



Prof. dr hab. Michał Ciborowski

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Centrum Badań Klinicznych

Laboratorium Metabolomiki

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Tomasza Sobczaka pt.:

„Zastosowanie nowatorskich technologii preparatyki próbek do analiz antydopingowych oraz terapeutycznego monitorowania leków w złożonych matrycach biologicznych”

zrealizowanej na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Promotor: dr hab. Marcin Koba, prof. UMK

Promotor pomocniczy: dr Krzysztof Goryński

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska poświęcona jest aspektom analitycznym procesu oznaczania substancji zakazanych, m.in. stosowanych jako doping czy o właściwościach psychotropowych, w ślinie. Poruszane aspekty to m.in. proces pobierania materiału do badań, a w głównej mierze opracowywanie nowych innowacyjnych rozwiązań analitycznych związanych z ekstrakcją analitów. Pod wieloma względami ślina jest cennym materiałem do badań. Zawiera praktycznie wszystkie substancje drobnocząsteczkowe obecne w osoczu, a substancje egzogenne występują w ślinie w postaci niezmetabolizowanej i w stężeniu wyższym niż w próbkach osocza czy moczu. Szczególnie interesująca jest zaproponowana w rozprawie idea przeprowadzania badań antydopingowych w próbkach śliny. Obecnie Światowa Agencja Antydopingowa (WADA) dopuszcza przeprowadzanie oznaczeń substancji zakazanych w próbkach osocza lub moczu; gdzie pobieranie krwi jest zabiegiem inwazyjnym, a pobieranie moczu wiąże się z naruszeniem prywatności sportowca w związku z wymogiem by mocz do badań był oddawany w obecności osoby nadzorującej. Pobieranie próbek śliny nie wiąże się z powyższymi ograniczeniami, zatem wykorzystanie śliny jako materiału do badań antydopingowych czy oznaczania innych substancji zakazanych wydaje się być bardzo dobrym pomysłem. Jednak zanim różne organy nadzorujące dopuszczą możliwość oznaczania w ślinie substancji antydopingowych czy innych związków, których stosowanie jest zakazane lub ograniczone

prawem, niezbędne jest przeprowadzenie szeregu badań podstawowych, m.in. takich jakie zostały wykonane przez Doktoranta.

Oceniana rozprawa została przygotowana na podstawie pięciu spójnych tematycznie publikacji anglojęzycznych, a każda z prac została opublikowana w innym czasopiśmie. Należy podkreślić, że każde z czasopism posiada wysokie wartości współczynnika oddziaływania (z ang. impact factor, IF), a trzy z nich klasyfikowane są w kategorii Q1, co wskazuje, że aktualnie są to najlepsze na świecie czasopisma w swoich dziedzinach. Sumaryczny IF wspomnianych prac wynosi 38,133, a suma punktów MEiN jest równa 620. Doktorant jest pierwszym autorem w trzech pracach, a w pozostałych - drugim. Szczegółowy wkład autorów w powstanie prac znajduje się w większości publikacji, a ponadto przedstawiony jest w oświadczeniach stanowiących załączniki do rozprawy (str. 143-156). Zgodnie z informacjami zawartymi w załączonych oświadczeniach wkład Doktoranta w powstanie każdej z prac był znaczący. Oceniana rozprawa obejmuje 142 strony maszynopisu (bez załączników). Na początku umieszczone są: spis publikacji wchodzących w skład rozprawy, słowa kluczowe oraz wykaz stosowanych skrótów. Zamiast tradycyjnego wstępu Autor przygotował obejmujące 5 stron Wprowadzenie, w którym w sposób ciekawy przedstawia rys historyczny rozwoju chromatografii cieczowej, spektrometrii mas oraz ekstrakcji do fazy stałej. Następnie przedstawiony jest cel pracy, a po nim występują trzy rozdziały poświęcone historii badań antydopingowych (rozdział 3), charakterystyce substancji dopingujących i odurzających (rozdział 4) oraz rodzajom materiałów biologicznych w jakich wykonuje się oznaczenia wspomnianych substancji (rozdział 5). Moim zdaniem rozdziały 3-5 oraz rozdział 7 (Metody oczyszczania próbek materiałów biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem metod mikroekstrakcyjnych) powinny zostać umieszczone przed celem pracy i wraz ze wspomnianym rozdziałem Wprowadzenie tworzyć wstęp teoretyczny. Nie zmienia to faktu, że przedstawione w tych rozdziałach informacje są ciekawe, przedstawione w dostępnym sposobie i istotne z punktu widzenia tematyki rozprawy. Świadczą również o szerokiej wiedzy Doktoranta w zakresie tematyki prowadzonych badań.

Sformułowany cel pracy jest precyzyjny i składa się z celu głównego oraz celów dodatkowych. Głównym celem jest udoskonalenie metod przygotowania próbek do oznaczania substancji zakazanych w próbkach śliny, a cele dodatkowe to dobór odpowiedniej procedury pobierania próbek śliny do badań oraz opracowanie zupełnie nowej metody przygotowania próbek.

Prace będące podstawą rozprawy wkomponowane są w rozdział 6 (Publikacja nr 1), 8 (Publikacje nr 2 i 3) oraz 9 (Publikacje nr 4 i 5). Rozdział 6 dotyczy metod pobierania materiału biologicznego do badań, a w szczególności próbek śliny. W Publikacji nr 1 porównano 15 dostępnych komercyjnie zestawów do pobierania próbek śliny pod kątem ich użyteczności do oznaczania 49 popularnych substancji dopingujących i narkotycznych. Przeprowadzone badania są kompleksowe, objęły wszystkie dostępne na rynku zestawy, a uzyskane wyniki pokazują, że dobór odpowiedniej metody pobierania próbek ma ogromne znaczenie dla powodzenia procesu analitycznego.

Rozdział 8 poświęcony jest nowym rodzajom powłok urządzeń do mikroekstrakcji do cienkiej powłoki (TFME). Metoda TFME jest modyfikacją wprowadzonej już ponad 30 lat temu metody SPME, a jej głównym atutem jest możliwość stosowania TFME w układzie płytki 96-dołkowej, co pozwala na zwiększenie przepustowości prowadzonych oznaczeń. W Publikacji nr 2 porównano 12 różnych rodzajów powłok ekstrakcyjnych różniących się między sobą przede wszystkim typem oddziaływań międzycząsteczkowych zapewniających wiązanie analitów do powłoki. Oprócz 12 rodzajów powłok przebadanych zostało również 8 roztworów desorpcyjnych, co w połączeniu z 48 badanymi substancjami dało w sumie imponującą matrycę danych składającą się z 4608 wartości. Najlepsza do ekstrakcji badanych substancji metodą TFME okazała się powłoka zawierająca równe proporcje cząsteczek zawierających grupy oktylowe (C8) i 3-cyjanopropylowe (CN). W kolejnej pracy (Publikacja nr 3) porównano możliwość ekstrakcji 30 związków, m.in. narkotyków i środków dopingujących, metodą TFME przy zastosowaniu powłok pokrytych cząstkami C18 o różnej wielkości (5, 10 i 45 μm) oraz powłoki C18 wielkości 10 μm zawierającej polarne grupy pomocnicze. Przeprowadzone badania pokazały, że polarne grupy pomocnicze umożliwiają skuteczniejsze wiązanie hydrofilowych analitów obecnych w wodzie; zaś porównanie powłok przygotowanych z cząstek o różnej wielkości wskazuje, że korzystniejsze jest stosowanie cząsteczek o mniejszej wielkości, które charakteryzowały się mniejszą wielkością porów wewnętrznych. Dobrym uzupełnieniem tych badań byłoby zastosowanie cząstek o różnej wielkości zawierających polarne grupy pomocnicze.

W rozdziale 9 przedstawiona została możliwość wykorzystania technologii druku 3D w chemii analitycznej. Doktorant zaplanował i przeprowadził innowacyjne badania, w których druk 3D wykorzystano do przygotowania urządzeń mikroekstrakcyjnych, a uzyskane wyniki opublikowano w prestiżowych czasopismach *Analytical Chemistry* (Publikacja nr 4) i *Talanta* (Publikacja nr 5). W Publikacji nr 4, zamiast tradycyjnie stosowanego metalu, do wykonania wewnętrznej struktury urządzeń TFME wykorzystano termoplastyczny poliamid wzmocniony włóknem węglowym. Tak przygotowane struktury pokryto powłoką ekstrakcyjną, a ich zdolność ekstrakcyjną porównano z tradycyjnie przygotowanym urządzeniem, w którym struktura wykonana jest z metalu. Ponadto sprawdzono możliwości ekstrakcyjne urządzenia wykonanego jedynie z poliamidu 6 wzmocnionego

włóknem węglowym (bez pokrywania go powłoką ekstrakcyjną). Rodzaj materiału z jakiego wykonana została wewnętrzna struktura urządzenia TFME nie wpływał na wydajność ekstrakcji, przy wykorzystaniu obu urządzeń uzyskano porównywalne wyniki. Natomiast ekstrakcja przeprowadzona urządzeniem w całości wykonanym z poliamidu 6 wzmocnionego włóknem węglowym charakteryzowała się m.in. lepszą powtarzalnością i wysokim stopniem oczyszczenia próbki, a ponadto uzyskano znaczną redukcję czasu i kosztu przygotowania urządzenia ekstrakcyjnego. W kolejnych badaniach (Publikacja nr 5) porównano zdolność ekstrakcyjną urządzeń TFME wykonanych za pomocą druku 3D z 11 różnych polimerów o właściwościach adsorpcyjnych. Uzyskane wyniki potwierdziły zalety poliamidu 6 jako obiecującego polimeru do produkcji urządzeń ekstrakcyjnych, korzystne wyniki uzyskano również przy użyciu urządzeń wydrukowanych z różnego rodzaju poliuretanów. Ważnym aspektem przeprowadzonych badań jest fakt, że produkcja urządzeń ekstrakcyjnych ze wspomnianych polimerów jest nie tylko tańsza i szybsza, ale także nie wymaga stosowania szkodliwych dla środowiska odczynników.

Chciałbym podkreślić, że badania umieszczone w każdej z publikacji wchodzących w skład cyklu zostały bardzo dobrze zaprojektowane. Na uwagę zasługuje również obszerna ilość badań wykonana w ramach każdej z tych prac. Jedynie badania w Publikacjach nr 2 i 3 mogłyby być uzupełnione o pomiary z uwzględnieniem matrycy biologicznej. Zastanawia mnie natomiast na jakiej podstawie zostało wybrane stężenie oznaczanych substancji. W Publikacji nr 1 było to 10 ng/ml, natomiast w pozostałych 50 ng/ml. Czy wiadome jest w jakich stężeniach mogą one występować w próbkach krwi czy śliny u osób je stosujących? Przypuszczam, że mogą one występować na bardzo różnych poziomach stężeń, co może wpływać nie tylko na proces ekstrakcji, ale też oznaczania.

Wnioski wyciągnięte przez Doktoranta z przeprowadzonych badań przedstawione są w sposób opisowy i obejmują 5 stron maszynopisu. Są one podzielone na wnioski jakie Doktorant wyciągnął z badań przedstawionych w pięciu publikacjach, a jednocześnie odpowiadają na cele rozprawy doktorskiej.

W dalszej części rozprawy zamieszczone są streszczenia w języku polskim i angielskim oraz bibliografia. Spis literatury obejmuje 116 pozycji piśmiennictwa, z czego prawie 90% prac zostało opublikowanych w ostatnim dwudziestoleciu. Ostatnia część maszynopisu to załączniki, wśród których znajdziemy wspomniane wcześniej oświadczenia oraz imponujący dorobek Doktoranta.

Podsumowując, uważam, iż rozprawa doktorska Pana mgr Łukasza Tomasza Sobczaka jest innowacyjna i stanowi ważny wkład w rozwój chemii analitycznej, zwłaszcza etapu przygotowania próbek. Przeprowadzone badania i opracowane rozwiązania przyczyniają się do rozwoju metod oznaczania substancji dopingujących i odurzających w ślinie. Rozprawa jest bardzo dobrze napisana pod względem merytorycznym i stylistycznym, należy podkreślić estetykę i dbałość o szczegóły.

Stwierdzam, iż Rozprawa doktorska mgr Łukasza Tomasza Sobczaka spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742), w związku z czym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne w Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z wnioskiem o dopuszczenie mgr farm. Łukasza Tomasza Sobczaka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

Białystok, dn. 22.08.2023r.

KIEROWNIK
Laboratorium Metabolomiki
Centrum Badań Klinicznych
Ciborowski
prof. dr hab. Michał Ciborowski