



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735



Białystok, 31.12.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Elżbiety Marii Gniazdowskiej pt. „Opracowanie nowych metod bioanalitycznych
oraz optymalizacja sposobu ich walidacji”

zrealizowanej w Zakładzie Chemii Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz
Laboratorium Analityki Farmaceutycznej Sekcji Farmakokinetyki Sieci Badawczej Łukasiewicz

Pojawiające się w ostatnich latach epidemie, wzrost ilości zachorowań na choroby cywilizacyjne, indywidualizacja terapii, rozwój leków generycznych, opracowywanie nowych formułacji, skracanie okresu wprowadzania nowych leków do obrotu wymuszają konieczność opracowywania nowych metod bioanalitycznych, które umożliwią pełną weryfikację bezpieczeństwa i efektywności działania leków. Ponadto rosnące wymagania wobec przemysłu farmaceutycznego w zakresie troski o środowisko naturalne spowodowało wprowadzanie zasad zielonej chemii, co więcej spowodowało wyodrębnienie „zielonej chemii analitycznej” - opracowania praktyk laboratoryjnych bardziej przyjaznych dla środowiska. Kolejnym czynnikiem wymuszających badania nad nowymi metodami bioanalitycznymi jest konieczność opracowania metod uwzględniających oprócz badań jakościowych i ilościowych substancji czynnej, także jej metabolitów. Pomiary stężeń metabolitów mają kluczowe znaczenie także dla bezpieczeństwa produktów leczniczych już stosowanych przez pacjentów.

Obecnie walidacja metod bioanalitycznych wykonywana jest zgodnie z wytycznymi Europejskiej Agencji Leków (EMA) lub Amerykańskiej Agencji ds. Leków i Żywności (FDA), a dokumentowana według zasad Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP). W odpowiedzi na postulat harmonizacji na poziomie międzynarodowym zaleceń dotyczących walidacji metod bioanalitycznych, w 2019 roku powstał projekt wytycznej ICH M10, opracowany przez



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

Międzynarodową Radę Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ICH).

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Elżbiety M. Gniazdowskiej pt. „Opracowanie nowych metod bioanalitycznych oraz optymalizacja sposobu ich walidacji” doskonale wpisuje się w te innowacyjne trendy badań nad opracowaniem innowacyjnych podejść bioanalitycznych.

Badania zawarte w rozprawie wykonano pod kierownictwem znakomitej specjalistki z zakresu bioanalizy farmaceutycznej – dr hab. n. farm. Joanny Giebułtowicz w Zakładzie Chemii Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Laboratorium Analityki Farmaceutycznej Sekcji Farmakokinetiki Sieci Badawczej Łukasiewicz. Promotorem pomocniczym rozprawy jest dr Katarzyna Buś-Kwaśnik. Doktorat wykonano w ramach projektu badawczego realizowanego w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy” DW/03/2019.

Oceniana rozprawa doktorska ma formę zbioru opublikowanych, powiązanych tematycznie pięciu prac. Jest on poprzedzony opisem, na który składają się: Wykaz publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, Spis treści, Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie, Streszczenie w języku angielskim, Wprowadzenie, Założenia i cel badań, Piśmiennictwo. Kolejnymi rozdziałami są kopie prac zawartych w rozprawie, Podsumowanie i wnioski, Oświadczenia współautorów, Wykaz innych publikacji naukowych, Wykaz doniesień zjazdowych oraz Wykaz innych aktywności naukowych Doktorantki.

Wyniki badań Doktorantki opublikowano w pięciu pełnotekstowych, spójnych tematycznie publikacjach wieloautorskich. We wszystkich mgr E. M. Gniazdowska jest pierwszym autorem. Prace te opublikowano w latach 2020-2023 w specjalistycznych, recenzowanych czasopismach o łącznym współczynniku wpływu IF 17,134, punktacji MEiN 460. Pani Magister przedstawiła oświadczenia współautorów dotyczące ich udziału w publikacjach. Wynika z nich jednoznacznie, że udział mgr E. M. Gniazdowskiej w przygotowaniu prac był dominujący, gdyż obejmował m. in.: opracowanie koncepcji i metodologii badań, wykonanie



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

badan, analizę i interpretację wyników, wyciągnięcie wniosków, przygotowanie pierwszej wersji redagowanie i korektę manuskryptów.

Wstęp liczący 13 stron, opracowany na podstawie 41 pozycji literaturowych, w sposób syntetyczny przedstawia problematykę walidacji metod bioanalitycznych. Sposób przygotowania wstępu wskazuje na umiejętność Doktorantki posługiwania się literaturą naukową i wykorzystania jej do przygotowania celów badawczych. Literatura została prawidłowo dobrana, odzwierciedla aktualny stan wiedzy w zakresie tematyki doktoratu. Cytowanie dużej ilości prac świadczy o dobrej znajomości Doktorantki materiału z zakresu bioanalizy leków.

Jako założenia i cel badawczy mgr E.M. Gniazdowska wskazała opracowanie nowych metod bioanalitycznych oznaczania substancji czynnych leków i/lub ich metabolitów w osoczu ludzkim, optymalizację wybranych testów walidacyjnych oraz ocenę stabilności długoterminowej wybranych substancji czynnych leków. Realizacja celu polegała na:

- opracowaniu metody oznaczania 21 substancji czynnych leków przeciwdepresyjnych w osoczu ludzkim za pomocą metody ekstrakcji w punkcie zmętnienia połączonej z chromatografią cieczową i tandemową spektrometrią mas,
- opracowaniu metody oznaczania dutasteredu i jego metabolitów w osoczu ludzkim, oraz ocenie stabilności tego API w osoczu ludzkim po trzech latach od momentu pobrania próbek w klinice,
- optymalizacji liczby próbek kontroli jakości w teście stabilności podczas walidacji metody,
- ocenie wpływu kolejności analizy próbek w teście wpływu matrycy podczas walidacji metody,
- ocenie stabilności aripiprazolu w osoczu ludzkim po siedmiu latach od momentu pobrania próbek w klinice,
- analizie zmian wprowadzonych w wytycznej ICH M10, dotyczącej walidacji metod bioanalitycznych oraz analizie próbek z badania, w porównaniu z wytyczną FDA oraz EMA.



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

Zadania wskazane przez Doktorantkę nie budzą wątpliwości i w sposób jasny określają kierunek badawczy. Zaproponowane badania nad opracowaniem nowych metod bioanalitycznych są ważne zarówno z praktycznego jak i poznawczego punktu widzenia.

W ramach realizacji zaplanowanych badań Doktorantka opracowała modyfikację metody ekstrakcji w punkcie chmur (CPE). Innowacyjna modyfikacja CPE obejmowała użycie octanu amonu jako czynnika poprawiającego stopień ekstrakcji próbki, jak również użycie etanolu zamiast acetonitrylu w celu zredukowania lepkości próbki i uczynienia metody bardziej przyjazną dla środowiska. Opracowana i zweryfikowaliśmy metoda CPE–LC–MS pozwala na jednoczesne oznaczanie 21 leków przeciwdepresyjnych we krwi, co może być przydatne w toksykologii klinicznej i sądowej. Wyznaczony zakres liniowości wynosił od 10 do 750 ng/mL ($r^2 > 0,990$). Ważną umiejętnością, którą wykazała się Doktorantka w trakcie realizacji powyższych badań jest wskazanie ograniczeń opracowanej metody, co świadczy o dojrzałości naukowej Kandydatki.

Kolejnym ważnym problemem naukowym rozwiązany przez Doktorantkę jest opracowanie metody analitycznej umożliwiającej oznaczanie dutasterydu i jego aktywnych metabolitów: 4'-hydroksydutasterydu, 6 β -hydroksydutasterydu i 1,2-dihydrodutasterydu w osoczu po pojedynczym podaniu 0,5 mg dutasterydu. Mgr E.M. Gniazdowska udowodniła także długoterminową stabilność dutasterydu w próbkach klinicznych. Dutasteryd był stabilny w trakcie przechowywania w zamrażarce przez maksymalnie 2 lata w próbkach klinicznych. Doktorantka wykazała, że w ciągu 1014 dni przechowywania (poniżej -65 °C) próbki zawierające dutasteryd można ponownie przeanalizować bez ryzyka uzyskania niewiarygodnych wyników. Wykorzystana przez Doktorantkę metoda spełnia wszystkie kryteria walidacyjne wymagane przez Europejską Agencję Leków dla metod bioanalitycznych.

Ważnym osiągnięciem Doktorantki jest także wyznaczenie optymalnej liczby próbek do testowania stabilności. Mgr. E.M. Gniazdowska przeprowadziła badania eksperymentalne, retrospektywne (264 przedziały ufności dotyczące stabilności dziewięciu leków podczas walidacji regulacyjnej metody bioanalitycznej) oraz teoretyczne (matematyczne). Uzyskała dane eksperymentalne dotyczące stabilności dla dwóch analitów - tramadolu i jego głównego



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

metabolitu (O-dezmetyl-tramadolu). Wykazała, że pięć powtórzeń jest optymalne do oceny stabilności analitu.

Z uwagi na szerokie wykorzystanie spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową w badaniach farmakokinetycznych i toksykokinetycznych, Doktorantka podjęła badania nad efektem matrycy na wiarygodność wyników ilościowych. Głównym celem badania było ustalenie, jakie zaprojektowanie eksperymentu - przeplatanie czy zestaw bloków – efektywniej pozwala na wykrywanie zmienności efektu matrycy. Wykorzystując metody chemometryczne: analizę głównych składowych i analizę dyskryminacyjną częściowych najmniejszych kwadratów zaobserwowała porównywalny, ale statystycznie różny efekt matrycy przy użyciu schematów przeplatanych i blokowych. Schemat przeplatany był bardziej wrażliwy na wykrywanie efektu matrycy niż schemat blokowy. Jako konkluzję Doktorantka wskazała konieczność wskazywania kolejności próbek, w celu zapewnienia powtarzalności eksperymentów.

Osiągnięciem Doktorantki wartym podkreślenia jest przygotowanie pracy pogładowej „Wytyczna ICH M10 – jednolite podejście do bioanalizy na całym świecie” w języku polskim. Praca ta stanowi podsumowanie wytycznych ICH w zakresie opracowywania metod bioanalitycznych. W 2022 roku Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ICH) ukończyła prace nad ostateczną wersją wytycznej ICH M10 będącą połączeniem wytycznych amerykańskich, europejskich, brazylijskich i japońskich. Dokument ten zawiera zasady przeprowadzania walidacji metod bioanalitycznych i dokumentowania wyników z badań klinicznych i nieklinicznych prowadzonych w większości krajów na całym świecie na potrzeby rejestracji produktów leczniczych. Publikacja Pani Doktor stanowi cenne kompendium wiedzy na temat metod bioanalitycznych dla pracowników wielu laboratoriów prowadzących badania w tym obszarze.

Streszczenia w języku polskim i angielskim, w pełni oddają treść rozprawy. Dysertacja została napisana starannie, poprawnym językiem w sposób jasny i zrozumiały nawet dla



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

czytelników nie będących specjalistami z zakresu analityki farmaceutycznej. Edytorska strona pracy nie budzi wątpliwości.

Rozprawę doktorską mgr Elżbiety M. Gniazdowskiej oceniam bardzo pozytywnie. Doktorantka zrealizowała założone cele badawcze. Wyniki badań zaprezentowane w jej rozprawie doktorskiej posiadają charakter aplikacyjny i dużą wartość poznawczą. Przeprowadzone przez nią badania bioanalityczne mają duże znaczenie w przemyśle farmaceutycznym i analizie leków.

Rozprawa doktorska mgr E. M. Gniazdowskiej prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki farmaceutyczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Pani Magister poza pracami zawartymi w dysertacji jest autorką dwóch kolejnych publikacji oraz czterech doniesień zjazdowych. Odbiła zagraniczny staż naukowy w ramach programu NAWA.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Elżbiety Marii Gniazdowskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dn. 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. Z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Elżbiety M. Gniazdowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne oraz wyróżnienie jej rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Miłtyk