



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Prof. dr hab. Michał Piotr Marszałł
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII LEKÓW
ul. Dr Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz,
tel. +48 52 585 35 32, fax. +48 52 585 35 29
e- mail: mmars@cm.umk.pl

Bydgoszcz, dn. 1.08.2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Jarek

„GC/MS i GC/C/IRMS w badaniach antydopingowych. Studium przypadków”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Bulskiej

oraz dr hab. inż. Doroty Kwiatkowskiej

Doping towarzyszy sportowi niemal od samych jego początków. Stanowi on poważny problem mający wpływ na zniekształcenie rywalizacji sportowej. To kontrowersyjne zjawisko, które miało i cały czas ma miejsce na przestrzeni lat, dopiero na początku lat dwutysięcznych zostało w sposób jednolity określone i zdefiniowane a powstałe organizacje mają za zadanie kontrolować, zwalczać i przeciwdziałać dopingowi w sporcie. Szybki rozwój wiedzy w zakresie farmakologii, farmakokinetyki oraz wytwarzania leków często pozwala na ominięcie obowiązujących regulacji prawnych. W tym celu publikowana lista substancji i metod zabronionych w sporcie jest aktualizowana. Ma to miejsce dzięki wyspecjalizowanym laboratoriom współpracującym m.in. ze Światową Agencją Antydopingową (WADA). To właśnie często oddolna inicjatywa laboratoriów skutkuje zaostrzeniem przepisów oraz zwiększeniem katalogu naruszeń antydopingowych. Przykładem tego jest przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Anny Jarek wykonanej pod kierownictwem prof. dr hab. Ewy Bulskiej w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego oraz dr hab. inż. Doroty Kwiatkowskiej w Polskim Laboratorium Antydopingowym, którego doktorantka jest pracownikiem.

Zaproponowany temat rozprawy doktorskiej wpisuje się w nurt badań naukowych prowadzonych przez promotorów na Uniwersytecie Warszawskim jak również wykonywanych w ramach obowiązków ustawowych Laboratorium. Praca doktorska liczy 223 strony i jest zbiorem wyników badań prowadzonych przez mgr Annę Jarek ww. Laboratorium w ramach czterech projektów. Badania dotyczą zastosowania nowoczesnej aparatury naukowej bazującej na chromatografii gazowej pod kątem optymalizacji i walidacji przygotowania próbek i procedury

analitycznej, analizy wyników pod kątem uzyskania nowych informacji biochemicznych oraz interpretacji wyników w kontekście obowiązujących zasad antydopingowych. Opis badań został poprzedzony obszernym wstępem przedstawiającym problematykę doping, techniki analityczne stosowane w rutynowej kontroli antydopingowej ze szczególnym uwzględnieniem technik chromatograficznych i spektrometrii mas oraz podstawy walidacji metod analitycznych. Dodatkowo został przedstawiony aneks w formie materiałów dodatkowych zawierający dane farmakokinetyczne, walidacyjne i statystyczne badanych substancji.

Pierwszy projekt wykonany w ramach pracy dotyczył retrospektywnej analizy próbek moczu pod kątem zawartości trimetazydyny, zebranych w rutynowej kontroli antydopingowej u sportowców w latach 2005-2011. Należy wspomnieć, że w tym czasie ww. lek zwiększający tolerancję wysiłkową nie był umieszczony na liście substancji zabronionych i został wykryty podczas badań na obecność innych substancji „zakazanych”. Doktorantka odważnie formułuje przypuszczenie, że obecność znacznych ilości trimetazydyny w moczu sportowców mogło być konsekwencją świadomego podawania leku a tym samym udziału lekarzy w tym procederze. Wyniki badań wskazują na wybrane grupy sportowców (kolarstwo, triathlon oraz koszykówka) jako najbardziej narażone na stosowanie trimetazydyny. Chcąc pogłębić wiedzę na temat farmakokinetyki leku oraz potencjalnych metabolitów/markerów przeprowadziła autorskie badania z użyciem techniki chromatografii gazowej. Porównując wyniki niezależnych badań wykonanych w niemieckim laboratorium potrafi krytycznie ocenić swoje osiągnięcie stwierdzając, że zastosowana technika nie jest wystarczająca do identyfikacji i oznaczania metabolitów jako potencjalnych markerów. Z informacji zawartej na str. 57 wynika, że analizy Polskiego Laboratorium Antydopingowego przyczyniły się do wprowadzenia ww. substancji na Listę zabronioną. Stąd rodzi się pytanie: jeśli dobrze rozumiem to właśnie polskie laboratorium w tym mgr Anna Jarek było pionierem ww. badaniach? W 2015 roku trimetazydyna została wpisana do grupy hormonów S4 Hormonów i modulatorów metabolizmu na liście substancji i metod zabronionych WADA.

Drugi projekt wykonany został pod kątem identyfikacji nowych związków w materiale biologicznym podczas rutynowych badań w laboratorium – identyfikacji substancji z grupy S6 oraz S7. Doktorantka podczas analiz wykazała się dużą czujnością i spostrzegawczością obserwując niezidentyfikowany sygnał na chromatogramie w obszarze charakterystycznym dla związków o budowie chemicznej zbliżonej do amfetaminy. Co ważne we współpracy z innymi laboratoriami, żadne z nich nie potwierdziło takiego problemu. Dlatego zgodnie z procedurami WADA została poinformowana o ww. sytuacji. W celu pełnej identyfikacji nieznaney

substancji mgr Anna Jarek dokonała pełnej analizy widma mas identyfikując nieznaną substancję jako N,N – Dimetylo-2-fenylpropano-1-aminę. Jednocześnie nawiązała współpracę z laboratorium z Nowej Zelandii, które podjęło się syntezy wzorca dla tego związku. Uzyskanie substancji wzorcowej, umożliwiło doktorantce pełną walidację metody oznaczania ww. substancji zarówno w materiale biologicznym jak i odżywkach. Uwieńczeniem projektu jest pełna identyfikacja substancji (pochodnej fenyletyloaminy) oraz potwierdzenie zasadności wprowadzenia w 2015 roku na Listę zabronioną zapisu o zakazie stosowania pochodnych fenyletyloaminy w sporcie. Fakt ten ma ogromne znaczenie, szczególnie w przypadku występowania ww. substancji w odżywkach i suplementach diety, których spożywanie przez sportowców może skutkować wynikiem niekorzystnym w przypadku badań antydopingowych. Analizując opis projektu mam pytanie:

- Czy zakres całkowitego zbierania chromatogramu (str 89) od 30m/z do 500 m/z nie jest za szeroki i czy z punktu widzenia analitycznego nie lepiej podzielić eksperyment aby skan przeprowadzić w dwóch zakresach oddzielnie tj. 30-250 m/z oraz 250-500 m/z?

- W praktyce w detektorach mas stosowane jonizatory pozwalające na skan cząsteczek do 2 kDa. Jakie było kryterium zawężenia tego zakresu?

Trzeci projekt wykonany został w celu oznaczenia nikotyny i wybranych metabolitów podczas standardowych analiz próbek moczu pod kątem obecności stymulantów i narkotyków. Doktorantka opracowała i zoptymalizowała pod kątem walidacji czułą metodę oznaczania nikotyny i jej metabolitów techniką chromatografii gazowej. Jednocześnie postawiła sobie odważny cel – rozróżnienie biernego od czynnego narażenia na nikotynę. Uzyskując wyniki z analiz, wysunęła również hipotezę zakładającą możliwość wykorzystania informacji o zawartości nikotyny, przy jednoczesnym braku obecności metabolitów jako wskaźnika świadomego zastosowania „używek” zawierających nikotynę celem stymulacji mózgu i obniżeniem stresu na organizm sportowca. Stąd nasuwa się pytanie - czy przy postawieniu tej hipotezy wzięto pod uwagę:

- możliwość zajścia interakcji lek-nikotyna tzn. niektóre leki (np. z grupy przeciwpsychotycznych) hamują lub zmieniają metabolizm nikotyny?

- możliwość wystąpienia polimorfizmu genów kodujących głównie CYP2A6 (P450) biorących udział w procesie utleniania nikotyny?

Podsumowanie na stronach 127-129 stanowi ciekawą lekturę interpretacji wyników w zależności od różnych poziomów nikotyny lub/oraz jej metabolitów u sportowców różnych dyscyplin. Taki opis wymaga od autorki dużej wiedzy oraz doświadczenia zawodowego.

Czwarty projekt miał na celu wykazanie przydatności układu GC/C/IRMS przy wsparciu detektora mas w badaniach nad rozróżnieniem endogennego od egzogenego pochodzenia wybranych steroidów anaboliczno-androgenowych w próbkach moczu u sportowców. Zgodnie z procedurą, w celu lepszego monitorowania steroidów wprowadzono wiele wskaźników a profil naturalny jest zapisany w paszporcie biologicznym zawodnika. Z uwagi na fakt, że nie ma określonych procedur przygotowania próbek do analizy techniką GC/C/IRMS, realizując założony cel mgr Anna Jarek zaproponowała własny sposób postępowania, w tym jednostopniowy proces oczyszczania próbek moczu przed analizą. Poprawność uzyskanych wyników została potwierdzona w badaniach międzylaboratoryjnych a uzyskane dane w ramach realizacji projektu doktorantki stanowią istotny wkład w rozwój populacyjnej bazy danych WADA.

Przedstawioną do recenzji pracę oceniam bardzo dobrze. Opisuje ona profesjonalne podejście do poruszonych zagadnień. Każda metoda łącznie z przygotowaniem próbek do analizy została w pełni zwalidowana. Oprócz dobrej znajomości technik analitycznych, w tym chromatografii gazowej w połączeniu z analizą statystyczną doktorantka wykazała się również umiejętnością współpracy z różnymi laboratoriami – w tym międzynarodowymi. Oprócz bogatego doświadczenia zawodowego zdobytego w Laboratorium na uwagę zasługuje jej aktywność naukowa poparta współautorstwem artykułów w czasopismach krajowych i międzynarodowych.

Stwierdzam, iż praca doktorska odpowiada wymaganiom stawianym przez obowiązujące przepisy. Dlatego wnoszę o dopuszczenie pani magister Anny Jarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Kierownik
Katedry Chemii Leków

prof. dr hab. Michał Marszałł



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Prof. dr hab. Michał Piotr Marszałł
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII LEKÓW
ul. Dr Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz,
tel. +48 52 585 35 32, fax. +48 52 585 35 29
e- mail: mmars@cm.umk.pl

Bydgoszcz, dn. 1.08.2022 r.

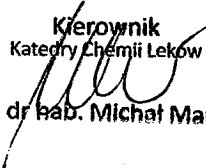
Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

pani mgr Anny Jarek

Wysoka ocena badań zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej została potwierdzona 8 publikacjami części wyników w międzynarodowych czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 23,459$, gdzie również należy podkreślić, iż w dwóch z nich doktorantka jest główną autorką. Współpraca z interdyscyplinarnym zespołem potwierdza umiejętność kierowania warsztatem badawczym oraz duże zaangażowanie doktorantki w jakość i rzetelność prowadzonych badań. Dlatego wszystkie projekty i etapy realizowane w ramach przedstawionej pracy oceniam bardzo wysoko.

Mając na uwadze wskazanie najważniejszego osiągnięcia, uważam pracę dotyczącą identyfikacji N,N-dimetylo-2-fenylopropano-1-aminy jako potencjalnej substancji dopingującej za wyróżniającą. Przyczyniła się ona do wprowadzenia zapisu na Listę zabronioną WADA w 2015 roku dla wszystkich pochodnych fenyletyloaminy. Waga tego osiągnięcia została poparta współautorstwem doktorantki w 3 publikacjach w czasopismach: *Drug Testing and Analysis*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* oraz *Analytical and Bioanalytical Analysis*.

Stąd wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani magister Anny Jarek.

Kierownik
Katedry Chemii Leków

prof. dr hab. Michał Marszałł