

Lublin, 08.08.2022

Prof. dr hab. Anna Gumieniczek

## OCENA

pracy doktorskiej mgr Beaty Gralak-Dąbrowskiej

pt. „Farmakokinetyczne monitorowanie inhibitorów proteazy w terapii antywirusowej”

Wydział Farmaceutyczny

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Praca doktorska mgr Beaty Gralak-Dąbrowskiej została przygotowana w Zakładzie Chemii Leków Wydział Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. Tomasza Pawińskiego i dotyczy terapeutycznego monitorowania terapii antywirusowej z użyciem inhibitorów proteazy, tj. lopinawiru lub lopinawiru w połączeniu z sakwinawirem oraz darunawiru. Zadania szczegółowe polegały na opracowaniu wiarygodnych, szybkich i ekonomicznych metod ilościowego oznaczania wymienionych leków, następnie na oznaczeniu tych leków w osoczu pacjentów i przeprowadzeniu analizy farmakokinetycznej oraz dokonaniu porównań służących optymalizacji prowadzonych terapii antywirusowych.

Terapia antyretrowirusowa jest zalecana u wszystkich pacjentów zakażonych wirusem HIV, niezależnie od poziomu limfocytów T CD4+, w celu zmniejszenia częstości występowania zakażeń oportunistycznych oraz związanej z tym śmiertelności, a także w celu zapobiegania przenoszenia się wirusa HIV. Rozpoczęcie terapii jest uwarunkowane akceptacją przez pacjenta zaistniałej sytuacji, zobowiązaniem się przez niego do rygorystycznego przestrzegania zaleceń lekarskich i stosowania zaleconych leków do końca życia. Jednocześnie należy wziąć pod uwagę ewentualną konieczność zmiany terapii w trakcie leczenia, głównie ze względu na niepowodzenie pierwotnie wybranej terapii, działania niepożądane stosowanych leków, występowanie u pacjenta innych chorób czy stanów, np. ciąży. W celu poprawy skuteczności i bezpieczeństwa terapii antywirusowej może być wykorzystane terapeutyczne monitorowanie leczenia (TML). Jest ono szczególnie istotne dla leków z grupy inhibitorów proteazy i nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (NNIRT). Kryteria, które kwalifikują terapię antywirusową do monitorowania to między innymi potwierdzona korelacja pomiędzy stężeniem leku a jego skutecznością i/lub toksycznością, a także zmienność międzyosobnicza u poszczególnych pacjentów w reakcji na dane leki. Stosowanie TML

w terapii antyretrowirusowej może mieć także znaczenie przy występujących zaburzeniach pracy wątroby czy nerek czy stanach szczególnych, np. u pacjentek w ciąży. Jak jednak wskazują dotychczasowe dane, losowe pomiary stężeń leków u pacjentów nie zawsze korelują ze stanem klinicznym pacjentów. Najbardziej celowe jest więc monitorowanie w sytuacji niepowodzeń terapeutycznych czy występowania działań niepożądanych. Dodatkowo, leki z grupy inhibitorów proteazy i NNIRT wykazują dużą zmienność w zakresie parametrów farmakokinetycznych takich jak  $C_{\min}$  czy  $C_{\max}$ . Tak więc, wdrożenie TML i zestawianie oznaczanych stężeń leków z parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi umożliwia optymalizację dawki stosowanego leku oraz zapobieganie wystąpieniu lekooporności.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę zostały wykonane we współpracy z Wojewódzkim Szpitalem Zakaźnym w Warszawie. Celem nadrzędnym było prowadzenie TML u pacjentów leczonych w tej placówce. W związku z powyższym jestem przekonana, że cel pracy postawiony przez Doktorantkę jest bardzo ważny, a przeprowadzone badania mają znaczenie zarówno teoretyczne jak i praktyczne.

Nadesłana do oceny praca doktorska liczy 159 stron. Zawiera wykaz stosowanych skrótów, spis rycin, spis tabel oraz część teoretyczną i część doświadczalną. Część teoretyczna obejmuje między innymi wstęp, gdzie podano najważniejsze informacje dotyczące wirusa HIV, klasyfikację zakażeń wirusem HIV, schematy leczenia antyretrowirusowego i stosowane grupy leków. Do części teoretycznej zaliczam także wydzielony rozdział dotyczący terapeutycznego monitorowania leczenia, w którym Doktorantka opisuje cele terapii monitorowanej oraz warunki, które rekomendują konieczność takiego postępowania. Z opisanych wcześniej zagadnień jasno wynikają założenia prezentowanej pracy i jej cele szczegółowe. Jak wiadomo, wdrożenie TML wymaga stosowania dokładnych, czułych i precyzyjnych procedur analitycznych pozwalających na wiarygodny pomiar stężeniu leku w materiale pobranym od pacjenta. Jak wynika z analizy piśmiennictwa przygotowanej przez Doktorantkę metodami z wyboru wykorzystywanymi w TML w leczeniu antywirusowym są metody chromatograficzne, LC-UV oraz LC-MS. Dlatego w celu prowadzenia TML w ramach niniejszej pracy wykorzystano metodę HPLC z detekcją spektrofotometryczną oraz opracowano prostą metodykę ekstrakcji oznaczanych leków z próbek krwi. Metody te okazały się wystarczająco czułe, dokładne i precyzyjne, a jednocześnie nie wymagały skomplikowanej aparatury, były stosunkowo szybkie i ekonomiczne.

Biorąc pod uwagę szczegółowe cele analityczne, do zadań Doktorantki należało opracowanie metody jednoczesnego oznaczania sakwinawiru i lopinawiru oraz metody oznaczania darunawiru, w osoczu pacjentów poddanych odpowiednim terapiom antywirusowym.

W kolejnym etapie zaplanowano obliczenia wybranych parametrów farmakokinetycznych, tj.  $C_{min}$ ,  $C_{max}$  oraz AUC dla sakwinawiru i lopinawiru, wyznaczenie profili farmakokinetycznych dla sakwinawiru, lopinawiru i darunawiru, a także wyznaczenie przedziałów terapeutycznych stężeń darunawiru i zaproponowanie optymalnego wskaźnika prognostycznego dla skutecznej terapii tym lekiem. Jako wskaźniki kliniczne zostały uwzględnione takie parametry jak poziom wirerii, poziomy limfocytów CD4+ oraz CD8+, a także wiek i płeć pacjentów oraz współistniejące infekcje.

Wspomniana część teoretyczna jest napisana czytelnie i przejrzysto, w sposób ukierunkowany na główny temat pracy. Całość jest spójna i zrozumiała, a cele pracy sformułowane jasno i precyzyjnie. Z punktu widzenia chemii leków, szczególnie wartościowe wydaje mi się zebranie informacji na temat współcześnie stosowanych leków antyretrowirusowych, w tym najnowszych opcji terapeutycznych. W części doświadczalnej Autorka omawia zastosowane procedury, a następnie wyniki przeprowadzonych eksperymentów, rozszerzając zakres informacji przedstawionych w poprzednich rozdziałach pracy. Opis jest poprawny i czytelny z wykorzystaniem dużej liczby wykresów i tabel. W dyskusji wyników pewną trudność może sprawiać czytającemu rozróżnienie wyników własnych Doktorantki od danych z piśmiennictwa, ale zdaję sobie sprawę, że nie jest łatwo dokonywać takich porównań, biorąc pod uwagę dużą liczbę cytowanych prac. Piśmiennictwo załączone do pracy obejmuje aż 233 pozycje. Trzeba podkreślić, że Doktorantka włożyła dużo pracy, aby przeanalizować tak dużą liczbę publikacji i odnieść je do własnych wyników.

W prowadzonej dyskusji stwierdzenia Doktorantki wynikają bezpośrednio z wyników uzyskanych podczas przeprowadzonych doświadczeń, a jednocześnie Doktorantka jest świadoma pewnych niedoskonałości czy ograniczeń w zastosowanych procedurach. W tym miejscu chciałabym jednak poprosić o doprecyzowanie niektórych zapisów ze str. 125. Czy czułość opracowanych przez Doktorantkę metod nie zawsze była wystarczająca, czy objętość próbki pobranej od pacjentów powinna być większa? Proszę także o komentarz do konkluzji nr 4 z tej samej strony. Podsumowując ostatni rozdział pracy proszę także o doprecyzowanie niektórych wniosków ze str. 126 i 127, a mianowicie:

-czy wyznaczono profile 12- czy 24-godzinne

-w jaki sposób potwierdzono skuteczność terapii z użyciem populacyjnej średniej wartości stężenia darunawiru.

Do mocnych stron prezentowanej pracy należy zaliczyć zebranie i czytelne opracowanie współczesnej wiedzy na temat leków antyretrowirusowych oraz wykorzystania terapii monitorowanej w celu optymalizacji leczenia antyretrowirusowego. W zakresie badań

eksperymentalnych należy podkreślić, że opracowane przez Doktorantkę metody HPLC były stosunkowo proste, ekonomiczne, selektywne i szybsze niż podobne prace opublikowane w piśmiennictwie. Oceniając formalną stronę pracy należy też wspomnieć, że zamieszczono w niej dokument potwierdzający zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie opisanych badań z udziałem pacjentów oraz streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, spełniając kolejne wymogi redakcyjne i formalne.

Z obowiązku Recenzenta zwróciłam uwagę na kilka nieścisłości w tekście pracy, głównie o charakterze edytorskim, które przedstawiam poniżej.

1. W zakresie walidacji mam uwagę dotyczącą oznaczania precyzji i dokładności. Wyniki zamieszczone w odpowiednich tabelach dotyczą innych stężeń niż te opisane w procedurze przygotowania roztworów kontrolnych (str. 56 i 72 dla lopinawiru oraz sakwinawiru; a następnie str. 63 i 74 dla darunawiru).

2. W grupie pacjentów leczonej lopinawirem dodatkowo była stosowana lamiwudyna i abakawir. W pracy podano informację o potwierdzonej selektywności opracowanych metod ilościowego oznaczania. W jaki sposób potwierdzono brak interferencji ze strony tych dwóch dodatkowych leków, czyli lamiwudyny i abakawiru?

Jednocześnie w pracy nie znalazłam podobnej informacji w odniesieniu do rytonawiru, który również był podawany pacjentom we wszystkich stosowanych schematach leczenia. Czy brano pod uwagę możliwość wykrywania tego związku w materiale pobranym od pacjentów?

3. W niektórych tabelach wkradła się literówka w skrócie oznaczającym medianę.

4. Rycina 14: w legendzie brak oznaczenia kolorów dla dwóch pacjentów.

Te nieliczne uwagi i/lub sugestie mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie umniejszają osiągnięć Doktorantki. Jestem przekonana, że wszystkie badania zostały wykonane rzetelnie, z możliwie największą starannością. W zakresie edytorskim, praca jest napisana starannie, dobrym językiem, w przejrzystym układzie, o czym napisałam powyżej. Wykonana praca może być bardzo cennym źródłem informacji dla członków zespołów terapeutycznych zajmujących się leczeniem pacjentów z infekcją HIV. Zaprezentowane wyniki wnoszą więc nowe informacje do nauki i stanowią cenny wkład w rozwój badań farmaceutycznych zmierzających w efekcie końcowym do lepszego diagnozowania i leczenia pacjentów z infekcją HIV.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że oceniana dysertacja wywiera bardzo pozytywne wrażenie. Doktorantka wykazała się niezbędnymi kompetencjami do przeprowadzenia opisanych badań, tj. umiejętnością planowania i przeprowadzania doświadczeń, posługiwania się właściwymi metodami analitycznymi oraz prezentowania

wyników swoich badań. Przedstawiona do recenzji praca doktorska wnosi elementy nowości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, a jednocześnie posiada bardzo wyraźny charakter aplikacyjny. Stwierdzam więc, że prezentowana praca spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789), a zatem może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Beaty Gralak-Dąbrowskiej do dalszych etapów postępowania mającego na celu nadanie stopnia naukowego doktora.

Lublin, 08.08.2022

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Chemii Leków  
*Gummaurzel*  
Prof. dr hab. Anna Gumieniczek