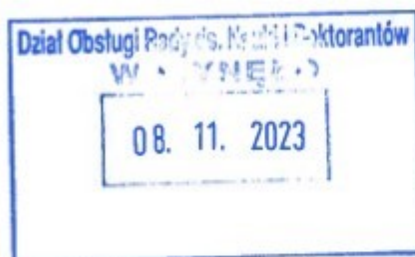


Prof. dr hab. Anna Gumieniczek
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 08.11.2023



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Arkadiusza Kocura

z tytułu: „Terapeutyczne monitorowanie stężeniem takrolimusu i kwasu mykofenolowego z zastosowaniem mikropróbkowania objętościowo-absorpcyjnego połączonego z techniką LC-MS/MS u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki”

Recenzowana rozprawa została wykonana w Zakładzie Chemii Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pana dr hab. Tomasza Pawińskiego jako promotora oraz Pani dr Doroty Marszałek jako promotora pomocniczego. Praca została wykonana przy udziale pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki leczonych w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie. Jednocześnie część badań została wykonana przy wykorzystaniu infrastruktury wymienionego Instytutu, a także infrastruktury Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest przykładem połączenia badań analitycznych z bardzo ważną z punktu widzenia klinicznego oceną stężenia leków immunosupresyjnych u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki, w ramach terapeutycznego monitorowania leków (TML). Utrzymanie stężenia leków immunosupresyjnych w zakresie terapeutycznym zapewnia optymalne wyniki przeszczepiania czyli skutecznie zapobiega odrzuceniu przeszczepu, przy ograniczeniu występowania działań niepożądanych. Jest to jeden z najważniejszych czynników w opiece nad dziećmi po przeszczepie nerki z uwagi na trudny dobór optymalnych dawek leków, interakcje z wieloma lekami powszechnie stosowanymi w populacji pediatrycznej oraz brak przestrzegania zaleceń lekarskich. W ostatnich latach dąży się do uproszczenia oraz automatyzacji metod pobierania materiału biologicznego jak również metod oznaczania odpowiednich analitów. Obserwowane trendy są szczególnie ważne przy pobieraniu, przechowywaniu i transporcie próbek, a także obróbce materiału biologicznego przed właściwą analizą. Najbardziej krytyczną częścią procesu analitycznego może być wybór odpowiedniej metody pobierania próbek. Autor jako hipotezę badawczą postawił tezę, iż stosunkowo nowa technika mikropróbkowania objętościowo-absorpcyjnego (VAMS) może być zastosowana do optymalizacji terapii immunosupresyjnej jako równoważna, lub w pewnych aspektach nawet lepsza, od metod stosowanych obecnie, np. techniki suchej plamki krwi. Badane w pracy próbki do VAMS zapewniają dokładne pobieranie małych objętości materiału, umożliwiają też pobieranie materiału w warunkach domowych. Pobranie krwi włośniczkowej z opuszki palca jest proste i praktycznie bezbolesne, a pobrany w ten sposób materiał jest stabilny po wyschnięciu przez co najmniej kilka tygodni, nie wymaga szczególnych warunków przechowywania i może być wysłany dowolną drogą do laboratorium analitycznego. Dzięki temu możliwe jest częstsze pobieranie materiału i przesyłanie go do ośrodka referencyjnego

oddalonego znacznie od miejsca zamieszkania małych pacjentów. Technika VAMS wydaje się też obiecująca z uwagi na prostą ekstrakcję analitów i prostotę kolejnych etapów przygotowania i przeprowadzenia właściwej analizy.

Wiadomo, że TML powinno być prowadzone za pomocą czułej, szybkiej, selektywnej i dokładnej techniki ilościowej, np. wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Jak wynika z informacji podanych przez Doktoranta jest to metoda uznawana za referencyjną w oznaczeniach takrolimusu (TAC) i kwasu mykofenolowego (MPA). Wiadomo też, że ponad połowa laboratoriów stosuje tę technikę w rutynowych oznaczeniach poziomów stężeń leków immunosupresyjnych. Główną zaletą tej metody jest wysoka selektywność i czułość oraz możliwość jednoczesnej analizy wielu leków połączona ze znacznym ograniczeniem objętości analizowanych próbek. Z tego powodu, badania prowadzone w ramach niniejszej pracy miały na celu oznaczanie TAC i MPA przy użyciu opracowanych i zwalidowanych metod LC-MS/MS u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki, w tym oznaczania badanych leków w materiale pobranym metodą VAMS.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi cykl 2 prac oryginalnych i 1 pracy przeglądowej, co stanowi wystarczający zestaw publikacji do zamknięcia dysertacji. Ponadto rozprawa zawiera część opisową składającą się z wprowadzenia, celu pracy, metodologii, omówienia otrzymanych wyników i wniosków. Dołączona jest też analiza bibliometryczna prac włączonych do cyklu oraz pozostałych publikacji Doktoranta. Sumaryczna wartość współczynnika IF dla cyklu prac wynosi 15,40 (420 punktów MEiN), podczas gdy całkowity dorobek stanowią 4 kolejne publikacje, 8 doniesień naukowych na zjazdach krajowych i międzynarodowych oraz 6 recenzji publikacji dla czasopism branżowych. Należy także wspomnieć, że Doktorant był kierownikiem projektu „Młody badacz” finansowanego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny oraz wykonawcą w projekcie finansowanym przez „Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka”.

Pozostając przy ocenie formalnej niniejszej pracy, znaczący wkład naukowy Doktoranta w przedstawione badania nie budzi wątpliwości, gdyż we wszystkich publikacjach włączonych do cyklu jest pierwszym i jednocześnie w dwóch korespondencyjnym autorem. Wszyscy współautorzy złożyli oświadczenia, w których poświadczają, że ich wkład w poszczególne publikacje wynosi od 1 do 20%. Wkład Doktoranta wynosi 70 lub 80%, co stanowi istotną część powstałych prac. Doktorant przygotował koncepcję i metodologię badań, wykonał większość badań eksperymentalnych oraz opracował otrzymane wyniki i przygotował publikacje do druku.

Pierwsza publikacja z cyklu (P1) jest przeglądowym opracowaniem dotyczącym techniki zastosowania techniki VAMS w terapeutycznym monitorowaniu stężeniem leków immunosupresyjnych, co wprowadza czytającego w tematykę pracy i jednocześnie w pełni uzasadnia cel podjętych badań eksperymentalnych. Omówiono zalety i wady badanej techniki, która została wprowadzona w roku 2014, w zestawieniu do innych technik pobierania materiału biologicznego, czyli klasycznego pobrania krwi żyłnej oraz innych technik mikropóbkowania, np. techniki suchej plamki krwi. Praca przeglądowa jest interesująca i oparta na dobrze dobranym piśmiennictwie. Zawiera wyczerpujące omówienie poszczególnych procedur pobierania materiału do TML leków immunosupresyjnych takich jak takrolimus, cyklosporyna, sirolimus, ewerolimus i kwas mykofenolowy. Zwrócono uwagę na możliwość automatyzacji pobierania próbek z zastosowaniem techniki VAMS, a także na możliwość zastosowania tej techniki w domu pacjenta.

Publikacja nr 2 (P2) jest pracą oryginalną i dotyczy oznaczania takrolimu (TAC) u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki, przy użyciu techniki VAMS i metody LC-MS/MS. Bardzo ważną częścią pracy było opracowanie i walidacja metody ilościowej według standardów międzynarodowych w taki sposób, aby udowodnić równoważność tej nowej metody z rutynowo stosowanymi protokołami analitycznymi. W ramach zaplanowanych badań opracowano strategię pobierania materiału techniką VAMS, co wymagało wyedukowania pacjentów i personelu medycznego. Opracowano warunki suszenia pobranej mikroprobki i ekstrakcji TAC z próbki VAMS. Opracowano warunki metody LC-MS/MS, w tym dobór optymalnego standardu wewnętrznego, aby potwierdzić prawidłowość opracowanej metody oznaczania, przeprowadzono walidację krzyżową w ramach zastosowanych technik pobierania materiału, jak również walidację nowej metody przez porównanie z rutynowo stosowaną w Centrum Zdrowia Dziecka metodą chemiluminescencyjną oznaczania TAC. Ważnym aspektem była ocena efektu hematokrytowego przez porównanie stężenia TAC w próbkach krwi tętniczej i żyłnej przy klasycznym pobraniu materiału do badania. Potwierdzono możliwość wymiennego stosowania obydwu technik oraz zaproponowano algorytm umożliwiający przeliczanie otrzymanego stężenia TAC z użyciem techniki VAMS na estymowane stężenie TAC oznaczone przy użyciu rutynowo stosowanej metody chemiluminescencyjnej.

Publikacja nr 3 (P3) jest również pracą oryginalną i dotyczy oznaczania kwasu mykofenolowego (MFA) u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki leczonych takrolimusem i kwasem mykofenolowym, przy użyciu techniki VAMS i metody ilościowej LC-MS/MS. Podobnie jak w publikacji P2, bardzo ważną częścią pracy było opracowanie i walidacja opracowanej metody ilościowej według standardów międzynarodowych, w taki sposób, aby udowodnić równoważność tej nowej metody z rutynowo stosowanymi protokołami analitycznymi. Aby potwierdzić prawidłowość opracowanej metody oznaczania MFA przeprowadzono porównanie z rutynowo stosowaną w Centrum Zdrowia Dziecka metodą HPLC-DAD. Ponieważ MPA silnie wiąże się z białkami osocza, wskutek czego jego dystrybucja ogranicza się głównie do osocza, w niniejszej pracy uwzględniono oznaczanie MFA we krwi tętniczej, ale także we krwi żyłnej i w osoczu. Dużo uwagi poświęcono badaniu stabilności próbek pobranych metodą VAMS, a także oceniono efekt hematokrytowy. Potwierdzono możliwość wymiennego stosowania opracowanych metod z metodami stosowanymi rutynowo oraz zaproponowano algorytmy umożliwiające przeliczanie otrzymanego stężenia MFA w próbkach pobranych metodą VAMS na przewidywane stężenie MFA w osoczu. Ze względu na istotny wpływ efektu hematokrytowego zaproponowano także algorytm umożliwiający przeliczanie wyników otrzymanych metodą VAMS z uwzględnieniem indywidualnego poziomu hematokrytu u poszczególnych pacjentów.

Recenzent doktoratu stanowiącego cykl publikacji jest w uprzywilejowanej pozycji ze względu na fakt, iż prace włączone do cyklu przeszły już ocenę merytoryczną w trakcie przyjmowania publikacji do druku. Moja ocena pracy jest także wysoka, a do głównych osiągnięć Doktoranta zaliczam wielokierunkową walidację wszystkich opracowanych procedur według najnowszych wymogów w zakresie metod bioanalitycznych. Istotna jest także aplikacyjność opracowanych procedur i zastosowanie ich w rzeczywistych warunkach klinicznych. Jedyne uwagi, a właściwie pytania do Doktoranta wynikają z mojej ciekawości. Pierwsza to kwestia dostępności metody LC-MS/MS dla specjalistów zajmujących się terapią monitorowaną stężeniem w polskich klinikach. Czy jest szansa, aby LC-MS/MS zastąpiła metodę chemiluminescencyjną i metodę HPLC-DAD w przypadku

monitorowania stężeniem TAC i MFA? Po drugie, czy rozważano opracowanie metody jednoczesnego oznaczania badanych leków metodą LC-MS/MS ? I trzecia kwestia. W publikacji P1 wykazano, że pobieranie próbek techniką VAMS przez wykwalifikowany personel medyczny jest obarczone mniejszym błędem niż samodzielne pobranie przez pacjenta lub przy pomocy opiekuna. Jednocześnie zakłada się, że odpowiednie przeszkolenie pacjenta zapewnia ograniczenie tego błędu do minimum. Ciekawi mnie, czy próbowano włączyć do badań próbki pobrane techniką VAMS samodzielnie przez pacjentów lub ich opiekunów.

Powyższe pytania nie wpływają na moją ocenę recenzowanej pracy. Wynikają z ciekawości bo dotyczą bardzo ważnej grupy leków i ważnego problemu klinicznego. Być może Doktorant będzie niektóre z tych kwestii badał w kolejnych etapach swojej kariery naukowej?

Reasumując, rozprawa doktorska mgr farmacji Arkadiusza Kocura spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Arkadiusza Kocura do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

Lublin, 08.11.2023