

Bydgoszcz, dn. 02.10.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Wojtkowiak

„Oznaczanie małych peptydów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w aspekcie badań antydopingowych”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Bulskiej

oraz dr hab. inż. Doroty Kwiatkowskiej

Problem dopingu w sporcie stanowi poważny problem mający wpływ na zniekształcenie rywalizacji sportowej a tym samym negatywnie wpływa na wizerunek sportu w społeczeństwie. Wpływ na to zjawisko bez wątpienia ma szybki rozwój i dostępność wiedzy w zakresie farmakologii, farmakodynamiki oraz farmakokinetyki. Podobnie jak to ma miejsce w przypadku wykazu substancji psychotropowych i środków odurzających i psychoaktywnych, zwiększająca się liczba nowych substancji o potencjalnym działaniu dopingującym oraz ich strukturalna różnorodność, stawia wysoką poprzeczkę akredytowanym laboratoriom. Powyższa sytuacja obliuguje je do stałej aktualizacji i rozwijania metod analitycznych umożliwiających jednoznaczne potwierdzenie procedury stosowania dopingu przez sportowców.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Wojtkowiak wykonana została 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. W pracy doktorantka podjęła się modyfikacji i udoskonalania metod analitycznych stosowanych w analizie antydopingowej. Dotyczyły one kompleksowego podejścia do analizy peptydów o masie cząsteczkowej poniżej dwóch kilodaltonów, które stanowią grupę substancji zabronionych w sporcie.

Praca obejmuje 215 stron wraz z załącznikami. Na początku autorka przedstawiła swój dorobek naukowy oraz przydatny podczas czytania lektury wykaz skrótów i akronimów. We wstępie opisała problematykę dopingu w sporcie na przestrzeni lat wraz ewolucją uwarunkowań i regulacji prawnych w tym zakresie. Następnie w sposób skondensowany i czytelny przedstawiła teorię

dotyczącą peptydów o potencjalnym zastosowaniu leczniczym i pozamedycznym wraz z ich problematyką dotyczącą metabolizmu i stabilności oraz ich analizy. W tym miejscu przedstawiła w formie załącznika nr 1 pełną listę 50 substancji (peptydów) stanowiących przedmiot rozprawy, zawierającą m. in. peptydy uwalniające i pobudzające hormon wzrostu, fragmenty hormonu wzrostu i czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego, hormony uwalniające gonadotropinę oraz inne. Z uwagi na niską stabilność badanych związków, doktorantka bazując na literaturze oraz dostępnych procedurach a przede wszystkim na własnym doświadczeniu opisała problematykę związaną z przygotowaniem próbek jak również doбором odpowiednich metod analitycznych ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

Głównym celem rozprawy doktorskiej było opracowanie i walidacja metod oznaczania peptydów o masie poniżej dwóch kilodaltonów za pomocą właśnie chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. W uwagi na fakt, iż oznaczanie ww. związków w próbkach moczu ludzkiego wymaga specjalnego i kompleksowego podejścia do problemu, doktorantka przed właściwą analizą chromatograficzną przeprowadziła liczne badania obejmujące: określenie optymalnych warunków przechowywania roztworów wzorcowych i próbek moczu, analizę różnych warunków odparowania próbek oraz porównanie klasycznych metod przygotowania próbek. W ramach badania zdecydowano się na sprawdzenie wpływu ośmiu wybranych modyfikacji w różnych temperaturach (RT, 4°C i -20°C) na stabilność wodnych roztworów wzorcowych wybranych 10 peptydów. W związku z tym rodzi się pytanie:

- czym kierowała się doktorantka wybierając zestaw 10 peptydów w stosunku do deklarowanej większej liczby związków przedstawionych w załączniku nr 1?

Badania zostały powtórzone celem określenia najlepszych warunków dla przechowywania próbek moczu celem zachowania jak największej stabilności zawartych w nich peptydów. Uzyskane wyniki pokazują brak znacznego wpływu użytego materiału pojemnika do przechowywania próbek wskazując na temperaturę jako główny czynnik determinujący ich stabilność. Należy wspomnieć, że na stabilność ma przede wszystkim wpływ charakter oznaczanej substancji, dlatego doktorantka słusznie podsumowała badania wnioskiem o konieczności analizy próbek kontrolnych przygotowanych z wykorzystaniem większej liczby moczy w celu ustalenia mechanizmów tego zjawiska. Podobny wniosek został sformułowany odnośnie oceny sposobu i wpływu temperatury na proces odparowania próbki, iż optymalne warunki odparowania zależą od badanego związku. Pytanie dotyczące ww. optymalizacji:

- doktorantka badając wpływ sposobu i temperatury odparowania próbek na stabilność peptydów (str 108), wskazała odparowanie w warunkach $<30^{\circ}\text{C}$ pod zmniejszonym ciśnieniem jako najbardziej uniwersalne. Dlaczego w toku opracowania metody przygotowania próbek na potrzeby analizy przesiewowej dla peptydów $<2\text{ kDa}$ w procesie ekstrakcji ciecz-ciecz (str 112) zastosowano proces odparowywania z użyciem azotu w temp 55°C ?

W dalszej części pracy, doktorantka zgodnie z założonym celem dokonała porównania klasycznych metod przygotowania próbek wykorzystanych w metodzie LC-MS/MS. Ten etap ma duże znaczenie z punktu widzenia metod przesiewowych z uwagi na konieczność dostosowania obecnych procedur analitycznych do wykrywania znanych lub nowych substancji, z uwzględnieniem szlaków metabolicznych. Uzyskane wyniki w ramach wyboru metod przygotowania próbek, dla ekstrakcji do fazy stałej (SPE) wskazują ją na wystraszająco uniwersalną pod kątem analizy przesiewowej (str 118). Intensywność sygnałów analitycznych uzależniona jest m. in. od rodzaju fazy stałej czy też ilości płukania kolumny ekstrakcyjnej.

- czy planując badania wzięto pod uwagę zastosowanie techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) i czy jest ona dopuszczona do procedur laboratoryjnych zgodnie z wytycznymi WADA?

Spośród pięciu procedur bazujących na ekstrakcji do ciała stałego, doktorantka do dalszej szczegółowej walidacji wytypowała trzy biorąc pod uwagę uniwersalność metody pod kątem analizy substancji macierzystych oraz ich metabolitów. Wyniki przedstawiła w wielu tabelach, w których dla pojedynczych związków umieszczona jest informacja o braku danych stąd pytanie:

- z czego wynika brak danych z analizy stopnia przeniesienia pomiędzy kolejnymi nastrzyknięciami dla metabolitów substancji AOD-9604 oraz TB-500 dla procedury WCX 2 w tabeli 19 (str 142)?

Podsumowując przeprowadzone procedury, doktorantka wytypowała dwie metody WCX 1 oraz WCX 2 wdrażając je w latach 2015-2022 do rutynowych badań antydopingowych dla ponad 5000 próbek zgodnie z wytycznymi WADA. Uzasadniła i wskazała zalety ww. metod pod kątem identyfikacji wybranej grupy związków - niskocząsteczkowych peptydów oraz peptydomimetyków. Na podkreślenie zasługuje fakt skuteczności zastosowanych metod potwierdzonych weryfikacją w międzylaboratoryjnych testach będących elementem systemu oceny jakości WADA. W tym miejscu należałoby zadać pytanie:

- aplikując metody WCX 1 oraz WCX 2 do rutynowych badań antydopingowych (str 150), proszę o sprecyzowanie – czy było konkretne kryterium odrzucenia metody HLB (np. niska wydajność ekstrakcji i silny wpływ matrycy?)

Kolejny cel obejmował wyznaczenie profili wydalania heksareliny oraz jej metabolitów w moczu po jedno- oraz wielokrotnym podaniu doustnym. Warto podkreślić, że badania stanowiły część projektu zrealizowanego w ramach wsparcia finansowego Ministerstwa Sportu i Turystyki. Dobrze zaplanowane badania z wykorzystaniem wysokorozdzielczego spektrometru mas, pozwoliły na identyfikację pięciu potencjalnych markerów doustnego stosowania heksareliny w moczu. Doktorantka po szczegółowej identyfikacji i opisanu widm mas substancji macierzystej oraz metabolitów, zaproponowała metodę pozwalającą na analizę jakościową pod kątem wytypowanych markerów a także do wstępnego oszacowania ich stężeń. Analizując profil wydalania heksareliny w moczu wytypowała heksarelinę 1-6 A oraz 1-3 FA jako potencjalne markery w analizie przesiewowej po kątem jej stosowania w celach dopingowych. Podczas analizy danych nasuwa się pytanie:

- analizując Rys. 32 oraz 33 skąd może wynikać brak lub słaby sygnał dla heksareliny 4-6 A?

Wyznaczenie potencjalnych markerów, w tym szlaku metabolicznego ma istotne znaczenie, które zostało podkreślone podczas ujemnego wyniku testu biomarkerów somatotropiny przy zastosowaniu testów immunologicznych. Wniosek przedstawiony przez doktorantkę wskazuje na przewagę zaproponowanych markerów heksareliny w testach przesiewowych, szczególnie w przypadku jej stosowania w postaci suplementów o jej niskim stężeniu.

Zapoznając się z lekturą dysertacji stwierdzam, iż doktorantka umiejętnie wykorzystała zaoferowany jej potencjał naukowy promotorów oraz infrastrukturę naukową jednostki i Polskiego Laboratorium Antydopingowego. Oprócz doświadczenia zawodowego, doktorantka od 2014 roku wykazywała aktywność naukową poprzez udział lub współudział w konferencjach naukowych. Ponadto jest współautorką monografii oraz artykułów w czasopiśmie międzynarodowych, głównie opisujących problematykę analizy materiału biologicznego pod kątem identyfikacji markerów/profilu wybranej grupy związków zabronionych w sporcie. Warto podkreślić fakt zdobycia i kierowania projektem Preludium Narodowego Centrum Nauki dla młodych naukowców. Cenną umiejętnością doktorantki jest poprawne formułowanie problemów oraz wyciąganie wniosków z uzyskanych wyników często popartych aktualną literaturą naukową. Planując prace eksperymentalne uwzględniała dostępne

wytyczne WADA tak aby można było je zaimplementować w akredytowanym laboratorium antydopingowym.

W mojej ocenie praca doktorska mgr Katarzyny Wojtkowiak spełnia wymagania stawiane przez obowiązujące przepisy i tym samym wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry Chemii Leków

prof. dr hab. Michał Marszałł