzanie analiz w matrycy biologicznej. Podczas określania selektywności metody należy wykazać, że nie obserwuje się znaczącej reakcji przypisywanej składnikom zakłócającym. Odpowiedzi przypisane tym składnikom nie powinny być większe niż 20 % odpowiedzi analitu przy LLOQ (ang. *lower limit of quantification*, dolna granica oznaczalności) i nie większe niż 5 % odpowiedzi wzorca wewnętrznego w próbce LLOQ.

Specyficzność dotyczy zdolności metody bioanalitycznej do wykrywania i odróżniania analitu od innych substancji, w tym także takich o podobnej strukturze chemicznej. Wybranie konkretnie określonych wartości przejść MRM pozwala oznaczyć w analizowanej próbce jedynie związki wybrane do oznaczeń ilościowych.

6.6.2. Krzywa kalibracyjna

Krzywa kalibracyjna pokazuje zależność pomiędzy nominalnym stężeniem analitu a reakcją sprzętu laboratoryjnego na badany związek. Przygotowane (przez połączenie wymieszanej matrycy biologicznej (osocza) ze znaną ilością analitów) w tym celu wzorce kalibracyjne obejmują zakres liniowości. Analiza tak przygotowanych próbek pozwala wyznaczyć krzywą kalibracyjną. Stężenia poszczególnych związków wyznaczane były na podstawie stosunku pola powierzchni analitu do pola powierzchni wzorca wewnętrznego.

Krzywa kalibracyjna w zależności od oznaczanego analitu obejmowała 7 lub 8 punktów pomiarowych na poziomach: 0,015; 0,03; 0,05; 0,25; 0,5; 2,5; 5,0 oraz 10 µg/ml. Dodatkowo przygotowano trzy próby kontrolne na: niskim, średnim oraz wysokim poziomie stężenia. Próbki LQC (ang. *low quality control*), MQC (ang. *medium quality control*) oraz HQC (ang. *high quality control*) przygotowane były poprzez dodanie odpowiedniej objętości mieszaniny analitów oraz wzorca wewnętrznego do próbki ślepej w celu uzyskania ostatecznego stężenia 0,1 (LQC); 1,0 (MQC) oraz 7,5 µg/ml (HQC) w próbce.

Aby uznać wyniki za właściwe, wartość współczynnika determinacji musi zawierać się w zakresie $r^2 = 0,990$ do $r^2 = 1,000$ [79].

6.6.3. Granice wykrywalności i oznaczalności

W celu wyznaczenia granic wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD) i oznaczalności (ang. *limit of quantification*, LOQ) dla analizowanych związków, podjęto się wyznaczenia krzywej opracowanej na podstawie analizy próbek osocza wzbogaconych o mieszaninę substancji wzorcowych. Wartości LOQ i LOD oblicza się na podstawie wzorów podanych poniżej.

$$LOQ = \frac{10 \times \text{błąd standardowy}}{\text{współczynnik zmienności}}$$

$$LOD = \frac{3 \times \text{błąd standardowy}}{\text{współczynnik zmienności}}$$

Kolejną z metod wyznaczania granic wykrywalności i oznaczalności jest odczyt stosunku sygnału do szumu w używanej aparaturze pomiarowej. Podczas walidacji opracowanej metody wykorzystano i porównano oba powyższe podejścia do wyznaczania LOD i LOQ.

6.6.4. Dokładność i precyzja

Zarówno dokładność, jak i precyzja metody zostały potwierdzone poprzez porównanie wyników uzyskanych wewnątrz jednej sekwencji (ang. *intra-day*) oraz pomiędzy sekwencjami (ang. *inter-day*) przeprowadzonymi w kolejnych dniach. Ocenie poddano pięciokrotne pomiary trzech poziomów QC w każdej sekwencji analiz. Dodatkowo, dokładność oraz precyzja zostały określone porównując wyniki z następujących po sobie sekwencji analiz, z trzech kolejnych dni.

Dokładność obliczonych stężeń powinna mieścić się w zakresie $\pm 15\%$ od stężenia nominalnego, za wyjątkiem poziomu LLOQ, dla którego dokładność może mieścić się w granicach $\pm 20\%$.

6.6.5. Efekt matrycy

Efekt matrycy definiowany jest jako zmiana odpowiedzi analitu z powodu zakłócających i często niezidentyfikowanych składników matrycy próbki. Efekt matrycy oceniony został poprzez analizę próbek na poziomach LQC oraz HQC. W przypadku analizy FAEE porównano wpływ matrycy biologicznej jaką jest osocze (trzy próbki LQC oraz trzy próbki HQC) z metanolem (trzy próbki LQC oraz trzy próbki HQC).

Efekt matrycy wyznaczono dzięki porównaniu wyników analiz próbek przygotowanych na matrycy osocza oraz w roztworze metanolu. Obliczono wskaźnik matrycy (ang. *matrix factor*, MF) dla każdego z poziomów stężeń według następujących wzorów:

$$MF_{analitu} = \frac{AUC_{analitu} \text{ w osoczu}}{AUC_{analitu} \text{ w metanolu}}$$

$$MF_{wzorca} = \frac{AUC_{wzorca} \text{ w osoczu}}{AUC_{wzorca} \text{ w metanolu}}$$

Następnie wyznaczono średnią wartość wskaźnika matrycy oraz jego odchylenie standardowe. Efekt matrycy został obliczony poprzez wartość współczynnika zmienności (ang. *coefficient of variation*, CV) według wzoru:

$$CV_{MF} = \frac{\text{odchylenie standardowe } \frac{MF_{analitu}}{MF_{wzorca}}}{\text{średnia } \frac{MF_{analitu}}{MF_{wzorca}}} \times 100 \%$$

6.6.6. Stabilność

Ocena stabilności została przeprowadzona w celu zapewnienia, że każdy etap procedury przygotowania próbki, przechowywania oraz analizy materiału biologicznego nie wpływa znacząco na końcowe stężenie analitów w mierzonych próbkach. Parametry te zostały sprawdzone przy pomocy analizy próbek LQC oraz HQC. W celu stwierdzenia, czy zaprezentowana metoda charakteryzuje się wystarczającą stabilnością porównano, w każdym z przypadków, obliczone średnie stężenie analitu w próbce do stężenia nominalnego.

a) Test zamrażania – rozmrażania (ang. *freeze-thaw stability*)

Aby ocenić wpływ wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek przygotowano zestaw 12 próbek na poziomie LQC oraz 12 próbek na poziomie HQC (ślepa próbka osocza o obj. 500 µl z dodatkiem mieszaniny substancji wzorcowych o odpowiednim stężeniu). Pierwsze 3 próbki LQC oraz 3 próbki HQC zostały przygotowane od razu po przygotowaniu całego zestawu, a kolejne 18 próbek zostało przeniesionych do zamrażarki niskotemperaturowej (-80°C). Każdorazowo, w odstępach co najmniej 12 godzin pomiędzy cyklami mrożenia, dokonywano rozmrożenia wszystkich próbek. Następnie przygotowywano i analizowano 3 próbki LQC oraz 3 próbki HQC, a pozostałe próbki ponownie zamrażano.

b) Stabilność w czasie przygotowania próbki

W niniejszej pracy przeprowadzono także badanie stabilności w okresie przygotowania próbki (ang. *benchtop stability*). W tym celu, próbki LQC oraz HQC zostały przygotowane w identycznych warunkach laboratoryjnych jak rzeczywiste próbki biologiczne i przechowywane były na blacie laboratoryjnym w temperaturze laboratorium (około 20°C) przez okres odpowiadający co najmniej czasowi potrzebnemu na przygotowanie próbek badanych.

c) Stabilność w automatycznym podajniku próbek

Sprawdzono stabilność przygotowanej próbki osocza w warunkach przechowywania, które są stosowane podczas oznaczeń analitycznych. Przygotowywano po trzy próbki osocza o stężeniu analitów równym 0,1 µg/ml oraz trzy próbki o stężeniu 7,5 µg/ml. Tak przygotowane próbki umieszczano w automatycznym podajniku próbek, w którym utrzymywana była temperatura 11°C.

6.6.7. Elastyczność metody analitycznej

Badaniu elastyczności podlegały parametry procedury przygotowania próbki, takie jak czas mieszania w wytrząsarce laboratoryjnej, temperatura mieszania w wirówce laboratoryjnej, objętość metanolu używanego do strącenia białek w próbkach oraz temperatura odparowywania próbek.

W celu zweryfikowania elastyczności metody przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu sprawdzenie wpływu poszczególnych etapów przygotowania próbki na ostateczny wynik oznaczeń. Zaplanowano w tym celu 16 eksperymentów testujących wpływ 9 różnych parametrów, w tym zmiennej sztucznej, według planu Placketta-Burmana (tabela 8.).

Próbki do badań przygotowano zgodnie z wartościami parametrów zawartymi w tabeli 8. Do ich przygotowania użyto mieszaniny osocza zmarłych zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Pozostałe odczynniki użyte w eksperymentach były tożsame z używanymi w standardowej metodzie przygotowania próbki badanej.

Po przygotowaniu próbki umieszczono ją w automatycznym podajniku próbek, w którym utrzymywana była temperatura 11°C.

Tabela 8. Eksperymenty przeprowadzone w ramach badania elastyczności metody analitycznej.

Nr	Mieszanie 1 [min]	Obj. osocza [μl]	Obj. MeOH [μl]	Mieszanie 2 [min]	Czas wirowania po odbiałczeniu [min]	Temp. wirowania [°C]	Temp. odparowywania [°C]	Mieszanie 3 [min]	Zmienna fikcyjna
1	5	500	1475	5	15	4	30	5	0
2	5	500	1475	5	15	4	30	5	0
3	6	495	1470	4	16	3	30	6	-1
4	4	495	1480	4	16	5	32	4	-1
5	6	495	1480	6	16	3	30	4	1
6	4	505	1470	4	16	3	32	6	1
7	5	500	1475	5	15	4	32	5	0
8	4	505	1470	6	16	5	30	4	-1
9	6	495	1470	6	14	5	32	6	-1
10	6	505	1470	4	14	5	30	4	1
11	4	505	1480	6	14	3	30	6	-1
12	5	500	1475	5	15	4	32	5	0
13	4	495	1470	6	14	3	32	4	1
14	4	495	1480	4	14	5	30	6	1
15	6	505	1480	4	14	3	32	4	-1
16	6	505	1480	6	16	5	32	6	1

6.6.8. Ponowna analiza próbki

Różnice wynikające z wiązania białek, konwersji znanych oraz nieznanymi analitów obecnych w próbkach, współistniejące składniki biologiczne oraz leki mogą wpływać na końcowe stężenie oznaczanego związku w analizowanych próbkach. Ponowna analiza próbki (ang. *incurred sample reanalysis*, ISR) ma na celu weryfikację wiarygodności oznaczanych stężeń analitu w próbce.

Procentową różnicę pomiędzy stężeniem początkowym a stężeniem zmierzonym podczas powtórnej analizy obliczyć można w odniesieniu do ich wartości średniej przy użyciu równania:

$$\% \text{ różnicy} = \frac{\text{wartość powtórzona} - \text{wartość początkowa}}{\text{wartość średnia}} \times 100$$

W przypadku metod chromatograficznych różnica ta powinna zawierać się w zakresie $\pm 20\%$ dla co najmniej 2/3 powtórzeń.

6.7. Przygotowanie i analiza danych

Po pobraniu materiału biologicznego podczas sekcji zwłok mrożono uzyskane próbki. W okresie pomiędzy pobraniem próbek a wyselekcjonowaniem konkretnej grupy do dalszych etapów analiz zapoznawano się z uzupełnianą dokumentacją medyczną, dostępną do wglądu dla obducentów oraz osób upoważnionych. Ze względu na to, iż czynnikiem różnicującym pacjentów na grupę badaną i kontrolną był poziom alkoholu etylowego oznaczonego podczas rutynowych badań toksykologicznych, zapoznawano się z wynikami przedstawianymi w wydawanych posekcyjnie opiniach toksykologicznych.

Alkohol etylowy oznaczany jest rutynowo w laboratorium toksykologicznym Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego metodą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym. Wszystkie warunki przeprowadzania analiz spełniają aktualne wymogi Instytutu Ekspertyz Sądowych.

Następnie w laboratorium Katedry Biofarmacji i Farmakokinetyki dokonano oznaczeń estrów etylowych kwasów tłuszczowych w dostępnym materiale biologicznym i uzyskano dane analityczne, które stanowiły wyliczone, w oparciu o krzywe kalibracyjne, stężenia

oznaczanych FAEE znormalizowane przez wzorzec wewnętrzny. Dane te wyrażono w jednostkach $\mu\text{g/ml}$. W kontekście przygotowania oraz analizy danych przeprowadzono jednowymiarową analizę statystyczną po uprzednim zbadaniu normalności rozkładu zmiennych (z zastosowaniem analizy histogramów oraz testu W Shapiro-Wilka). Następnie zastosowano test U Manna-Whitneya do oceny istotności statystycznej zmiennych objaśniających stanowiących stężenia konkretnych FAEE względem badanych grup (kontrolnej oraz badanej). Przeprowadzono także analizę typu ramka-wąsy z wyliczeniem średniej oraz odchylenia standardowego danych analitycznych. Obliczenia przeprowadzono w programie Statistica (TIBCO Software Inc.).

Korelacje występujące między poszczególnymi związkami sprawdzano przy użyciu programu Matlab.

7. Wyniki

7.1. Wyniki walidacji uzyskane z zastosowaniem techniki GC-QqQ/MS

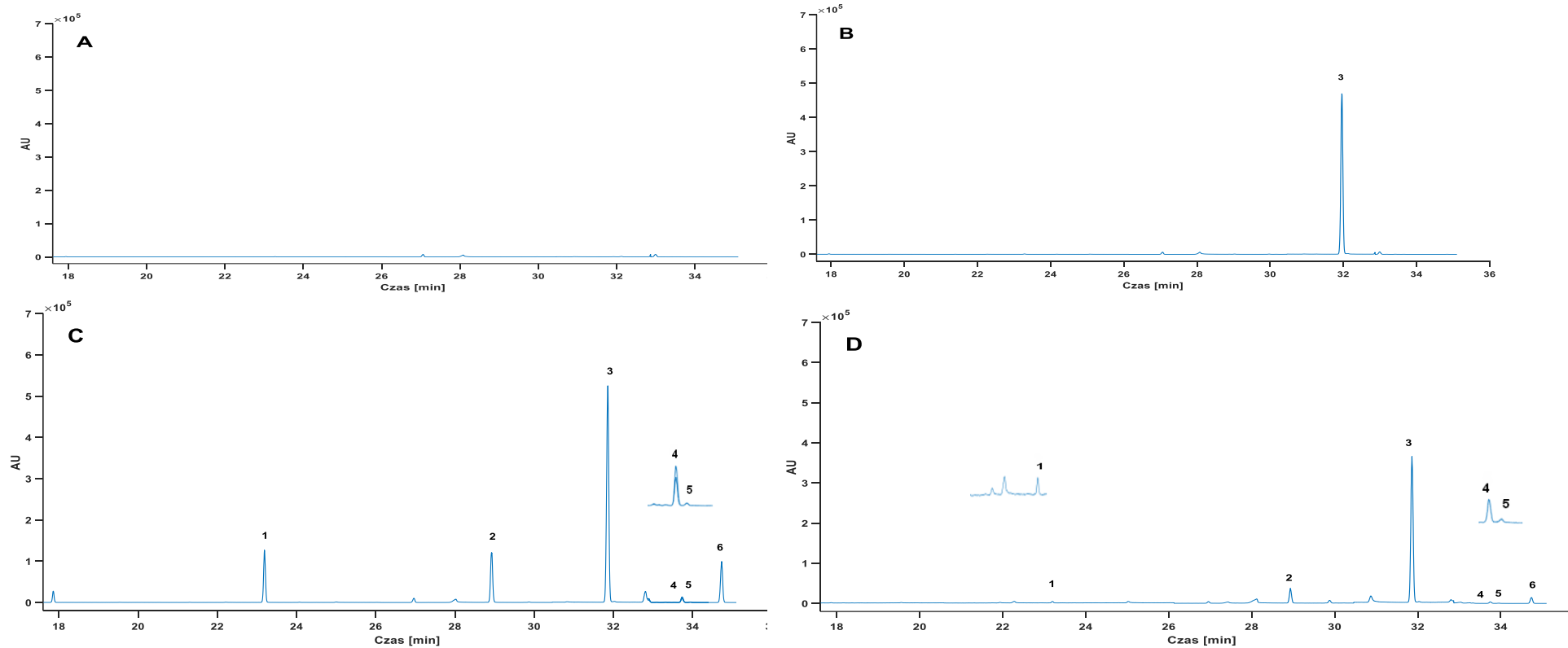
W toku przeprowadzanych analiz walidacyjnych zdecydowano o odrzuceniu z oznaczanej grupy analitów laurynianu etylu. Związek ten charakteryzował się dużą niestabilnością uniemożliwiającą otrzymanie wiarygodnych wyników oznaczeń. Trudności związane z oznaczaniem tego związku przedstawiono szczegółowo w części Dyskusji.

7.1.1. Selektywność i specyficzność

Ocena selektywności i specyficzności opracowanej metody została przeprowadzona poprzez analizę prób ślepych osocza przygotowanych do analiz w analogiczny sposób jak próbki biologiczne analizowane w późniejszym czasie. Próbki ślepe analizowane były każdorazowo na początku sekwencji poprzedzając analizę pozostałych próbek, w tym m.in. próbek służących do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej.

Za pomocą techniki GC-QqQ/MS uzyskano profil oznaczonych FAEE - wybranych sześciu estrów etylowych kwasów tłuszczowych (w tym jednego wzorca wewnętrznego, nie występującego endogennie w organizmie ludzkim estru etylowego kwasu heptadekanowego).

W trakcie procedury walidacji metody udowodniono brak w analizowanym materiale innych związków mogących zakłócać pomiar stężenia wybranych estrów etylowych kwasów tłuszczowych. Przykładowe chromatogramy z oznaczeń analitycznych przedstawiono na rycinie 10.



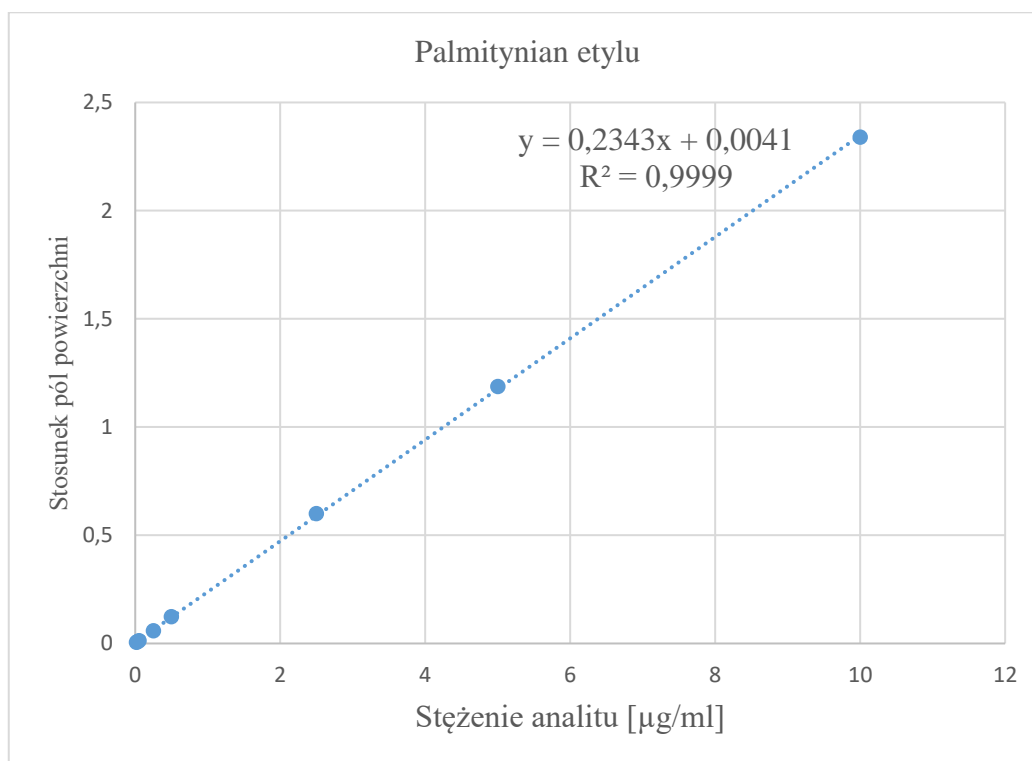
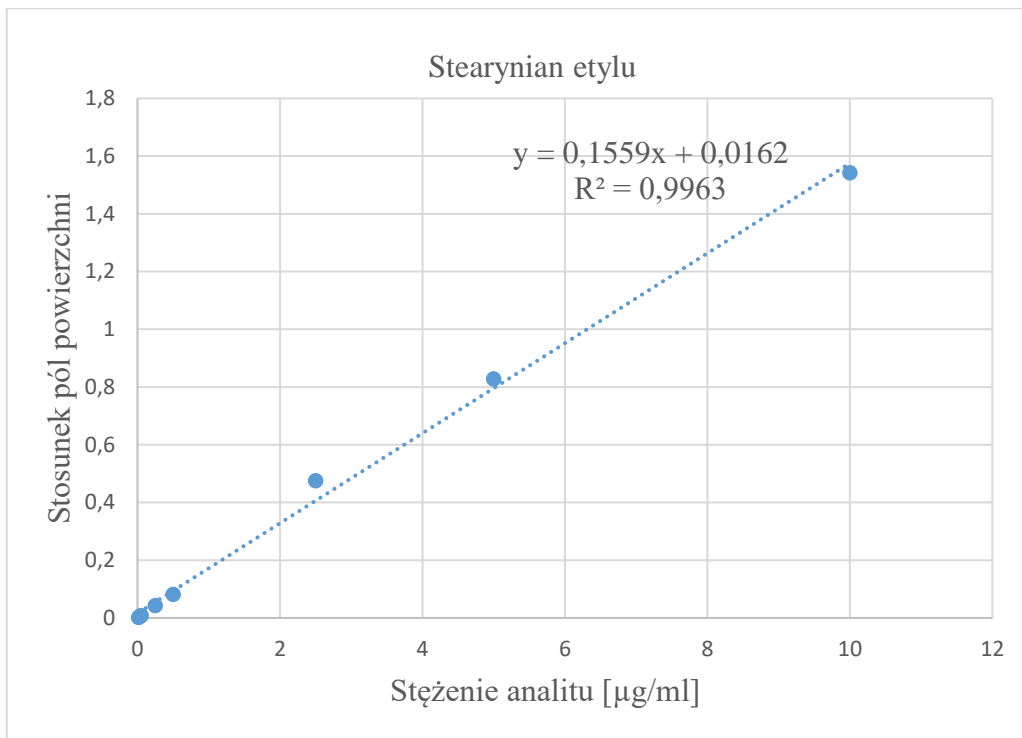
Rycina 10. Przykładowe chromatogramy z oznaczeń analitycznych: (A) próbki ślepej; (B) próbki ślepej wzbogaconej o IS; (C) próbki MQC; (D) próbki rzeczywistej; 1 – mirystynian etylu; 2 – palmitynian etylu; 3 – heptadekanian etylu (IS); 4 – linoleinian etylu; 5 – oleinian etylu; 6 – stearynian etylu. Górna linia na chromatogramach odzwierciedla powiększenie w odpowiednich zakresach czasu.

7.1.2. Liniowość

Podczas wyznaczania liniowości każda z sekwencji rozpoczynała się analizą próbki ślepej, jak i próbki ślepej wzbogaconej wzorcem wewnętrznym. Wartości stężeń dla ULOQ (ang. *upper limit of quantification*, górna granica oznaczalności) wybrano na podstawie przeglądu literaturowego. LLOQ wyznaczono natomiast podczas wyznaczania granicy oznaczalności dla każdego analitu. Szczegółowe wyniki zaprezentowano w tabeli 9. W wyniku analizy rzeczywistych próbek biologicznych ludzkiego osocza potwierdzono, iż zakres stężeń dobrany został prawidłowo. Próbki pochodzące od grupy badanej w większości mieściły się w zakresie liniowości metody. Z kolei próbki rzeczywiste pochodzące od grupy kontrolnej nie mieściły się w wielu przypadkach w zakresie liniowości metody. Założono jednak, że powodem nie jest niedostateczna czułość opracowanej metody a charakter związków FAEE, które będąc metabolitami alkoholu etylowego, nie występują fizjologicznie w organizmie grupy kontrolnej.

Tabela 9. Wyniki krzywej kalibracyjnej.

Oznaczany analit	Zakres stężeń krzywej kalibracyjnej [µg/ml]	Średnia wartość współczynnika determinacji r^2 (n=4)	Dokładność na poziomie LLOQ [%]
Mirystynian etylu	0,015-10	0,9996	83,7
Palmitynian etylu	0,015-10	0,9998	102,8
Linoleinian etylu	0,03-10	0,9995	90,8
Oleinian etylu	0,03-10	0,990	98,0
Stearynian etylu	0,015-10	0,9993	95,6



Rycina 11. Przykładowe krzywe kalibracyjne wyznaczone dla stearynianu etylu oraz palmitynianu etylu.

7.1.3. Granica wykrywalności i oznaczalności

Krzywe dla analizowanych związków wyznaczono na podstawie analizy próbek osocza wzbogaconych mieszaniną substancji wzorcowych w niskich stężeniach: 0,01; 0,015; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Tak przygotowane próbki przeanalizowano dwukrotnie, każdorazowo z nowo przygotowanych próbek. Na podstawie odczytu stosunku pola powierzchni analitu do pola powierzchni wzorca wewnętrznego wyznaczono krzywą i obliczono wartości LOD i LOQ. Wyznaczone metodą krzywej niskich stężeń wartości LOQ przedstawiono w tabeli 10.

Uzyskane wyniki pokrywają się z wartościami wyznaczonymi pierwotnie na podstawie odczytu stosunku sygnału do szumu w używanej aparaturze pomiarowej, tj. LOQ = 0,015 $\mu\text{g/ml}$ dla laurynianu, mirystynianu, palmitynianu oraz stearynianu etylu oraz LOQ = 0,03 $\mu\text{g/ml}$ dla oleinianu oraz linoleinianu etylu.

Tabela 10. Wyznaczone wartości LOQ oznaczanych związków.

Oznaczany związek	Błąd standardowy	Odchylenie standardowe	Wyliczona wartość LOQ
Mirystynian etylu	0,00043	0,2845	0,0153
Palmitynian etylu	0,00040	0,2766	0,0144
Linoleinian etylu	0,00012	0,0404	0,0308
Oleinian etylu	0,00022	0,0908	0,0246
Stearynian etylu	0,00025	0,1771	0,0141

7.1.4. Dokładność i precyzja

Do oceny powtarzalności wykonano sześciokrotny pomiar próbek o stężeniu 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ oraz 7,5 $\mu\text{g/ml}$ (tzn. LQC, MQC oraz HQC). Oznaczenia te zostały wykonane tego samego dnia, przez tego samego badacza, w tej samej sekwencji. Za pomocą współczynnika zmienności dokonano oceny powtarzalności metody. Wartość współczynnika CV nieprzekraczająca 10 % dla pięciu FAEE, wskazywała na precyzję

uzyskanych pomiarów. O odtwarzalności w odstępie czasowym w wykonywaniu oznaczeń świadczyła wartość CV poniżej limitu 10 % pomiędzy poszczególnymi pomiarami.

Dodatkowo zweryfikowano precyzję metody na poziomie stężeń LLOQ równym 0,015 µg/ml.

Tabela 11. Podsumowanie parametrów służących wyznaczeniu dokładności i precyzji w ciągu dnia (ang. *intra-day*) oraz między dniami (ang. *inter-day*).

Oznaczany analit	Próbka kontrolna	Stężenie nominalne [µg/ml]	Dzień analizy	Analizy w ciągu dnia [n=5]		Analizy między dniami [n=15]		
				ACC [%]	CV [%]	ACC [%]	CV [%]	
Mirystynian etylu	LLOQ	0,015	1	110,58	7,47	-	-	
	LQC	0,1	1	109,03	4,39	107,36	6,81	
			2	106,10	10,11			
			3	107,22	4,96			
	MQC	1	1	102,19	8,97	104,86	7,19	
			2	108,56	5,83			
			3	104,35	6,07			
	HQC	7,5	1	105,11	9,75	102,01	8,12	
			2	104,27	7,04			
			3	96,65	5,37			
	Palmitynian etylu	LLOQ	0,015	1	110,10	4,61	-	-
		LQC	0,1	1	90,50	6,22	97,4	8,33
2				98,20	3,03			
3				104,76	8,15			
MQC		1	1	102,41	6,43	101,24	5,10	
			2	100,66	3,54			
			3	102,82	3,08			
HQC		7,5	1	101,13	1,70	101,47	3,68	
			2	102,63	5,76			
			3	100,57	2,14			
Linoleinian etylu		LLOQ	0,03	1	98,25	6,60	-	-
		LQC	0,1	1	111,74	0,86	100,62	8,36
	2			93,00	4,19			
	3			99,98	3,73			
	MQC	1	1	101,48	3,82	102,58	3,55	
			2	101,26	2,44			
			3	105,55	2,67			
	HQC	7,5	1	93,87	4,46	95,82	4,80	
			2	99,03	5,91			
			3	95,52	1,86			
	LLOQ	0,03	1	112,06	3,22	-	-	

Oleinian etylu	LQC	0,1	1	99,22	5,65	96,89	7,97
			2	96,65	10,91		
			3	94,32	7,97		
	MQC	1	1	102,10	3,36	103,72	2,99
			2	103,70	2,09		
			3	105,65	2,60		
	HQC	7,5	1	94,68	5,29	97,83	8,89
			2	102,04	6,08		
			3	98,36	1,09		
Stearynian etylu	LLOQ	0,015	1	103,45	8,76	-	-
	LQC	0,1	1	105,54	3,94	105,65	5,82
			2	108,90	8,44		
			3	102,53	2,53		
	MQC	1	1	96,51	6,38	102,78	8,03
			2	102,21	1,40		
			3	109,72	1,99		
	HQC	7,5	1	99,33	7,35	105,04	8,70
			2	110,05	4,19		
3			106,58	5,00			

Legenda:

ACC ang. *accuracy*, dokładność

CV ang. *coefficient of variation*, współczynnik zmienności

HQC ang. *high quality control*, próba kontrolna o wysokim stężeniu

LLOQ ang. *lower limit of quantification*, dolna granica oznaczalności

LQC ang. *low quality control*, próba kontrolna o niskim stężeniu

MQC ang. *medium quality control*, próba kontrolna o średnim stężeniu

7.1.5. Efekt matrycy

Dla każdego analitu obliczono współczynnik matrycy (MF), dzieląc pole powierzchni pod pikiem analitu w matrycy biologicznej przez pole powierzchni pod pikiem analitu przygotowanego o tym samym stężeniu w roztworze metanolu. MF obliczono również dla wzorca wewnętrznego. Następnie uzyskane współczynniki matrycy dla każdego analitu zostały znormalizowane przez MF wzorca wewnętrznego. Na podstawie uzyskanych znormalizowanych współczynników matrycy wyliczono współczynnik zmienności. Obliczony współczynnik zmienności nie powinien być większy niż 15 %.

Wzorzec wewnętrzny - ester etylowy kwasu heptadekanowego, zarówno w matrycy biologicznej, jak i w metanolu oznaczany jest na bardzo zbliżonym poziomie. W większości przypadków potwierdzono, iż osocze jako matryca biologiczna ma wpływ na odczytywane stężenie oznaczanych związków. Wyniki analiz przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Wyniki oceny efektu matrycy prób QC w osoczu oraz metanolu.

Oznaczany analit	Próbka kontrolna	$\frac{MF_{analitu}}{MF_{wzorca}}$	CV_{MF}
Mirystynian etylu	LQC	1,7867	7,14
	HQC	1,1270	1,70
Palmitynian etylu	LQC	1,2159	10,68
	HQC	0,9383	1,07
Linoleinian etylu	LQC	1,1086	2,31
	HQC	1,0373	8,29
Oleinian etylu	LQC	0,9596	10,72
	HQC	0,9856	9,40
Stearynian etylu	LQC	0,9383	1,07
	HQC	0,9001	4,48

$AUC_{analitu}$ - pole powierzchni pod krzywą oznaczanego analitu

AUC_{IS} – pole powierzchni pod krzywą wzorca wewnętrznego

7.1.6. Stabilność

Ocena stabilności została przeprowadzona w celu zapewnienia, że każdy etap procedury przygotowania próbki, a także przechowywania oraz analizy materiału biologicznego nie wpływa znacząco na finalne stężenie analitów w mierzonych próbkach. Parametry te zostały sprawdzone przy pomocy analizy próbek LQC oraz HQC.

a) Test zamrażania – rozmrażania

Dokonano trzech pomiarów próbek ponownie zamrażanych, udowadniając brak wpływu wielokrotnego zamrażania na stężenie oznaczanych analitów.

b) Stabilność w czasie przygotowania próbki

W przypadku każdego z oznaczanych związków oznaczone średnie stężenie na poziomie HQC wynosiło od 7,73 $\mu\text{g/ml}$ dla palmitynianu etylu do 7,99 $\mu\text{g/ml}$ w przypadku mirystynianu etylu. Na poziomie LQC oznaczone średnie stężenia wynosiły: najniższe w przypadku stearynianu etylu 0,09 $\mu\text{g/ml}$, a najwyższe 0,12 $\mu\text{g/ml}$ w przypadku palmitynianu etylu. Tym samym wnioskować można, iż kilkugodzinny proces przygotowania próbek nie ma istotnego wpływu na ostateczny wynik pomiarów stężeń FAEE w analizowanych próbkach biologicznych.

c) Stabilność w automatycznym podajniku próbek

Próbki kontrolne po przygotowaniu zostały umieszczone w automatycznym podajniku próbek, a po upływie 48 h poddane zostały analizie chromatograficznej. Temperatura 11°C, która utrzymywana była w podajniku, ograniczyła odparowywanie rozpuszczalnika z przygotowanych próbek osocza oraz zwiększyła stabilność analitów.

W tabeli 13. przedstawiono szczegółowe wyniki analiz dotyczących stabilności analitów.

Podsumowując wyniki analiz dotyczących stabilności, zaleca się podzielenie zabezpieczanego materiału biologicznego na mniejsze porcje, w celu uniknięcia niepotrzebnych wielokrotnych procesów rozmrażania i zamrażania. Jednak w przypadku, gdy materiał został już zabezpieczony w większej ilości nie ma potrzeby rezygnacji z niego lub ograniczonego jego zużycia, ponieważ wpływ procesu rozmrażania i zamrażania na stężenie analitów w próbkach okazał się być niewielki. Wpływ przechowywania próbek w warunkach laboratoryjnych podczas procesu przygotowywania kolejnych oraz ostateczne przetrzymywanie ich w automatycznym podajniku próbek podczas analiz nie ma znaczącego wpływu na zawartość analitów w próbce.

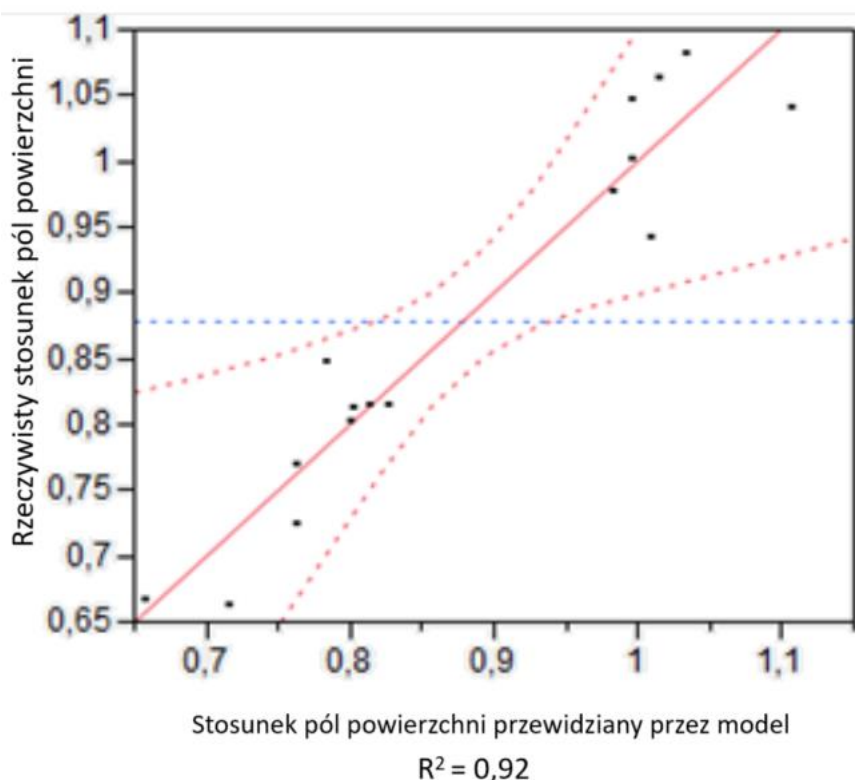
Tabela 13. Wyniki analiz stabilności badanych estrów etylowych.

Oznaczany analit	Poziom analitu w próbce kontrolnej	Stężenie nominalne [µg/ml]	Stabilność w czasie przygotowania próbki (n=3)	Stabilność w automatycznym podajniku próbek (n=3)	Stabilność zamrażania-rozmrażania		
			3h [%]	48 h [%]	cykl 1 [%] (n=3)	cykl 2 [%] (n=3)	cykl 3 [%] (n=3)
Mirystynian etylu	LQC	0,015	110,08	90,11	86,72	90,03	102,02
	HQC	7,5	100,09	96,63	90,30	98,30	113,64
Palmitynian etylu	LQC	0,015	111,64	92,49	89,78	89,99	88,85
	HQC	7,5	104,49	103,02	91,63	102,70	96,67
Linoleinian etylu	LQC	0,015	101,54	88,93	88,05	87,78	87,30
	HQC	7,5	93,79	90,97	90,66	97,12	97,79
Oleinian etylu	LQC	0,015	107,02	99,96	92,87	93,44	94,19
	HQC	7,5	98,55	101,34	96,25	103,98	99,92
Stearynian etylu	LQC	0,015	108,20	89,19	97,65	94,65	89,88
	HQC	7,5	100,09	96,64	96,38	107,18	99,24

7.1.7. Elastyczność metody analitycznej

Przeprowadzenie analiz według planu Placketta-Burmana pozwoliło na potwierdzenie elastyczności opracowanej metody analitycznej w przypadku czterech (palmitynian, linoleinian, oleinian i stearynian etylu) z pięciu oznaczanych estrów etylowych. Zmienną istotnie wpływającą na otrzymane wyniki w przypadku mirystynianu etylu okazała się być temperatura odparowywania rozpuszczalnika po procesie odbiałczania. Różnica jednego stopnia Celsjusza powoduje około 11 procentowy spadek zawartości oznaczanego mirystynianu etylu. W przypadku pozostałych oznaczanych związków taka zależność nie została zaobserwowana.

Rycina 12. obrazuje dopasowanie modelu do danych eksperymentalnych uzyskanych podczas prowadzonych oznaczeń.



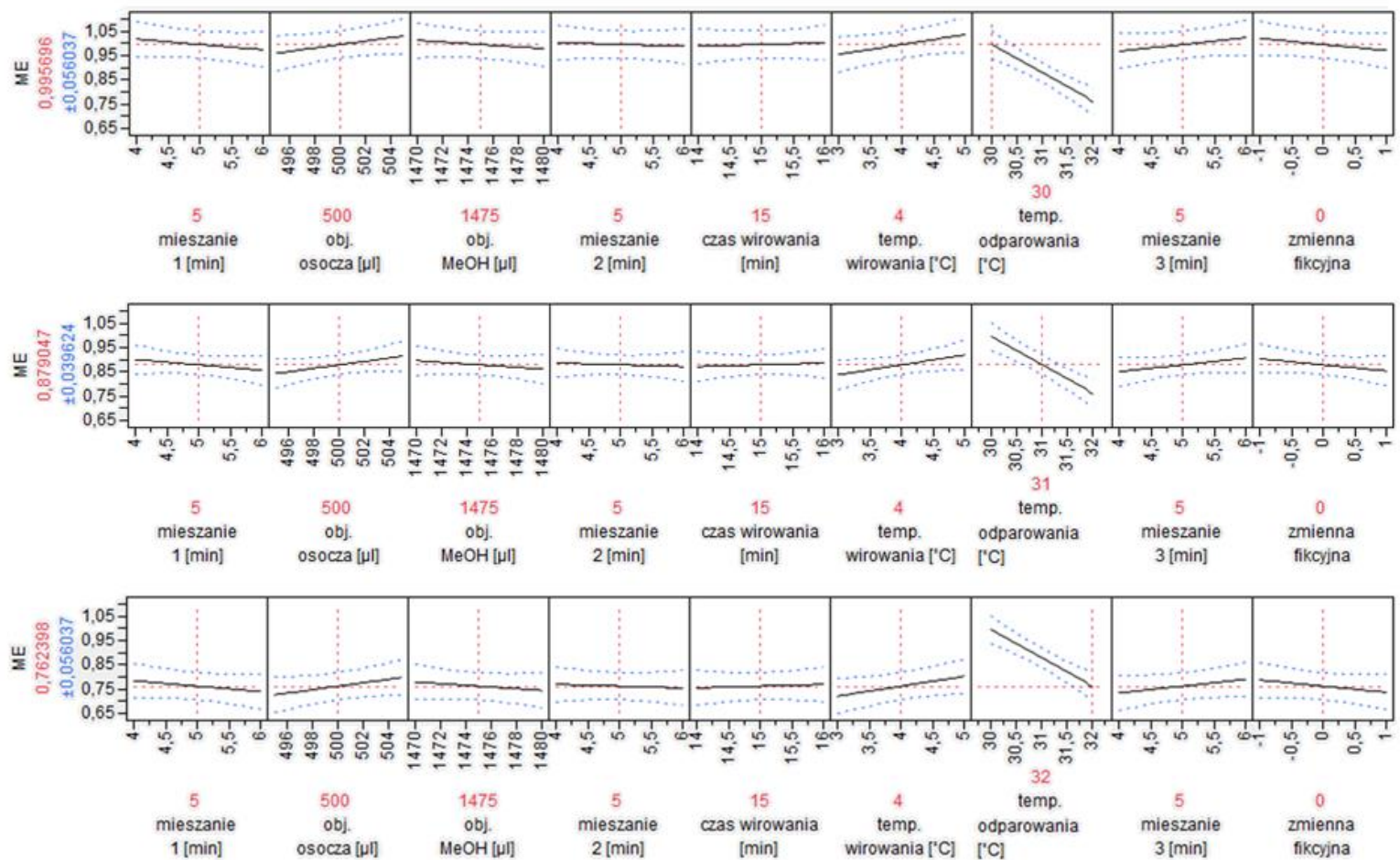
Rycina 12. Model dopasowania dla mirystynianu etylu.

Tabela 14. Oceniane zmienne w modelu dla mirystynianu etylu.

Zmienna	Wartość bazowa	Średnia	Odchylenie std.	Prawdopodobieństwo
Temp. odparowania [°C]	30	-0,1166	0,0162	0,0004
Temp. wirowania [°C]	5	0,0407	0,0187	0,0726
Obj. osocza [μl]	500	0,0354	0,0187	0,1072
Mieszanie 3 [min]	5	0,0278	0,0187	0,1871
Zmienna fikcyjna	-	-0,0249	0,0187	0,2310
Mieszanie 1 [min]	5	-0,0218	0,0187	0,2881
Obj. MeOH [μl]	1500	-0,0173	0,0187	0,3908
Mieszanie 2 [min]	5	-0,0076	0,0187	0,6991
Czas wirowania [min]	15	0,0073	0,0187	0,7096

Graficzne przedstawienie zależności między zmiennymi oraz występujących między nimi interakcji wyraźnie obrazuje, że temperatura odparowywania jest kluczowym dla powtarzalności analiz etapem w całym procesie i znacząco wpływa na otrzymywane wyniki w postaci wartości stężeń mirystynianu etylu obecnego w próbkach biologicznych (rycina 13.).

Pozostałe z weryfikowanych parametrów nie charakteryzowały się istotnym wpływem na wyniki przeprowadzanych oznaczeń analitycznych.



Rycina 13. Porównanie modelu dla 3 różnych wartości temperatury odparowywania rozpuszczalnika dla oznaczeń mirystynianu etylu.

7.1.8. Ponowna analiza próbki

W przypadku poniższego badania przeprowadzono ponowną analizę 10 % próbek w innej sekwencji, przy użyciu tej samej metody analitycznej.

Procentową różnicę pomiędzy stężeniem początkowym a stężeniem zmierzonym podczas powtórnej analizy obliczono według wzoru zaprezentowanego na stronie 45.

Procentowa różnica zawartości między wynikami mieściła się w zakresie $\pm 20\%$ dla co najmniej 2/3 powtórzeń. Wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Procent próbek zawierających się w granicy 20 % odchylenia od wartości początkowych.

Oznaczany analit	Wyniki mieszczących się poniżej 20 % różnicy [%]
Mirystynian etylu	83,3
Palmitynian etylu	66,7
Linoleinian etylu	66,7
Oleinian etylu	66,7
Stearynian etylu	83,3

7.2. Wyniki oznaczeń próbek osocza

W wyniku wstępnych analiz zgromadzonego osocza stwierdzono, iż należy dokonać zmiany plastikowych elementów zużywalnych na takie, które nie są poddawane wysokim temperaturom w autoklawie. Autoklawowane elementy zużywalne były źródłem plastyfikatorów, które uniemożliwiały właściwą analizę otrzymanych chromatogramów. Po zmianie materiałów zużywalnych na niewyjaławiane – wyeliminowano źródło sygnałów zakłócających.

Ostatecznie do oznaczeń ilościowych FAEE zakwalifikowano próbki biologiczne pochodzące od 31 przypadków. Spełniały one kryteria włączenia i wyłączenia, jak również ich objętość oraz jakość dawały możliwość przeprowadzenia eksperymentów.

Próbki osocza poddane analizom podzielono losowo na dwie grupy badane w dwóch osobnych sekwencjach. Analizę każdej z grup poprzedzono wyznaczeniem krzywej kalibracyjnej, a także upewniając się, iż sprzęt laboratoryjny działa poprawnie. Próbki osocza były analizowane w kolejności losowej, a co sześć nastrzyków analizowana była próbka kontrolna (LQC, MQC lub HQC). Przez cały czas trwania analiz utrzymywano jednolite warunki, w tym m.in. temperaturę w automatycznym podajniku próbek równą 11°C.

W wyniku przeprowadzenia analiz oznaczono wartości stężeń estrów etylowych kwasów tłuszczowych w próbkach pochodzących od 31 pacjentów pobranych w dwóch punktach czasowych: (1) przez powłoki ciała w ciągu 24 godzin od domniemanego czasu zgonu oraz (2) w czasie przeprowadzanej sekcji zwłok bezpośrednio z serca. Wyniki dla każdego z estrów etylowych zaprezentowano w tabelach poniżej.

Tabela 16. Wyniki oznaczeń ilościowych dla mirystynianu etylu w osoczu.

Grupa badana				Grupa kontrolna			
Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [$\mu\text{g/ml}$]	Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [$\mu\text{g/ml}$]
1.	0,24	1.	< LOQ	1.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	< LOQ
2.	2,11	1.	< LOQ	2.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	< LOQ
3.	3,5	1.	0,042	3.	-	1.	< LOQ
		2.	0,146			2.	< LOQ
4.	4,18	1.	0,0338	4.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	< LOQ
5.	1,14	1.	0,032	5.	-	1.	< LOQ
		2.	1,046			2.	< LOQ
6.	0,49	1.	< LOQ	6.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	< LOQ
7.	2,13	1.	< LOQ	7.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	0,116
8.	4,77	1.	0,108	8.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	< LOQ
9.	2,62	1.	0,569	9.	-	1.	< LOQ
		2.	0,577			2.	< LOQ
10.	4,69	1.	0,727	10.	-	1.	< LOQ
		2.	0,785			2.	< LOQ
11.	3,73	1.	0,070	11.	-	1.	< LOQ
		2.	0,060			2.	< LOQ
12.	4,87	1.	< LOQ	12.	-	1.	0,046
		2.	< LOQ			2.	0,022
13.	0,69	1.	0,043	13.	-	1.	< LOQ
		2.	0,094			2.	< LOQ
14.	1,96	1.	0,032	14.	-	1.	< LOQ
		2.	0,030			2.	< LOQ
15.	1,82	1.	0,057	15.	-	1.	< LOQ
		2.	0,526			2.	0,0315
				16.	-	1.	< LOQ
						2.	< LOQ

Tabela 17. Wyniki oznaczeń ilościowych dla palmitynianu etylu w osoczu.

Grupa badana				Grupa kontrolna			
Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [µg/ml]	Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [µg/ml]
1.	0,24	1.	0,025	1.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	0,115
2.	2,11	1.	0,935	2.	-	1.	< LOQ
		2.	1,344			2.	< LOQ
3.	3,5	1.	1,121	3.	-	1.	0,019
		2.	3,172			2.	< LOQ
4.	4,18	1.	1,763	4.	-	1.	< LOQ
		2.	0,496			2.	< LOQ
5.	1,14	1.	0,432	5.	-	1.	0,020
		2.	1,057			2.	< LOQ
6.	0,49	1.	0,083	6.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	< LOQ
7.	2,13	1.	0,178	7.	-	1.	< LOQ
		2.	0,081			2.	0,112
8.	4,77	1.	1,268	8.	-	1.	< LOQ
		2.	1,031			2.	0,054
9.	2,62	1.	2,769	9.	-	1.	< LOQ
		2.	2,729			2.	< LOQ
10.	4,69	1.	4,934	10.	-	1.	0,020
		2.	5,072			2.	0,341
11.	3,73	1.	1,592	11.	-	1.	< LOQ
		2.	1,489			2.	< LOQ
12.	4,87	1.	0,010	12.	-	1.	0,485
		2.	0,083			2.	0,022
13.	0,69	1.	0,436	13.	-	1.	< LOQ
		2.	3,323			2.	< LOQ
14.	1,96	1.	1,689	14.	-	1.	< LOQ
		2.	0,139			2.	< LOQ
15.	1,82	1.	1,243	15.	-	1.	0,019
		2.	1,342			2.	0,341
				16.	-	1.	< LOQ
						2.	< LOQ

Tabela 18. Wyniki oznaczeń ilościowych dla linoleinianu etylu w osoczu.

Grupa badana				Grupa kontrolna			
Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [µg/ml]	Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [µg/ml]
1.	0,24	1.	< LOQ	1.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	0,123
2.	2,11	1.	0,319	2.	-	1.	0,067
		2.	0,268			2.	< LOQ
3.	3,5	1.	0,675	3.	-	1.	< LOQ
		2.	2,467			2.	< LOQ
4.	4,18	1.	0,532	4.	-	1.	< LOQ
		2.	0,178			2.	< LOQ
5.	1,14	1.	0,398	5.	-	1.	< LOQ
		2.	1,237			2.	< LOQ
6.	0,49	1.	0,195	6.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	< LOQ
7.	2,13	1.	0,093	7.	-	1.	< LOQ
		2.	0,049			2.	< LOQ
8.	4,77	1.	0,240	8.	-	1.	< LOQ
		2.	0,138			2.	0,052
9.	2,62	1.	2,558	9.	-	1.	< LOQ
		2.	2,278			2.	< LOQ
10.	4,69	1.	3,244	10.	-	1.	< LOQ
		2.	3,435			2.	< LOQ
11.	3,73	1.	0,401	11.	-	1.	< LOQ
		2.	0,371			2.	< LOQ
12.	4,87	1.	0,095	12.	-	1.	0,474
		2.	0,308			2.	0,104
13.	0,69	1.	3,452	13.	-	1.	< LOQ
		2.	3,704			2.	< LOQ
14.	1,96	1.	0,094	14.	-	1.	< LOQ
		2.	0,089			2.	< LOQ
15.	1,82	1.	0,184	15.	-	1.	< LOQ
		2.	0,092			2.	0,083
				16.	-	1.	< LOQ
						2.	< LOQ

Tabela 19. Wyniki oznaczeń ilościowych dla oleinianu etylu w osoczu.

Grupa badana				Grupa kontrolna			
Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [µg/ml]	Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [µg/ml]
1.	0,24	1.	0,629	1.	-	1.	0,081
		2.	0,957			2.	1,060
2.	2,11	1.	0,060	2.	-	1.	< LOQ
		2.	0,195			2.	< LOQ
3.	3,5	1.	2,097	3.	-	1.	0,070
		2.	4,242			2.	< LOQ
4.	4,18	1.	3,688	4.	-	1.	0,607
		2.	1,746			2.	0,555
5.	1,14	1.	3,416	5.	-	1.	0,806
		2.	1,287			2.	< LOQ
6.	0,49	1.	0,540	6.	-	1.	0,562
		2.	< LOQ			2.	0,683
7.	2,13	1.	1,114	7.	-	1.	< LOQ
		2.	0,911			2.	< LOQ
8.	4,77	1.	2,138	8.	-	1.	< LOQ
		2.	2,500			2.	0,383
9.	2,62	1.	3,710	9.	-	1.	2,039
		2.	3,631			2.	1,893
10.	4,69	1.	4,994	10.	-	1.	0,362
		2.	5,313			2.	0,295
11.	3,73	1.	2,993	11.	-	1.	< LOQ
		2.	3,125			2.	< LOQ
12.	4,87	1.	1,488	12.	-	1.	1,447
		2.	1,738			2.	1,865
13.	0,69	1.	3,710	13.	-	1.	0,431
		2.	3,631			2.	0,199
14.	1,96	1.	0,563	14.	-	1.	< LOQ
		2.	0,199			2.	0,023
15.	1,82	1.	0,43	15.	-	1.	0,076
		2.	0,479			2.	< LOQ
				16.	-	1.	< LOQ
						2.	< LOQ

Tabela 20. Wyniki oznaczeń ilościowych dla stearynianu etylu w osoczu.

Grupa badana				Grupa kontrolna			
Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [µg/ml]	Pacjent	Stężenie alkoholu we krwi [%]	Numer pobrania	Stężenie analitu obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej [µg/ml]
1.	0,24	1.	0,039	1.	-	1.	0,024
		2.	0,023			2.	0,032
2.	2,11	1.	0,565	2.	-	1.	< LOQ
		2.	0,447			2.	< LOQ
3.	3,5	1.	0,611	3.	-	1.	< LOQ
		2.	1,912			2.	< LOQ
4.	4,18	1.	1,016	4.	-	1.	< LOQ
		2.	0,900			2.	< LOQ
5.	1,14	1.	1,072	5.	-	1.	< LOQ
		2.	0,988			2.	< LOQ
6.	0,49	1.	0,219	6.	-	1.	< LOQ
		2.	< LOQ			2.	< LOQ
7.	2,13	1.	0,131	7.	-	1.	< LOQ
		2.	0,102			2.	0,109
8.	4,77	1.	0,435	8.	-	1.	< LOQ
		2.	0,398			2.	0,024
9.	2,62	1.	1,034	9.	-	1.	< LOQ
		2.	0,941			2.	< LOQ
10.	4,69	1.	1,127	10.	-	1.	< LOQ
		2.	1,076			2.	< LOQ
11.	3,73	1.	0,738	11.	-	1.	< LOQ
		2.	0,698			2.	< LOQ
12.	4,87	1.	0,101	12.	-	1.	0,239
		2.	0,078			2.	< LOQ
13.	0,69	1.	0,248	13.	-	1.	< LOQ
		2.	0,660			2.	< LOQ
14.	1,96	1.	1,022	14.	-	1.	< LOQ
		2.	1,044			2.	< LOQ
15.	1,82	1.	1,232	15.	-	1.	< LOQ
		2.	1,342			2.	0,153
				16.	-	1.	< LOQ
						2.	< LOQ

Tabela 21. Procent wyników poniżej wartości LOQ.

Oznaczany związek	Grupa badana [%]	Grupa kontrolna [%]
Mirystynian etylu	40	87,5
Palmitynian etylu	6,7	65,6
Linoleinian etylu	10	81,3
Oleinian etylu	3,3	40,6
Stearynian etylu	3,3	81,3

7.3. Analiza danych

Przeprowadzono analizę statystyczną otrzymanych wyników oznaczeń ilościowych. Na rycinie 14. przedstawiono po lewej stronie wykresy ramka-wąsy oraz po prawej histogramy przedstawiające rozkład stężeń w każdej z grup w przypadku każdego ze związków.

W wyniku przeprowadzonych analiz potwierdzono właściwy zakres stężeń wyznaczonych krzywych kalibracyjnych. W większości przypadków stężenia analitów obliczonych dla próbek mieściły się w zakresie krzywej kalibracyjnej. W licznych przypadkach grupy kontrolnej poziom oznaczanych estrów był poniżej granicy oznaczalności (zależność tę pokazano w tabeli 21. na stronie 76), co wynikało z charakterystyki próbek zakwalifikowanych do tej grupy. Pomimo małej liczebności grup podjęto się próby określenia wartości dyskryminacyjnej oznaczanych estrów.

Oceniano zależność pomiędzy stężeniami oznaczonych metabolitów a pośmiertnie określonym poziomem alkoholu we krwi pełnej oraz sprawdzano rozkład każdego ze związków w badanych próbkach. Ponieważ nie spełniono warunków do przeprowadzenia testów parametrycznych (m.in. normalność rozkładu), zastosowano analizy nieparametryczne (test U Manna-Whitneya). Różnice w stężeniach oznaczonych związków u pacjentów obydwu grup są istotne statystycznie ($p < 0,05$). Dokładne wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono w tabeli 22.

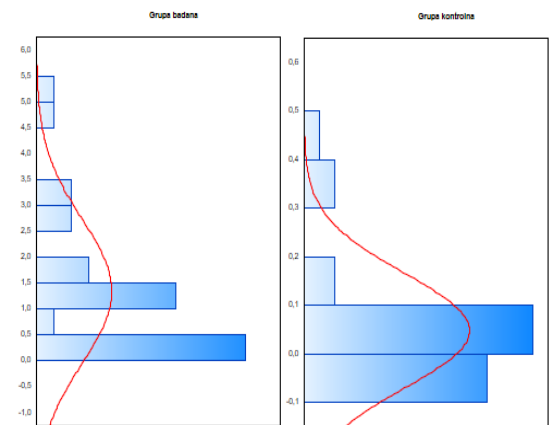
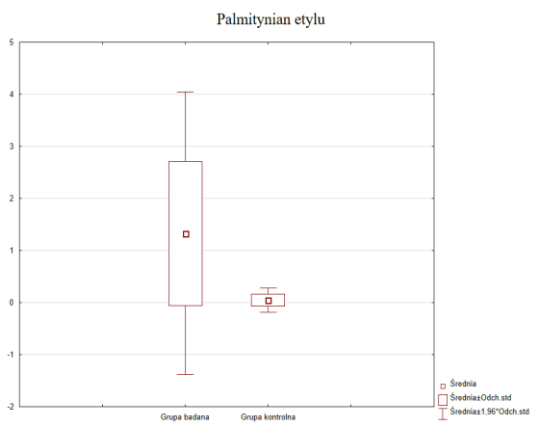
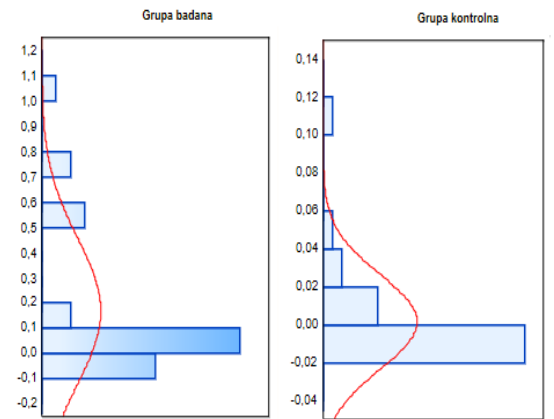
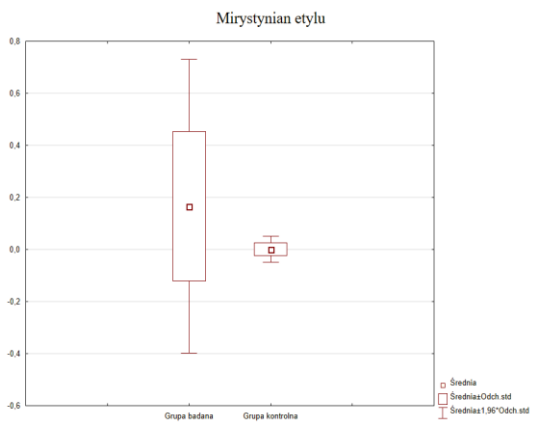
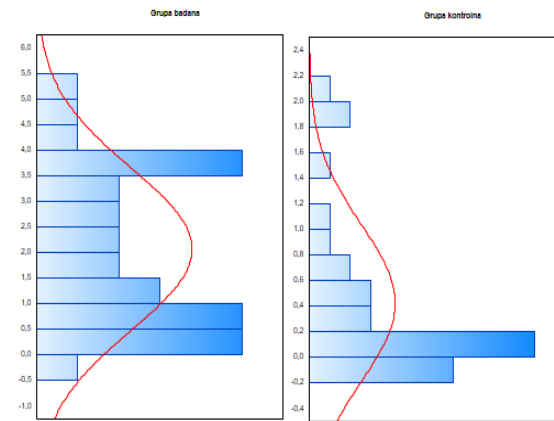
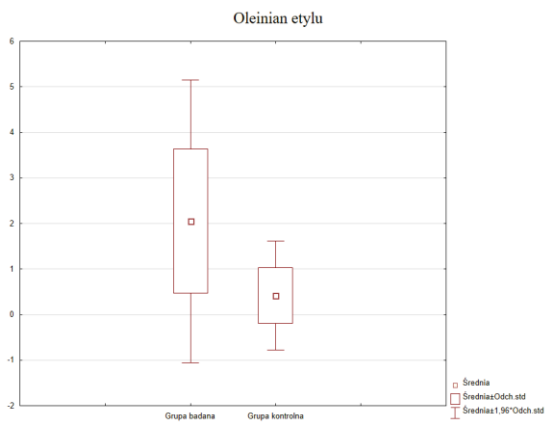
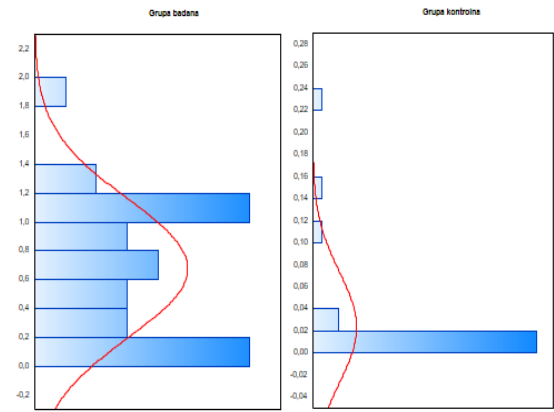
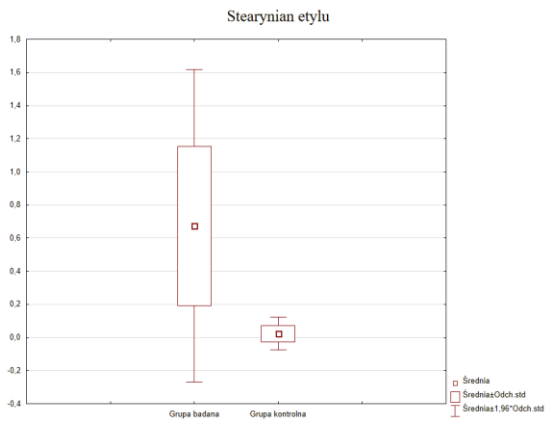
Uzyskane wyniki oznaczeń porównano również wewnątrz podgrup o zbliżonej zawartości promili w pośmiertnie zabezpieczonych próbkach krwi. Średnie stężenia poszczególnych analitów oraz odchylenia standardowe przedstawiono w tabeli 23.

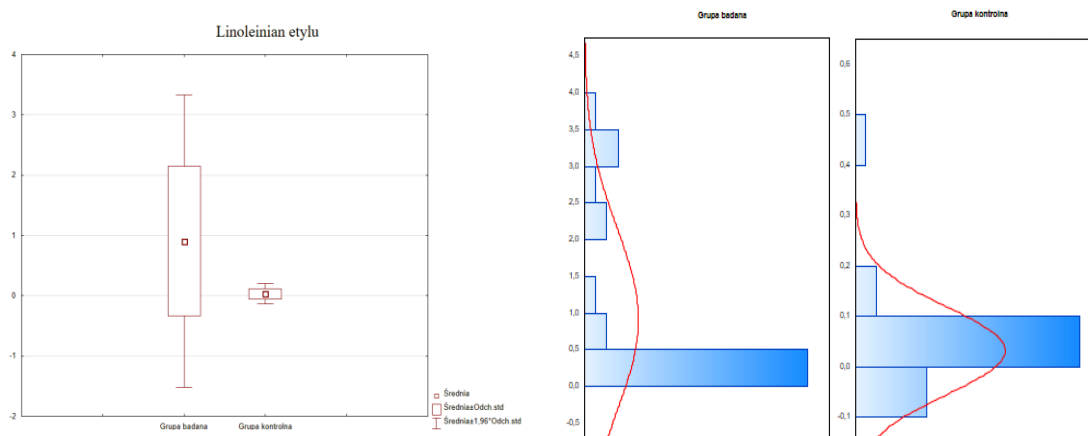
Tabela 22. Wyniki analizy statystycznej.

Oznaczany związek	Stężenie [$\mu\text{g/ml}$]		Odchylenie std.		Wartość współczynnika <i>p</i>
	Grupa kontrolna (n=16)	Grupa badana (n=15)	Grupa kontrolna (n=16)	Grupa badana (n=15)	
Mirystynian etylu	0,007	0,166	0,000	0,251	0,003
Palmitynian etylu	0,048	1,331	0,016	1,296	< 0,001
Linoleinian etylu	0,028	0,903	0,081	1,230	< 0,001
Oleinian etylu	0,420	2,051	0,072	1,531	< 0,001
Stearynian etylu	0,018	0,673	0,591	0,453	< 0,001
Suma FAEE	0,521	5,124	0,035	4,202	< 0,001

Tabela 23. Średnie stężenia oznaczanych analitów w zależności od pośmiertnego stężenia alkoholu etylowego oznaczonego we krwi.

Stężenie alkoholu we krwi [%o]	Średnie stężenie oznaczanych analitów \pm odchylenie standardowe				
	$\leq 0,25$	0,26-1,00	1,01-2,00	2,01-3,00	$\geq 3,01$
Liczebność grupy	1	2	2	3	7
Mirystynian etylu	0,0064	0,0343 \pm 0,048	0,2870 \pm 0,254	0,1911 \pm 1,321	4,2900 \pm 0,292
Palmitynian etylu	0,0463	0,9603 \pm 1,299	0,9836 \pm 0,281	1,3395 \pm 1,321	0,1643 \pm 1,687
Linoleinian etylu	0,0266	1,8380 \pm 2,461	0,3489 \pm 0,406	0,9275 \pm 1,296	1,8433 \pm 1,256
Oleinian etylu	0,4419	1,9703 \pm 2,405	1,0634 \pm 1,116	1,6037 \pm 1,844	1,0070 \pm 1,195
Stearynian etylu	0,0189	0,2820 \pm 0,244	1,1166 \pm 0,147	0,5367 \pm 0,436	3,0053 \pm 0,442

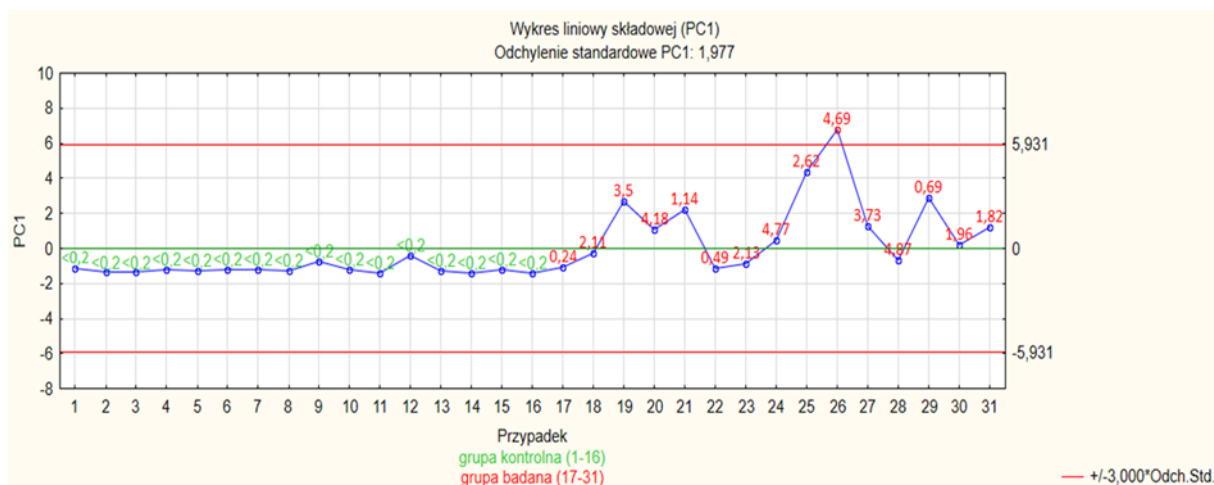




Rycina 14. Przedstawienie rozkładu w grupach badanej oraz kontrolnej dla każdego ze związków.

Na podstawie uzyskanych wartości stężeń przeprowadzono analizę wielowymiarową metodą głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA) przy użyciu programu Statistica (14.0.1.25). Metoda ta stosowana jest najczęściej do redukcji macierzy danych, wstępnej oceny danych analitycznych oraz poszukiwania korelacji między zmiennymi.

Na poniższym wykresie liniowym (rycina 15.) przedstawiono wartości przypadków dla pierwszej składowej (jest to model nienadzorowany, gdzie pierwsza składowa wyjaśnia około 80 % zmienności). Przypadki oznaczone kolorem zielonym to grupa kontrolna, natomiast przypadki oznaczone na czerwono to grupa badana. Wartość wariancji w przypadku pierwszej składowej istotnej wynosi $r^2=0,782$, co pokazuje, jak dobrze model opisuje dane rzeczywiste. Zaobserwowano tym samym, iż bez wskazywania grupy badanej, na podstawie wyników, model jest w stanie przypisać oceniany przypadek do odpowiedniej grupy: kontrolnej lub badanej.



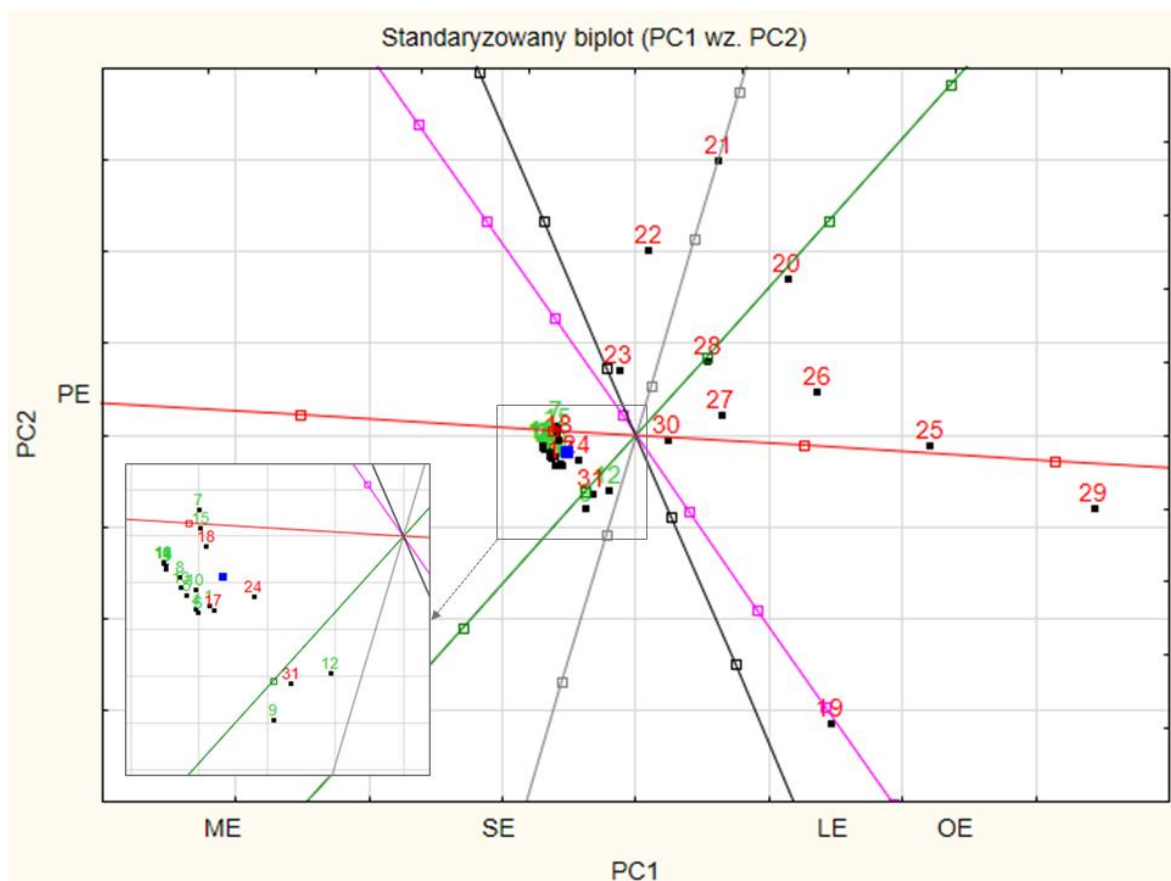
Rycina 15. Wykres liniowy składowej pierwszej.

Miarą podobieństwa między dwoma zmiennymi jest kąt jaki tworzą między sobą ich wektory wag o początku w punkcie P o współrzędnych (0,0) oraz końcach określanych przez wartości wag zmiennych. W przypadku, kiedy kąt między dwiema zmiennymi kształtuje się na poziomie 180° lub 0° to zmienne te są ze sobą odpowiednio skorelowane (dodatnio lub przeciwnie). Natomiast jeśli kąt jest bliski 90° to zmienne te są niezależne od siebie. W wyniku analiz dwóch zmiennych budujących składowe wnioskować można o tym, że spośród oznaczanych związków silną korelację zaobserwować można pomiędzy mirystynianem oraz stearynianem etylu, a także między linoleinianem i oleinianem etylu.

Z kolei dla stearynianu oraz oleinianu etylu, jak i linoleinianu i mirystaniu etylu kąty mierzą około 90°, co oznaczać może, że informacje, których dostarczają są niezależne od siebie.

Zaobserwowano także, iż próbki pochodzące od pacjentów będących grupą kontrolną (osoby trzeźwe w momencie zgonu) tworzą skupioną grupę, natomiast próbki od osób będących pod wpływem alkoholu w momencie śmierci cechują się większym rozrzutem .

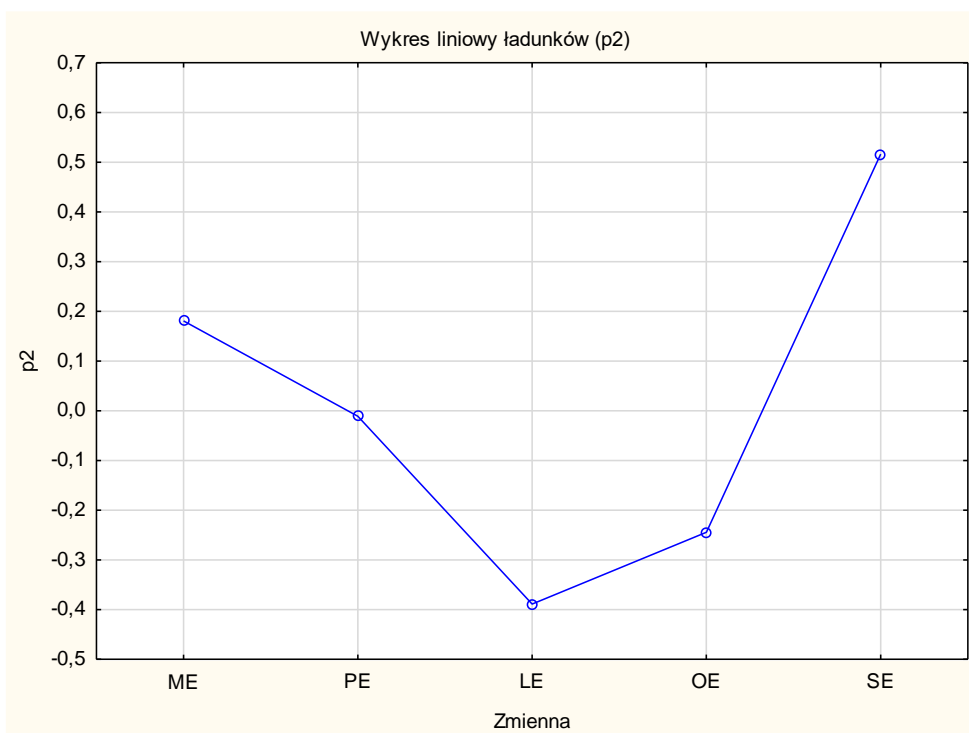
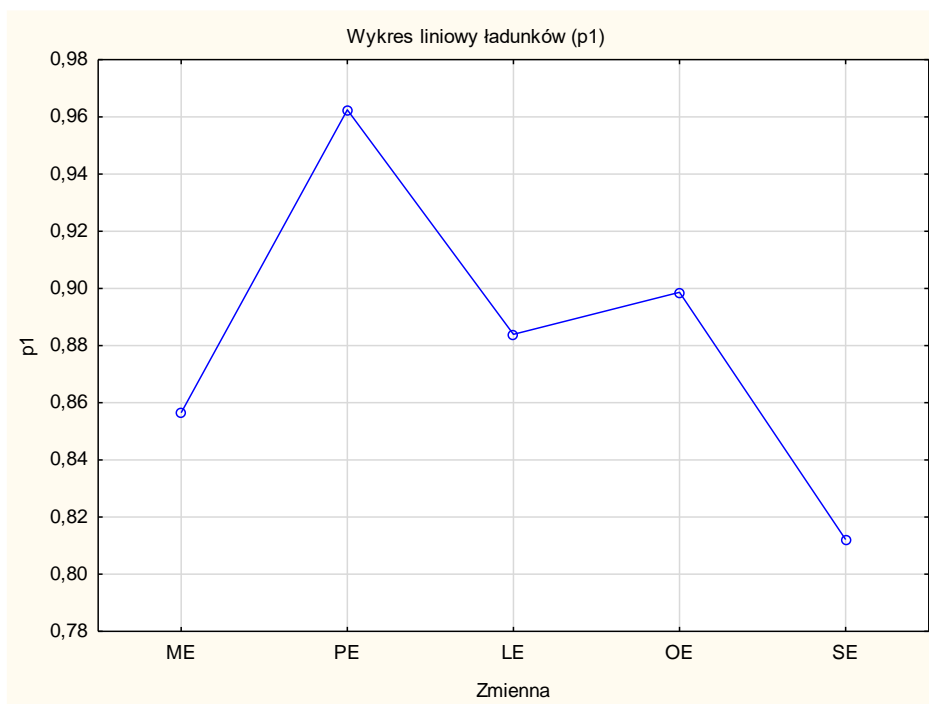
Wartość r^2 w przypadku analizy dwóch składowych głównych wynosi 0,884.



Rycina 16. Analiza składowych głównych dla danych pochodzących z oznaczeń ilościowych FAEE; ME – mirystynian etylu; SE – stearynian etylu; LE – linoleinian etylu; OE – oleinian etylu; PE – palmitynian etylu.

Pierwsza składowa główna wyjaśnia 78,17 %, natomiast druga 10,20 % zmienności. Potwierdza to, że głównie pierwsza składowa ma największy wpływ na przypisanie próbki do konkretnej grupy badanej.

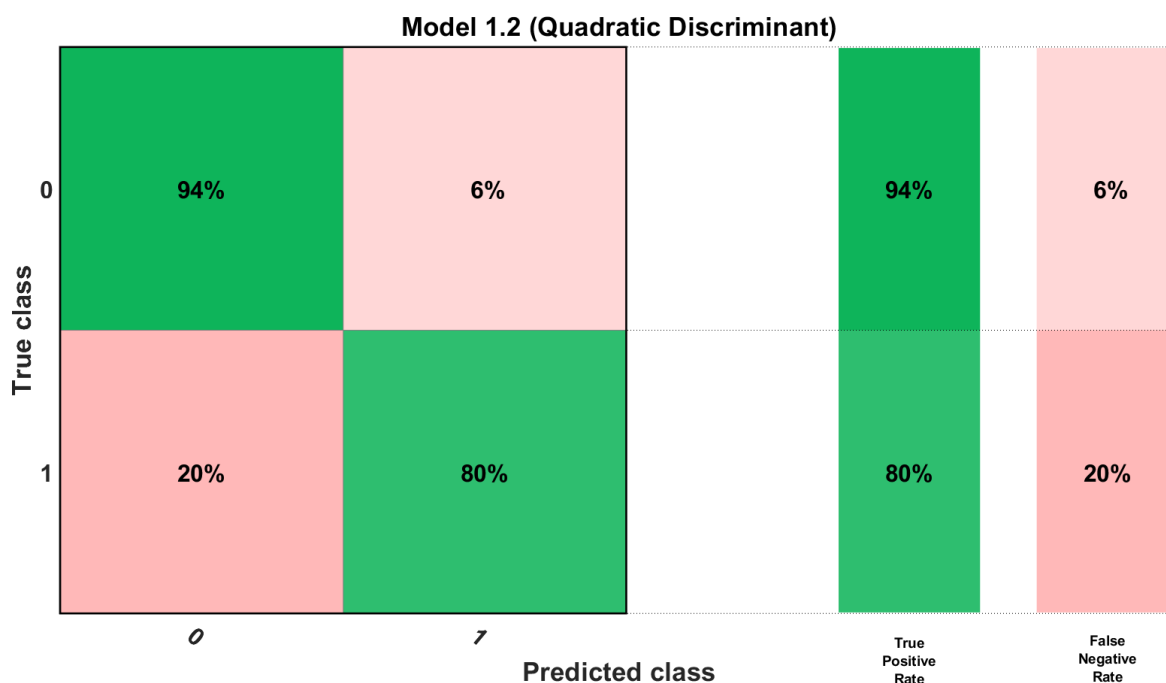
Na rycinie poniżej (rycina 17.) przedstawiono w jaki sposób konkretne związki budują istotność składowych. Pierwsza istotna składowa jest budowana głównie przez palmitynian etylu, natomiast na drugą silny wpływ wykazuje zarówno stearynian, jak i linoleinian oraz oleinian etylu.



Rycina 17. Wykresy liniowe ładunków zmiennej składowej pierwszej oraz drugiej.

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę dyskryminacyjną dla stearynianu etylu, który według analiz okazał się być związkiem wykazującym najsilniejszą korelację z zawartością

alkoholu w krwi pełnej pobranej pośmiertnie. Na jej podstawie stworzono prognozę klasyfikacyjną przypadków. Dla modelu kwadratowego ilość przypadków prawdziwie dodatnich wynosi 94 % dla grupy kontrolnej oraz 80 % dla grupy badanej (rycina 18.).



Rycina 18. Dokładność dla stearynianu etylu wyliczona dla modelu kwadratowego.

Wewnątrz grupy badanej obliczone stężenia oznaczanych analitów są zdecydowanie wyższe (porównując do przypadków z grupy kontrolnej), jednak brak jest wyraźnych zależności pomiędzy wynikami pochodzącymi z pobrań przez powłoki ciała oraz śródsekcyjnymi ($p=0,7063$ dla sumy oznaczonych FAEE). Aby zrozumieć dokładniejszą zależność należałoby znać dokładną godzinę oraz ilość spożytego przed śmiercią alkoholu.

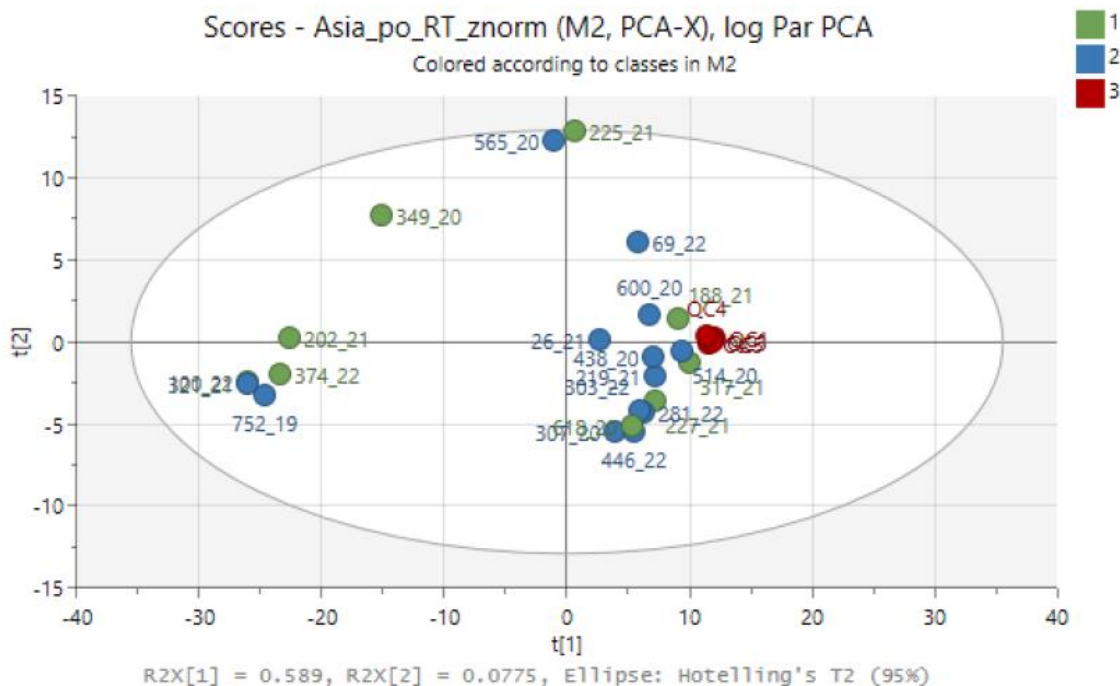
7.4. Wyniki niecelowanych analiz metabolomicznych

Po dokonaniu analiz celowanych skoncentrowanych na oznaczeniu związków z grupy estrów etylowych kwasów tłuszczowych podjęto się próby analiz niecelowanych wykorzystując pozostały materiał biologiczny. Ilość przypadków ujętych w analizie

niecelowanej jest mniejsza niż w przypadku oznaczeń celowanych, ponieważ, jak wspomniano we wcześniejszych częściach pracy – ze względu na specyfikę analizowanego materiału biologicznego jego dostępność w wystarczająco dużych objętościach i dobrej jakości stanowiła spore wyzwanie. Niecelowane analizy metabolomiczne przeprowadzono dla dwunastu przypadków z grupy kontrolnej oraz dziewięciu przypadków z grupy badanej (nie uwzględniając podziału na miejsce pobrania materiału do badań: śródsekcyjnie lub przez powłoki ciała).

Do identyfikacji metabolitów oznaczonych za pomocą techniki GC-QqQ/MS wykorzystano uniwersalną bibliotekę danych NIST11 (ang. *National Institute of Standards and Technology Library*). Po przetworzeniu i procesowaniu danych pomiarowych macierz danych zawierała 107 zidentyfikowanych metabolitów.

Otrzymane wyniki poddano analizie składowych głównych. Sumaryczna wartość współczynnika determinacji R^2 wyniosła 0,666. Według testu T-kwadrat Hotelling'a dla grup niezależnych nie stwierdzono wartości odstających. Na Rycinie 19 zaprezentowano rozkład wyników pochodzących z obydwu porównywanych grup oraz próbek kontrolnych QC. Próbki QC widocznie grupują się, co potwierdza zminimalizowanie zmienności analitycznej aparatury pomiarowej oraz świadczy o zapewnieniu powtarzalności procedury przygotowania próbek osocza do niecelowanych analiz metabolomicznych.



Rycina 19. Model PCA dla danych z niecelowanych analiz metabolomicznych z wykorzystaniem techniki GC-QqQ/MS (1 – grupa badana; 2 – grupa kontrolna; 3 – próbki QC).

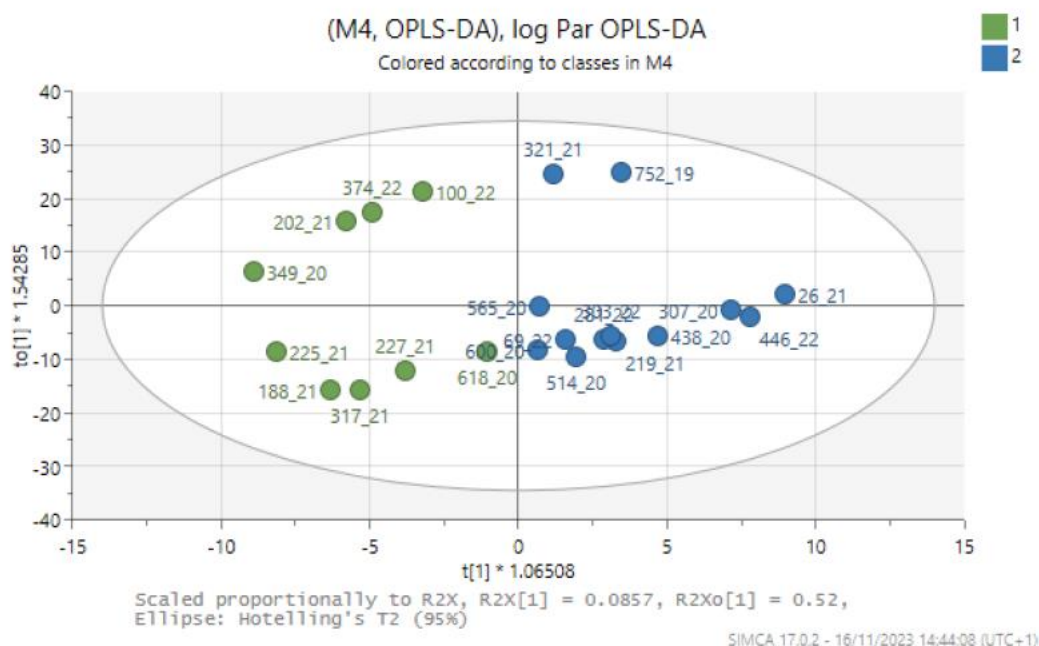
W kolejnym etapie zastosowano dyskryminacyjną analizę cząstkowych najmniejszych kwadratów w projekcji ortogonalnej (ang. *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*, OPLS-DA). Metoda OPLS-DA pozwala na określenie przynależności próbki do jednej z badanych grup, na podstawie wprowadzonej do modelu wartości kategoryzowanej. Selekcję zmiennych wpływających w najwyższym stopniu na dyskryminację próbek przeprowadzono na podstawie wartości współczynnika wpływu zmiennej na projekcję (ang. *Variable Importance into Projection*, VIP) $\geq 1,2$ oraz wartości bezwzględnej współczynnika korelacji $|pcorr| \geq 0,4$.

Na tej podstawie wytypowano zestaw kilkunastu metabolitów najbardziej różnicujących porównywane grupy (Tabela 24.)

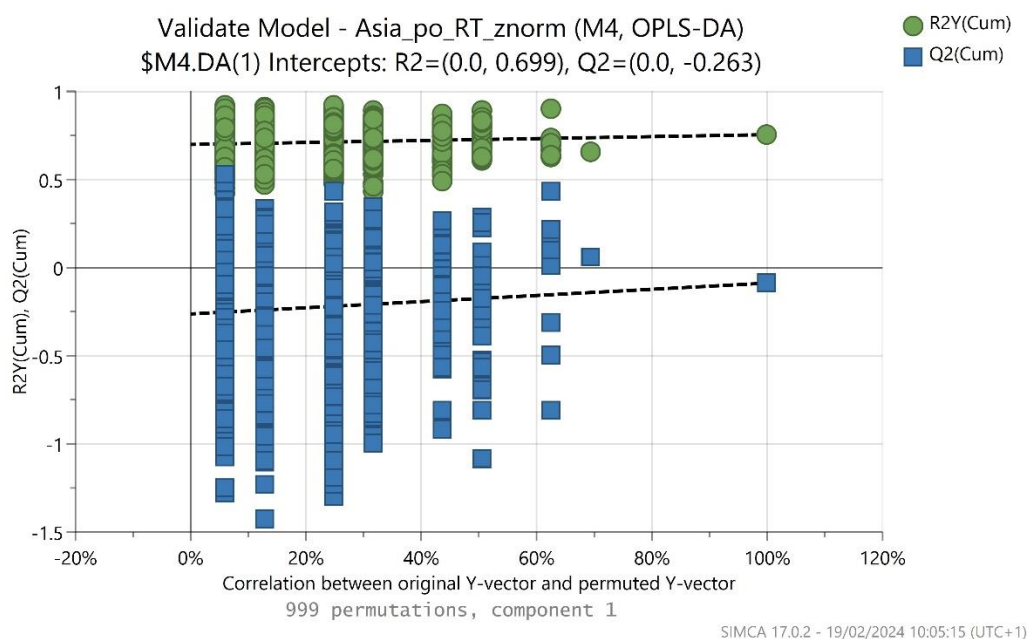
Tabela 24. Wstępnie zidentyfikowane metabolitów różnicujące porównywane grupy.

Zidentyfikowany metabolit	<i> pcorr </i>	VIP
Urydyna	0,60	1,78
Kwas heksadekanowy	0,60	1,79
Kwas asparaginowy	0,58	1,79
Kwas 3,4-dihydroksybutanowy	0,57	1,50
Kwas glutarowy	0,48	1,57
Kwas oktadekadienowy	0,47	1,36
Kwas pirogronowy	0,46	1,52
Glicyna	0,46	1,63
Puryna	0,44	1,56
Treonina	0,44	1,58
Tyrozyna	0,42	1,48
Glukopiranoza	0,41	1,36

Na podstawie analizy OPLS-DA wygenerowano model przedstawiony na rycinie 20. Uzyskane wartości R^2 i Q^2 wynoszą odpowiednio 0,754 oraz -0,0881. Wyniki te świadczą kolejno o właściwym dopasowaniu modelu do danych, jednak o jego słabej zdolności predykcyjnej. Uzyskany model OPLS-DA zvalidowano za pomocą testu permutacji ($n = 999$), którego wyniki zobrazowano na rycinie 21.



Rycina 20. Model OPLS-DA dla danych z niecelowanych analiz metabolomicznych z wykorzystaniem techniki GC-QqQ/MS.



Rycina 21. Wyniki testu permutacji dla zbudowanego modelu OPLS-DA ($R^2=0,699$; $Q^2=-0,263$).

8. Dyskusja

Celowana analiza metabolomiczna może być wykorzystywana do określania różnic w stężeniach wielu związków w materiale biologicznym zabezpieczonym pośmiertnie. Wyniki uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej mieszczą się w aktualnych trendach badawczych, w których dąży się do zaimplementowania metabolomiki w badaniach z zakresu medycyny sądowej.

Celem pracy była ocena zmian metabolicznych w przypadkach nadużywania alkoholu etylowego prowadzących do śmierci, poprzez przeprowadzenie celowanej analizy metabolicznej próbek osocza pochodzących od osób zmarłych. Wytypowanie estrów etylowych kwasów tłuszczowych jako związków analizowanych podyktowane było przeprowadzonym przeglądem literaturowym oraz właściwościami fizykochemicznymi tych związków.

Estry etylowe kwasów tłuszczowych są jednymi z metabolitów powstających na ścieżce nieoksydacyjnego procesu utleniania alkoholu etylowego. Mimo tego, iż procesy te stanowią nikły procent wszystkich reakcji mających na celu przekształcenie i eliminację alkoholu etylowego z ludzkiego organizmu, są one cennym źródłem informacji odnośnie obecności alkoholu w organizmie, w tym czasu spożycia oraz ilości przyjętego etanolu. Dzieje się tak,

ponieważ estry etylowe gromadzą się w różnych tkankach ludzkiego organizmu, przy czym tkanki o największej użyteczności analitycznej to osocze, paznokcie, włosy, czy tkanki organów wewnętrznych, np. wątroby [80].

Dotychczasowe badania skupiające się na badaniu estrów etylowych kwasów tłuszczowych jako indykatorach spożycia alkoholu etylowego bazowały na materiale biologicznym pobranym od żywego dawcy – człowieka bądź zwierzęcia, i nie było to tylko osocze, ale również wycinki wątroby, smółka, włosy czy paznokcie [43,47,80,81]. FAEE były też oznaczane w materiale biologicznym, gdy chciano pokazać zależność pomiędzy ich obecnością, a występowaniem jednostki chorobowej indukowanej spożyciem alkoholu (np. zapalenia trzustki) [82,83].

Z uwagi na wyjątkowy charakter badań prowadzonych w ramach działalności toksykologów i medyków sądowych, szeroko stosowane w medycynie sądowej analizy toksykologiczne muszą być nieustannie monitorowane i ulepszone w celu uzyskania nie tylko dokładniejszych wyników, ale również w celu uzyskania tych wyników w jak najszybszym czasie. W analityce sądowej materiał do badań wybrać można spośród wielu tkanek. W poniższej pracy skupiono się na próbkach osocza pochodzących od osób zmarłych. Mimo tego, iż jest to matryca powszechnie znana, stosowana i stosunkowo nieskomplikowana, w tym przypadku użyteczność większości zabezpieczonego materiału została podana w wątpliwość ze względu na proces hemolizy oraz zasobność łożyska krwi zmarłych.

Problemy napotkane na etapie zabezpieczania osocza były zaskakujące i często niemożliwe do przewidzenia. Pierwsze próbki osocza po odwirowaniu były standardowo przenoszone do próbek typu Eppendorf, które uprzednio poddane były procesowi autoklawowania (co standardowo wykonuje się w Zakładzie Medycyny Sądowej, w celu użyteczności próbek do zabezpieczania materiału do analiz genetycznych). W przypadku analizowanych estrów ten sposób nie sprawdził się ze względu na uwolnione plastyfikatory, które silnie interferowały podczas analiz. Kolejną przeszkodą, trudną do przewidzenia, była wspomniana wyżej hemoliza i dostępność krwi do pobrania. Niejednokrotnie zdarzyło się, że przypadek wstępnie kwalifikujący się do jednej z grup musiał być odrzucony, gdyż osoba ta zmarła z powodu krwotoku wewnętrznego i objętość krwi dostępna do pobrania była znikoma, jeśli nie żadna. W wielu przypadkach, nawet tych już finalnie zakwalifikowanych do analiz – dostępna objętość osocza pozwalała jedynie na jednokrotną analizę. Fakt ten znacząco wpłynął na wybór metody przygotowania próbek do analizy jak i samej analizy (pierwotne założenia przyjmowały liczebności grup na poziomie co najmniej dwukrotnie wyższym niż ostateczne użyte do badań, co przedstawia rycina 6. na stronie 38).

Wyselekcjonowane spośród wielu próbek osocza cechowały się zadawalającą klarownością oraz dostępne były w objętości pozwalającej na przeprowadzenie co najmniej jednej analizy. Zaprezentowana metoda przygotowania próbek, obejmująca ekstrakcję ciecz-ciecz, bez konieczności przeprowadzania konwersji chemicznej analitów, umożliwia wyekstrahowanie oznaczanych związków z próbek o niewielkiej objętości, a poziom oznaczonych analitów odzwierciedla rzeczywisty poziom związków w osoczu. Przyszłościowym w procesie przygotowania próbek wydaje się być zastosowanie metody SPME (ang. *solid phase microextraction*, mikroekstrakcja do fazy stałej), która umożliwiłaby dokładniejsze oczyszczenie próbki biologicznej. Jednak ze względu na ograniczoną dostępność materiału pobranego pośmiertnie nie udało się podczas prowadzonych badań zoptymalizować przygotowania próbek z udziałem metody SPME. Sprzęt analityczny stosowany do oznaczeń jest aparaturą szeroko rozpowszechnioną w wielu ośrodkach badawczych i analitycznych/diagnostycznych, co wpływa korzystnie na użyteczność opracowanej metody.

Przeprowadzone badanie elastyczności stosowanej metody analitycznej podkreśliło istotność kontrolowania poszczególnych etapów procesu przygotowania próbki do analiz, w szczególności temperatury odparowywania rozpuszczalnika. Ze względu na termolabilność oznaczanych analitów ważnym jest utrzymywanie możliwie najniższej temperatury podczas procesu przygotowywania próbek. Kluczowy jest etap odparowywania rozpuszczalnika po procesie odbiałczania. Z uwagi na ograniczenia aparaturowe w laboratorium, minimalną temperaturą możliwą do zastosowania i kontrolowanego utrzymania podczas całego procesu, jest temperatura 30°C. W ofertach firm wyposażających laboratoria dostępne są koncentratory próżniowe umożliwiające zastosowanie również niższych temperatur, jednak ich użycie w przeprowadzonym badaniu nie było możliwe. Należy przypuszczać (co zweryfikować można przeprowadzając kolejne eksperymenty z zastosowaniem DoE), że obniżenie temperatury odparowywania rozpuszczalnika o kilka stopni Celsjusza jeszcze korzystniej wpłynie na odzysk oznaczanych analitów z suchej pozostałości, a także powtarzalność wyników, zwłaszcza mirystynianu etylu.

Analizując wyniki zawartości poszczególnych estrów etylowych kwasów tłuszczowych w osoczu ludzkim zabezpieczonym po śmierci, pierwszym nasuwającym się wnioskiem jest to, iż wybrane związki mogą być potencjalnymi wskaźnikami nadmiernej konsumpcji alkoholu etylowego. Jak potwierdzono w innych badaniach skupiających się na FAEE – utrzymują się one w organizmie na podwyższonym poziomie przez kilkadziesiąt godzin po spożyciu [84,85]. W stężeniach oznaczanych analitów widoczna jest zdecydowana

dysproporcja pomiędzy grupą badaną a kontrolną, co potwierdzają wyniki jednowymiarowej analizy statystycznej. Wartości otrzymanych stężeń dla każdego z analitów nie dają możliwości stwierdzenia jednoznacznych zależności między stwierdzonym stężeniem alkoholu w promilach, a stężeniem oznaczanych związków. Na podstawie uzyskanych wyników oraz dostępnej literatury można jedynie zasugerować, iż to poziom oleinianu oraz stearynianu etylu będzie znacząco wpływał na różnicowanie próbek pomiędzy grupami. Wspomniany oleinian etylu, w wyższym niż pozostałe związki stężeniu, obecny jest w próbkach pochodzących od grupy kontrolnej, jak i grupy badanej. Sugeruje to, że związek ten jest wyjątkowo długo eliminowany z ludzkiego organizmu i/lub w obecności etanolu powstaje w ludzkim organizmie w większym odsetku niż inne FAEE. Spośród wszystkich oznaczanych w poniższej pracy FAEE to oleinian najbardziej może odzwierciedlać ilość alkoholu w czasie poprzedzającym zgon (mimo, że badanie pośmiertne nie wykazało obecności alkoholu we krwi) co w swojej pracy również potwierdził Soderberg wraz ze współpracownikami [86]. Wyniki przeprowadzonych przez nich badań sugerowały, że oznaką chronicznego alkoholizmu jest stężenie oleinianu etylu na poziomie 0,0004 µg/ml. W przypadku grupy badanej w pracy doktorskiej, takie lub wyższe stężenie występuje u 96,67 %, a w przypadku grupy kontrolnej aż 59,38 % przypadków. Z kolei poziom stearynianu etylu wydaje się być związkiem najlepiej odzwierciedlającym niedawne spożycie alkoholu etylowego. Dlatego też, uzyskane wyniki można traktować jako punkt wyjścia do planowania dalszych etapów badań, aby zobaczyć wyraźniejsze różnice w poziomach oleinianu oraz stearynianu etylu, wykorzystując np. długotrwałe badania z możliwością wielokrotnego próbkowania.

Przeprowadzone analizy składowych głównych pokazują, że oznaczone stężenie stearynianu etylu w wysokim stopniu różnicuje zebrane próbki, pokazując różnice występujące między oznaczeniami grupy kontrolnej oraz badanej.

Poszczególne składowe wzajemnie się uzupełniają rozdzielając analizowane przypadki na dwie grupy.

Niestety, m.in. ze względu na liczebność grup nie zdołano zaobserwować istotnych korelacji pomiędzy stężeniami związków w dwóch punktach czasowych, a stężeniem alkoholu oznaczonym pośmiertnie z krwi pełnej. Aby to osiągnąć należałoby ponadto znać dokładne godziny i wartości spożytego alkoholu, tak by móc odnieść się do konkretnych punktów na osi czasu. Niemniej jednak, badania wykazały, iż dla samego potwierdzenia informacji, czy zmarły spożywał alkohol przed śmiercią nie jest koniecznym pobieranie osocza przez

powłoki ciała. Można bez obaw zrobić to w czasie sekcji zwłok, ponieważ oznaczane anality występują zarówno w próbkach pobranych przez powłoki jak i w próbkach śródsekcyjnych. Argumentem za pobieraniem przez powłoki jest fakt, że takie próbki dostępne są do analizy w krótkim czasie od zgonu, co korzystnie może wpływać na mniejszy stopień hemolizy oraz lepszą jakość analityczną otrzymywanego osocza.

Pierwotnie do oznaczania ilościowego wyznaczonych było sześć związków należących do grupy FAEE. Podczas walidacji, ze względu na niespełnianie części parametrów, w tym, m.in. wymogów stawianym precyzji oraz stabilności, podjęto decyzję o rezygnacji z dalszego oznaczania laurynianu etylu (tabela 25.). Niemożliwym było uzyskanie dla tego związku powtarzalnych i wiarygodnych wyników. Ze względu na swoją budowę chemiczną nie charakteryzował się trwałością wystarczającą do oznaczenia go w warunkach stosowanej metody. Z dostępnej literatury także wynika, że jest to związek najtrudniejszy do identyfikacji i dokładnego oznaczenia [87]. Stężenie laurynianu etylu w próbkach biologicznych pochodzących od pacjentów znajdowałoby się w większości na poziomie nieprzekraczającym granicy oznaczalności. Z uwagi na to, że nie jest to związek endogenny, w literaturze nie ma danych na temat średnich wartości laurynianu etylu w organizmie ludzkim.

Tabela 25. Wyniki oznaczeń dla laurynianu etylu.

Poziom analitu w próbce	Analizy w ciągu dnia (n=3)				Analizy między dniami (n=15)	
	ACC [%]		CV [%]		ACC [%]	CV [%]
	min.	max.	min.	max.		
LQC	100,73	148,63	7	44	107,29	65,67
MQC	75,22	226,48	28,79	36,89	142,11	72
HQC	47,71	214,52	19,82	39,91	133,58	75,58
LLOQ	ACC [%]		CV [%]		-	-
	96,27		10,22			

W kolejnych badaniach – przy dostępności większej objętości próbki, należałoby podjąć się ponownej analizy próbek przy użyciu bardziej czułego sprzętu lub też zastosowaniu bardziej selektywnej i pozwalającej na zateżenie próbki metody ekstrakcji (np. SPME). Należy wtedy

jednak mieć na uwadze konieczność posiadania do dyspozycji większej objętości próbek pobranych śródsekcyjnie.

Przeprowadzone w ostatnim etapie pracy doktorskiej niecelowane analizy metabolomiczne potwierdziły słusznie obrany kierunek badań i dobór grupy związków. Otrzymane modele wielowymiarowe, PCA oraz OPLS-DA, świadczą o dość dobrym dopasowaniu modelu do danych, jednak nie charakteryzują się zdolnością predykcyjną. Może to wynikać przede wszystkim z małej liczby próbek w każdej z porównywanych grup, które cechowały się bardzo dużą zmiennością wewnątrzgrupową związaną m.in. z innym miejscem pobrania materiału biologicznego. W takim przypadku zmienność wewnątrzgrupowa jest znacznie większa niż międzygrupowa.. Tym samym należy podkreślić, iż w kolejnych etapach największy nacisk należy przyłożyć do zwiększenia liczebności grup badanej i kontrolnej, skupiając się na dokładnie znanym czasie zgonu oraz dokumentacji medycznej.

Zidentyfikowane metabolity w osoczu, które różnicowały grupę kontrolną oraz badaną pochodzą głównie ze szlaków biochemicznych związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych, aminokwasów oraz puryn. Dla zidentyfikowanych istotnych statystycznie metabolitów nie wykazano korelacji z parametrami klinicznymi tj: pośmiertne stężenie alkoholu, wiek, płeć czy domniemany czas zgonu. Z kolei korelację pomiędzy oznaczonymi profilami metabolomicznymi a pośmiertnym stężeniem alkoholu wykazano dla dwóch grup metabolitów, tj: kwasy tłuszczowe oraz cukry. Ze względu na bardzo małą liczebność badanych grup konieczna jest walidacja na niezależnych i bardziej licznych grupach.

Podsumowując, interpretacja biochemiczna otrzymanych wyników z oznaczeń analitycznych potwierdziła znaczące różnice w poziomach stężeń oznaczanych FAEE u osób, które przedśmiertnie spożywały alkohol etylowy od tych, które alkoholu nie spożywały. W grupie badanej można wnioskować o użyteczności oznaczania estrów etylowych kwasów tłuszczowych w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności egzogenego alkoholu etylowego w organizmie. Dla potwierdzenia tego faktu należy podkreślić, że średnio w ponad 80 % próbek grupy kontrolnej stężenia oznaczanych analitów znajdowały się poniżej granicy oznaczalności. Tym samym, przedstawione wyniki traktować należy jako badania wstępne będące wskazówką dla prowadzenia dalszych, bardziej rozbudowanych analiz. Ze względu na charakterystykę stosowanego w projekcie materiału biologicznego, jakim było osocze pobrane pośmiertnie, grupa przypadków zakwalifikowanych do oznaczeń była niewielka. Stanowiło to ograniczenie w wyznaczeniu zależności pomiędzy wiekiem czy też BMI pacjentów a uzyskanymi wynikami. Otrzymane

wyniki są wystarczające w celu stwierdzenia, iż wybrane związki są specyficzne dla osób spożywających alkohol etylowy.

W kolejnych etapach cennym byłoby porównanie otrzymanych zależności z wynikami u osób żywych lub zwierząt, kiedy to warunki spożycia alkoholu byłyby kontrolowane. Poznanie dokładnego czasu spożycia, jak i rodzaju i objętości alkoholu, który pacjent przyjął przed pobraniem materiału biologicznego do badań, pozwoliłoby na dokładne określenie jak stężenie poszczególnych FAEE koreluje ze stężeniem alkoholu we krwi. Z drugiej strony, podawanie alkoholu ludziom w celach badawczych do tej pory zastępowane było modelem zwierzęcym, co jednak w pełni nie odzwierciedla tempa metabolizmu. Co więcej, na prędkość metabolizmu wpływ mogą mieć takie czynniki jak płeć, wiek, BMI – dlatego należałoby przeprowadzić analizy w wielu podgrupach.

9. Wnioski

- Celowana analiza metabolomiczna próbek osocza jest użytecznym narzędziem badawczym do oceny zmian metabolicznych związanych ze spożyciem alkoholu etylowego.
- Zastosowanie techniki analitycznej GC-QqQ-MS pozwoliło na opracowanie i walidację użytecznej metody oznaczania ilościowego FAEE w próbkach osocza pochodzących od osób zmarłych.
- Interpretacja biochemiczna otrzymanych wyników z dostępną dokumentacją medyczną pozwala sądzić, iż stężenia FAEE w osoczu stanowią cenny wskaźnik przedśmiertnego spożycia alkoholu i mogą stanowić jeden z czynników pomocnych przy określaniu przyczyny oraz mechanizmu śmierci.
- Oznaczanie FAEE w badanych próbkach osocza pobranego od osób zmarłych jest użyteczne w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności egzogenego alkoholu etylowego w organizmie.

Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej zostały opisane w publikacji pt.: „Overcoming challenges in determination of FAEE in postmortem blood samples with the use of targeted metabolomics and QbD approach” autorstwa Dawidowska J., Jacyna J., Wawrzyniak R., Kaliszan M., Markuszewski M. J., zgłoszonej do recenzji.

WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Procentowy udział materiałów biologicznych wykorzystywanych w badaniach toksykologicznych w medycynie sądowej na podstawie przeglądu artykułów oryginalnych z lat 1997-2020 [17].

Rycina 2. Schemat metabolizmu alkoholu etylowego w organizmie ludzkim.

Rycina 3. Porównanie schematów badawczych stosowanych w niecelowanych i celowanych analizach metabolomicznych.

Rycina 4. Sposób pobierania próbek krwi przez powłoki ciała.

Rycina 5. Schemat przedstawiający dwa etapy pobierania materiału biologicznego do oznaczeń; (A) pierwsze pobranie w czasie do 24 h po śmierci; (B) drugie pobranie w czasie do 96 godzin od zgonu.

Rycina 6. Zakres liczby pobieranych próbek i ostateczna liczebność grupy wybranej do oznaczeń analitycznych.

Rycina 7. Prezentacja pięciu próbek osocza pochodzących od pięciu różnych pacjentów.

Rycina 8. Procedura przygotowania próbek osocza do celowanych analiz metabolomicznych.

Rycina 9. Procedura przygotowania próbek osocza do niecelowanych analiz metabolomicznych.

Rycina 10. Przykładowe chromatogramy z oznaczeń analitycznych: (A) próbki ślepej; (B) próbki ślepej wzbogaconej o IS; (C) próbki MQC; (D) próbki rzeczywistej; 1 – mirystynian etylu; 2 – palmitynian etylu; 3 – heptadekanian etylu (IS); 4 – linoleinian etylu; 5 – oleinian etylu; 6 – stearynian etylu. Górna linia na chromatogramach odzwierciedla powiększenie w odpowiednich zakresach czasu.

Rycina 11. Przykładowe krzywe kalibracyjne wyznaczone dla stearynianu etylu oraz palmitynianu etylu.

Rycina 12. Model dopasowania dla mirystynianu etylu.

Rycina 13. Porównanie modelu dla 3 różnych wartości temperatury odparowywania rozpuszczalnika dla oznaczeń mirystynianu etylu.

Rycina 14. Przedstawienie rozkładu w grupach badanej oraz kontrolnej dla każdego ze związków.

Rycina 15. Wykres liniowy składowej pierwszej.

Rycina 16. Analiza składowych głównych dla danych pochodzących z oznaczeń ilościowych FAEE; ME – mirystynian etylu; SE – stearynian etylu; LE – linoleinian etylu; OE – oleinian etylu; PE – palmitynian etylu.

Rycina 17. Wykresy liniowe ładunków zmiennej składowej pierwszej oraz drugiej.

Rycina 18. Dokładność dla stearynianu etylu wyliczona dla modelu kwadratowego.

Rycina 19. Model PCA dla danych z niecelowanych analiz metabolomicznych z wykorzystaniem techniki GC-QqQ/MS (1 – grupa badana; 2 – grupa kontrolna; 3 – próbki QC).

Rycina 20. Model OPLS-DA dla danych z niecelowanych analiz metabolomicznych z wykorzystaniem techniki GC-QqQ/MS.

Rycina 21. Wyniki testu permutacji dla zbudowanego modelu OPLS-DA ($R^2=0,699$; $Q^2=0,263$).

WYKAZ TABEL

Tabela 1. Estrы etylowe kwasów tłuszczowych wytypowane do analiz.

Tabela 2. Kryteria włączenia i wyłączenia.

Tabela 3. Charakterystyka grupy pacjentów zakwalifikowanych do badania.

Tabela 4. Podział pacjentów z grupy badanej na podgrupy według stężenia alkoholu etylowego stwierdzonego pośmiertnie we krwi pobranej śródsekcyjnie.

Tabela 5. Gradient temperaturowy podczas oznaczeń GC-QqQ/MS.

Tabela 6. Pozostałe parametry opracowanej metody analitycznej GC-QqQ/MS.

Tabela 7. Wybrane wartości przejść m/z oraz energii kolizji (ang. *collision energy*, CE).

Tabela 8. Eksperymenty przeprowadzone w ramach badania elastyczności metody analitycznej.

Tabela 9. Wyniki krzywej kalibracyjnej.

Tabela 10. Wyznaczone wartości LOQ oznaczanych związków.

Tabela 11. Podsumowanie parametrów służących wyznaczeniu dokładności i precyzji w ciągu dnia (ang. *intra-day*) oraz między dniami (ang. *inter-day*).

Tabela 12. Wyniki oceny efektu matrycy prób QC w osoczu oraz metanolu.

Tabela 13. Wyniki analiz stabilności badanych estrów etylowych.

Tabela 14. Oceniane zmienne w modelu dla mirystynianu etylu.

Tabela 15. Procent próbek zawierających się w granicy 20 % odchylenia od wartości początkowych.

Tabela 16. Wyniki oznaczeń ilościowych dla mirystynianu etylu w osoczu.

Tabela 17. Wyniki oznaczeń ilościowych dla palmitynianu etylu w osoczu.

Tabela 18. Wyniki oznaczeń ilościowych dla linoleinianu etylu w osoczu.

Tabela 19. Wyniki oznaczeń ilościowych dla oleinianu etylu w osoczu.

Tabela 20. Wyniki oznaczeń ilościowych dla stearynianu etylu w osoczu.

Tabela 21. Procent wyników poniżej wartości LOQ.

Tabela 22. Wyniki analizy statystycznej.

Tabela 23. Średnie stężenia oznaczanych analitów w zależności od pośmiertnego stężenia alkoholu etylowego oznaczonego we krwi.

Tabela 24. Wstępnie zidentyfikowane metabolitów różnicujące porównywane grupy.

Tabela 25. Wyniki oznaczeń dla laurynianu etylu.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J.H. Hammer, M.C. Parent, D.A. Spiker, World Health Organization, Global status report on alcohol and health 2018, 2018. <https://doi.org/10.1037/cou0000248>.
- [2] A. Jakliński, Zarys sądowo-lekarskiej toksykologii alkoholu etylowego, Państwowe Zakłady Wydawnictw Lekarskich, 1978.
- [3] M.-A. Enoch, D. Goldman, The Genetics of Alcoholism and Alcohol Abuse, (2001).
- [4] Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence SUMMARY World Health Organization Geneva WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Neuroscience of psychoactive substance use and dependence : summary, (n.d.).
- [5] American Psychiatric Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed., text rev.), American Psychiatric Association Publishing, 2022. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425787>.
- [6] B. Álvarez-Sánchez, F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.003>.
- [7] S. Barnes, H.P. Benton, K. Casazza, S.J. Cooper, X. Cui, X. Du, J. Engler, J.H. Kabarowski, S. Li, W. Pathmasiri, J.K. Prasain, M.B. Renfrow, H.K. Tiwari, Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data, *J. Mass Spectrom.* 51 (2016) 461–475. <https://doi.org/10.1002/jms.3782>.
- [8] R. Chaleckis, I. Murakami, J. Takada, H. Kondoh, M. Yanagida, Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 4252 LP – 4259. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603023113>.
- [9] M.K. Townsend, C.B. Clish, P. Kraft, C. Wu, A.L. Souza, A.A. Deik, S.S. Tworoger, B.M. Wolpin, Reproducibility of Metabolomic Profiles among Men and Women in 2 Large Cohort Studies, *Clin. Chem.* 59 (2013) 1657 LP – 1667. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.199133>.
- [10] S.C. Moore, C.E. Matthews, J.N. Sampson, R.Z. Stolzenberg-Solomon, W. Zheng, Q. Cai, Y.T. Tan, W.-H. Chow, B.-T. Ji, D.K. Liu, Q. Xiao, S.M. Boca, M.F. Leitzmann,

- G. Yang, Y.B. Xiang, R. Sinha, X.O. Shu, A.J. Cross, Human metabolic correlates of body mass index, *Metabolomics*. 10 (2014) 259–269. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0574-1>.
- [11] D. Lent-Schochet, M. McLaughlin, N. Ramakrishnan, I. Jialal, Exploratory metabolomics of metabolic syndrome: A status report, *World J. Diabetes*. 10 (2019) 23–36. <https://doi.org/10.4239/wjd.v10.i1.23>.
- [12] C. Menni, E. Fauman, I. Erte, J.R.B. Perry, G. Kastenmüller, S.-Y. Shin, A.-K. Petersen, C. Hyde, M. Psatha, K.J. Ward, W. Yuan, M. Milburn, C.N.A. Palmer, T.M. Frayling, J. Trimmer, J.T. Bell, C. Gieger, R.P. Mohney, M.J. Broxnan, K. Suhre, N. Soranzo, T.D. Spector, Biomarkers for Type 2 Diabetes and Impaired Fasting Glucose Using a Nontargeted Metabolomics Approach, *Diabetes*. 62 (2013) 4270 LP – 4276. <https://doi.org/10.2337/db13-0570>.
- [13] P.-C. Hsu, R.S. Lan, T.M. Brasky, C. Marian, A.K. Cheema, H.W. Ransom, C.A. Loffredo, W.B. Pickworth, P.G. Shields, Metabolomic profiles of current cigarette smokers, *Mol. Carcinog.* 56 (2017) 594–606. <https://doi.org/10.1002/mc.22519>.
- [14] T. Voutilainen, O. Kärkkäinen, Changes in the Human Metabolome Associated With Alcohol Use: A Review, *Alcohol Alcohol.* 54 (2019) 225–234. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agz030>.
- [15] R. Kaddurah-Daouk, B.S. Kristal, R.M. Weinshilboum, Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48 (2008) 653–683. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094715>.
- [16] T. Esko, J.N. Hirschhorn, H.A. Feldman, Y.-H.H. Hsu, A.A. Deik, C.B. Clish, C.B. Ebbeling, D.S. Ludwig, Metabolomic profiles as reliable biomarkers of dietary composition, *Am. J. Clin. Nutr.* 105 (2017) 547–554. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.144428>.
- [17] J. Dawidowska, M. Krzyżanowska, M.J. Markuszewski, M. Kaliszan, The Application of Metabolomics in Forensic Science with Focus on Forensic Toxicology and Time-of-Death Estimation, *Metabolites*. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/METABO11120801>.
- [18] A.D. Maher, S.F.M. Zirah, E. Holmes, J.K. Nicholson, Experimental and Analytical Variation in Human Urine in ¹H NMR Spectroscopy-Based Metabolic Phenotyping

- Studies, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5204–5211. <https://doi.org/10.1021/ac070212f>.
- [19] J.I. Coe, Postmortem chemistry update: Emphasis on forensic application, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 14 (1993) 91–117. <https://doi.org/10.1097/00000433-199306000-00001>.
- [20] L.S. Castillo-Peinado, M.D. Luque de Castro, Present and foreseeable future of metabolomics in forensic analysis, *Anal. Chim. Acta.* 925 (2016) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.040>.
- [21] A.E. Donaldson, I.L. Lamont, Estimation of post-mortem interval using biochemical markers, *Aust. J. Forensic Sci.* 46 (2014) 8–26. <https://doi.org/10.1080/00450618.2013.784356>.
- [22] B. Álvarez Sánchez, F.P. Capote, J.R. Jiménez, M.D. Luque de Castro, Automated solid-phase extraction for concentration and clean-up of female steroid hormones prior to liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: An approach to lipidomics, *J. Chromatogr. A.* 1207 (2008) 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.085>.
- [23] Z. León, A. Chisvert, I. Tarazona, A. Salvador, Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 831–843. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3947-6>.
- [24] B.M. Warrack, S. Hnatyshyn, K.-H. Ott, M.D. Reily, M. Sanders, H. Zhang, D.M. Drexler, Normalization strategies for metabolomic analysis of urine samples, *J. Chromatogr. B.* 877 (2009) 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.007>.
- [25] I.-L. Tsai, T.-I. Weng, Y.J. Tseng, H.K.-L. Tan, H.-J. Sun, C.-H. Kuo, Screening and Confirmation of 62 Drugs of Abuse and Metabolites in Urine by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 642–651. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt083>.
- [26] S. Tridico, Hair: Animal, in: *Wiley Encycl. Forensic Sci.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2014: pp. 1–15. <https://doi.org/10.1002/9780470061589.fsa172.pub2>.

- [27] P. Kintz, M. Villain, V. Cirimele, Hair analysis for drug detection, *Ther. Drug Monit.* 28 (2006) 442–446. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000211811.27558.b5>.
- [28] P. Kintz, Value of hair analysis in postmortem toxicology, *Forensic Sci. Int.* 142 (2004) 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.027>.
- [29] K.L. Opel, E.L. Fleishaker, J.A. Nicklas, E. Buel, B.R. McCord, Evaluation and Quantification of Nuclear DNA from Human Telogen Hairs, *J. Forensic Sci.* 53 (2008) 853–857. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00777.x>.
- [30] P. Kintz, D. Nicholson, Interpretation of a highly positive ethyl glucuronide result together with negative fatty acid ethyl esters result in hair and negative blood results, *Forensic Toxicol.* 32 (2014) 176–179. <https://doi.org/10.1007/s11419-013-0209-2>.
- [31] A. Namera, S. Urabe, T. Saito, A. Torikoshi-Hatano, H. Shiraishi, Y. Arima, M. Nagao, A fatal case of 3,4-methylenedioxypropylamphetamine poisoning: Coexistence of α -pyrrolidinobutyrophenone and α -pyrrolidinovalerophenone in blood and/or hair, *Forensic Toxicol.* 31 (2013) 338–343. <https://doi.org/10.1007/s11419-013-0192-7>.
- [32] N. Shima, K. Sasaki, T. Kamata, S. Matsuta, M. Katagi, A. Miki, K. Zaitso, T. Sato, T. Nakanishi, H. Tsuchihashi, K. Suzuki, Single-hair analysis of zolpidem on the supposition of its single administration in drug-facilitated crimes, *Forensic Toxicol.* 33 (2015) 122–130. <https://doi.org/10.1007/s11419-014-0260-7>.
- [33] P. Kintz, M. Villain, V. Dumestre-Toulet, B. Ludes, Drug-facilitated sexual assault and analytical toxicology: The role of LC-MS/MS. A case involving zolpidem, *J. Clin. Forensic Med.* 12 (2005) 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.jcfm.2004.08.005>.
- [34] S. Harada, T. Takebayashi, A. Kurihara, M. Akiyama, A. Suzuki, Y. Hatakeyama, D. Sugiyama, K. Kuwabara, A. Takeuchi, T. Okamura, Y. Nishiwaki, T. Tanaka, A. Hirayama, M. Sugimoto, T. Soga, M. Tomita, Metabolomic profiling reveals novel biomarkers of alcohol intake and alcohol-induced liver injury in community-dwelling men, *Environ. Health Prev. Med.* 21 (2016) 18–26. <https://doi.org/10.1007/s12199-015-0494-y>.
- [35] A. Rocco, D. Compare, D. Angrisani, M. Sanduzzi Zamparelli, G. Nardone, Alcoholic disease: Liver and beyond, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 14652–14659. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14652>.
- [36] R.J. Dinis-Oliveira, Metabolomics of drugs of abuse: A more realistic view of the

- toxicological complexity, *Bioanalysis*. 6 (2014) 3155–3159. <https://doi.org/10.4155/bio.14.260>.
- [37] S.S. Zhu, R. Long, T. Song, L. Zhang, Y.L. Dai, S.W. Liu, P. Zhang, UPLC-Q-TOF/MS Based Metabolomics Approach to Study the Hepatotoxicity of Cantharidin on Mice, *Chem. Res. Toxicol.* 32 (2019) 2204–2213. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00233>.
- [38] J.L. Griffin, J. Scott, J.K. Nicholson, The Influence of Pharmacogenetics on Fatty Liver Disease in the Wistar and Kyoto Rats: A Combined Transcriptomic and Metabonomic Study, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 54–61. <https://doi.org/10.1021/pr0601640>.
- [39] J.L. Griffin, R.M. Salek, Metabolomic applications to neuroscience: More challenges than chances?, *Expert Rev. Proteomics*. 4 (2007) 435–437. <https://doi.org/10.1586/14789450.4.4.435>.
- [40] A. Turner, *Biochemistry and the Central Nervous System (Fifth Edition)*, *Biochem. Educ.* 14 (1986) 46. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(86\)90054-3](https://doi.org/10.1016/0307-4412(86)90054-3).
- [41] S. Naz, D.C. Moreira Dos Santos, A. García, C. Barbas, Analytical protocols based on LC-MS, GC-MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues, *Bioanalysis*. 6 (2014) 1657–1677. <https://doi.org/10.4155/bio.14.119>.
- [42] C. Gonzalez-Riano, A. Garcia, C. Barbas, Metabolomics studies in brain tissue: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 141–168. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.008>.
- [43] T.M. Maenhout, M.L. De Buyzere, J.R. Delanghe, Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake, *Clin. Chim. Acta.* 415 (2013) 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.11.014>.
- [44] S. Zakhari, Overview: How is alcohol metabolized by the body?, *Alcohol Res. Heal.* 29 (2006) 245–254.
- [45] C. Heier, H. Xie, R. Zimmermann, Nonoxidative ethanol metabolism in humans— from biomarkers to bioactive lipids, *IUBMB Life*. 68 (2016) 916–923. <https://doi.org/10.1002/iub.1569>.
- [46] B.S. Kaphalia, P. Cai, M.F. Khan, A.O. Okorodudu, G.A.S. Ansari, Fatty acid ethyl esters: Markers of alcohol abuse and alcoholism, *Alcohol*. 34 (2004) 151–158.

<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.07.013>.

- [47] A. Bakdash, P. Burger, T.W. Goecke, P.A. Fasching, U. Reulbach, S. Bleich, M. Hastedt, M. Rothe, M.W. Beckmann, F. Pragst, J. Kornhuber, A. Bakdash, M. Hastedt, F. Pragst, P. Burger, : U Reulbach, S. Bleich, J. Kornhuber, T.W. Goecke, P.A. Fasching, M.W. Beckmann, M. Rothe, Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study, *Anal Bioanal Chem.* 396 (2010) 2469–2477. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3474-5>.
- [48] M.K. Woźniak, L. Banaszekiewicz, J. Aszyk, M. Wiergowski, I. Jańczewska, J. Wierzba, A. Kot-Wasik, M. Biziuk, Development and validation of a method for the simultaneous analysis of fatty acid ethyl esters, ethyl sulfate and ethyl glucuronide in neonatal meconium: application in two cases of alcohol consumption during pregnancy, (n.d.). <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03248-0/Published>.
- [49] R.J. Dinis-Oliveira, Metabolism and metabolomics of opiates: A long way of forensic implications to unravel, *J. Forensic Leg. Med.* 61 (2019) 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2018.12.005>.
- [50] M. Mamas, W.B. Dunn, L. Neyses, R. Goodacre, The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 5–17. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0609-6>.
- [51] W.J. Griffiths, T. Koal, Y. Wang, M. Kohl, D.P. Enot, H.-P. Deigner, Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery, *Angew. Chemie Int. Ed.* 49 (2010) 5426–5445. <https://doi.org/10.1002/anie.200905579>.
- [52] J.K. Nicholson, I.D. Wilson, Understanding “global” systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 668–676. <https://doi.org/10.1038/nrd1157>.
- [53] G.G. Harrigan, G. Maguire, L. Boros, Metabolomics in alcohol research and drug development., *Alcohol Res. Health.* 31 (2008) 26–35. <https://doi.org/10.1002/jssc.200400092>.
- [54] O. Fiehn, Metabolomics — the link between genotypes and phenotypes, in: *Funct. Genomics*, Springer Netherlands, 2002: pp. 155–171. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0448-0_11.

- [55] B.J. Blaise, G. Correia, A. Tin, J.H. Young, A.-C. Vergnaud, M. Lewis, J.T.M. Pearce, P. Elliott, J.K. Nicholson, E. Holmes, T.M.D. Ebbels, Power Analysis and Sample Size Determination in Metabolic Phenotyping, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5179–5188. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00188>.
- [56] A.M. Weljie, J. Newton, P. Mercier, E. Carlson, C.M. Slupsky, Targeted Profiling: Quantitative Analysis of ¹H NMR Metabolomics Data, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4430–4442. <https://doi.org/10.1021/ac060209g>.
- [57] J.F. Xiao, B. Zhou, H.W. Ransom, Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 32 (2012) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.08.009>.
- [58] S. Snowden, S.E. Dahlén, C.E. Wheelock, Application of metabolomics approaches to the study of respiratory diseases, *Bioanalysis.* 4 (2012) 2265–2290. <https://doi.org/10.4155/bio.12.218>.
- [59] A. Týčová, V. Ledvina, K. Klepárník, Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications, *Electrophoresis.* 38 (2017) 115–134. <https://doi.org/10.1002/elps.201600366>.
- [60] Z. Lei, D. V Huhman, L.W. Sumner, Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics *, (2011). <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.238691>.
- [61] L.S. Castillo-Peinado, M.D. Luque de Castro, An overview on forensic analysis devoted to analytical chemists, *Talanta.* 167 (2017) 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.087>.
- [62] K. MacDonald, A. Krishnan, E. Cervenka, G. Hu, E. Guadagno, Y. Trakadis, Biomarkers for major depressive and bipolar disorders using metabolomics: A systematic review, *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 180 (2019) 122–137. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32680>.
- [63] H. Pang, W. Jia, Z. Hu, Emerging Applications of Metabolomics in Clinical Pharmacology, *Clin. Pharmacol. Ther.* 106 (2019) 544–556. <https://doi.org/10.1002/CPT.1538>.
- [64] P.H. Stefanuto, K.A. Perrault, S. Stadler, R. Pesesse, H.N. Leblanc, S.L. Forbes, J.F. Focant, GC × GC-TOFMS and supervised multivariate approaches to study human cadaveric decomposition olfactory signatures, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015)

4767–4778. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8683-5>.

- [65] M.R. Meyer, H.H. Maurer, Toxicokinetics and Toxicogenetics, in: *Handb. Forensic Med.*, John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK, 2014: pp. 889–899. <https://doi.org/10.1002/9781118570654.ch50>.
- [66] E. Locci, G. Bazzano, A. Chighine, F. Locco, E. Ferraro, R. Demontis, E. d’Aloja, Forensic NMR metabolomics: one more arrow in the quiver, *Metabolomics*. 16 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01743-6>.
- [67] M. Mora-Ortiz, M. Trichard, A. Oregioni, S.P. Claus, Thanatometabolomics: introducing NMR-based metabolomics to identify metabolic biomarkers of the time of death, *Metabolomics*. 15 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1498-1>.
- [68] E. Locci, M. Stocchero, A. Noto, A. Chighine, L. Natali, P.E. Napoli, R. Caria, F. De-Giorgio, M. Nioi, E. d’Aloja, A ¹H NMR metabolomic approach for the estimation of the time since death using aqueous humour: an animal model, *Metabolomics*. 15 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1533-2>.
- [69] M. Kaliszan, R. Hauser, G. Kernbach-Wighton, Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling, *Leg. Med.* 11 (2009) 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2008.12.002>.
- [70] A.K. Kosmides, K. Kamisoglu, S.E. Calvano, S.A. Corbett, I.P. Androulakis, Metabolomic fingerprinting: Challenges and opportunities, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 41 (2013) 205–221. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2013007736>.
- [71] R. Akçan, B. Taştekin, M.Ş. Yildirim, H.C. Aydoğan, N. Sağlam, Omics era in forensic medicine; towards a new age, *Turkish J. Med. Sci.* 50 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.3906/sag-1912-197>.
- [72] M. Szeremeta, K. Pietrowska, A. Niemcunowicz-Janica, A. Kretowski, M. Ciborowski, Applications of Metabolomics in Forensic Toxicology and Forensic Medicine, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, Vol. 22, Page 3010. 22 (2021) 3010. <https://doi.org/10.3390/IJMS22063010>.
- [73] K. Woyna-Orlewicz, P.S. Kraków Zakłady Farmaceutyczne Grzegorz Harańczyk, S. Polska Sp oo, REALIZACJA KONCEPCJI QUALITY BY DESIGN, (2009). www.statsoft.pl/pharmawww.statsoft.pl/czytelnia.html#81 (accessed November 12, 2023).

- [74] B. Junker, M. Kosinski, D. Geer, R. Mahajan, M. Chartrain, B. Meyer, P. Dephillips, Y. Wang, R. Henrickson, K. Ezis, M. Waskiewicz, Design-for-Six-Sigma for Development of a Bioprocess Quality-by-Design Framework, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 65 (2011) 254–286. <https://doi.org/10.5731/PDAJPST.2011.00739>.
- [75] Design of experiment techniques for the optimization of chromatographic analysis conditions: A review, *Electrophoresis.* 43 (2022) 1882–1898. <https://doi.org/10.1002/ELPS.202200072>.
- [76] S.N. Politis, P. Colombo, G. Colombo, D.M. Rekkas, Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43 (2017) 889–901. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672>.
- [77] P.K. Sahu, N.R. Ramiseti, T. Cecchi, S. Swain, C.S. Patro, J. Panda, An overview of experimental designs in HPLC method development and validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 590–611. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.05.006>.
- [78] R.L. PLACKETT, J.P. BURMAN, THE DESIGN OF OPTIMUM MULTIFACTORIAL EXPERIMENTS, *Biometrika.* 33 (1946) 305–325. <https://doi.org/10.1093/BIOMET/33.4.305>.
- [79] European Medicines Agency, ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation, *Sci. Med. Heal.* 44 (2019) 57. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf
%0Ahttps://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation#current-version-section.
- [80] C.C. Kulig, T.P. Beresford, G.T. Everson, Rapid, accurate, and sensitive fatty acid ethyl ester determination by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Lab. Clin. Med.* 147 (2006) 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.11.006>.
- [81] F. Krumbiegel, M. Hastedt, M. Tsokos, Nails are a potential alternative matrix to hair for drug analysis in general unknown screenings by liquid-chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 10 (2014) 496–503. <https://doi.org/10.1007/s12024-014-9588-x>.
- [82] A. Jakkampudi, R. Jangala, R. Reddy, B. Reddy, G. Venkat Rao, R. Pradeep, D. Nageswar Reddy, R. Talukdar, Fatty acid ethyl ester (FAEE) associated acute pancreatitis: An ex-vivo study using human pancreatic acini, *Pancreatology.* 20

(2020) 1620–1630. <https://doi.org/10.1016/J.PAN.2020.10.027>.

- [83] B.S. Kaphalia, G.A. Ansari, Fatty acid ethyl esters and ethanol-induced pancreatitis., *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)*. 47 Online Pub (2001).
- [84] K.M. Doyle, J.E. Cluette-Brown, D.M. Dube, T.G. Bernhardt, C.R. Morse, M. Laposata, Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake, *JAMA*. 276 (1996) 1152–1156. <https://doi.org/10.1001/jama.276.14.1152>.
- [85] K. Borucki, J. Dierkes, J. Wartberg, S. Westphal, A. Genz, C. Luley, In Heavy Drinkers, Fatty Acid Ethyl Esters Remain Elevated for Up to 99 Hours, (2007). <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00323.x>.
- [86] B.L. Soderberg, R.O. Salem, MS, C.A. Best, MS, J.E. Cluette-Brown, MS, M. Laposata, MD, PhD, Fatty Acid Ethyl Esters: Ethanol Metabolites That Reflect Ethanol Intake, *Pathol. Patterns Rev.* 119 (2003) 94–99. <https://doi.org/10.1309/6f39ear2l4gyx5g6>.
- [87] H.S. Kwak, Y.S. Kang, K.O. Han, J.T. Moon, Y.C. Chung, J.S. Choi, J.Y. Han, M.Y. Kim, E.Y. Velázquez-Armenta, A.A. Nava-Ocampo, Quantitation of fatty acid ethyl esters in human meconium by an improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 1871–1874. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.05.001>.