

Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES

Kraków, dnia 2 września 2022 roku

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

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Anny Jarek
pt. GC/MS i GC/C/IRMS w badaniach antydopingowych. Studium przypadków

Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Jarek dotyczy zastosowania metody chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas różnego typu do badania obecności w materiale biologicznym pobranym od sportowców substancji dopingujących i ich metabolitów, a także innych związków mogących wspomagać w sposób niedozwolony wydolność organizmu.

Autorka pracy jest zatrudniona w Polskim Laboratorium Antydopingowym i z tego względu problematyka badań mających na celu weryfikację czy zawodnicy postępują zgodnie z zasadami *fair play*, w szczególności nie wspomagają się środkami zabronionymi do stosowania w sporcie, jest dominująca w rozprawie. W pracy zostały przedstawione wyniki czterech projektów, które dotyczyły odrębnych problemów badawczych, co obrazuje złożoność tego zjawiska.

Niedozwolony doping w sporcie jest stosowany od dawna. Wydaje się jednak, że w ostatnich latach problem ten staje się coraz większy i bardziej złożony. Jest to związane z postępami farmakologii, ale też m.in. z rozwojem internetu, który przyczynił się do powstania globalnego rynku narkotykowego, co powoduje względnie łatwy dostęp do substancji zabronionych czy informacji nt. niedozwolonych praktyk. Sportowcy dla osiągnięcia lepszych rezultatów sięgają po nowe substancje, które w ich odczuciu albo opinii innych (np. zamieszczonych na forach internetowych) mają wspomagać wydolność i poprawiać wyniki. Jednak należy zwrócić uwagę na rozwój coraz skuteczniejszych narzędzi stosowanych przez badaczy – analityków, dzięki czemu możliwe jest wykrycie różnych nowych form dopingu. Przykładem jest choćby chromatograf gazowy sprzężony z komorą spalania i detektorem stosunku mas izotopowych, stosowany w badaniach

przez Autorkę rozprawy, dzięki któremu możliwe jest formułowanie kategorycznych wniosków dotyczących stosowania steroidów anaboliczno-androgennych.

W obszarze badań podjętych przez Autorkę rozprawy kluczową rolę odgrywa Światowa Agencja Antydopingowa (WADA), która nie tylko corocznie publikuje „Listę substancji i metod zabronionych w sporcie” (z podziałem na te, które są zabronione wyłącznie w trakcie zawodów, oraz te, które są zabronione również poza nimi, jak też substancje i metody zakazane w wybranych dyscyplinach sportowych), określa wyłączenia dotyczące stosowania substancji dla celów terapeutycznych, a także definiuje tzw. standard dla laboratoriów. Agencja ta systematycznie publikuje również istotne z punktu widzenia pracy laboratoriów antydopingowych tzw. dokumenty techniczne, listy techniczne, przewodniki laboratoryjne i noty techniczne, w których określone są szczegółowe wymagania dla różnych substancji i ich grup, metod badawczych czy też wytyczne dotyczące interpretacji uzyskanych wyników. Dokumenty te są wynikiem wyteżonej pracy specjalistów – analityków pracujących głównie w laboratoriach antydopingowych na całym świecie, w tym w Polskim Laboratorium Antydopingowym. Wyniki badań przedstawione w rozprawie pokazują, że to laboratorium odgrywa bardzo ważną rolę w zwalczaniu dopingu w sporcie, a osiągnięcia Autorki pracy znalazły uznanie w oczach specjalistów WADA, co przełożyło się m. in. na włączenie wykrytego przez nią nowego związku do „Listy substancji i metod zabronionych w sporcie”.

Nie mam wątpliwości, że badania przedstawione w niniejszej pracy mają ogromne znaczenie dla zwalczania dopingu w sporcie nie tylko w Polsce, ale praktycznie na całym świecie. Autorka pracy wdrożyła opracowane metody do praktyki w Polskim Laboratorium Antydopingowym, potwierdziła ich poprawność uczestnicząc w badaniach biegłości organizowanych przez WADA, a także przedstawiając wyniki na konferencjach i warsztatach, w których brali udział inni naukowcy z laboratoriów antydopingowych. Przedstawiona do recenzji praca ma więc ogromny walor aplikacyjny. Pokazuje, że w laboratoriach badawczych takich jak PLAD naukowcy aktywnie starają się dbać o czystość rywalizacji w sporcie i tak szybko jak to możliwe wykrywać próby nieetycznych działań ze strony części uczestników zawodów sportowych. Konieczne są do tego pasja, odpowiednia wiedza i doświadczenie, których – co można stwierdzić na podstawie treści rozprawy – nie brakuje Pani mgr Annie Jarek. Istotne znaczenie ma również odpowiedniej klasy sprzęt badawczy oraz współpraca z innymi naukowcami, co również jest zauważalne podczas analizy recenzowanej rozprawy.

Układ pracy i poruszane zagadnienia

Przedłożona do recenzji rozprawa jest dość obszerna – część zasadnicza liczy 223 strony i została ona uzupełniona pięcioma aneksami, liczącymi łącznie 28 kart.

Część teoretyczna, poprzedzona spisem treści i wykazem skrótów, liczy 33 strony i składa się ze wstępu oraz czterech rozdziałów. W pierwszym rozdziale Autorka rozprawy przedstawiła historię doping w sporcie, prawne aspekty jego zwalczania, historię i charakterystykę badań antydopingowych w Polsce, a także opisała genezę oraz specyfikę „Listy substancji i metod zabronionych w sporcie” publikowanej przez WADA. W kolejnym rozdziale opisane zostały różne formy doping: wydolnościowy, farmakologiczny, fizjologiczny oraz genowy. W trzecim rozdziale zawarte są informacje na temat technik stosowanych do wykrywania substancji zabronionych w sporcie, w tym testów biologicznych, które prowadzono na zwierzętach, historii badań próbek pochodzących od ludzi za pomocą testów chemicznych, testów biochemicznych, technik chromatografii cienkowsarstwowej i bibułowej, chromatografii gazowej i cieczowej, a także spektrometrii mas. Tej ostatniej technice Autorka rozprawy poświęciła najwięcej uwagi, podając nie tylko informacje na temat jej rozwoju, ale przede wszystkim zasad działania różnych spektrometrów mas, różnych układów wprowadzania próbki do urządzenia, stosowanych źródeł jonów, analizatorów jonów, detektorów i rejestratorów. Oddzielny podrozdział poświęcony został spektrometrii stosunków mas izotopowych (IRMS).

Część teoretyczną kończy rozdział o walidacji metod analitycznych, w którym opisane zostały sposoby wyznaczenia parametrów walidacyjnych podczas badań prowadzonych w czasie realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Warto zaznaczyć, że wymagania w stosunku do metod stosowanych w badaniach antydopingowych są wysokie i mimo tego ulegają częstemu podwyższeniu, co sprawia, że opracowane metody muszą być rozwijane lub też zastępowane innymi, np. o niższej granicy wykrywalności czy lepszej precyzji. Takie działania podejmowała również Autorka pracy w stosunku do opracowanych przez nią metod.

W dalszej kolejności określone zostały założenia i cel pracy, a następnie opisano metody i materiały zastosowane podczas wykonywania części eksperymentalnej, w szczególności sposoby przygotowania próbek do analiz instrumentalnych oraz stosowaną aparaturę badawczą.

Część eksperymentalna została zaprezentowana dość nietypowo, z podziałem na cztery problemy badawcze, dotyczące odpowiednio trimetazydyny (TMZ), N,N-dimetylo-

fenylopropano-1-aminy, nikotyny oraz profilu steroidowego. Dla każdego z problemów badawczych określony został cel badania, opisane zostały podstawy teoretyczne oraz stan przed rozpoczęciem badań przez Autorkę, przedstawiony został sposób przeprowadzenia analiz, otrzymane wyniki badań oraz procesu walidacji, po czym zostały one omówione i porównane z danymi literaturowymi, a na tej podstawie zaproponowane zostały wnioski z poszczególnych części badań. Na koniec rozprawy przedstawione zostało podsumowanie całości badań oraz wyciągnięto wnioski ogólne. Pracę kończy spis rysunków i tabel, spis publikacji i bibliografia, która liczy aż 321 pozycji.

Aneks do pracy zawiera szczegółowe wyniki badań dotyczących procesu eliminacji TMZ z organizmu człowieka, dane walidacyjne oznaczania nikotyny i kotyniny w moczu, dane statystyczne dla analiz ilościowych tych związków z lat 2013 – 2018, w tym z podziałem w zależności od dyscypliny sportu, oraz zestawienie wyników dla próbek o najwyższych wartościach stężenia nikotyny i kotyniny.

Układ pracy jest zatem prawidłowy, a poruszane zagadnienia są ściśle związane z założeniami i celami pracy. Rozprawa napisana jest w sposób staranny, w nietypowym – narracyjnym stylu, dzięki czemu czyta się ją z dużym zainteresowaniem. Sposób przedstawienia tematyki i przeprowadzenia badań pozwala na ocenę prawidłowości podejmowanych decyzji i interpretacji wyników. Uwagę zwraca dogłębna analiza danych literaturowych, co wskazuje na doskonałą orientację Autorki pracy w tematyce badań.

Jak wspomniano wyżej, w rozprawie przedstawione zostały wyniki czterech projektów badawczych.

Pierwszy temat podjęty przez Autorkę rozprawy dotyczył potencjalnego stosowania przez sportowców TMZ jako substancji dopingującej. Przeprowadziła ona szczegółowe badania eliminacji trimetazydyny z organizmu człowieka, poszukując nowych markerów stosowania tego związku, a także dokonała retrospektywnego przeglądu wyników badań antydopingowych w Polsce od 2008 do 2014 roku w poszukiwaniu tego związku w materiale pobranym od sportowców. Zastosowana metoda analityczna została w pełni zwalidowana, a szeroki zakres stężeń wybrany do badań, wynoszący od 50 ng/ml do 60 000 ng/ml, potwierdził jej przydatność dla celów diagnostycznych. Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie przedziału czasu, w którym TMZ może być zidentyfikowany w próbce moczu po przyjęciu pojedynczej dawki leku – wg Autorki wynosi on ponad 5 dni. Wykazała Ona również, że wiedza na

temat eliminacji tego związku, przy oszacowanym stężeniu, pozwala na określenie czy TMZ został zastosowany jako środek dopingujący czy też była to pozostałość po leczeniu, co ma istotne znaczenie przy interpretacji wyników dla paneli dyscyplinarnych decydujących o karze, jaka zostanie nałożona na sportowca.

Drugi problem badawczy dotyczył identyfikacji nowych substancji pojawiających się w próbkach moczu pobranych od sportowców. Autorka pracy wykazała na przykładzie identyfikacji N,N-dimetylo-fenylopropa-1-aminy, że wykorzystanie układu GC/MS, a w szczególności trybu całkowitego zbierania danych, jest bardzo pomocne w tym zakresie. Potwierdzenie struktury nowo wykrytej substancji możliwe było dzięki zsyntezowaniu we współpracy z laboratorium chemicznym z Nowej Zelandii substancji odpowiadającej założonej strukturze chemicznej. Pozwoliło to również na przeprowadzenie procesu walidacji. N,N-dimetylo-fenylopropa-1-amina, dzięki badaniom Autorki pracy, została uznana za analog fenprometaminy i dopisana w 2013 roku przez WADA do „Listy substancji i metod zabronionych w sporcie”. Od tego czasu związek ten został wykryty przez Autorkę w 5 próbkach moczu pobranych od sportowców w trakcie kontroli antydopingowych oraz w odżywcze NOXPUMP.

Trzeci problem badawczy podjęty przez Autorkę rozprawy to analiza obecności nikotyny i jej metabolitów w próbkach moczu pobranych od sportowców w ramach badań antydopingowych i ocena czy ta substancja powinna być uznana za środek dopingujący. W ramach badań opracowano i zwalidowano metodę GC/MS oznaczania nikotyny i kotyniny w próbkach moczu, a także przeprowadzono analizę retrospektywną ponad 10 000 wyników próbek moczu pobranych w ramach badań antydopingowych. Autorka pracy wykazała, że procent sportowców przyjmujących nikotynę przewyższa średnią dla populacji polskiej, co wydaje się zaskakujące mając na uwadze negatywny jej wpływ na organizm człowieka. Z tego względu zaproponowała ona koncepcję stosowania nikotyny jako substancji dopingującej, co mogłoby być wykazane poprzez wykrycie wysokiego poziomu tego związku, przy jednoczesnym braku jego metabolitów. Opracowana metoda badawcza jest szybka i prosta, nie wymaga złożonego przygotowania próbek do badań i charakteryzuje się szerokim zakresem liniowości, dzięki czemu może być wykorzystana w innych obszarach nauki.

Czwarty problem badawczy podjęty przez Autorkę pracy to rozróżnienie źródła pochodzenia wybranych steroidów anaboliczno-androgennych, tj. ustalenie czy są one

pochodzenia egzogenne czy endogenne. W celu przeprowadzenia analizy ilościowej tych związków opracowana została metoda GC/C/IRMS. Przeprowadzona walidacja wykazała, że metoda ta cechuje się właściwymi – wymaganymi przez WADA – wartościami granicy wykrywalności, niepewności metody czy parametrów sprawności układu analitycznego, a czas przypadający na pojedynczą analizę został maksymalnie skrócony przy zachowaniu selektywności, precyzji i dokładności metody. Autorka pracy przeprowadziła również badania populacyjne osób mieszkających na terenie Polski, co jest kluczowe przy interpretacji wyników badań tzw. profilu steroidowego pod kątem rozróżnienia źródła pochodzenia steroidów anaboliczno-androgennych.

Ocena metod badawczych, sposobu przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników

Recenzowana praca miała charakter eksperymentalny. Badania zostały zaplanowane we właściwy sposób, a dobór analitów, rodzaju eksperymentów oraz aparatury badawczej, jak również sposób przeprowadzenia badań oraz interpretacja uzyskanych wyników były odpowiednie.

W badaniach Doktorantka stosowała technikę chromatografii gazowej, wykorzystując odpowiednie detektory, dobrane w zależności od celów badawczych. Początkowo w części badań, w szczególności do identyfikacji TMZ i jej metabolitów, stosowany był detektor azotowo-fosforowy (NPD), który z uwagi na obecność azotu w strukturach chemicznych substancji kontrolowanych z grupy S6 i S7 był dobrym źródłem diagnostycznym, ze względu na zmniejszenie wpływu tła pochodzącego z matrycy próbek. Detektor ten pozwalał jednak na identyfikację substancji jedynie na podstawie porównania czasów retencji, dlatego w dalszej części badań został on zastąpiony spektrometrem mas. Autorka pracy opracowała program wizualizacji uzyskanych wyników pomiarowych, który pozwolił na skrócenie czasu niezbędnego do interpretacji wyników. Jednocześnie możliwa była obserwacja całkowitego chromatogramu jonowego, co umożliwiało wykrycie ewentualnych nowych substancji. W drugim i trzecim projekcie Autorka stosowała wyłącznie metodę chromatografii gazowej z kwadrupolowym analizatorem mas, co pozwoliło na jednoznaczną identyfikację analitów i ich oznaczenie. W przypadku czwartego projektu badawczego w procesie przygotowania próbek do analizy, na etapie ich oczyszczenia, wykorzystany został wysokosprawny chromatograf ciekłowy z detektorem w zakresie

ultrafioletu i światła widzialnego (HPLC/UV/Vis), a do analiz jakościowych i ilościowych steroidów anaboliczno-androgennych użyty był chromatograf gazowy sprzężony z komorą spalania i spektrometrem mas stosunków izotopowych (GC/C/IRMS).

Autorka pracy w analizach chromatograficznych wykorzystywała różne kolumny i optymalizowała proces rozdzielania. Dużo uwagi poświęciła też doborowi warunków pracy spektrometrów mas, w szczególności testowała różne warunki pomiarowe. Opracowane metody poddawała bardzo szczegółowym, właściwie zaplanowanym i wykonanym, procesom walidacyjnym.

Analiza danych przedstawionych w rozprawie wskazuje jednoznacznie, że doboru metod badawczych dokonywano właściwie do zamierzonego celu. Doktorantka opracowała wiele metod analitycznych i poddała je procesowi walidacji, dostosowując się w tym zakresie do międzynarodowych standardów dotyczących jakości badań, w szczególności wymogów wskazanych przez WADA. Metody te zostały zweryfikowane, m.in. udziałem w badaniach biegłości, a następnie wdrożone do praktyki.

Duża część badań poświęcona została retrospektywnej analizie wyników badań próbek moczu pobranych w ramach badań antydopingowych i ich interpretacji w świetle danych literaturowych. Autorka pracy postawiła kilka hipotez, np. dotyczącą stosowania nikotyny jako środka dopingującego przez sportowców, które właściwie zweryfikowała i na tej podstawie zaproponowała odpowiednie sposoby interpretacji wyników. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej Autorki pracy.

Wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Jarek oceniam jako bardzo wysoką. Niezależnie od tej oceny, poniżej przedstawiłem kilka uwag do treści pracy, do których Autorka pracy może odnieść się podczas publicznej obrony:

1. Na stronie 38 Autorka pracy – odwołując się do danych literaturowych – podała, że „sama wartość liczbowa LOD zależy nie tylko od poziomu zawartości oznaczanego związku, ale także od obecności innych składników wchodzących w skład analizowanej próbki”. Czy zatem w przeprowadzonych badaniach Autorka przy wyznaczaniu granic wykrywalności uwzględniała inne składniki próbek, a jeśli tak, to w jaki sposób?
2. W przypadku niektórych związków, np. 3'-hydroksykotyniny, nie udało się uzyskać zadowalających wartości odzysku i nie podjęto działań mających na celu

przewyciężenie tego problemu. Z czego wyniknął zatem wybór eteru tert-butylo-
metylowego do badań i czy Autorka pracy rozważała zmianę ekstrahenta?

3. Na stronie 67 podano, że „Poniżej przedstawiono (...) widmo mas z wybranymi jonami do analizy: m/z 181, 166, 85, 288 (...)”. Analizując Rys. 17 a także treść rozprawy na stronie 75, wydaje się, że doszło do omyłki i ostatni z wymienionych jonów powinien mieć wartość $m/z = 266$.
4. Dla części badanych związków, jak podała Autorka pracy – „ze względu na szeroki zakres stężeń”, liniowość układu sprawdzano w dwóch zakresach: niższych stężeń i wysokich stężeń. Czy takie podejście wynikało z założenia *a priori*, że liniowość nie będzie zachowana w całym zakresie roboczym metody, a jeśli tak, to w jaki sposób dobierano zakresy stężeń niskich i wysokich? W jaki sposób wyznaczano stężenie w przypadku, gdy sygnał analityczny był zbliżony do „wartości granicznej” (górnej wartości dla stężeń niskich i dolnej granicy dla stężeń wysokich)?
5. Na Rys. 19, 24, 25, 27, 29 i 32, a także w aneksie nr 1 przedstawiono proces eliminacji TMZ u poszczególnych ochotników. Jaki sens miała analiza zmian stężenia tego związku z czasem, mając na uwadze wielość czynników wpływających na poziom analitów w moczu?
6. Na rysunku 59 przedstawiony został procentowy rozkład ilości próbek w zależności od stężenia kotyniny, przy czym jako granice przedziałów przyjęto: 50, 1 000, 5 000, 6 000, 7 000, 8 000, 9 000 i 10 000 ng/ml. Z czego wynikał taki wybór zakresów stężeń jako poszczególnych kategorii?
7. Na Rys. 37 pokazane są widma masowe zidentyfikowanego przez Autorkę pracy związku. Na tymże rysunku pokazany jest też wzór związku z proponowaną fragmentacją, przy czym zaznaczono jedynie w jaki sposób powstają jony o wartości $m/z = 58$ oraz 103. Wydaje się, skoro jest to jedno z osiągnięć Autorki, że właściwe byłoby podanie wzorów również innych jonów widocznych na widmie.

W pracy znalazło się też kilka błędów językowych i słownych (np. „Wykrycie takiej substancji nie jest jednak pogwałceniem w świetle prawa międzynarodowego (...)” na stronie 21). Część rysunków pochodzących ze źródeł literaturowych (np. Rys. 10, 13, 15) podano w oryginalnym, angielskim języku, choć wydaje się, że bardziej właściwe na potrzeby rozprawy byłoby ich przetłumaczenia na język polski.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości pracy, którą jak podałem powyżej oceniam bardzo dobrze.

Podsumowanie

Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pani mgr Anna Jarek posiada dużą wiedzę na temat substancji dopingujących oraz ich metabolitów, dobry warsztat analityczny, w szczególności w zakresie opracowania i rozwijania metod analitycznych, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić badania z wykorzystaniem nowoczesnej, zaawansowanej aparatury oraz zinterpretować uzyskane wyniki. Doskonale zna wymagania w zakresie badań antydopingowych. W sposób właściwy odniosła wyniki badań własnych do danych literaturowych oraz wymogów stawianych przez WADA, z należytą krytyką podchodząc do własnych ustaleń. Uwagę zwraca umiejętność doboru odpowiedniej aparatury badawczej czy optymalizacji warunków prowadzenia procesów.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Jarek zawiera wiele elementów nowości. Właściwie każdy z podjętych tematów badawczych był innowacyjny i doprowadził do uzyskania nowych, użytecznych danych. Przeprowadzone badania eliminacji TMZ z organizmu człowieka pozwoliły na lepsze zrozumienie możliwości stosowania tego leku jako substancji dopingującej. Badania retrospektywne wskazały na zjawisko nadużywania TMZ, który wówczas był substancją dozwoloną – lekiem kardiologicznym – przez sportowców, w szczególności w takich dyscyplinach jak kolarstwo, triathlon i koszykówka. Doprowadziło to do umieszczenia TMZ przez WADA na „Liście substancji i metod zabronionych”. Analogiczny skutek przyniósł drugi projekt badawczy – zidentyfikowana przez Autorkę pracy w próbkach moczu nowa substancja, tj. N,N-dimetylo-fenylopropano-1-amina, została dodana do ww. Listy. Nie można wykluczyć podobnych działań ze strony WADA w zakresie interpretacji wyników oznaczeń nikotyny i jej metabolitów w moczu sportowców – schemat interpretacji wyników zaproponowany przez Autorkę pracy jest prosty i jednoznacznie wskazuje na możliwość przyjęcia tego związku w celu poprawy wydolności organizmu. Z kolei dane populacyjne charakteryzujące wybrane steroidy anaboliczno-androgenne u osób mieszkających na terenie Polski, uzyskane przez Autorkę pracy, są kluczowe przy interpretacji wyników w zakresie źródła określenia pochodzenia tych substancji. Uzyskanie powyższych wyników poprzedzone było opracowaniem nowoczesnych metod analitycznych i ich walidacją. Ważną

ich cechą jest uniwersalność oraz niski stopień złożoności procedur przygotowania próbek do badań (poza procedurą z czwartego projektu badawczego, ale w nim również skrócenie czasu procesu analitycznego było jednym z celów opracowania metody), co przekłada się na sprawność i wydajność pracy laboratorium, w którym pracuje Autorka pracy, a metody te mogą być niemal wprost przeniesione do innych laboratoriów, nie tylko antydopingowych, ale również np. toksykologicznych czy środowiskowych.

WNIOSEK

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) i stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Jarek do publicznej obrony.

**Dr hab. Dariusz Zuba
Profesor Instytutu**

*Dokument podpisany kwalifikowanym
Podpisem elektronicznym*