



Gdański Uniwersytet Medyczny
KATEDRA BIOFARMACJI
I FARMAKODYNAMIKI

Medical University of Gdańsk
DEPARTMENT OF BIOPHARMACEUTICS
AND PHARMACODYNAMICS

Prof. dr hab. dr h.c. Roman Kaliszan, czł. rzeczn. PAN

tel. (48)(58) 3491493 fax: (48)(58) 3491962

ul. Gen. J. Hallera 107, PL80-416 Gdańsk

e-mail: roman.kaliszan@gumed.edu.pl

Gdańsk, 2015-06-18

Recenzja

pracy doktorskiej **mgr. Joanny Ronowicz** pt. *Wykorzystanie metod chemometrycznych w analizie produktów pochodzenia roślinnego oraz realizacji koncepcji Quality by Design w technologii farmaceutycznej*

Chemometria jest metodą matematycznego (statystycznego) przetwarzania danych analitycznych, pozwalającą na „wyłuskanie” z licznych i złożonych zbiorów maksimum istotnej, systemowej informacji o substancjach i produktach złożonych, ich właściwościach i skutkach interakcji z otoczeniem. Chemometria rozwinęła się dzięki upowszechnieniu w laboratoriach naukowych komputerów. Obecnie, metody i procedury chemometryczne są mniej czy bardziej rutynowo wykorzystywane przy opracowywaniu różnorodnych danych pomiarowych, jak również do optymalizacji eksperymentów i procedur technologicznych. Komisja Farmakopei Europejskiej (PHARMEUROPEA) i Europejska Agencja do spraw Produktów Leczniczych (EMA) podają zalecenia Dobrej Praktyki Chemometrycznej w odniesieniu do projektowania i interpretacji wyników farmaceutycznych prac badawczo-rozwojowych, procesu wytwarzania preparatów leczniczych oraz bieżącej kontroli jakości produktu farmaceutycznego. W tę tematykę świetnie wpisuje się dysertacja doktorska mgr Joanny Ronowicz, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Budzisz (promotor pomocniczy dr n. farm. Bogumiła Kupcewicz) na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Recenzowana praca doktorska ma nowoczesny układ koncepcyjny i redakcyjny. Jej podstawę stanowią cztery oryginalne, eksperymentalne prace pełnotekstowe, opublikowane w czasopismach posiadających tzw. *Impact Factor* (IF). Sumaryczny IF tych prac wynosi 6 punktów. W każdej z czterech prac składowych doktoratu mgr Joanna Ronowicz jest pierwszą autorką i niewątpliwie wniosła do tych prac większościowy wkład (z oświadczeń autorskich

wynika, że wkład ten wyniósł 55-60-% i obejmował zarówno koncepcję pracy jak wykonanie doświadczeń, interpretację wyników i przygotowanie publikacji). Nie ma powodów, by obawiać się, że znakomity wkład naukowy Doktorantki w dysertację jest przeszacowany. Wystarczy zauważyć, że Jej całociowy dorobek publikacyjny obejmuje współautorstwo pięciu dalszych prac pełnotekstowych oraz 13 komunikatów sympozjalnych, w tym plakatu wyróżnionego na Konferencji Naukowej „Nowoczesne techniki badawcze stosowane w analizie farmaceutycznej i biomedycznej” w Bydgoszczy w 2014 r. O wyróżniających kwalifikacjach naukowych i zawodowych Doktorantki świadczy dodatkowo udział w 6 projektach badawczych wykonanych w ramach współpracy z instytucjami gospodarczymi, odbyte dwa staże w przedsiębiorstwach (razem przez 9 miesięcy), oraz trzy akademickie kursy szkoleniowe z zakresu chemometrii, chemii obliczeniowej i monitorowania badań klinicznych. Doktorantka zdołała już zdobyć dwa granty MN dla młodych naukowców. Niewątpliwie słusznie za swoje dotychczasowe dokonania została uhonorowana w 2013 r. zespołowym wyróżnieniem Rektora UMK w Toruniu. Te dokonania, obok oryginalnej dysertacji, zasługują na wyróżnienie doktoratu Joanny Ronowicz, o co wnioskuję niezależnie.

W ramach doktoratu mgr Joanna Ronowicz, za pomocą zaawansowanych metod chemometrycznych, zbadała propozycje składu recepturowego nowego preparatu farmaceutycznego - zawiesiny z węglem aktywnym, oznaczyła warunki procesu wytwarzania peletek metodą ekstruzji i sferonizacji oraz zaproponowała oryginalną procedurę oceny jakości dwóch leczniczych wyciągów roślinnych, pochodzących z surowców *Ginkgo biloba* i *Camelia sinensis*.

Nowy preparat, zawiesina z węglem aktywnym, jawi się szczęśliwie ostatnio jako nietrywialny. Chociażby ze względu na zastosowanie praktyczne w przypadkach przedawkowania nowoczesnych preparatów przeciwzakrzepowych typu riwaroksaban. Doktorantka opracowała skład recepturowy proponowanej zawiesiny. Do tego celu najpierw zdefiniowała tzw. krytyczny atrybut jakościowy (CQA), wybrała plan doświadczenia i wykonanie postaci leku. Opracowała metodę chromatograficzną oznaczania zdolności adsorpcyjnej aktywnego składnika preparatu i przy jej pomocy określiła wpływ zastosowanych substancji pomocniczych. Ujęła to w kategoriach ilościowych wyprowadzając odpowiednie równanie regresji wielokrotnej i warstwiczny wykres powierzchni odpowiedzi. Zaproponowane przez Doktorantkę plany dla mieszanin (*Mixture Design*) pozwoliły na optymalizację składu zawiesiny węgla aktywnego zgodnie z koncepcją „jakości zapewnianej przez planowanie” (*Quality by Design*) w odróżnieniu od standardowej, nieefektywnej koncepcji „jakości zapewnianej przez wykonywanie analiz” (*Quality by Testing*).


Drugie rozwiązane w pracy doktorskiej zagadnienie chemometryczne z zakresu technologii postaci leku dotyczyło optymalizacji metody produkcji peletek z zastosowaniem procesów ekstruzji i sferonizacji. W tym przypadku przetwarzane chemometrycznie były dane odnośnie do składu jakościowego i ilościowego badanych formułacji, a także parametrów procesowych i współczynnika kształtu (zbliżonego do kulistego) uzyskanych peletek, opisane przez Mendyka i in. (pozycja piśmiennictwa numer 85). W analizie chemometrycznej Autorka wykorzystwała algorytm drzew decyzyjnych CART (*Classification and Regression Trees*). Udało się wypracować reguły decyzyjne poprzez wskazanie najistotniejszych technologicznych czynników warunkujących kształt peletek, takich jak szybkość obrotów sferonizatora, liczba otworów w ekstruderze czy zawartość wody w masie ekstrudacyjnej. Natomiast nie stwierdzono znaczącego wpływu substancji pomocniczych na kształt peletek. Ta część doktoratu ma charakter badań retrospektywnych. Uzyskane w oparciu o racjonalne metody chemometryczne reguły decyzyjne potwierdzają obserwacje oryginalnych eksperymentatorów (Mendyk i in. [85]) i potwierdzają, że podejście *Quality by Design* może i powinno zastąpić przy opracowywaniu technologii postaci leku żmudne i kosztowne podejście *Quality by Testing*.

W dwóch z czterech prac składowych doktoratu mgr Joanna Ronowicz skupiła się na chemometrycznej ocenie jakości preparatów leczniczych pochodzenia roślinnego. Jest to wyzwanie, przed którym stoi współczesna farmacja ze względu na coraz liczniejsze próby fałszowania leków, zwłaszcza złożonych i pochodzenia naturalnego. W jednej z ocenianych w ramach dysertacji doktorskiej prac Autorka badała wyciągi z liści *Ginkgo biloba*, a w drugiej liście lub wyciągi z liści *Camelia sinensis*. Najpierw prowadziła analizę typu „odcisk palca” (*fingerprint*) chromatogramów preparatów, oznaczanych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w tzw. odwrotnym układzie faz. Wykazała się w biegłością w zakresie współczesnych metod separacyjnych. Także sprawność analityka wykazała Doktorantka opracowując metodę spektrofotometryczną oznaczania polifenoli w badanych ekstraktach. Wartościowe są też biochemiczne oznaczenia właściwości przeciwutleniających ekstraktów. Własne dane eksperymentalne poddała Doktorantka analizie chemometrycznej, mającej na celu określenie podobieństwa badanych ekstraktów. Zastosowała algorytmy segmentacji bezwzorcowej. Analiza składników głównych (PCA – *Principal Component Analysis*) i inne hierarchiczne i niehierarchiczne metody grupowania obiektów (preparatów roślinnych) dobrze różnicowały produkty lecznicze od tzw. suplementów diety, jeśli chodzi o aktywność przeciwutleniającą. Z kolei, w oparciu o tzw. *fingerprints*, analizowane metodą drzew decyzyjnych, można było jednoznacznie różnicować tę aktywność między poszczególnymi próbkami preparatów roślinnych. Potwierdza to możliwość identyfikacji zafalszowań farmaceutycznych.

Maszynopis rozprawy zredagowany jest starannie, w sposób skondensowany, ale ze zrozumieniem przedstawianych treści. Biegłość Doktorantki w zakresie stosowanych różnorodnych metod chemicznej analizy instrumentalnej, zawansowanych metod i procedur chemometrycznych, a także umiejętność wykorzystania profesjonalnego oprogramowania komputerowego i sprawnego planowania i redagowania prac naukowych zasługuje na uznanie.

W tekście pracy nie znalazłem znaczących usterek. Jedyne w wersji anglojęzycznej streszczenia zginęło ostatnie zdanie. Gwoli ścisłości, stwierdzenie na str. 11, wiersz 21, że „różne odmiany polimorficzne tej samej substancji czynnej mogą wykazywać różną rozpuszczalność” nie jest termodynamicznie uprawnione, aczkolwiek „szybkość rozpuszczania” może rzeczywiście być różna. Jeśli wolno mi wyrazić swoją opinię o danych przedstawionych na cytowanej Ryc. 1, to są one może i efektywne, ale absolutnie arbitralne. Nie radziłbym w nie wierzyć.

Uważam, że oceniana praca doktorska jest bardzo wartościowa i spełnia ustawowe wymogi stawiane dysertacjom na stopień doktora nauk farmaceutycznych. Wnioskuje zatem do Pana Dziekana i Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie p. mgr Joanny Ronowicz do publicznej obrony tez przedstawianych w recenzowanej dysertacji. Oddzielnie dołączam do recenzji wniosek o wyróżnienie Doktorantki.



Prof. dr hab. Roman Kaliszan
Czł. rzecz. PAN