



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

ul. Rokietnicka 5A
60-806 Poznań

tel. 61 6418366

e-mail: glowka@ump.edu.pl

prof. zw. dr hab. Franciszek Główka

Poznań, 15 listopada 2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Bodnar-Broniarczyk: *Dystrybucja takrolimusu podczas monitorowanej terapii immunosupresyjnej u pacjentów po przeszczepieniach narządowych*, w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Mgr chemii Magdalena Bodnar-Broniarczyk rozprawę doktorską wykonała w Zakładzie Chemii Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr. hab. n. farm. Tomasza Pawińskiego. Promotorem pomocniczym był dr n. farm. Paweł Kunicki. Jednostką doktoryzującą jest Warszawski Uniwersytet Medyczny, poprzez Radę Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne.

Rezultaty badań stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w trzech oryginalnych pełnotekstowych pracach, w uznanych czasopismach naukowych o cyrkulacji międzynarodowej.

1. M. Bodnar-Broniarczyk, Tomasz Pawiński, Paweł Kunicki. *Isotope-labeled versus analog internal standard in LC-MS/MS method for tacrolimus determination in human whole blood samples – A compensation of matrix effects*. J. Chromatogr. B, 2019, 1104, 220-227.
2. M. Bodnar-Broniarczyk, M. Durlik, T. Bączkowska, K. Czerwińska, R. Marszałek, T. Pawiński *Kidney and Liver Tissue Tacrolimus Concentrations in Adult Transplant Recipients—The Influence of the Whole Blood and Tissue Concentrations on Efficiency of Treatment during Immunosuppressive Therapy*. Pharmaceutics 2021, 13, 1576.
3. M. Bodnar-Broniarczyk, K. Warzyszyńska, K. Czerwińska, D. Marszałek, N. Dziewa, M. Kosieradzki, T. Pawiński, *Development and Validation of the New Liquid*

Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Unbound Tacrolimus in the Plasma Ultrafiltrate of Transplant Recipients. Pharmaceutics, 2022, 14, 632.

Czasopisma, w których zostały opublikowane wyżej wymienione prace naukowe posiadają znaczące współczynniki IF, a sumaryczna ich wartość wynosi 15,646, wg punktacji MEiN 270 pkt. Należy uznać opublikowanie trzech prac wchodzących w rozprawę doktorską z tak wysokim współczynnikiem oddziaływania za sukces publikacyjny doktorantki i zespołu.

Rozprawa doktorska, której podstawę stanowi cykl trzech publikacji ze współautorstwem mgr Magdaleny Bodnar-Broniarczyk, została przygotowana w układzie przyjętym dla tego typu prac. Na początku podany został tytuł rozprawy w języku polskim, informacja, że rozprawa doktorska jest w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne oraz, że została przygotowana na podstawie cyklu trzech publikacji. W dalszej kolejności doktorantka zamieściła słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, które podobnie jak tytuł wskazują na farmakokinetyczno-bioanalityczną tematykę rozprawy. Podany został zwięzłe spis treści, a następnie jak najbardziej zasadny wykaz stosowanych skrótów oraz ich wyjaśnienie w języku polskim. Zamieszczone są też skróty z rozwinięciem tylko w języku angielskim np. CSs czy MQC. Korekty wymaga wyjaśnienie TAC LCPT. Proponuję w miejsce *lek hybrydowy* podać: *preparat o przedłużonym uwalnianiu takrolimusu*. Doktorantka zamieściła też spis trzech pełnotekstowych prac z jej udziałem jako pierwszego autora, które zostały opublikowane w czasopismach naukowych i stanowią podstawę rozprawy doktorskiej. Tym samym doktorantka wypełniła wymogi zawarte w art. 186. 1.3. ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 2018 r. Należy podkreślić, że w ostatniej pracy opublikowanej w Pharmaceutics, w 2022 r. jest już autorem korespondencyjnym, co potwierdza jej znaczącą już pozycję naukową, również w ocenie promotora, dr. hab. Tomasza Pawińskiego. W części teoretycznej doktorantka zawarła istotne informacje dotyczące badanego leku. Omówiła znaczenie takrolimusu w skuteczności podtrzymania przeszczepienia narządów, głównie wątroby i nerek. Podkreśliła konieczność terapeutycznego monitorowania tego leku immunosupresyjnego w kontekście

skuteczności leczniczej jak i bezpieczeństwa jego stosowania. Omówiła znaczenie odpowiednio czułych, dokładnych, wysoce selektywnych i powtarzalnych metod analitycznych w celu monitorowania leku zarówno we krwi jak i tkankach silnie ukrwionych w celu zapobieżenia odrzuceniu przeszczepionego narządu. Zaznaczyła problem dużej zmienności farmakokinetyki w całym procesie losów leku w ustroju, wskazując jako przyczynę uwarunkowane genetycznie różnice w aktywności enzymów metabolizujących lek. Trafnie zwróciła uwagę na zagrożenia wynikające z małych jak i dużych poziomów takrolimusu w kontekście odrzucenia przeszczepionego narządu jak i działań nefrotoksycznych. Czytelnie zaprezentowała mechanizm działania inhibitorów kalcyneuryny. Wyjaśnienia wymaga jednak sformułowanie zawarte w rozprawie: *TAC docierając do komórek nabłonka jelitowego jest metabolizowany przez CYP3A5, a następnie wyrzucany z powrotem przez Pgp do światła jelita*. Cytowany fragment w mojej ocenie pochodzi z przeglądowej pracy Ilony Kurnatowskiej *Optymalizacja leczenia takrolimusem po przeszczepieniu nerki* opublikowanej w czasopiśmie Forum Nefrologiczne 2020,13, 128-137. W spisie piśmiennictwa nie zauważyłem jednak, żeby ta praca była cytowana przez doktorantkę.

Interesująco i ze znanstwem przedstawiła zagadnienie stosowania leków immunosupresyjnych w terapii po przeszczepieniu narządów. Wskazała na stopniowe zmniejszanie dawki leków immunosupresyjnych w okresie po przeszczepieniu. Istotnym problemem, na który doktorantka zwróciła uwagę są interakcje w fazie farmakokinetycznej takrolimusu i cyklosporyny z innymi lekami przyjmowanymi przez chorych. Zwróciła też uwagę na istotne różnice w dawkach takrolimusa podawanych drogą dożylną i pozanaczyniową, podając jako przyczynę mniejszą, a przy tym bardzo zmienną biodostępność takrolimusu podawanego pozanaczyniowo. Ze szczególną uwagą zapoznałem się z zagadnieniami tak ściśle związanymi z bezpieczeństwem i efektywną farmakoterapią, a mianowicie z terapeutycznym monitorowaniem takrolimusu. Stosowany od ponad dwudziestu lat takrolimus plasuje się na czele stawki leków monitorowanych stężeniem we krwi. Trwają nadal poszukiwania parametru, który lepiej niż poziom $C(0)$ w pełnej krwi odzwierciedlałby indywidualną odpowiedź chorego na stosowane leczenie i pozwolił na najbardziej optymalny dobór dawki leku. Zatem podjęcie badań mających na celu opracowywanie selektywnej i czulej metody oznaczania frakcji wolnej takrolimusu oraz procedur analitycznych pozwalających na

oznaczanie bardzo niskich poziomów tego leku w przeszczepianych narządach, rzędu ng/ml a nawet pg/ml, stały się jednym ze znaczących i uzasadnionych celów rozprawy doktorskiej M. Bodnar-Broniarczyk. Dużą część pracy poświęciła przeglądowi metod wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) oznaczania takrolimusu w pełnej krwi. Interesującym jest fakt, że w tych licznie prezentowanych pracach jako wzorzec wewnętrzny stosowano wyłącznie askomycynę, analog takrolimusu bądź deuterowany takrolimus. Takie też wzorce wewnętrzne stosowano w pracach z udziałem doktorantki, dotyczących głównie zagadnień bioanalitycznych takrolimusu. Temat *Dystrybucja takrolimusu podczas monitorowanej terapii immunosupresyjnej u pacjentów po przeszczepieniach narządowych* wskazuje na farmakokinetyczne zagadnienia rozprawy, jednak tak nie jest, o czym można się przekonać w dalszej części rozprawy, gdzie jednoznacznie wskazano, że „*Celem przeprowadzonych badań było opracowanie i walidacja metod analitycznych (LC-MS/MS) umożliwiających oznaczenie stężenia takrolimusu w zróżnicowanych matrycach jako narzędzia do oceny dystrybucji leku w różnych kompartmentach.* Zatem sądzę, że temat rozprawy powinien odzwierciedlać aspekt bioanalityczny.

Opublikowane prace będące przedmiotem rozprawy doktorskiej przeszły pozytywnie etap weryfikacji w recenzowanych czasopismach, stąd moja ocena pozostanie bardziej formalnością, tym nie mniej odniosę się do ich treści. Wszystkie trzy publikacje odnoszą się do zagadnień opracowywania metod bioanalitycznych oznaczania ilościowego takrolimusu. Praca opublikowana w *J. Chromatogr. B* (2019) obejmuje opracowanie i walidację metody LC-MS/MS oznaczania leku w próbkach pełnej krwi z zastosowaniem dwóch wzorców wewnętrznych, deuterowanego takrolimusu i askomycyny, wzorców powszechnie stosowanych w metodach chromatograficznych dotyczących oznaczania takrolimusu w matrycach biologicznych. Lek oznaczano w stosunkowo małych, bo 0,25 ml próbkach krwi, co jest istotne ze względów bioetycznych. Zakres krzywej wzorcowej obejmował stężenia 0,5-20 ng/ml. Przydatność metody sprawdzono w warunkach *in vitro*, przez oznaczanie takrolimusu w próbkach, do których był uprzednio wstrzykiwany oraz próbkach testowanych w międzynarodowych badaniach walidacyjnych. Na tym etapie zabrakło jeszcze potwierdzenia przydatności metody do oznaczania leku w próbkach klinicznych,

pobranymi od pacjentów leczonych takrolimusem. Należy pokreślić skrupulatne przeprowadzenie analizy pozostałych parametrów walidacyjnych metody LC-MS/MS takich jak selektywność metody, efekt przeniesienia, liniowość, granicę oznaczalności, dokładność i precyzję, krótko długoterminową stabilność analitów w przechowywanych próbkach oraz w podajniku. Ponadto oceniony został efekt matrycy. Nie podano jednak odzysku metody. Badania podsumowano stwierdzeniem przydatności askomycyny jako wzorca wewnętrznego równoważnego znakowanemu izotopowo takrolimusowi.

Istotnym rozwinięciem badań bioanalitycznych takrolimusu z bardzo znaczącym, bo 60% udziałem Doktorantki było opracowanie metod oznaczania takrolimusu w tkance nerkowej i wątrobowej u chorych po przeszczepieniu tych narządów. Oznaczeń ilościowych analitu doktorantka dokonywała za pomocą techniki chromatograficznej LC-MS/MS. Doktorantka brała też udział w optymalizacji i walidacji metody LC-MS/MS oraz izolacji i oznaczaniu takrolimusu w próbkach tkanki wątrobowej i nerkowej chorych po przeszczepieniu narządów. Brała też aktywny udział w przygotowaniu manuskryptu do czasopisma naukowego *Pharmaceutics*. Istotnym wnioskiem wynikającym z badań Doktorantki mogącym mieć implikacje kliniczne było stwierdzenie braku istotnej korelacji między dawką leku, a stężeniem w przeszczepionych tkankach oraz stężeniem C(0) we krwi a poziomami w tkance wątrobowej i nerkowej. Uzyskane wyniki nie znalazły odzwierciedlenia w istniejących danych literaturowych, o czym autorzy publikacji wyraźnie informują. Zwraca uwagę oznaczenie bardzo niskiego, 10 pg/mg poziomu leku w próbkach tkanek, co można uznać za znaczące osiągnięcie analityczne doktorantki.

Etapem wieńczącym cykl publikacji jest praca opublikowana również w *Pharmaceutics*. Zadania badawcze koncentrują się na istotnym zagadnieniu jakim jest oznaczanie frakcji niezwiązanej takrolimusu z białkami osocza. Niewątpliwie ta praca stanowi wysokie osiągnięcie badawcze zarówno w aspekcie zastosowanej metodyki, oznaczania bardzo niskich poziomów analitu w matrycy biologicznej w zakresie liniowości 0,1-20 pg/ml jak i praktycznego jej zastosowania do oznaczeń frakcji niezwiązanej takrolimusu w próbkach po ultrafiltracji pobranych od chorych po przeszczepieniu nerki jak i wątroby. Dwuetapowa metoda przygotowania próbek osocza poprzez odbiałczanie a następnie ekstrakcję ciec-ciecz pozwoliła na uzyskanie ekstraktów o odpowiedniej czystości, pozwalającej na oznaczenie niskich poziomów takrolimusu obok związków

endogennych osocza. Metoda z powodzeniem była stosowana do oznaczania poziomów niezwiązanego z białkami takrolimusu u chorych po przeszczepieniu narządów, co podkreśla niewątpliwie jej aplikacyjny charakter. Należy zaznaczyć, że wyniki badań zostały czytelnie przedstawione w postaci tabel i wykresów oraz załączono liczne chromatogramy. Omówienie oraz dyskusja wyników prowadzona jest w dojrzały sposób, w oparciu o najnowsze dane literaturowe, a wyciągnięte wnioski odzwierciedlają wyniki badań. Jednak zaleciłbym bardziej sprecyzowane ujęcie wniosków, bez ponownego zamieszczania wyników badań. Bogato jest prezentowane piśmiennictwo specjalistyczne, w większości są to publikacje z ostatnich 10 lat. W spisie piśmiennictwa uzupełnienia wymaga pozycja 18, brakuje danych autorów i tytułu publikacji. Prawdopodobnie będzie to praca: Calcineurin Inhibitors: 40 Years Later, Can't Live Without ...Jamil R. Azzi, Mohamed H. Sayegh and Samir G. Mallat. J Immunol, December 15, 2013,191(12) 5785-5791.

Na przeprowadzenie badań z udziałem chorych uzyskano zgody Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym .

Podczas czytania pracy znalazłem fragmenty, które w mojej ocenie wymagają poprawienia. Odnosząc się do stylu pisania rozprawy, proponuję zmienić niektóre sformułowania. Zamiast używać *we krwi pełnej*, proponuję *we krwi* albo *w pełnej krwi* . Wyrażenie „Ponad to” jest wg mnie użyte w znaczeniu „oprócz tego” powinno być zapisane łącznie, str. 63

Wniosek 4. z drugiej publikacji „ Nie stwierdzono korelacji między dawką, krwi C(0) i stężeniem TAC w tkankach” wymaga doprecyzowania. str.73

Zamiast podać *rpm* (obroty na minutę), poprawnie jest podawać w całym tekście rozprawy jak i publikacjach, *x g* (siła przyciągania)

Wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Magdaleny Bodnar-Broniarczyk stanowią istotny wkład w poznanie zależności pomiędzy poziomami takrolimusu we krwi i w tkankach przeszczepianych narządów, nerki i wątroby i mogą istotnie przyczynić się do uzyskania parametru farmakokinetycznego, który będzie wyraźnie wskazywał na zależność między poziomem leku, a ryzykiem odrzucenia przeszczepienia. Przyczyniłoby się to z pewnością do uzyskania lepszych efektów przeszczepienia narządów i zwiększyłoby bezpieczeństwo chorych. Należy też

podkreślić, że badania prowadzone przez mgr Magdalenę Bodnar-Broniarczyk jak i uzyskane wyniki wpisują się jednoznacznie w dyscyplinę nauki farmaceutyczne. Rozprawa posiada nowatorski charakter w zakresie opracowywania nowych metod oceny dyspozycji takrolimusu we krwi i tkankach przeszczepianych narządów oraz ocenie frakcji niezwiązanej takrolimusu i jest dużym osiągnięciem badawczym, ze względu na możliwość selektywnego oznaczania bardzo niskich poziomów leku. Opracowanie czułej i selektywnej metody oznaczania ilościowego leków immunosupresyjnych w płynach ustrojowych jak i tkankach u chorych ludzi po przeszczepieniu narządu jest niezwykle trudnym i odpowiedzialnym zadaniem analitycznym, z którego rozwiązaniem Kandydatka do stopnia doktora bardzo dobrze sobie poradziła. Doskonale opanowała warsztat analityczny stosując w badaniach bardzo czułą i selektywną technikę LC-MS/MS, która oprócz bardzo dużych możliwości analitycznych jest techniką niezwykle wymagającą umiejętności i wiedzy analitycznej zwłaszcza, gdy matryca jest złożona jak w przypadku próbek biologicznych. Poczynione uwagi zawarte w tekście recenzji nie umniejszają istotnie wartości merytorycznej rozprawy.

Podsumowując uważam, że mgr Magdalena Bodnar-Broniarczyk wywiązała się z założonych celów badawczych osiągając bardzo dobre efekty badawcze jak i publikacyjne, a potwierdzeniem tego są prace opublikowane w czasopiśmie naukowych o cyrkulacji międzynarodowej. Biorąc pod uwagę znaczące i nowatorskie osiągnięcia naukowe doktorantki stwierdzam, że rozprawa spełnia wymagania ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. i na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Magdaleny Bodnar-Broniarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Katedry i Zakładu
Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Prof. dr hab. Franciszek Główka