

**Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES**

Kraków, dnia 11 stycznia 2022 roku

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

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Marioli Wickiej pt. *Badania toksykologiczne  
płynów ustrojowych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej  
sprzężonej ze spektrometrią mas***

**Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej**

Rozprawa doktorska Pani mgr Marioli Wickiej dotyczy opracowania nowoczesnych metod badania różnych materiałów biologicznych, głównie krwi i moczu, w kierunku zawartości substancji dopingujących oraz psychoaktywnych za pomocą zaawansowanej techniki instrumentalnej, jaką jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS).

Autorka pracy jest pracownikiem Polskiego Laboratorium Antydopingowego i z tego względu problematyka badań mających na celu weryfikację czy sportowcy postępują zgodnie z zasadami *fair play*, w szczególności nie wspomagają się środkami zabronionymi do stosowania w sporcie, jest dominująca w rozprawie.

Problem doping w sporcie jest znany od dawna, jednak zdaje się intensywnie wzrastać w ostatnich latach. Sportowcy dla osiągnięcia lepszych rezultatów sięgają po coraz to nowe substancje, które w ich odczuciu mają wspomagać wydolność i poprawiać wyniki. Wiąże się to z postępem farmakologii, ale też rozwojem globalnego rynku narkotykowego i samego internetu, co powoduje względnie łatwy dostęp do substancji zabronionych. Jednak należy zwrócić uwagę na coraz skuteczniejsze narzędzia stosowane przez badaczy – analityków, dzięki czemu wykrycie różnych nowych form doping jest możliwe.

Z pewnością pracę naukowców pracujących w laboratoriach antydopingowych wspomagają działania Światowej Agencji Antydopingowej (WADA), która od ponad 20 lat zajmuje się nadzorem nad systemem walki z dopingiem. Wynikiem jej działania są m.in. zmiany przepisów antydopingowych, w tym rozszerzenie definicji doping, opublikowanie Światowego Kodeksu Antydopingowego (*World Anti-Doping Code*), który

stanowi zasadniczy zbiór reguł antydopingowych obowiązujących w sporcie, w tym także standardów międzynarodowych dotyczących różnych obszarów technicznych i operacyjnych w światowym programie zwalczania dopingu. Obecnie obowiązuje sześć standardów międzynarodowych WADA, w tym kluczowe dla badań zawartych w niniejszej pracy: standard określający listę substancji i metod zabronionych (*The International Standard for the Prohibited List*), standard wyłączeń dla celów terapeutycznych (*The International Standard for Therapeutic Use Exemptions, ISTUE*) oraz standard dla laboratoriów (*The International Standard for Laboratories, ISL*). WADA publikuje również istotne z punktu widzenia pracy laboratoriów antydopingowych tzw. dokumenty techniczne (*Technical Documents, TD*), listy techniczne (*Technical Letters, TL*), przewodniki laboratoryjne (*Laboratory Guidelines*) i noty techniczne (*Technical Notes*), w których określone są szczegółowe wymagania dla różnych substancji i ich grup, metod badawczych czy też wytyczne dotyczące interpretacji uzyskanych wyników. Zdefiniowanie wymogów stawianych przez WADA pomaga naukowcom pracującym w laboratoriach antydopingowych określić minimalne parametry analityczne w stosunku do badanych związków, jakie muszą osiągnąć opracowywane metody analityczne i następnie w procesie walidacji wykazać, że zostały one osiągnięte. WADA nie określa jednak np. jaką technikę analityczną ma zastosować laboratorium, w jaki sposób należy przygotować próbki do badań czy jakie warunki analityczne należy zastosować. To zadanie dla naukowców z laboratoriów antydopingowych i ono właśnie było przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej pracy.

Celem pracy było bowiem opracowanie i udoskonalenie uniwersalnej metody przesiewowej, która pozwoli na identyfikację dużej grupy substancji dopingujących, środków odurzających, substancji psychotropowych oraz nowych substancji psychoaktywnych, należących do różnych grup związków chemicznych, a także ich metabolitów, jak również opracowanie takich metod potwierdzających obecność wyżej wymienionych substancji, które pozwolą na ich jednoznaczną identyfikację w materiale biologicznym, a gdy to jest wskazane również określenie zawartości tych związków. Autorka pracy za cel badań postawiła sobie także opracowanie metody przesiewowej na obecność środków dopingujących w moczu do wykorzystania w analizach rutynowych. Wśród bardziej szczegółowych celów badań Doktorantka podała optymalizację metody oznaczania nowych glikokortykoidów z wykorzystaniem źródła UniSpray do analiz przesiewowych i potwierdzających, oraz opracowanie metody rozdzielenia izomerów strukturalnych

wybranych nowych substancji psychoaktywnych i porównanie efektywności metod przy zastosowaniu różnych źródeł jonów w spektrometrach mas.

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 po pierwsze 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. Bardzo istotny przy ocenie wartości i znaczenia pracy jest fakt, że lista substancji określona przez WADA ma otwarty charakter, często zdefiniowane są one rodzajowo a nie w postaci enumeratywnego wyliczenia i lista ta jest corocznie aktualizowana, co sprawia, że metody analityczne muszą być rozwijane. Metody opracowane przez Doktorantkę cechuje otwartość i uniwersalność, co sprawia, że są one właściwa do tego typu zastosowań.

### **Układ pracy i poruszane zagadnienia**

Przedłożona do recenzji rozprawa liczy łącznie 215 stron. Część literaturowa, poprzedzona streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem treści, wykazem skrótów i akronimów oraz wprowadzeniem, liczy 45 stron i składa się z pięciu rozdziałów. We wstępnej części Autorka pracy omówiła zjawisko dopingu w sporcie, obowiązujące przepisy i inne regulacje prawne w zakresie zwalczania tego zjawiska w Polsce i na świecie, rolę i uprawnienia Światowej Agencji Antydopingowej, a także substancje, które najczęściej są przyjmowane i nadużywane przez osoby uprawiające sport. Zwróciła uwagę na specyficzne kryteria umieszczania substancji na Liście substancji zabronionych WADA, które odnoszą się nie tylko do realnej bądź hipotetycznej poprawy wyników sportowych, ale również stwarzania potencjalnego lub faktycznego zagrożenia dla zdrowia a nawet życia osób je zażywających. Takie podejście sprawia, że w kręgu zainteresowania są nie tylko różne substancje psychotropowe, środki odurzające, w szczególności nowe substancje psychoaktywne (NPS), ale również różne grupy leków oraz tzw. suplementów diety, które nominalnie powinny wykazywać efekt odżywczy lub inny fizjologiczny na organizm, a niekiedy zawierają substancje o silnym, negatywnym wpływie na jego funkcjonowanie. Autorka pracy omówiła również zmiany na światowym i europejskim rynku narkotykowym, które zaszły w ostatnich kilkunastu latach, co również wpłynęło na rodzaje substancji

przyjmowanych przez sportowców. Przykładem są syntetyczne katynony, jako grupa NPS o działaniu stymulującym zbliżonym do amfetaminy czy bliskich strukturalnie np. pseudoefedrynie – popularnemu lekowi stosowanemu przy przekrwieniu błony śluzowej nosa i kaszlu, a także projektowane pochodne benzodiazepiny, które zostały zsyntezowane jako potencjalne leki o działaniu nasennym i uspokajającym, ale które nigdy nie zostały dopuszczone do sprzedaży, m.in. z uwagi na szereg efektów niepożądanych.

W dalszej kolejności Autorka pracy zaprezentowała klasyfikację i ogólną charakterystykę substancji psychoaktywnych, w tym środków odurzających i substancji psychotropowych, nowych substancji psychoaktywnych (NSP), leków z grupy pochodnych benzodiazepiny i projektowanych benzodiazepin, leków z grupy pochodnych kwasu barbiturowego i innych leków o działaniu uspokajającym, a także markery spożycia alkoholu. Następnie przedstawiona została klasyfikacja i ogólna charakterystyka substancji zabronionych z grupy glikokortykoidów stosowanych w dopingu oraz innych wybranych grup substancji dopingujących. Autorka pracy opisała także procedury przesiewowe i potwierdzeniowe dla substancji psychoaktywnych oraz uzależniających stosowanych w dopingu, z podziałem dla tzw. substancji progowych i nieprogowych, a także badania przesiewowe w analizie środków odurzających i substancji psychotropowych, z omówieniem stosowanych rodzajów materiałów biologicznych, techniki immunochemiczne i inne szybkie testy, a także techniki instrumentalne wykorzystywane do identyfikacji, w szczególności chromatografię ciekową sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS). Wstęp jest zatem dobrym wprowadzeniem do zagadnień poruszanych w pracy, w którym w sposób klarowny omówiono poszczególne aspekty badań.

Po przedstawieniu założeń i celów pracy, które zostały określone prawidłowo, Doktorantka podała materiały stosowane w badaniach, w tym listę certyfikowanych i innych materiałów odniesienia, opis aparatury i użytych metod. Określiła w jaki sposób materiały były przygotowywane do oznaczania substancji biologicznie aktywnych we krwi, oraz wybranych izomerów katynonów, substancji psychoaktywnych i glikokortykoidów zabronionych w sporcie oraz glukuronidu etylu w moczu. Omówiła w jaki sposób została przeprowadzona walidacja metod chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS, UPLC-MS/MS), także tych, które dotyczyły oznaczania wybranych benzodiazepin oraz leków z grupy pochodnych barbituranów,

imidazopirydyn oraz pochodnych cyklopirolonu we krwi, a także oznaczania substancji psychoaktywnych i glikokortykoidów zabronionych w sporcie w moczu. Scharakteryzowała również metodę oznaczania glikokortykoidów z wykorzystaniem źródła UniSpray, a także dokonała porównania wyników uzyskanych za pomocą klasycznego źródła jonów ESI oraz nowego typu źródła. W dalszej kolejności pokazała jakie wyniki zostały uzyskane w Polskim Laboratorium Antydopingowym przy zastosowaniu opracowanych metod, a także w testach biegłości, w których to laboratorium uczestniczyło. Wszystkie uzyskane wyniki zostały szczegółowo omówione w kontekście danych literaturowych i na podstawie dyskusji Autorka pracy wyciągnęła prawidłowe wnioski. Rozprawę kończy zestawienie piśmiennictwa, spis tabel i rycin, a także wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

Układ pracy jest zatem prawidłowy, a poruszane zagadnienia są ściśle związane z założeniami i celami pracy.

Rozprawa napisana jest w sposób bardzo staranny. Zauważa się dbałość Doktorantki o formę graficzną pracy. W konsekwencji pracę czyta się z przyjemnością i zainteresowaniem. Jest ona kompendium wiedzy na temat substancji stosowanych w dopingu i metod ich wykrywania. Autorka rozprawy posługuje się poprawną polszczyzną, swobodnie operując nią w złożonej tematyce naukowej. Nie ustrzegła się Ona wielu wtrąceń czy bezpośrednich tłumaczeń z języka angielskiego (np. mocz czy krew zerowe), nazwy części związków pozostały w języki angielskim lub też tłumaczenia prowadziły do błędów literowych (np. oksykodone – str. 64), występują też błędy literowe, niemniej jednak ani ich liczba ani waga nie mają znaczenia przy ocenie recenzowanej pracy.

### **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 wysokosprawnej, w tym ultrasprawnej, chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Taki zestaw technik analitycznych jest dziś „złotym standardem” w badaniach antydopingowych i toksykologicznych dla celów sądowych. Doktorantka w analizach chromatograficznych wykorzystywała różne kolumny chromatograficzne i właściwie do nich dobierała fazy ruchome. W drugiej wymienionej technice analitycznej testowała różne źródła jonów i ustalała warunki pomiarowe. Opracowane metody poddawała bardzo szczegółowym, właściwie zaplanowanym i wykonanym, procesom walidacji.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania potwierdziły, że kluczowe w identyfikacji substancji psychoaktywnych i glikokortykoidów dla celów badań antydopingowych oraz sądowych jest zastosowanie odpowiednio czułych i selektywnych metod analitycznych, prowadzących do uzyskania wiarygodnych wyników. Techniką stosowaną w badaniach prowadzonych przez Doktorantkę była LC-MS/MS, którą charakteryzuje również komplementarny charakter oraz szerokie spektrum zastosowań. Pomiaru były prowadzone głównie w tzw. trybie celowanym (MS/MS), pozwalającym na wybieranie odpowiednich jonów fragmentacyjnych, gwarantującym selektywność. W pracy za pomocą walidacji dokonano oceny opracowanych metod identyfikacyjnych, stwierdzając ich zgodność z obowiązującymi wymaganiami dotyczącymi jakości badań. Wykazano również, że mogą być one stosowane do oznaczania substancji w płynach biologicznych. Co istotne, opracowane procedury są proste i szybkie, co umożliwia analizę dużej liczby próbek w krótkim czasie. Ponadto opracowane procedury są uniwersalne, co pozwala na rozszerzenie metod o kolejne związki, a także nowe matryce. Jak przykładowo wskazała Autorka pracy, opracowana metoda przygotowania próbek moczu do analizy techniką LC-MS/MS, która przebiega według schematu: hydroliza – ekstrakcja ciecz-ciecz – odparowanie – rozpuszczenie, może być użyta nie tylko do analiz związków przestawionych w pracy, ale także m.in. do steroidów anaboliczno-androgennych, beta-2-agonistów, inhibitorów aromatazy, innych substancji antyestrogenowych oraz modulatorów metabolizmu. Do części analizowanych związków opracowane zostały oddzielne metody badań, np. Autorka pracy zaproponowała metodę skutecznego rozdzielania izomerów strukturalnych wybranych katynonów w celu ich prawidłowej identyfikacji.

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 tym wymogów wskazanych przez WADA. Metody te zostały zweryfikowane udziałem w badaniach biegłości, po czym zostały wdrożone do praktyki.

Wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Marioli Wickiej oceniam jako bardzo wysoką. Niezależnie od tej oceny, poniżej przedstawiłem kilka drobnych uwag:

1. Na stronie 65 Autorka pracy podała, że badaniom poddana została „surowica krwi jak również materiał sekcyjny”. Nie znalazłem informacji o jaki materiał chodzi i czy opracowane metody były walidowane pod kątem analizy tych materiałów.
2. Na kolejnej stronie podano, że materiał biologiczny do badań stanowiło co najmniej 15 300 próbek moczu. Wydaje się, że na potrzeby opracowania, konieczne jest zamknięcie okresu analizy próbek i opracowanie dla niego wyników.
3. Na Rycinie 4.1.3.2. (strona 72) suma zawartości składników w fazie ruchomej do 8 minuty jest mniejsza niż 100%. Zapewne jest to wyłącznie skutkiem błędnego zaznaczenia.
4. Doktorantka w kilku miejscach w pracy używa określenia „oznaczanie markerów etanolu w moczu” (np. strona 74), podczas gdy w ramach pracy opracowała metodę analizy tylko jednego z nich – glukoronidu etylu (co zresztą wynika również z opisu na wspomnianej stronie).

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

## **Podsumowanie**

Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pani mgr Mariola Wicka posiada dużą wiedzę na temat substancji dopingujących i psychoaktywnych 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 i toksykologicznych dla celów

postępowania sądowych. W sposób właściwy odniosła wyniki badań własnych do danych literaturowych oraz wymogów stawianych przez organizacje międzynarodowe, w tym WADA, z należytą krytyką podchodząc do własnych ustaleń. Uwagę zwraca interesujący sposób przygotowania próbek przez Doktorantkę, umiejętność doboru odpowiedniej aparatury badawczej czy optymalizacji warunków prowadzenia procesów.

Rozprawa doktorska Pani mgr Marioli Wickiej zawiera wiele elementów nowości. Uwagę zwraca szczególnie przetestowanie nowego typu źródła jonów UniSpray, które okazało się bardzo przydatne w analizie substancji dopingujących z uwagi na znaczącą poprawę czułości w stosunku do większości analitów, a tym samym umożliwiło uzyskanie niższych granic wykrywalności i oznaczalności, co jest kluczowe w badaniach antidopingowych.

Innymi bardzo ważnymi cechami metod analitycznych opracowanych przez Doktorantkę jest ich uniwersalność oraz niski stopień złożoności procedur przygotowania próbek do badań, co przekłada się na sprawność i wydajność pracy laboratorium.

### **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 Marioli Wickiej do publicznej obrony.**

**Dr hab. Dariusz Zuba  
Profesor Instytutu**

*Dokument podpisany kwalifikowanym  
Podpisem elektronicznym*