
prof. dr hab. Tomasz Grabowski
Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
ul. Generała Józefa Hallera 107
80-416 Gdańsk

Gdańsk, 18.12.2023 r.



Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Gniazdowskiej pt.:

Opracowanie nowych metod bioanalitycznych

oraz optymalizacja sposobu ich opracowywania.

Recenzję opracowano zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz pismem Przewodniczącego Rady z dnia 07.11.2023 roku, w procedurze nadania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Bioanaliza oraz szeroko rozumiana analityka to obszar działań o kluczowym znaczeniu, dla utrzymania prawidłowej funkcji co najmniej trzech systemów jakości, związanych z pracami nad lekiem. Są to systemy GMP, GLP oraz GCP, określane często akronimem GxP. U podstaw regulacji związanych z pracami bioanalitycznymi leży więc jakość przyszłych produktów leczniczych oraz skuteczność prac nad kandydatami na leki. Patrząc z tej perspektywy, prace związane z optymalizacją metod bioanalitycznych oraz implementowaniem nowych koncepcji do istniejących regulacji jest działaniem niezwykle istotnym. Działania te w kontekście prac jakie prowadzi przemysł farmaceutyczny warunkują tworzenie i wprowadzanie na rynek leków w sposób powtarzalny i bezpieczny. To właśnie analityka oraz bioanalityka umożliwia przeprowadzenie oraz weryfikację wielu procesów wytwarzania a także wielu typów badań naukowych.

Zakres zasad stosowanych obecnie w bioanalizie złożonych matryc biologicznych takich jak krew, surowica, osocze, mocz, czy samych tkanek lub fragmentów organów od dawna nie jest już tylko domeną działań związanych z systemami jakości. Od wielu lat najlepsze czasopisma naukowe obejmujące swym zasięgiem szeroko rozumianą farmakologię czy toksykologię wymagają stosowania zasad przyjętych w celu ujednolicenia jakościowego bioanalizy *per se*. Należy przy tym przypomnieć że niektóre z systemów jakości takie jak GLP wprowadzone zostały właśnie ze względu niski poziom prac badawczych których

składową były prace bioanalityczne. Dzisiaj mamy pewność że właściwie opisane metody stosowane w bioanalityce są powtarzalne, możliwe do odtworzenia i weryfikowalne nawet po wielu latach od walidacji. Należy przy tym dodać że uregulowanie wielu zasad jakie należy stosować na przykład w procesie walidacji metod, nie zmniejszyło zainteresowania tematem. Obecnie szeroko znane bazy danych skupiające najlepsze światowe czasopisma naukowe indeksują rocznie nawet ≈ 1400 publikacji naukowych zawierających słowo 'bioanalytical' (NCBI, 2023). Na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat notujemy dziesięciokrotny wzrost tej wartości (z ok. 140 rocznie w roku 2003)!

W kontekście obecnych jak i przyszłych potrzeb środowiska naukowego, zarówno akademickiego jak i skupionego wokół działań *stricte* przemysłowych, zaproponowany temat pracy doktorskiej „Opracowanie nowych metod bioanalitycznych oraz optymalizacja sposobu ich opracowywania” uważam za uzasadniony. Nie ulega wątpliwości że podjęte zadania badawcze są aktualne, mają również ogromny potencjał aplikacyjny.

Oceniana rozprawa ma 145 stron maszynopisu w którym, w kolejności można wyróżnić stronę tytułową zawierającą tytuł rozprawy w języku polskim, stronę z informacją o słowach kluczowych, podziękowania, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, założenia i cel badań oraz piśmiennictwo. W kolejnych częściach odnajdujemy kopie opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład rozprawy wraz z materiałami publikowanymi w formie suplementu do pracy, podsumowanie i wnioski oraz oświadczenia wszystkich współautorów publikacji. Koniec pracy wieńczy wykaz innych publikacji naukowych, doniesienia zjazdowe oraz wykaz innych aktywności naukowych doktorantki.

Rozprawa autorstwa mgr Elżbiety Gniazdowskiej, jest dziełem napisanym na podstawie ciągu pięciu powiązanych tematycznie publikacji, w tym cztery z nich to publikacje oryginalne. We wszystkich mgr Elżbieta Gniazdowska jest pierwszym autorem, w większości jest również autorem korespondencyjnym. Należy zauważyć, że sumaryczny współczynnik wpływu przedstawionych prac jest bardzo wysoki i w przypadku każdej z prac oryginalnych wynosi > 3.0 .

Spis treści informuje o kolejności wszystkich elementów przedstawionej do oceny dysertacji. W wykazie stosowanych skrótów Autorka wyjaśniła większość skrótów stosowanych w dysertacji oraz dołączonych publikacjach. Streszczenie w języku angielskim jest wiernym tłumaczeniem tekstu polskiego. Tekst streszczenia wprowadza do lektury

rozprawy we właściwy sposób. Prowadzi od uzasadnienia i celu poprzez zagadnienia metodyczne aż do wyjaśnienia osiągniętych rezultatów. Zachęca do zapoznania się z kolejnymi częściami dzieła i jest doskonałym wstępem do szerszego w swym zakresie Wprowadzenia.

Kilkustronicowe Wprowadzenie wraz z piśmiennictwem wyjaśnia podstawowe elementy związane z tematem zarówno od strony metodycznej, statystycznej, regulatorowej, jak i naukowej. Na przestrzeni 3.5 stronicowego tekstu wykorzystano aż 41 pozycji piśmiennictwa. Już na tym etapie widać doskonale przygotowanie Autorki do analizy referencji, zarówno *stricte* naukowych jak i wytycznych, oraz stosowania ich w przyjętym toku argumentacji. Nieliczne potknięcia są odzwierciedleniem skrótów myślowych stosowanych przez środowisko np.: „...od momentu pobrania w klinice.....”. Nie każda próbka jest pobierana jak należy się domyślać z kontekstu w trakcie badań zdefiniowanych jako badania kliniczne. W innym miejscu stwierdzenie „.... klinicznie istotne metabolity” jest nie do końca precyzyjnym tłumaczeniem z wytycznej FDA („*clinically relevant metabolites*”) słowo ‘*relevant*’ ma w tym wypadku znaczenie inne niż ‘*significant*’. Należałoby raczej tłumaczyć „metabolity istotne z punktu widzenia efektu klinicznego”. Na taki tok naprowadza kolejne stwierdzenie w wytycznej ‘*In such cases, sponsors can consider two approaches to assessing the effect of the drug metabolite.*’. We wstępie Autorka umieściła dwa rysunki które do pewnego stopnia ułatwiają rozumienie tematu. Na pewno bardzo korzystne byłoby umieszczenie dodatkowych schematów/rysunków, szczególnie dla osób o mniejszym doświadczeniu, które chciałyby poszerzyć swoją znajomość tematu w trakcie lektury przedmiotowej rozprawy.

Pomijając nieliczne potknięcia, wstęp napisany został rzeczowo, w sposób zwięzły z użyciem fachowego języka. Poruszane zagadnienia zostały poparte odpowiednio dobranym bardzo szerokim piśmiennictwem. Tekst wstępu w sposób logiczny koresponduje z podjętą tematyką badawczą. Autorka doskonale porusza się w zawiłościach merytoryki związanej z bioanalitiką. Doskonale prezentuje zależności pomiędzy zagadnieniami natury technicznej, naukowej oraz regulatorowej - wymogami agencyjnymi (FDA, EMA etc.). Świadczy to o doskonałym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do podjęcia tematu rozprawy.

Punkt drugi rozprawy precyzuje główny cel badań. W dalszej części określono w siedmiu podpunktach jak cel zrealizowano a dokładnie stwierdzono „Cel zrealizowany został poprzez:”. Tu wymieniono siedem podpunktów które we właściwy sposób opisują bieg prowadzonych prac. Wydaje się jednak, że dużo trafniejszym byłoby po prostu określenie tych podpunktów jako cele szczegółowe. Podsumowując, Autorka we wstępie oraz jasno wyrażonych celach w

pełni wyjaśniła dlaczego podjęła tematykę badawczą prezentowaną w dysertacji. Przedstawiony cel w sposób precyzyjny i rzeczowy ilustruje przedział jaki Autorka objęła prowadzonymi badaniami naukowymi.

Dysertacja dowodzi tego, że Doktorantka potrafi realizować prace naukowe w laboratorium, ale co niezwykle ważne, również skutecznie upowszechniać ich wyniki w wysokiej klasy, rozpoznawalnych czasopismach naukowych. Podstawą dysertacji są cztery prace oryginalne oraz jedna praca przeglądowa. Prace opublikowano w wysokiej klasy recenzowanych czasopismach: *Pharmaceuticals*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Molecules*, *Journal of Chromatography B*. Prace mają klasyczny układ. Przedstawiony do recenzji ciąg prac w pełni pokrywa treścią i zakresem postawiony w rozprawie cel. W sumie w ciągu prezentowanych publikacji Doktorantka cytuje ponad 170 pozycji piśmiennictwa. Na szczególne podkreślenie zasługuje biegłość z jaką posługuje się piśmiennictwem w postaci wytycznych agencji i organizacji takich jak EMA, FDA, WHO, ICH oraz wielu innych. Mało tego, rozprawa mimo że jest dziełem naukowym, z niezwykłą lekkością pokazuje świat zmian w wytycznych, zmian w podejściu do stanu technologii w zakresie bioanalitiky od strony szeroko rozumianych *regulatory affairs*. Z dużą sprawnością ilustruje również luki w harmonizacji wytycznych w skali światowej oraz ich wpływ na poziom prac bioanalitycznych.

Pierwsza praca pt.: „*Determination of Antidepressants in Human Plasma by Modified Cloud-Point Extraction Coupled with Mass Spectrometry*” stanowiąca podstawę rozprawy jest wręcz przykładem układu badawczego ukierunkowanego na rozwiązanie postawionego problemu. Opracowano i zwalidowano metodę oznaczania 21 substancji czynnych leków przeciwdepresyjnych w ludzkim osoczu za pomocą metody ekstrakcji w punkcie zmętnienia metodą chromatografii cieczowej z użyciem spektrometrii mas. Praca ma typowy układ zawiera liczne grafiki objaśniające uzyskane rezultaty. Na uwagę zasługuje ciekawe spojrzenie na wyniki przez pryzmat analizy PCA oraz parametrów wymienianych między innymi w regule Lipińskiego. Na uwagę zasługują także podsumowania ilustrujące analizy stabilności oraz podsumowanie dotyczące efektu matrycy. Tyko ta jedna praca to 25 stron tekstu który dla wielu młodych adeptów bioanalitiky może stanowić materiał szkoleniowy pozwalający na znaczne pogłębienie wiedzy. Potencjał aplikacyjny opublikowanej metody jest niepodważalny. Precyzyjny opis poszczególnych elementów optymalizacyjnych pozwala również na

wprowadzanie modyfikacji oraz rewalidowanie i optymalizację metody w kierunku innych substancji aktywnych.

Druga praca przedstawiona przez Autorkę dotyczy optymalizacji i walidacji metody oznaczania dutasterydu oraz jego kluczowych metabolitów w osoczu człowieka. Autorka przedstawiła w pracy nie tylko technologiczny ciąg, działania zmierzające do optymalizacji i przygotowania metody do fazy walidacji czy samą walidację. Autorka przedstawiła także dotychczas opublikowane metody oraz ich charakterystykę walidacyjną. Podobnie jak w poprzedniej pracy nie sposób nie docenić aplikacyjności zaproponowanej metody. Szczególnie istotne jest to że przedstawiona metoda pozwala prześledzić kinetykę dwóch metabolitów duasterydu. Metoda pozwala również na jej stosowanie w badaniach biorównoważności przy założeniu stosowanego obecnie poziomu dawkowania. Na uwagę zasługuje szczególne podejście do kwestii stabilności długoterminowej którą w tym wypadku wyznaczono w niezwykle szerokim zakresie aż 1014 dni. Podobnie jak w poprzedniej publikacji praca jest bogato ilustrowana. Zachowuje przy tym klarowność i czystość przekazu. Pewien niedosyt pozostawia analiza parametrów farmakokinetycznych którą ograniczono do analizy pola powierzchni pod krzywą, stężenia maksymalnego, czasu jego obserwacji oraz wartości okresu półtrwania w fazie eliminacji. W farmakometria podejście tego rodzaju nawet ograniczone do poziomu analizy niekompartimentowej (NCA) opisuje podanie jednorazowe leku znacznie szerszą gamą parametrów.

Trzecia z cyklu prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej dotyczy kwestii metodycznych i może w przyszłości stanowić istotny wkład w rozwój wytycznych. Autorka skupiła się na problematyce niedoprecyzowanej w obecnych regulacjach dotyczących walidacji metod bioanalitycznych. Praca wskazuje na potrzebę zmiany paradygmatów i odpowiada na pytanie ile *de facto* próbek/powtórzeń należałoby przeznaczyć w odniesieniu do próbek kontrolnych i badań stabilności. Jak wiadomo cała grupa badań stabilnościowych jest jednym z kluczowych elementów walidacji każdej metody bioanalitycznej. Niejednokrotnie brak informacji o stabilności długoterminowej analitu w badaniach klinicznych prowadzonych równoległe z procesem walidacji metod może stać się wąskim gardłem procesu. Może również pod znakiem zapytania postawić uzyskane wyniki. Właśnie dlatego proces ten powinien być w pełni kontrolowany również wyznaczonymi granicami dotyczącymi kryteriów akceptacji oraz metodologii. Tekst publikacji jest bogato ilustrowany. Na uwagę zasługują doskonale przygotowane ryciny które bez zbędnych dodatków w sposób przejrzysty i prosty ilustrują uzyskane wyniki. Badania retrospektywne które przeprowadziła Autorka pokazują niezwykle perspektywę i przekonują do postawionych wniosków. Ponownie sam temat jak i jego

realizacja dowodzi dużej dojrzałości w analizie tematu i wskazuje jednocześnie na bogate doświadczenie Doktorantki w rozumieniu i weryfikacji obecnych zasad walidacji metod. Wkład analizowanej publikacji w rozumienie i rozwijanie obecnego *state of the art* w bioanalityce jest niezwykle istotny. Autorka doskonale wychwyciła luki obecne w wytycznych do których stosuje się nie tylko przemysł ale cały świat naukowy.

Czwarta z analizowanych publikacji dotyczy również ciekawego problemu naukowego podobnie jak w przypadku publikacji nr 3. Również i w tym wypadku Autorka z dużym wyczuciem zlokalizowała istotną lukę w regulacjach dotyczących metod bioanalitycznych oraz procesu walidacji. Tym razem skupiła się na zasadach dotyczących analizy efektu i wpływu matrycy na wynik. Przetestowano kilka podejść wychodząc ze schematu blokowego i naprzemiennego analizy próbek. Jednocześnie poddano weryfikacji podejście dotyczące liczby próbek lipemicznych lub hemolitycznych na etapie walidacji. To niezwykle wrażliwy obszar weryfikujący metodę analityczną w odniesieniu do zmienności składu oraz jakości próbek które trafiają do laboratorium. W pracach Autorki przewija się istotna informacja która leży u podstaw co najmniej kilku istotnych wniosków i propozycji rozwiązań. Próbkę walidacyjną osocza nie reprezentują zmienności która często może być wypadkową nawet tysięcy różnych źródeł próbki. W związku z tym zmienność osobnicza, wady związane z hemolizą, obecnością wytrąconego włókna, lipemicznością próbki nie są na etapie walidacji badane wystarczająco precyzyjnie. Na uwagę zasługuje również dyskusja wątku związanego z testowaniem stabilności w krwi pełnej. Dzisiaj gdy nasza wiedza na temat dystrybucji wielu leków do wnętrza erytrocytów jest znaczna temat ten jest szczególnie interesujący. Podobnie jak w poprzednich pracach poziom oprawy graficznej i przekaz budowany właśnie tą drogą zdecydowanie zasługuje na wyróżnienie. Konkluzje z pracy można stosować wprost w walidacji metod bioanalitycznych. Uzasadnienie podejścia proponowanego przez Autorkę jest bardzo szerokie i nie pozostawia pola do dyskusji.

Piąta z prezentowanych prac jest swego rodzaju podsumowaniem elementów prac poprzednich. Sumuje i konkluduje obecny stan procesu harmonizacji wytycznych w zakresie walidacji metod bioanalitycznych. Praca po raz kolejny dowodzi szerokiej perspektywy Autorki. Po raz kolejny Autorka trafnie wskazuje luki w obecnych wytycznych w tym zharmonizowanym dokumencie ICH M10. Publikacja stanowi ciekawą klamrę zamykającą ciąg zaprezentowanych prac i jednocześnie wskazującą na kolejne elementy wymagające głębszej dyskusji i weryfikacji.

Podsumowując opis prac zaprezentowany w publikacjach świadczy o dużym doświadczeniu oraz samodzielności Doktorantki w zakresie optymalizacji metod chromatograficznych, a także praktycznych umiejętnościach w pracy ze złożonymi matrycami biologicznymi. Z przedstawionego materiału jasno wynika, że Doktorantka doskonale opanowała warsztat badawczy. Prace które włączono do analizowanego cyklu wymagały dużego zaangażowania, ukierunkowania, konsekwencji i naukowej rzetelności.

Detale wyników oraz szczegółowa dyskusja dostępna jest w załączonych do rozprawy publikacjach. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała siedem szczegółowych wniosków, które w pełnej rozciągłości korespondują z postawionymi w rozprawie celami.

Począwszy od strony 117 Autorka w postaci załączników dołączyła oświadczenia współautorów publikacji będących podstawą omawianej dysertacji. W oświadczeniach Autorka dysertacji wyraziła zgodę sobie samej na wykorzystanie poszczególnych prac jako część swojej własnej rozprawy doktorskiej. Takie stwierdzenie w Jej wypadku nie znajduje uzasadnienia.

Lektura rozprawy jest niezwykle inspirująca, zachęca również do dyskusji oraz postawienia kilku pytań Doktorantce:

Pytanie 1. Przy założeniu pełnej harmonizacji wymogów i wskazówek, w jakich elementach wytycznych dotyczących walidacji metod bioanalitycznych zdecydowanie powinniśmy oczekiwać jednak podejścia *case by case*.

Pytanie 2. Proces walidacji metod analitycznych jest bardzo zbliżony zarówno w odniesieniu do klasycznych syntetycznych leków jak i leków biotechnologicznych. Co Pani zdaniem znacząco różnicuje problematykę walidacji (lek syntetyczny *versus* lek biotechnologiczny) w kontekście składu próbki surowicy pochodzącego z badania klinicznego.

Pytanie 3. Jakie wyzwania widzi Pani w kontekście walidacji metod ukierunkowanych na oznaczanie poziomu biomarkerów, jak ocenia Pani obecny poziom regulacji i harmonizacji wymogów w tym zakresie.

Przytoczone wyżej uwagi, głównie natury porządkującej lub redakcyjnej, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy. Dlatego uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska, **mgr Elżbiety Gniazdowskiej pod tytułem: „Opracowanie nowych metod bioanalitycznych oraz optymalizacja sposobu ich opracowywania”**, w pełni odpowiada warunkom ujętym w Art. 187 Ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Elżbietę Gniazdowską do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na względzie osiągnięcia naukowe Doktorantki, publikowane w prestiżowych czasopismach naukowych, wnioskuję o wyróżnienie wymienionej wyżej dysertacji.

TOMASZ GRABOWSKI
2023-12-18



prof. dr hab. Tomasz Grabowski