

Lublin, 22.07.2022

Prof. dr hab. Anna Gumieniczek

OCENA

pracy doktorskiej mgr Anny Welz

pt. „Opracowanie i zastosowanie metod chromatografii cieczowej do analizy związków z grupy *designer drugs* należących do piperazyn”

Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Praca doktorska mgr Anny Welz została przygotowana w ramach studiów doktoranckich prowadzonych przez Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. Marcina Koby i dotyczy analizy chromatograficznej pochodnych piperazyny stosowanych pozaleczniczo, jako tzw. nowe substancje psychoaktywne (NSP). Oceniana praca doktorska została na 3 artykułach naukowych: jednym o charakterze przeglądowym i dwóch prezentujących wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Doktorantkę.

Prezentowana praca przeglądowa (P1) oparta na 75 pozycjach piśmiennictwa stanowi bardzo dobry wstęp do zaplanowanych przez Doktorantkę eksperymentów. Praca ta prezentuje skrupulatną analizę literatury na temat chemizmu oraz farmakologicznych działań pochodnych piperazyny używanych jako NSP, ich właściwości toksycznych oraz uzależniających, a także metod analitycznych stosowanych do ich wykrywania i oznaczania.

Pochodne piperazyny jako substancje aktywne biologicznie prowadzą do wzrostu poziomu neurotransmiterów takich jak dopamina, serotonina i noradrenalina oraz blokują neuronalny wychwyty tych związków. Podwyższone poziomy tych neuroprzekaźników mogą więc powodować oczekiwane efekty poprawy nastroju czy pobudzenia psychofizycznego, ale równocześnie wiele niepożądanych skutków behawioralnych i klinicznych. Jak wskazują dane piśmiennictwa, u większości stosujących je osób, po krótkim okresie poprawy nastroju i zwiększonej aktywności organizmu następuje dłuższy etap wyczerpania psychofizycznego, a u niektórych osób mogą się pojawić zaburzenia psychiczne. Dane piśmiennictwa wskazują, że pochodne piperazyny są potencjalnie kardiotoksyczne, hepatotoksyczne, neurotoksyczne, nefrotoksyczne oraz wykazują potencjał uzależniający. W związku z powyższym zostały

uznane za substancje o działaniu narkotycznym i uwzględnione w raporcie Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii z roku 2021.

Jednocześnie, jak wynika z analizy piśmiennictwa, nie opracowano dotychczas szybkich i wiarygodnych metod wykrywania takich pochodnych oraz ich oznaczania, szczególnie w materiale biologicznym. W związku z powyższym jestem przekonana, że cel pracy postawiony przez Doktorantkę jest bardzo aktualny, a przeprowadzone badania nad nowymi metodami oznaczania pochodnych piperazyny mają znaczenie zarówno teoretyczne jak i praktyczne.

Dwie oryginalne publikacje włączone do cyklu (P2 oraz P3) przedstawiają wyniki badań Doktorantki dotyczące opracowania nowych metod oznaczania 5 pochodnych benzylopiperazyny lub fenylopiperazyny (BZP, MDBP, pFBP, mCPP i TFMPP), metod odpowiednio selektywnych i czułych do stosowania ich w analizie próbek biologicznych pobranych od pacjentów. Celem badań przeprowadzonych przez Doktorantkę było opracowanie, optymalizacja i walidacja metod oznaczania wymienionych pochodnych piperazyny przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją MS (LC-MS) oraz DAD (LC-DAD). Celem było także opracowanie odpowiednich procedur przygotowania próbek biologicznych (osocze, surowica, mocz), a następnie sprawdzenie skuteczności proponowanych metod w analizie rzeczywistych próbek pobranych od pacjenta zażywającego pochodne piperazyny jako NSP. Stosując metodę LC-MS uzyskano rozdzielanie 5 pochodnych piperazyny w stosunkowo krótkim czasie ok. 15 min i czułość rzędu piko- i nanogramów. Zdefiniowano jony macierzyste oraz co najmniej dwa jony potomne w celu zwiększenia powtarzalności metody oraz jej selektywności, co jest ważne dla wiarygodnej analizy w złożonych matrycach biologicznych. Ciekawym etapem w procesie opracowania tej metody był wybór optymalnego standardu wewnętrznego. Finalnie, Doktorantka potwierdziła szczególną przydatność deuterowanych analogów oznaczanych związków, poprzez zastosowanie BZP-D7, mCPP-D8 i TFMPP-D4.

Stosując metodę LC-DAD, dobre rozdzielanie 5 pochodnych piperazyny (BZP, MDBP, pFBP, mCPP i TFMPP) uzyskano w stosunkowo krótkim czasie ok. 20 min, osiągając czułość rzędu nano- i mikrogramów. Podobnie jak metoda LC-MS, metoda LC-DAD została zwalidowana zgodnie z wytycznymi dla metod bioanalitycznych. Ciekawym etapem była optymalizacja fazy ruchomej, która finalnie umożliwiła oznaczanie zarówno pochodnych benzylopiperazyny jak i fenylopiperazyny w jednej próbce, przy użyciu pentedronu jako wzorca wewnętrznego.

W obydwu metodach zastosowano prostą procedurę izolacji analitów z materiału biologicznego poprzez ekstrakcję acetonitrylem ze środowiska zasadowego i filtrację z użyciem filtrów

membranowych. Skuteczność obydwu opracowanych metod potwierdzono poprzez przeprowadzenie analizy rzeczywistych próbek materiału biologicznego pobranego od pacjenta (surowica, moczu).

Opracowane metody mogą się uzupełniać w badaniach nad piperazynami, ale też mogą być stosowane niezależnie. Prosta procedura opracowania próbek biologicznych i krótki czas analiz chromatograficznych daje możliwość dostosowania metodyki badawczej do rutynowych analiz toksykologicznych. Dodatkowo potwierdzono, że próbki moczu mogą okazać się próbkami z wyboru przy identyfikacji związków z grupy NSP należących do piperazyn.

Opracowana metoda LC-MS może być z powodzeniem zastosowana do identyfikacji i oznaczeń ilościowych pochodnych piperazyny u pacjentów z podejrzeniem zatrucia, zarówno w przypadkach ostrych jak i przewlekłych. Opracowana metoda LC-DAD może być przydatna do analizy materiału biologicznego, ale też innych próbek, np. płynów, proszków, tabletek, które zostały zabezpieczone w punkcie sprzedaży czy u pacjenta. Obie zaproponowane metody mogą być przydatne w sytuacjach wymagających analitycznego potwierdzenia zatrucia pochodnymi piperazyny i mogą być pomocne w diagnostyce oraz w postępowaniu terapeutycznym dotyczącym zatruc tą grupą związków. Dodatkowo zaletą przedstawionych metod jest możliwość ich wykorzystania w przyszłości do monitorowania innych pochodnych piperazyn występujących jako metabolity leków o podobnej budowie.

Zaprezentowane wyniki wnoszą więc nowe informacje do nauki i stanowią cenny wkład w rozwój badań toksykologicznych oraz farmaceutycznych zmierzających w efekcie końcowym do lepszego diagnozowania i leczenia pacjentów, a być może także ograniczenia dostępności tego typu związków na rynku.

Nadesłana do oceny praca doktorska liczy 109 stron. Zawiera autoreferat, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz 3 artykuły naukowe opublikowane w języku angielskim. Artykuły pochodzą z uznanych czasopism o współczynniku wpływu wynoszącym sumarycznie 10,714 i sumie punktów MEiN równej 320.

Tekst autoreferatu został podzielony w sposób typowy dla prac naukowych na rozdziały, a następnie na podrozdziały, co porządkuje przedstawiane treści i ułatwia ich lekturę. Na wstępie Autorka opisuje pochodne piperazyny stosowane jako NSP oraz metody chromatograficzne opisane w piśmiennictwie, odpowiednie do analizy związków z grupy pochodnych piperazyny. Następnie Doktorantka omawia główny cel pracy oraz 7 celów szczegółowych i zaplanowane etapy pracy. Część teoretyczna jest napisana czytelnie i przejrzysto, w sposób ukierunkowany na główny temat pracy. Całość jest spójna i zrozumiała, cel pracy sformułowany jasno i czytelnie, a przedstawione etapy jego realizacji

są logicznie zaplanowane. W kolejnych częściach: wyniki, dyskusja oraz wnioski Autorka omawia wyniki przeprowadzonych eksperymentów, rozszerzając zakres informacji przedstawionych w poprzednich rozdziałach autoreferatu. Opis jest poprawny, czytelny i przemyślany. Wnioski bezpośrednio wynikają z wyników uzyskanych podczas przeprowadzonych doświadczeń, są czytelnie sformułowane i wnoszą element nowości zarówno do nauki, jak i do praktyki. Bibliografia załączone do autoreferatu zawiera 38 pozycji artykułów naukowych ułożonych w kolejności ich cytowania w autoreferacie, z czego 32 pozycje ukazały się w ciągu ostatnich 10 lat. Następnie zamieszczono spis tabel i rycin, wydruki 3 prac będących podstawą pracy doktorskiej (P1-P3), oświadczenia współautorów publikacji włączonych do cyklu oraz dokument potwierdzający zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie opisanych badań.

Udział Doktorantki w powstaniu prezentowanych prac jest wiodący, we wszystkich trzech pracach jest pierwszym autorem. Jej udział dotyczył opracowania warunków analiz, zbierania materiału biologicznego, wykonania analiz chromatograficznych, walidacji metod, opracowania i interpretacji wyników, przygotowania i korekty manuskryptów oraz pełnienia roli autora korespondencyjnego, co w pełni spełnia kryteria włączenia publikacji wieloautorskich do cyklu przedstawionego jako rozprawa doktorska.

Z obowiązku Recenzenta zwróciłam uwagę na kilka nieścisłości, głównie o charakterze edytorskim, które przedstawiam poniżej.

1. Z punktu widzenia kompletnej walidacji nowych procedur analitycznych, bardzo istotny jest parametr specyficzności metody. W związku z tym, sprawdzenie rozdziału w proponowanych warunkach chromatograficznych także dla innych związków często zażywanych łącznie z pochodnymi piperazyny wydaje się być istotne ze względu na możliwość interferencji pików, szczególnie w metodzie LC-DAD. Czy były podejmowane próby w tym zakresie, poza użyciem pentedronu jako wzorca wewnętrznego?
2. Niektóre skróty zostały potraktowane zbyt ogólnie, np. QC tłumaczone jako kontrola jakości. W piśmiennictwie tym skrótem określa się próbki kontrolne przygotowane do celów walidacyjnych i odnoszące się do różnych stężeń analitu w zakresie krzywej kalibracyjnej. Ten kontekst dotyczy również prezentowanej dyzertacji. W związku z powyższym, kolejne skróty takie jak QC, LQC, MQC i HQC powinny być tłumaczone jako próbki kontrolne oraz próbki kontrolne o niskim, średnim i wysokim stężeniu analitu.

3. Niektóre stwierdzenia czy określenia zawarte w tekście wydają się być pewnymi skrótami myślowymi, np.:

-str. 14

„Po krótkim okresie poprawy nastroju i zwiększonej aktywności organizmu następuje dłuższy etap wyczerpania neurochemicznego.” *Co oznacza określenie wyczerpanie neurochemiczne?*

-str. 15

„Zaproponowane do tej pory metody z użyciem LC-MS, GC-MS i LC-DAD zwykle nie dotyczyły bezpośrednio pochodnych piperazyny.” *Jak należy rozumieć określenie zwykle nie dotyczyły, czy piśmiennictwo obejmuje takie metody czy nie?*

-str. 21

„Zrealizowane badania dotyczące analizy pochodnych piperazyny z grupy „designer drugs” pozwoliły na uzyskanie wielu parametrów charakteryzujących budowę i właściwości chemiczne związków”. *O jakie parametry tutaj chodzi?*

-str. 24

„Zaprezentowane widma UV-VIS różnią się od siebie i cechy te zostały wykorzystane do potwierdzenia obecności badanych związków w materiale biologicznym”. *O jakie cechy tutaj chodzi?*

-str. 30, 31

„...uzyskując wysoki poziom ufności wyników”. *Czy chodzi o wiarygodność wyników?*

Te nieliczne uwagi i/lub sugestie mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie umniejszają osiągnięć Doktorantki. Jestem przekonana, że wszystkie badania zostały wykonane rzetelnie, z możliwie największą starannością. W zakresie edytorskim, praca jest napisana starannie, dobrym językiem, w syntetycznym przejrzystym układzie, jak napisałam powyżej.

Podsumowując pragnę podkreślić, że oceniana dysertacja wywiera bardzo pozytywne wrażenie. Doktorantka wykazała się niezbędnymi kompetencjami do przeprowadzenia opisanych badań, tj. umiejętnością planowania i przeprowadzania doświadczeń, posługiwania się nowoczesnymi metodami analitycznymi oraz prezentowania wyników swoich badań w formie publikacji naukowych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest oparta o publikacje w czasopiśmie o znaczącej wartości współczynnika wpływu i wnosi istotne elementy nowości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Jednocześnie posiada bardzo wyraźny charakter aplikacyjny. Stwierdzam więc, że prezentowana praca spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r., poz. 478), a zatem może być podstawą do nadania stopnia naukowego

doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.
W związku z powyższym przedstawiam Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu wniosek o dopuszczenie mgr Anny Welz do dalszych etapów postępowania mającego na celu nadanie stopnia naukowego doktora.

Lublin, 22.07.2022

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Leków
Gumieniczek
Prof. dr hab. Anna Gumieniczek