



Gdańsk, 2022-07-08

**Opinia**  
**na temat kandydatury Pani mgr farm. Anny Marii Welz**  
**do stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych prowadzi Rada Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu według posiadanych uprawnień oraz wymaganych procedur i przepisów.

Zgromadzony przez Panią mgr Annę Marię Welz dorobek publikacyjny będący podstawą cyklu pracy doktorskiej włącza trzy prace pełnotekstowe (jedną pracę przeglądową i dwie prace oryginalne). Rozprawa doktorska obejmuje dorobek publikacyjny przedstawiony jako spójny tematycznie zbiór trzech artykułów opublikowanych w punktowanych czasopismach naukowych z IF. Cykl obejmuje publikacje przygotowane przez zespoły badaczy liczące 2-4 współautorów i zamieszczone w czasopismach o uznaniu międzynarodowym z sumarycznym IF = 10,714. Według bazy *Scopus* prace Doktorantki posiadają na dzień 08.07.2022 r. 8 niezależnych cytowań (wynikających na ten moment głównie z 7 cytowań pracy przeglądowej).

Cykl publikacji Pani mgr Anny Welz, składający się ze spójnego tematycznie zbioru artykułów, został zatytułowany: „Opracowanie i zastosowanie metod chromatografii cieczowej do analizy związków z grupy *designer drugs*”. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Spójny pod względem tematycznym charakter zbioru artykułów wraz z dołączonymi oświadczeniami współautorów, potwierdzają wiodącą rolę Pani mgr Anny Welz w realizacji, założonej przez Promotora pracy doktorskiej Pana dr. hab.

n. farm. inż. Marcina Koby, prof. UMK, koncepcji badawczej, wykonaniu prac analitycznych i interpretacyjnych, oraz podczas przygotowania publikacji.

Zadania badawcze przedstawione w cyklu publikacji są właściwie sformułowane oraz systematycznie realizowane. Badania te posiadają także wartość poznawczą wnosząc wkład w rozwój nowoczesnej analityki chemicznej i toksykologii. Metodologia bazuje przy tym na sprawnie przeprowadzanej analizie z użyciem nowoczesnych technik analitycznych włączających wykorzystanie zaawansowanych strategii analizy biomedycznej i analityki chemicznej. Cykl publikacji został podzielony na dwie części dotyczące w pierwszym rzędzie szczegółowego przeglądu literatury, gdzie opisano problem nadużywania związków pochodnych piperazyny z grupy *designer drugs* i wynikających z tego konsekwencji zdrowotnych, co zostało także wskazane jako zgodne z europejskim raportem narkotykowym traktującym pochodne piperazyny jako monitorowane związki szkodliwe dla zdrowia. W drugim rzędzie zaprezentowano wyniki dwóch prac oryginalnych dotyczących opracowania metod analitycznych umożliwiających identyfikację pochodnych piperazyny w matrycach biologicznych (surowica, mocz) pacjentów z podejrzeniem zatrucia związkami z grupy *designer drugs* koncentrując się przy tym na: 1) optymalizacji metod chromatograficznych w celu wykonywania oznaczeń badanych pochodnych piperazyny w potencjalnie krótkim czasie analizy, ze szczególnym uwzględnieniem wybranych pochodnych benzylopiiperazyny i fenylopiiperazyny oraz 2) porównaniu i zastosowaniu opracowanych metod LC-DAD i LC-MS podczas oceny zdolności analitycznej badanych związków wraz z interpretacją wyników w zależności od rodzaju badanego materiału biologicznego.

Doktorantka w pierwszym etapie prac badawczych skoncentrowała się na zastosowaniu metody z wykorzystaniem chromatografii ciekłej w połączeniu ze spektrometrem mas (LC-MS). Celem tego badania była identyfikacja jonów macierzystych o ustalonych wartościach  $m/z$  (zależność stosunku masy jonu do jego ładunku) dla każdego z pięciu badanych związków, czyli: N-benzylopiiperazyna (BZP), 1-(3,4-metylenodiodybenzylo)piiperazyna (MDBP), 1-(4-fluorobenzylo)piiperazyna (pFBP), 1-(3-chlorofenylo)piiperazyna (mCPP) i 1-(3-trifluorometylofenylo)piiperazyna (TFMPP) oraz dla trzech deuterowanych analogów BZP-D7, mCPP-D8 i TFMPP-D4, a następnie jony macierzyste każdego badanego związku poddano fragmentacji, i w wyniku rozpadu jonów macierzystych zdefiniowano co najmniej dwa jony potomne. Kluczowymi dla dalszych



rozważań okazało się wyizolowanie jonów macierzystych oraz dwóch lub trzech jonów potomnych pozwalając również na eliminację naturalnych lub syntetycznych substancji zakłócających, podczas analizy stosownej matrycy biologicznej. Za szczególnie wartościowe na tym etapie badań uważam przedstawioną koncepcję badawczą popartą wynikami eksperymentalnymi i stosowną dyskusję wskazującą, że opracowaną metodę można z powodzeniem zastosować do identyfikacji i oznaczenia badanych związków pochodnych piperazyny w fortyfikowanych próbkach biologicznych (mocz, surowica). Uzyskane przez Panią mgr Annę Welz wyniki pozwoliły nie tylko na racjonalną dyskusję na temat uwarunkowań analitycznych dla poszczególnych związków badanych, ale także na ocenę jakości dyskryminacyjnej opracowanej metody. Wyniki badań opublikowano w *Journal of Clinical Medicine* (IF = 4,242). Ze względu na charakter zaproponowanej metodologii badawczej jest to oryginalne osiągnięcie naukowe, a Doktorantka mogłaby najprawdopodobniej (wspólnie z Promotorem pracy doktorskiej) rozważyć sugerowane wykorzystanie wypracowanej procedury w kontekście dalszych, jeszcze bardziej pogłębionych studiów o charakterze toksykologicznym. Na pewno też, biorąc pod uwagę złożony charakter oznaczeń pochodnych piperazyny w fortyfikowanych próbkach, wymagana jest walidacja metody z użyciem jeszcze większej liczby próbek rzeczywistych. Niezależnie – pierwsza oryginalna prace cyklu rozprawy doktorskiej pozwoliła na właściwe zaplanowanie drugiego etapu pracy badawczej.

Dobre kwalifikacje analityczne Pani mgr Anny Welz znalazły wyraz właśnie w drugim etapie badań. Podjęto się próby oceny porównawczej wyników uzyskanych przy zastosowaniu metody oznaczeń związków badanych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej w połączeniu z detektorem diodowym (LC-DAD) oraz z wykorzystaniem chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrem mas (LC-MS), wprowadzając jednocześnie kolejny aspekt analizy fortyfikowanych próbek biologicznych. Podkreślenia wymaga fakt samodzielnego przygotowania odpowiednio zaprojektowanych eksperymentów wraz z ich szczegółową realizacją i interpretacją. Wyrażam uznanie dla krytycznej interpretacji wyników sugerujących możliwość zaproponowania i użycia metody LC-DAD bądź metody LC-MS w zależności od okoliczności analitycznych i aplikacyjnych. Ocena wyników doprowadziła do wartościowych, ale prawdopodobnie wciąż wymagających ostrożnej interpretacji wyników, uwzględniając późniejsze rozważania dotyczące próbek rzeczywistych zawierających badane pochodne piperazyny. Wyniki badań opublikowano w *Journal of Clinical Medicine* (IF =

4,242). Warto na końcu dodać, że próbę powyższej interpretacji w odniesieniu praktycznym przedstawiono w opisie wstępnym opisując wyniki analizy rzeczywistych próbek biologicznych (mocz, surowica) dla oznaczeń mCPP.

Zwieńczeniem rozważań cyklu publikacyjnego, jednocześnie otwierając cykl rozprawy doktorskiej, jest praca przeglądowa wydana w *Acta Pharmaceutica* (IF = 2,230) opisująca szeroki problem nadużywania pochodnych piperazyny. Opisano skutki zdrowotne oraz możliwości identyfikacji tych związków w preparatach i materiale biologicznym. Jest to dobre wprowadzenie w dalsze prace badawcze dotyczące pochodnych piperazyny rozpatrywanych jako *designer drugs*, i które już zostało dostrzeżone także na świecie poprzez pierwsze cytowania tej publikacji. Ogólnej charakterystyce pochodnych piperazyny towarzyszą ciekawe rozważania na temat profilu osób nadużywających oraz korespondujących efektów farmakologicznych po ich zażywaniu. Konsekwencje zdrowotne oraz zestawienie działań niepożądanych zostało podparte bogatą literaturą. Ostatecznie cennym uzupełnieniem, istotnym z punktu widzenia celów rozprawy doktorskiej, była charakterystyka metod analitycznych służących podczas identyfikacji i oznaczeń pochodnych piperazyny jako *designer drugs*.

W badaniach objętych zbiorem prac wchodzących w cykl pracy doktorskiej Pani mgr Anna Welz udowodniła dobre przygotowanie analityczne oraz w zakresie przetwarzania i interpretacji danych. Wykazała się umiejętnością racjonalnej, systematycznej realizacji założonych prac eksperymentalnych oraz sprawnością podczas przygotowania wyników badań do ich bezpośredniego opublikowania w piśmiennictwie specjalistycznym.

Ostatecznie, wywiązując się z powierzonego obowiązku recenzenta, mam również kilka pytań, które poddane dyskusji być może zaowocują perspektywicznie pozytywnym, dalszym rozwinięciem opisywanej tematyki badawczej.

- 1) W opisie wstępnym na stronie 23 rozprawy doktorskiej można przeczytać: „Nieduże różnice odnośnie czasów retencji odnotowano przy zastosowaniu deuterowanego standardu BZP-D7 dla MDBP i pFBP. Większe różnice odnotowano dla poszczególnych związków i deuterowanych wzorców różniących się strukturą”. Wskazano przy tym Tabelę 1 z publikacji P2. Jednak korespondującej informacji w



- publikacji P2 nie można odszukać, a informacje zawarte w Tabeli 1 opisu wstępnego nie wskazują bezpośrednio deuterowanych wzorców. Jak duże konkretnie różnice zaobserwowano dla poszczególnych związków i jak do tej informacji można dotrzeć posługując się zgromadzonym materiałem?
- 2) W jaki sposób optymalizowano metody analityczne w publikacjach P2 i P3? Czy tylko metodą „prób i błędów”? Jak skomplikowany eksperymentalnie był to proces?
  - 3) Dlaczego dla związków MDBP i pFBP nie zastosowano ich deuterowanych analogów jako wzorca wewnętrznego w pierwszym etapie badań? Skąd preferencja analityczna dla trzech pozostałych związków w postaci ich deuterowanych analogów jako standardy wewnętrzne (strona 4 publikacji P2)?
  - 4) W jaki sposób dokonano wyboru przygotowania próbek i ekstrakcji analitów z badanego materiału biologicznego?
  - 5) Co oznacza w praktyce analitycznej i wyrażone ewentualnie w postaci liczbowej stwierdzenie: „Stosując deuterowane analogi jako wzorce wewnętrzne uzyskano najwyższy poziom ufności wyników.” (strona 26 opisu wstępnego)?
  - 6) Wartości m/z dla jonów prekursorowych dla mCPP w Tabeli 2 i 3 opisu wstępnego różnią się liczbowo. Dlaczego?
  - 7) Na stronie 31 opisu wstępnego napisano, że: „Uzyskane wyniki wskazują na możliwość oznaczania bardzo niskich stężeń pochodnych piperazyny, rzędu pikogramów i nanogramów.” Po pierwsze – rozumiem, że chodzi tutaj raczej o stężenie wyrażone jako pg/mL dla analizowanych związków. Po drugie – czy chodzi tutaj w szczególności o pFBP; jakie praktycznie użyteczne znaczenie (z toksykologicznego punktu widzenia) może mieć ten wynik?

Podsumowując, zbiór publikacji przedstawiony przez Panią mgr Annę Welz posiada wyraźne elementy nowości naukowej w zakresie nowoczesnej analityki, toksykologii i chemii analitycznej. Praca doktorska swoją tematyką i zakresem materiału badawczego zasługuje na uwagę. Została ona dobrze zaprojektowana i wykonana, odzwierciedlając przy tym duży wkład pracy eksperymentalnej podczas opracowania danych pomiarowych. Biorąc powyższe pod uwagę, nie mam wątpliwości, że spełnione są wymogi formalne, aby Rada Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu mogła podjąć uchwałę o dopuszczeniu Pani mgr Anny Welz do ostatniego etapu postępowania kwalifikacyjnego, czyli publicznej obrony.

**KIEROWNIK**  
Katedry i Zakładu  
Chemii Farmaceutycznej

prof. dr hab. Tomasz Bączek