



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Borowiak

Zakład Toksykologii Klinicznej i Sądowej

Katedra Medycyny Sądowej,

Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Szczecin, dnia 19. Sierpnia 2019 r.

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Pana mgr Krzysztofa Grucza

pt. „Identyfikacja nowych potencjalnych środków dopingujących w sporcie oraz udoskonalenie techniki LC-MS/MS w rutynowej analizie antydopingowej i toksykologicznej”

Przygotowanej w Katedrze Toksykologii Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Mirosława Szutowskiego oraz dr hab. n. chem. Doroty Kwiatkowskiej z Polskiego Laboratorium Antydopingowego w Warszawie, w którym zrealizowano część eksperymentalną pracy doktorskiej.

Rozprawa została przygotowana w formie spójnego tematycznie zestawienia opartego o cykl artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Maszynopis liczy 116 stron, gdzie obok publikacji stanowiących podstawę naukową rozprawy, zawarto typowe dla tego rodzaju wydawnictw uzupełniające rozdziały z zachowaniem klasycznego podziału na rozdziały i podrozdziały obejmujące część teoretyczną (wstęp), założenia i cele pracy, praktyczną obejmująca materiał i metodykę badań wraz z omówieniem wyników oraz wnioski i spis cytowanych pozycji piśmiennictwa składające się z 45 pozycji. Zwraca uwagę niezwykle staranna strona edytorska maszynopisu. Ogromną zaletą, znakomicie ułatwiającą czytanie tak obszernej dysertacji jest jej dobry literacki język, przy oszczędności środków wyrazu i wysokiej jakości ilustracji tabelarycznej i graficznej.

Problem „farmakologicznego” dopingu w sporcie istnieje praktycznie już od greckich olimpiad starożytnych, ale skala jego stosowania w ostatnich kilkudziesięciu latach jest wyjątkowo duża i dotyczy praktycznie wszystkich dyscyplin sportowych. Dlatego też zarówno władze międzynarodowe (MKOL, WADA) jak i komitety w poszczególnych krajach poświęcają obecnie znaczną uwagę i środki w zwalczaniu i ograniczaniu tego patologicznego zjawiska. Niewątpliwie znaczący postęp technik analitycznych i możliwości techniczne sprzętu pomiarowego przyczyniają się do tak wysokiej wykrywalności prób niedozwolonego stosowania środków farmakologicznych. Jednak z uwagi na stały i dynamiczny wzrost liczby nowych związków o działaniu farmakologicznym pojawiających się na rynkach, istotne jest stałe monitorowanie, a przede wszystkim opracowywanie procedur analitycznych pozwalających na ich wykrywanie i ilościowe oznaczanie w materiale biologicznym. Dlatego też wybór problematyki stanowiącej treść rozprawy doktorskiej uważam za niezwykle istotny zarówno od strony naukowo-poznawczej jak i praktycznej.

We ośmiostronicowym wstępie, doktorant odnosi się zarówno do historycznych korzeni i tradycji dopingu, wyjaśnia genezę terminu „doping” jak również szeroko omawia aktualną sytuację i problemy obserwowane w światowym sporcie oraz obowiązujące podstawy prawne (Światowy Kodeks Antydopingowy) przygotowane przez Światową Agencję Antydopingową (WADA) pozwalające na jednolitą, spójną politykę w zwalczaniu problemu nielegalnego dopingu w sporcie.

Założenia i cele pracy obejmowały trzy etapy realizacji projektu: zarówno identyfikację nowych potencjalnych związków stosowanych w dopingu, oraz nowych metabolitów umieszczonych na liście środków zakazanych. Badanie sposobów eliminacji nowych związków, udoskonalenie techniki LC-MS/MS wykorzystywanej w rutynowej analizie antydopingowej oraz toksykologicznej. Przyspieszenie procedur analitycznych oraz opracowanie procedury wykrywania substancji dopingujących w produktach specjalnego przeznaczenia żywieniowego dla sportowców.

Kolejnymi celami był przegląd aktualnego, światowego piśmiennictwa omawiającego problemy dopingu w sporcie i suplementacji oraz zaproponowanie zmian w dokumentacji WADA dotyczących sposobu interpretacji wyników analiz antydopingowych

Ważnym założeniem i celem pracy było przeprowadzenie części eksperymentalnej z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tande-

mową spektrometrią mas przy wykorzystaniu zestawu UPLC-MS/MS Xevo TQ-S firmy Waters.

Najistotniejszą, eksperymentalną część rozprawy, stanowi cykl 5 recenzowanych prac opublikowanych w języku angielskim w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, których sumaryczny IF wyniósł 12,314 co odpowiada wartości 100 pkt. MNiSW.

Co ważne w 3 z tych pięciu publikacji doktorant jest pierwszym autorem, w jednej widnieje jako trzeci w kolejnej jako czwarty autor. Publikacje mają charakter pełno tekstowy i obok wyników ilustrowanych tabelami i wykresami zawierają również ich omówienie, a w dyskusji autor interpretując własne wyniki i obserwacje, odnosi się do współczesnych wyników innych badaczy zajmujących się tymi problemami. Do każdej pracy załączono stosowane oświadczenia współautorów określające procentowy ich udział w realizacji publikacji.

Uzupełnieniem przedstawionego cyklu prac jest również lista prezentacji 7 ustnych wystąpień zjazdowych i konferencyjnych oraz 5 prac plakatowych prezentujących poszczególne etapy realizowanego projektu.

W pierwszej publikacji „Analysis of higenamine In urine by means of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry – interpretation of Results” skupił się na analitycznych aspektach, w tym modyfikacji przygotowania próbki, ekstrakcji i oznaczeniu alkaloidu w moczu. Jak sam autor przyznał w ostatnich latach analityka i farmakokinetyka tego związku była wielokrotnie opisywana jednak nowatorskim elementem publikacji było przedstawienie i identyfikacja analityczna nowych metabolitów związku macierzystego, a efektem było wprowadzenie w 2016 r. obowiązku ich oznaczania w ramach oficjalnych procedur WADA.

Drugą pozycję (Pharmacological Reports) pt. „ The influence of caffeine on ethyl glucuronide levels In rat serum and In rat hair” stanowi dla odmiany w pełni eksperymentalna praca przeprowadzona na modelu zwierzęcym (szczury). Praca skupia się na problemie nadużywania alkoholu i kofeiny jak najpopularniejszych używek o działaniu psychotropowym i wpływie tego drugiego związku na poziom glukozydów etylowych jako biomarkera nadużywania alkoholu. Istotnym aspektem pracy było opracowanie własnej procedury dla surowicy i włosów oraz przeprowadzenie jej pełnej walidacji zgodnie z zasadami GLP.

Trzecia publikacja pt. „Detection of bemitil and its metabolite In urine by means of LC-MS/MS In view of doping control of analysis” przedstawia problem środka dopingującego oraz jego metabolitu zawartego w wielu popularnych suplementach diety. W pracy przedstawiono zarówno własną procedurę analityczną uwzględniającą hydrolizę próbki moczu i ekstrakcję typu ciecz-ciecz jak również omówiono interpretację wyników w kontekście kontroli antydopingowej. Ważnym elementem pracy była też identyfikacja metabolitu związku macierzystego. Uzyskane rezultaty potwierdzały obserwacje innych badaczy.

Kontynuację tej problematyki stanowi czwarta pozycja stanowiąca podstawę naukową rozprawy pt. „Effects of supplementation with glutathione and its precursors on athlete performance”. W tej przeglądowej publikacji autor przedstawia jak ważną rolę glutation odgrywa w fizjologii człowieka jako główny inhibitor i stabilizator stresu oksydacyjnego. Zwraca również uwagę na znaczenie w tym procesie prekursorów glutationu (N acetyl-L-cysteina, L-glutamina), które są przyjmowane przez profesjonalnych sportowców doustnie dla suplementacji diety zalecanej w uprawianej dyscyplinie.

Ostatnią pozycję cyklu 5 prac stanowi publikacja pt. „ The use of a valid and straightforward metod for the identyfikation of higenamine In diatary supplements In view of anti-doping rule violation cases” Autor przedstawia opracowaną i zwalidowaną procedurę pozwalającą na identyfikację i oznaczanie higenaminy w produktach i odżywkach dedykowanych dla sportowców (nutrition products) powszechnie stosowanych dla suplementacji podstawowej diety. Zaletą procedury jest jej szybkość i prostota, co zwiększa możliwości oznaczania większej liczby próbek, a jednocześnie zmniejsz koszt jednostkowy analizy. Obok znaczenia poznawczego, wartością dodatkową pracy jest jej wprowadzenie do rutynowego zastosowania w ramach praktyki Laboratorium Antydopingowego w Warszawie.

Ponad to w cyklu znalazły się 2 opracowania (10 pkt MNiSW) materiałów z workshopów w Kolonii (materiały pełne konferencji Recent Advances In Doping Analysis) z 2017r. oraz 2018r. prezentujących pełny tekst prezentacji posterowych

Rozprawę kończy rozdział nr 4 „wyniki” stanowiący podsumowanie i omówienie najważniejszych rezultatów części eksperymentalnej. Niewątpliwie najbardziej znaczącą wartością poznawczą rozprawy jest opracowanie przez doktoranta i walidacja szere-

gu procedur analitycznych (dilute and shoot) pozwalających na oznaczanie zarówno związków macierzystych jak i ich metabolitów w surowicy i moczu, a także w odżywkach dla sportowców. Wydaje się analizując wyniki i dyskusje poszczególnych prac, że bardzo ważnym osiągnięciem doktoranta jest skupienie uwagi na metabolitach związków potencjalnie wywołujących efekt dopingowy i wykazanie istoty ich oznaczania dla interpretacji wyników kontroli antydopingowej. Znalazło to uznanie w decyzjach komitetu WADA. (pozytywne testy EQUAS) oraz w porównaniach między laboratoryjnych

Zwraca uwagę, że doktorant we wszystkich przedstawionych publikacjach wykazuje w formułowaniu wniosków właściwe dla dojrzałych badaczy, krytyczne i ostrożne spojrzenie, unikając nadinterpretacji poczynionych spostrzeżeń i obserwacji.

W rozdziale nr 5 przedstawiono kilkanaście wniosków płynących z wyników i obserwacji zrealizowanego projektu w formie opisowej

Spis piśmiennictwa wykorzystanego w przygotowaniu rozprawy obejmuje 45 pozycji w większości anglojęzycznych z okresu ostatnich 5 lat. Jedną pozycją to autocytowanie.

Uwagi recenzenta:

- W opinii recenzenta przedstawione „wnioski” mają zbyt opisowy, szczegółowy charakter, powtarzając *de facto* omówienie i interpretację uzyskanych wyników, nie spełniając wymogów dla tej części rozprawy. Wydaje się, że ten rozdział powinien w ostatecznej wersji zostać przeredagowany i skrócony.
- Jakkolwiek, co zrozumiałe założenia i cele prezentowanej rozprawy narzucały retorykę i treść rozdziałów, pewien niedosyt recenzenta budzi natomiast całkowite pominięcie przez doktoranta (choćby we wstępie) problematyki działań niepożądanych i odległych toksycznych wywołanych przez związki o działaniu dopingującym. Wydaje się, że ten aspekt jest istotny w dzisiejszych realiach częstego nadużywania dopingu i środków farmakologicznych zarówno przez profesjonalnych sportowców jak i młodzież amatorsko uprawiającą sport.

Przedstawione z obowiązku recenzenta uwagi nie umniejszają jednak bardzo wysokiej oceny merytorycznej recenzowanej pracy. Doktorant wykazał się umiejętnością stawiania celu, planowania i rzetelnego prowadzenia badań oraz wyciągania właściwych wniosków. Na dodatkowe podkreślenie zasługuje znakomite opanowanie

nowoczesnego warsztatu badawczego, obszerność przeprowadzonych badań, benedyktyńską skrupulatność w realizacji poszczególnych etapów oraz wykorzystanie przez doktoranta nowoczesnych technik i szerokiego wachlarza narzędzi statystycznych pozwalających na precyzyjne wnioskowanie

Pracę cechują niewątpliwie duże walory zarówno poznawcze, praktyczne, jak i przede wszystkim analityczne, co w opinii recenzenta musi podnosić jej ocenę.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca mgr Krzysztofa Grucza dotyczy aktualnej problematyki analitycznej, klinicznej i społecznej, stanowi znaczącą pozycję naukową i w pełni spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14.03. 2003 r. o zasadach nadawania tytułów i stopni naukowych (Dz.U. z 2017 r.poz. 1789) . Z całkowitym przekonaniem wnioskuję zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie mgr Krzysztofa Grucza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, dnia 19.sierpnia 2019 r.

Prof. dr hab. n. med.
Krzysztof Borowiak

