

Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES

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

**Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr Krzysztofa Gruczy pt.
*Identyfikacja nowych potencjalnych środków dopingujących w sporcie oraz udoskonalenie
techniki LC-MS/MS w rutynowej analizie antydopingowej i toksykologicznej***

Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej

Rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Gruczy została poświęcona problematyce środków dopingujących w sporcie, w szczególności wykrywaniu i identyfikacji nowych substancji, które przyjęte przez sportowca mogą w sposób sztuczny podnieść jego wydolność fizyczną lub psychiczną.

Wspomaganie się przez zawodników substancjami dopingującymi jest jedną z najbardziej zawstydzających stron sportu wyczynowego. Niestety coraz częściej dotyczy to również sportu amatorskiego. Motywacji takiego postępowania jest zapewne wiele, ale z pewnością żadna z nich nie jest zgodna z ideą sportu, olimpizmu, szlachetnej rywalizacji sportowców z całego świata. Sportowi oszuści nie tylko w sposób nieuczciwy próbują zdobyć sławę, zaszczyty, czy pieniądze, ale pozbawiają oni należnego szacunku osoby przygotowujące się do zawodów wyłącznie poprzez ciężką pracę na treningach. Oczywiście nie zawsze sytuacja jest „czarno-biała”, choćby dlatego że specjalistyczny trening zawodowych sportowców wymaga stosowania określonej diety, wzbogacanej o wspomniane w rozprawie produkty specjalnego przeznaczenia żywnieniowego (odżywki). Sportowcy jak każdy człowiek chorują, specjalistyczny trening często prowadzi do powstania alergii, w konsekwencji czego muszą brać leki. Wszystko to może wpływać na wyniki badań analitycznych. Dlatego przez ekspertami pracującymi w laboratoriach antydopingowych stoi bardzo trudne zadanie: opracowania metod, które w sposób jednoznaczny pozwolą wykryć substancje i metody, które w sposób niedozwolony zostały użyte przez zawodników-oszustów celem poprawienia ich sprawności i uzyskania lepszych wyników.

Zadanie to jest o tyle trudne, że postęp technologiczny i globalizacja sprawiają, że na nielegalnym rynku pojawiają się co chwilę nowe substancje, które potencjalnie mogą być wykorzystywane przez osoby startujące w zawodach. Najważniejszą instytucją, której zadaniem jest koordynacja walki przeciwko używaniu niedozwolonych środków chemicznych w sporcie jest Światowa Agencja Antydopingowa (ang. *The World Anti-Doping Agency*, WADA), utworzona pod auspicjami Międzynarodowego Komitetu Olimpijskiego. Agencja ta pracuje na rzecz badań nad wdrożeniem procedur testów antydopingowych, corocznie publikuje również „Listę substancji i metod zabronionych”, których stosowanie jest zakazane we współzawodnictwie sportowym. Innym kluczowym dokumentem w zwalczaniu doping w sporcie jest Międzynarodowy Standard dla Laboratoriów (ang. *International Standard for Laboratories*). Ważną cechą Listy WADA jest jej otwarty charakter, tzn. nie zawiera ona zamkniętego katalogu substancji podanych enumeratywnie z nazwy. Dla niektórych grup podane są jedynie przykłady substancji zabronionych, a za substancję dopingującą uznaje się każdą inną o „podobnej strukturze chemicznej lub podobnym działaniu biologicznym” do tych uznanych już za dopingujące. Lista ta rozróżnia substancje i metody zabronione w czasie i poza zawodami, substancje i metody zabronione jedynie podczas zawodów oraz substancje zabronione tylko w niektórych sportach. Obejmuje ona również tzw. „substancje niezatwierdzone”, zdefiniowane jako „substancje farmakologiczne, których nie ujęto w żadnej z sekcji listy i dla których żaden organ rządowy regulacyjny do spraw zdrowia nie wydał pozwolenia na dopuszczenie do obrotu jako produktu leczniczego stosowanego u ludzi”. Ich stosowanie jest zabronione w każdym czasie. Powyższe zapisy stanowią ogromne wyzwanie dla analityków z laboratoriów antydopingowych, którzy ciągle muszą udoskonalać opracowane metody analityczne, prowadzić badania naukowe czy analizować trendy w popularności środków niemieszczonych na liście aby wychwycić potencjalne nowe środki dopingujące. Osoby takie powinny być pasjonatami, nie lubiącymi rutyny naukowcami, posiadającymi odpowiednią wiedzę i warsztat analityczny. Analiza rozprawy doktorskiej skłania mnie do wniosku, że osobą obdarzoną takimi cechami jest Pan mgr Krzysztof Grucza, który badania do pracy doktorskiej wykonywał w Polskim Laboratorium Antydopingowym w Warszawie.

Układ rozprawy, struktura podziału treści i charakterystyka prac

Rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Gruzy, zgodnie z jego zamysłem, miała mieć postać spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach

naukowych. Ta dopuszczalna przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki forma rozprawy ma nietypowy układ. Praca zawiera:

- streszczenie w języku polskim i angielskim – łącznie 4 strony,
- wykaz skrótów stosowanych w pracy – 1 strona,
- dorobek naukowy Doktoranta w postaci wykazu publikacji oraz wystąpień ustnych i posterów przedstawionych na konferencjach naukowych – łącznie 4 strony,
- wstęp – 8 stron,
- założenia i cel pracy – 1 strona,
- skany publikacji stanowiących podstawę rozprawy, wraz z oświadczeniami Autorów o zakresie ich udziału w pracach, w tym procentowym udziale w powstaniu publikacji,
- wyniki – 6 stron,
- wnioski – 3 strony,
- piśmiennictwo – 4 strony (45 pozycji).

Sam tekst „zasadniczy” pracy, obejmujący wstęp, założenia i cel pracy, wyniki i wnioski, zajmuje zatem łącznie tylko 18 stron, co sprawia, że Recenzent musiał poddać szczegółowej analizie poszczególne publikacje.

Wstęp zawiera m.in. informacje na temat dopingu w sporcie, genezy tego terminu, regulacji dotyczących zwalczania zjawiska dopingu w sporcie, roli laboratoriów antydopingowych w tym zakresie, znaczenia rozwoju warsztatu laboratoryjnego w kontekście utrzymania akredytacji WADA, wpływu postępu w technikach analitycznych oraz rozwoju firm biotechnologicznych i farmaceutycznych na wymagania stawiane laboratoriom antydopingowym, liczby próbek badanych w takich laboratoriach czy konieczności badania w nich nie tylko próbek materiału biologicznego ale również wykonywania badań innych materiałów, np. środków spożywczych przeznaczonych dla sportowców. Doktorant zwrócił również uwagę na to, że istotą walki z dopingiem jest identyfikacja nowych środków dopingujących i metod zabronionych w sporcie oraz metabolitów tych związków, które znajdują się na liście substancji zabronionych WADA, co było przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie.

Rozprawa doktorska oparta jest na 5 pracach opublikowanych w recenzowanych czasopiśmie oraz 2 streszczeniach pokonferencyjnych, o następujących tytułach:

A1. *Analysis for higenamine in urine by means of ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Interpretation of results*

A2. *The influence of caffeine on ethyl glucuronide levels in rat serum and in rat hair*

A3. *Detection of bemitil and its metabolite in urine by means of LC-MS/MS in view of doping control analysis*

A4. *Effects of supplementation with glutathione and its precursors on athlete performance*

A5. *The use of a valid and straightforward method for the identification of higenamine in dietary supplements in view of anti-doping rule violation cases*

B1. *Excretion study of Higenamine following single oral dose of contaminated dietary supplement*

B2. *Detection of dorzolamide in athlete urine following ophthalmic application.*

Prace A1, A3 i A5 opublikowano w czasopiśmie *Drug Testing and Analysis* (jeden w pokonferencyjnym numerze specjalnym), pracę A2 w *Pharmacological reports*, a pracę A4 w *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research (BJSTR)*.

Wszystkie ww. artykuły i streszczenia są wieloautorskie. Liczba autorów zmienia się od 4 do 8, zwykle wynosi 6. Doktorant jest pierwszym autorem w 3 pracach opublikowanych w czasopismach oraz obu streszczeniach. W 2 pracach umieszczonych w czasopiśmie *Drug Testing and Analysis* jest autorem korespondencyjnym. Udział Doktoranta w powstaniu tych prac zmienia się w zakresie od 10% do 60%, średnio wynosi 40%.

Doktorant określił cele praktyczne i poznawcze pracy. Za najważniejsze cele praktyczne uznał identyfikację nowych związków, które można uznać za dopingujące oraz ich metabolitów, jak też ustalenie sposobu eliminacji tych związków dla celów oceny i interpretacji w kontekście naruszeń przepisów antydopingowych. Kluczowe uznał również udoskonalenie metody LC-MS/MS wykorzystywanej w rutynowej analizie antydopingowej, poprzez opracowanie szybkiej i wydajnej procedury badawczej wykrywania w moczu substancji dopingujących znajdujących się na liście zabronionej WADA, jak też opracowanie szybkiej i taniej metody wykrywania substancji dopingujących w produktach specjalnego przeznaczenia żywieniowego dla sportowców dla celów postępowań dyscyplinarnych. Celami poznawczymi pracy były: przegląd światowego piśmiennictwa dotyczącego suplementacji związkami polepszającymi wydolność organizmu, co może przyczynić się do poprawy osiągnięć sportowych i zaproponowanie na podstawie analizy potencjalnych związków dopingujących, a także zaproponowanie zmian w dokumentach WADA dotyczących sposobu interpretacji wyników z analiz antydopingowych.

Wątpliwości Recenzenta budzi włączenie w monotematyczny cykl publikacji o tytule „Identyfikacja nowych potencjalnych środków dopingujących w sporcie oraz udoskonalenie techniki LC-MS/MS w rutynowej analizie antidopingowej i toksykologicznej” pracy A2, dotyczącej wpływu kofeiny na poziom glukuronidu etylu w surowicy i włosach szczura. Artykuł ten jest małą wartością poznawczą, jednak zarówno kofeiny jak i etanolu nie sposób zaliczyć do nowych potencjalnych środków dopingujących w sporcie, a udział Doktoranta w powstaniu tej pracy został określony na 10%. W pracy znajduje się tylko jeden akapit dotyczący stosowanej przez Doktoranta metody LC-MS/MS, w którym podano wyłącznie szczegóły warunków analitycznych. W pracy nie znalazłem informacji na ile pomiary te były wykorzystywane przez Autorów, jaki był sens ich stosowania, np. czy wyniki dla glukuronidu etylu w surowicy były średnią z obu metod czy też np. służyły do potwierdzenia identyfikacji. Dodam, że w pracy podano, że prowadzono również analizy LC-MS/MS próbek włosów, ale w spisie oświadczeń nikt nie podał, że je wykonywał. Podobne, choć mniejsze wątpliwości Recenzent miał odnośnie włączenia do pracy doktorskiej publikacji dotyczącej wpływu suplementacji glutationem i jego prekursorami na wyniki sportowców. Argumentem „na obronę” włączenia może być jednak fakt, że poszukiwanie nowych potencjalnych środków dopingujących może mieć charakter teoretyczny, a nie wyłącznie „praktyczny”, jaki zaprezentowano w pozostałych pracach znajdujących się w cyklu publikacji.

Sposób przeprowadzenia badań, metody badawcze, analiza uzyskanych wyników

Większość badań przedstawionych w recenzowanej rozprawie miało charakter eksperymentalny. W mojej ocenie, zostały one zaplanowane we właściwy sposób, a dobór narzędzi badawczych, rodzaju eksperymentów oraz aparatury pomiarowej, jak również sposób przeprowadzenia badań były odpowiednie. Analiza uzyskanych wyników również była prawidłowa, choć nie zawsze ograniczona objętość publikacji pozwalała do szczegółową ocenę w tym zakresie.

Zgodnie z informacjami przedstawionymi w rozprawie, Doktorant był autorem nowej procedury badawczej stosowanej w analizie środków dopingujących. Kluczowym jej elementem było opracowanie nowej procedury przygotowania próbek do analizy instrumentalnej, określanej jako metoda „Dilute and Shoot” (DaS), wymagającej małej objętości moczu i charakteryzującej się dodaniem do próbki jedynie odpowiednich standardów wewnętrznych, rozcieńczeniem określoną objętością wody oraz jej wirowaniem. Metoda ta

została wdrożona do rutynowych analiz antydopingowych w laboratorium zatrudniającym Doktoranta do wykrywania substancji dopingujących i ich metabolitów, zaliczanych do takich grup jak: stymulanty, narkotyki, diuretyki i środki maskujące, β 2 agoniści oraz hormony i modulatory metabolizmu. Metoda ta jest udoskonalana oraz rozszerzana o kolejne grupy substancji z listy zabronionej WADA.

Przy zastosowaniu opracowanej metody Doktorant wykrył, a następnie zidentyfikował siarczan higenaminy, metabolit substancji dopingującej – higenaminy (praca A1). Opisaną metodologię wykrywania higenaminy w moczu oraz monitorowanie jej metabolitu wdrożono do rutynowych analiz antydopingowych. Ponadto badał profil eliminacji higenaminy z organizmu człowieka po spożyciu pojedynczej dawki produktu specjalnego przeznaczenia żywieniowego, który był dowodem w procedurze wyjaśniającej naruszenie przepisów antydopingowych przez zawodnika przed Panelem Dyscyplinarnym (praca B1). Z kolei w pracy A5 przedstawił metodologię wykrywania higenaminy w produktach specjalnego przeznaczenia żywieniowego dla sportowców, co również zostało wdrożone do zakresu prac laboratorium antydopingowego i jest wykorzystywane w postępowaniach toczących się przed Panelami Dyscyplinarnymi.

Podobne wyniki udało się uzyskać Doktorantowi w badaniach nad bemitilem, który jest substancją znajdującą się od 1 stycznia 2018 roku w Programie Monitorującym WADA. Doktorant opracował metodę wykrywania i oznaczania bemitilu w moczu oraz wykrył jego metabolit drugiej fazy – glukuronid bemitilu. Doktorant badał również profil eliminacji bemitilu po spożyciu suplementu diety o nazwie „Antihot” (praca A3). Dodatkowo, Doktorant opracował metodę oznaczania dorzolamidu (praca B2).

W badaniach nad higenaminą, bemitilem i dorzolanidem, Doktorant stosował dwa różne podejścia analityczne, obejmujące oprócz użycia metody DaS również procedurę opartą na hydrolizie enzymatycznej z wykorzystaniem β -glukuronidazy *E.coli* i ekstrakcji ciecz-ciecz.

Analizy przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas. Do badań wykorzystano system UPLC-MS/MS Xevo TQ-S firmy Waters, będący na wyposażeniu Polskiego Laboratorium Antydopingowego w Warszawie. Technika ta jest obecnie „złotym standardem” w badaniu substancji psychoaktywnych czy dopingujących w materiale biologicznych, cechuje się wysoką czułością, niskimi granicami wykrywalności, dużą selektywnością czy powtarzalnością. Jej wybór jako narzędzia badawczego do badań określonych w celu pracy należy uznać za właściwy.

Uwagi szczegółowe

Wartość merytoryczną prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Pana mgr Krzysztofa Gruczy oceniam wysoko. Niezależnie od tej oceny, z uwagi na ograniczoną ilość informacji przedstawionych w rozprawie i poszczególnych pracach, zawierających jedynie najistotniejsze elementy badań, przez co nie jest możliwe ich pełne odtworzenie, a przez to całościowa ocena uzyskanych wyników, poniżej przedstawiłem szczegółowe pytania i uwagi dotyczące publikacji wchodzących w skład przedstawionego do oceny cyklu. Odpowiedź na nie pozwoli Komisji Doktorskiej w pełni ocenić wartość badań przeprowadzonych przez Doktoranta.

1. Doktorant podał, że opracował prostą metodę przygotowania próbek do analizy instrumentalnej, tzw. metodę „Dilute and Shoot” (DaS), która została wdrożona do rutynowych analiz antydopingowych prowadzonych w ówczesnym Zakładzie Badań Antydopingowych Instytutu Sportu – Państwowego Instytutu Badawczego. Na podstawie analizy rozprawy trudno jednak ustalić, jak ona wygląda. W części wynikowej rozprawy (strona 104) podano, że do 0,2 ml moczu dodaje się do odpowiednie standardy wewnętrzne i rozcieńcza 0,8 ml wody. Ale w pracach będących podstawą rozprawy przedstawiono inne proporcje: praca A1 (oraz B2): 200 µl moczu + 200 µl wody, bez użycia standardu wewnętrznego; praca B1, też dotycząca siarczanu higenaminy (oraz A3): 100 µl moczu + 900 µl wody, z dodatkiem standardu. Na jakiej zasadzie Doktorant dobierał zatem stopień rozcieńczenia i czy nie miał on wpływu na wyniki analizy (efekt matrycy jest często bardzo istotny dla techniki LC-MS/MS)? Podobnie zwróciłem uwagę, że próbki trzymane były w autosamplerze w temperaturze 5°C (praca A1) lub 10°C (praca A3). Z czego wynikały różnice? Czy przy opracowaniu metod (również warunków chromatograficznych) stosowano jakiś plan optymalizacji?
2. Na czym dokładnie polegała rola Doktoranta przy opracowaniu metodyki przygotowania próbek oraz warunków rozdziału chromatograficznego i analizy za pomocą spektrometru mas? Czy Doktorant opracował tylko procedurę DaS czy również polegającą na hydrolizie enzymatycznej i ekstrakcji ciec-ciecz?
3. W pracach nie znalazłem informacji, czy procedurę DaS (jak również drugą z procedur) stosowano jedynie dla celów przesiewowych czy też w analizach ilościowych. Ma to znaczenie m.in. dla zakresu walidacji; np. dla analiz ilościowych istotne jest ustalenie

granicy oznaczalności (LOQ) i stosowanie próbek kontrolnych na tym poziomie, a dla jakościowych istotna jest granica wykrywalności (LOD).

4. Przedstawione prace analityczne (A1, A3, B1) nie zawierały wyników walidacji odnośnie metabolitów (a nawet dla analizy jakościowej należy ocenić m.in. granicę wykrywalności czy selektywność). Doktorant podawał wyniki stężeń tych związków (np. glukuronidu bemitilu w pracy A3), jednak z spisie odczynników w pracach nie ma wzorców metabolitów. Jeśli Doktorant nimi nie dysponował, to w jaki sposób wyznaczał ich stężenie? W jaki sposób przeliczał stężenia metabolitów na poziom substancji macierzystej, aby porównać uzyskane stężenia z wartościami progowymi – czy były to wyniki uzyskane przy użyciu procedury DaS czy też procedury obejmującej hydrolizę i ekstrakcję ciecz-ciecz?
5. Doktorant w części badań do wyznaczenia stężenia analitu stosował dwie procedury przygotowania próbki czy warunków pomiarowych. Czy sprawdzano zgodność stężeń uzyskanych dwiema metodami? Czy zakładano jakąś dopuszczalną różnicę dokładności?
6. Czy siarczan higenaminy i glukoronid bemitilu, wykryte przez Doktoranta, to jedyne metabolity odpowiednio higenaminy i bemitilu?
7. Doktorant podkreśla w rozprawie znaczenie identyfikacji metabolitów w postaci siarczanu higenaminy czy glukuronidu bemitilu i tego, że samo monitorowanie substancji macierzystych nie wystarczy. Jednak problem ten można rozwiązać, stosując hydrolizę jako etap przygotowania próbki. Czy zatem nie byłoby bardziej zasadne zastosować taką metodykę, aby zapobiec pominięciu innych metabolitów drugiej fazy biotransformacji?

Szczegółowe uwagi do wybranych prac:

– *praca A1:*

1. Doktorant pisze, że zidentyfikował nowy metabolit – siarczan higenaminy, jednak w pracy nie przedstawił jego proponowanej struktury. Higenamina ma trzy grupy hydroksykolowe – skąd wiadomo, która z nich ulega podstawieniu? Czy możliwe jest podstawienie dwóch lub trzech grup hydroksylowych higenaminy?
2. Czy identyfikacja siarczanu higenaminy została oparta wyłącznie o fakt uzyskania dla piku chromatograficznego dodatkowej substancji masy większej o 80 Da od masy protonowanej cząsteczki higenaminy oraz analizę rozkładu izotopów? Jak wyglądał rozkład izotopowy nieznannej substancji i na ile był on zgodny z wartościami

teoretycznymi (w pracy tych danych nie przedstawiono)? Czy taki sposób identyfikacji nowych związków jest akceptowany w analizach antydopingowych?

3. Czy możliwe jest stosowanie do identyfikacji jedynie dwóch przejść, tak jak to zastosowano dla siarczanu higenaminy w pracy A1? Uwagę zwraca, że w pracy B1 również dotyczącej siarczanu higenaminy, Autorzy stosowali trzy przejścia, tj. uwzględniono dodatkowy jon o $m/z = 161$ Da, obecny również w higenaminie.
4. Do pracy A1 prawdopodobnie wkradł się błąd. Na stronie 4 podano, że laboratorium monitorowało stężenia higenaminy większe lub równe 100 ng/ml, z kolei na stronie 6 podano, że stężenie było poniżej 10 ng/ml, czyli poniżej progu raportowania. Wartość 10 ng/ml pojawia się też na kolejnych stronach pracy A1 oraz 105 stronie rozprawy. Zastanawia mnie również, że granica wykrywalności tej metody wynosiła 10 ng/ml, czyli była równa wartości przyjętej jako próg raportowania. Zwykle przyjmuje się, że granica oznaczalności, będąca około trzykrotnie wyższa niż granica wykrywalności, powinna być nie wyższa niż $2/3$ wartości odcięcia. Takie rozwiązanie znacznie ogranicza możliwość wystąpienia błędów fałszywie dodatnich. Dla przykładu, w przypadku niepewności pomiarowej (współczynnika zmienności) na poziomie 10% – jaką uzyskano dla procedury DaS w pracy A3, wyniki 10,5 ng/ml czy 9,5 ng/ml mieszczą się w granicach niepewności pomiaru, a ich interpretacja przy wartości raportowania 10 ng/ml będzie dla zawodnika zupełnie odmienna. Błąd $\pm 20\%$, jaki w tej pracy uzyskano dla procedury 2, rozszerza jeszcze zakres niepewności wyniku wokół wartości progowej. Jak do tego problemu podchodzą laboratoria antydopingowe?
5. Jednym z podstawowych problemów metody LC-MS/MS jest wpływ matrycy. Doktorant wyznaczał wpływ matrycy i podał wartości średnie dla poszczególnych związków na poszczególnych poziomach stężeń, np. w pracy A1. A jaki był zakres zmienności tych wartości?

– *praca A3:*

1. Jon o $m/z = 113$ amu monitorowany dla glukuronidu bemitilu nie był monitorowany dla związku macierzystego. Czy Doktorant może cokolwiek powiedzieć na temat struktury tego jonu i wyjaśnić dlaczego nie jest on obserwowany dla związku macierzystego?
2. LOD dla bemitulu Doktorant ustalił na 5 ng/ml, a poziom raportowania na 10 ng/ml. Czy między tymi wartościami formalnie powinna być jakaś zależność? Jednocześnie selektywność metody Autorzy ocenili stosując wzorce od stężenia 0,5 ng/ml. Czy jest to rozwiązanie standardowe?

3. Praca nie zawiera informacji o badaniu wpływu matrycy dla procedury DaS – czy w tym przypadku prowadzono takie badania, a jeśli tak to jakie dały wyniki?
4. Czy jest jakaś dopuszczalna wartość niepewności pomiarowej w analizach antydopingowych? Jak wspomniano powyżej, dla procedury 2 w pracy A3 uzyskano współczynniki zmienności na poziomie 17,2 – 18,9%, które mogą mieć znaczenie przy interpretacji wyniku.
5. W przypadku identyfikacji glukuronidu bemitilu wyznaczano dokładną masę metabolitu i tworzących się jonów potomnych (str. 5) korzystając z wysokorozdzielczego analizatora mas typu Orbitrap. Czy podobnie postąpiono z siarczanem higenaminy?
6. Profil eliminacji bemitilu ustalono monitorując tylko ten związek, wykonując badania po przeprowadzeniu hydrolizy enzymatycznej. Czy Doktorant nie uważa, że interesujące byłoby wykonanie badań metodą DaS i śledzić zmiany stężeń zarówno substancji macierzystej jak i metabolitu? Czy standardowa procedura monitorowania stężeń substancji zakłada wyłącznie analizę substancji macierzystej, czy również metabolitów względnie poprzez przeprowadzenie hydrolizy enzymatycznej (która uwalnia substancję związaną w formie glukuronidu i siarczanu)?

– *praca B1:*

1. Dlaczego w badaniu profilu zmian stężenia higenaminy stosowano z kolei procedurę DaS, skoro wiadomo, że jest znacznie mniej czuła niż procedura obejmująca hydrolizę i ekstrakcję? Dlaczego nie określono profilu zmian stężenia siarczanu higenaminy?

– *praca B2:*

1. W pracy porównano stężenia dorzolamidu uzyskane przy użyciu procedury DaS, tj. 4 ng/ml, oraz dla drugiej procedury, tj. 3 ng/ml. Jaka jest niepewność pomiarów w przypadku tego związku? Jeśli jak w pracy A3, na poziomie 10 – 20%, to dlaczego wyników nie podano z większą dokładnością? Jakie były wartości LOD/LOQ dla opracowanej metody dla dorzolamidu?
2. Jak Doktorant skomentuje wydajność ekstrakcji na poziomie 30-40% dla różnych stężeń dorzolamidu i jaki to ma wpływ na wyznaczenie stężenia analitu?
3. Czy Doktorant mógłby wyjaśnić ostatnie zdanie dyskusji, które brzmi „Pomimo, że dorzolamid został zidentyfikowany dwiema metodami i jego stężenie obliczone

z zastosowaniem dwóch standardów wewnętrznych było podobne, wydaje się, że ta analiza nie wymaga przeprowadzenia hydrolizy”.

4. Na jakiej podstawie wyciągnięto wniosek, że ten przypadek pokazuje, iż niskie stężenia dorzolamidu mogą pochodzić z dozwolonego stosowania okulistycznego tego leku, skoro praca nie zawiera żadnych informacji na temat przypadku i że były przeprowadzone eksperymenty z podaniem tej substancji.

Podane powyżej uwagi, a w szczególności ich liczba, nie obniżają oceny wartości merytorycznej pracy doktorskiej, która jak podałem powyżej, jest w mojej ocenie wysoka.

Podsumowanie

Doktorant opracował i wdrożył do rutynowych analiz w Polskim Laboratorium Antydopingowym w Warszawie metodę wykrywania substancji dopingujących należących do różnych grup Listy substancji i metod zabronionych WADA, której poprawność potwierdził w badaniach biegłości i testach międzylaboratoryjnych. Jej największymi zaletami są prostota i wykorzystanie małej objętości materiału do badań, co znacznie skróciło czas przygotowania próbek do analizy instrumentalnej. Dzięki temu możliwe jest szybsze wydawanie wyników z analiz antydopingowych, co jest bardzo ważne w kontekście procedur odwoławczych. Innymi zaletami tej metody jest ograniczenie ekspozycji pracowników laboratorium na szkodliwe substancje oraz zmniejszenie kosztów jednostkowych analiz.

Doktorant zidentyfikował metabolit higenaminy, tj. jej siarczan, i zaproponował modyfikację procedury wykrywania i oznaczania tej substancji dopingującej oraz interpretacji wyników. Ponadto zidentyfikował glukuronid bemitilu – metabolit bemitilu, substancji znajdującej się w Programie Monitorującym WADA. Opracował również metodę oznaczania dorzolamidu.

Ponadto, Doktorant dokonał przeglądu literatury dotyczącej stosowania glutationu i jego prekursorów w kontekście możliwej poprawy osiągnięć sportowych. Praca ta miała na celu poszukiwanie nowych potencjalnych środków dopingujących.

Treść rozprawy doktorskiej i zawartych w niej publikacji potwierdza, że Pan mgr Krzysztof Grucza posiada dużą wiedzę na temat substancji, które mogą być stosowane w celu poprawienia wyników sportowych, bardzo dobry warsztat analityczny, potrafi właściwie

zaplanować i przeprowadzić badania oraz poddać interpretacji uzyskane wyniki. W sposób właściwy odniósł wyniki badań własnych do norm międzynarodowych i danych literaturowych. Zaproponował nowatorskie rozwiązanie sposobu przygotowania próbek moczu do analizy, co znacznie poprawiło wydajność laboratorium i pozwoli na przebadanie kilku tysięcy próbek rocznie. Poprawność zaproponowanej procedury znalazła potwierdzenie w wynikach testów biegłości. Rozprawa doktorska Pana mgra Krzysztofa Gruczy zawiera wiele elementów nowości, zarówno analitycznych jak i dotyczących metabolizmu nowych potencjalnych środków dopingujących. Rozprawa ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez jej Autora.

Uzyskane wyniki wniosły istotny wkład w rozwój światowej polityki antidopingowej. Rozwiązania analityczne zaproponowane przez Doktoranta mogą być użyte przez innych badaczy, w tym zajmujących się poszukiwaniem metabolitów czy interpretacją wyników np. dla potrzeb toksykologii sądowej.

Wniosek

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wymagania ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.) i stawiam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgra Krzysztofa Gruczy do publicznej obrony.



Kraków, dnia 16 sierpnia 2019 roku