



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej

Prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska

Wrocław, 25.08.2022 r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Beaty Gralak-Dąbrowskiej
pt. „Farmakokinetyczne monitorowanie inhibitorów proteazy w terapii
antyretrowirusowej”

wykonanej pod kierunkiem Promotora dr hab. Tomasza Pawińskiego
w Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Podstawę opracowania recenzji stanowiło pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – Prof. dr hab. n. farm. Grzegorza Nałęcz-Jaweckiego z dnia 23.06.2022 r. oraz przekazana rozprawa doktorska.

Ocena wyboru tematu

Przez wiele lat dawkowanie leków opierało się na metodzie „prób i błędów” tzn. po podaniu określonej dawki śledzono odpowiedź kliniczną organizmu. Przy braku efektu była ona stopniowo zwiększana, obserwowane niepożądane działania skłaniały do jej zmniejszenia. Utrzymujący się brak oczekiwanego działania stanowił powód zmiany terapii. Przy czym należy pamiętać, że zróżnicowanie odpowiedzi terapeutycznej po podaniu tej samej dawki leku różnym pacjentom może być uwarunkowane czynnikami biometrycznymi, genetycznymi, czy patologicznymi. Jak wykazano dla niektórych leków istnieje udowodniona zależność między określonym zakresem ich stężeń we krwi a intensywnością efektu farmakologicznego. Powyższe stwierdzenie, a także rozwój nowoczesnych technik analitycznych doprowadziły do wprowadzenia do praktyki klinicznej terapii monitorowanej pomiarem stężenia leku we krwi. Postępowanie to, przy interpretacji oznaczonego stężenia w ścisłym powiązaniu ze stanem klinicznym pacjenta i wartościami jego badań laboratoryjnych, dostarcza cennych informacji służących ustaleniu zindywidualizowanego schematu dawkowania wybranych leków.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na korzyści wynikające z objęcia procesem terapeutycznego monitorowania leków pacjentów stosujących inhibitory proteazy. Niewątpliwie, wszelkie działania, które mogą zwiększyć skuteczność i bezpieczeństwo leczenia antyretrowirusowego, poprawić jakość życia chorych są bardzo ważne, zwłaszcza w obliczu liczby ponad 37 mln ludzi żyjących z HIV pod koniec 2020 r. na świecie, 1.5 mln nowych zakażeń w 2020 r., ciągłego wzrostu liczby nowych rozpoznań w krajach Europy Środkowej i Wschodniej, Centralnej Azji, a także na Bliskim Wschodzie oraz w Afryce Północnej. Wprowadzenie do terapii inhibitorów proteazy na przełomie 1995/1996 r. zrewolucjonizowało leczenie osób żyjących z HIV/AIDS. Początkowo uważano, że wymagają one częstego przyjmowania w ciągu doby oraz ścisłego przestrzegania odpowiednich zaleceń związanych z m.in. procesem ich wchłaniania. Badania i doświadczenia kliniczne wykazały, że dodanie niewielkiej dawki rytonawiru może znacznie zmniejszyć liczbę koniecznych do przyjmowania tabletek, pozwala na ich stosowanie niezależnie od posiłków, a dodatkowo wzmacnia działanie. Pierwszym takim połączeniem był lopinawir z rytonawirem. Obecnie, wszystkie inhibitory proteazy, poza nelfinawirem, mogą być tak kojarzone. Pacjentów należy informować, że jeśli nie będą przestrzegać zaleceń lekarza dotyczących równoczesnego przyjmowania leków to mogą u nich w dalszym ciągu występować choroby związane z zaawansowanym zakażeniem HIV, w tym zakażenia oportunistyczne, ale zarazem muszą być uważni na ryzyko wystąpienia działań niepożądanych, w tym interakcji.

Optymalizacja terapii wymienionymi lekami wymaga jeszcze odpowiedzi na wiele pytań związanych m.in. z określeniem ich profilu farmakokinetycznego, czy ustaleniem schematu dawkowania u indywidualnych pacjentów. Do realizacji tych oraz innych z tego zakresu zamierzeń potrzebne są odpowiednie metody analityczne pozwalające na oznaczanie stężeń leków antyretrowirusowych z odpowiednią precyzją, dokładnością i powtarzalnością.

Tematyka badań podjętych przez Doktorantkę jest zatem oryginalna, nowatorska i aktualna. Uzyskane w pracy wyniki dzięki obserwacjom, przeprowadzonym pod kierunkiem doświadczonego Promotora, są istotne nie tylko z punktu widzenia nauk podstawowych ale mogą mieć w przyszłości aplikacje kliniczne. Uzupełniają one bowiem brakujące w dostępnym piśmiennictwie informacje dotyczące oznaczania stężeń i farmakokinetyki wybranych inhibitorów proteazy oraz poszukiwań optymalnego wskaźnika prognostycznego dla skutecznie prowadzonej terapii antyretrowirusowej.

Ocena strony formalnej rozprawy

Dysertacja jest zwartym opracowaniem w tradycyjnej formie, oprawionego wydruku komputerowego liczącego 159 kolejno ponumerowanych stron, zilustrowanego 34 rycinami i 48 tabelami. Układ jest typowy dla tego rodzaju opracowań. Po stronie tytułowej i słowach kluczowych, zamieszczono spis treści, wykaz stosowanych skrótów, spisy rycin i tabel oraz rozdziały: Wstęp, Terapeutyczne monitorowanie leków, Założenia i cel pracy, Materiały i metoda, Wyniki badań, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Ponadto Autorka dołączyła opinię Komisji Bioetycznej działającej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, która wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań. Język rozprawy jest precyzyjny i logiczny, przez co zyskuje ona na użyteczności naukowej i praktycznej. Cele pracy zostały właściwie sformułowane i dobrze wpisują się w aktualne obszary badań współczesnej farmakoterapii antyretrowirusowej. Obserwacje zostały starannie zaplanowane. Spis piśmiennictwa obejmuje 233 pozycje polsko- i anglojęzyczne, w tym 102 opublikowane w latach 2012-2022 (43.8%), 115 pochodzące z lat 2000-2011 (49.4%), 8 ukazało się od 1991 do 1999 r. (3.4%).

Moje uwagi odnoszą się do: braku odwołania się w wielu miejscach do stosownych pozycji piśmiennictwa uwiarygodniających informacje zamieszczone np. w poszczególnych akapitach, częste umieszczanie pozycji piśmiennictwa na końcu podrozdziału m.in. na stronie 14, 17 - czyżby tylko pozycja 4 odnosiła się do całego podrozdziału 1.3; usytuowanie pozycji 30 po 31 a nie na odwrót; braku pozycji 188 po pozycji 187; w przypadku pozycji stanowiących charakterystyki produktów leczniczych braku informacji, którego leku ona dotyczy i nie uwzględnienie adresów stron internetowych; braku akapitów w wielu miejscach; nie precyzowania oznaczanego parametru np. str. 47 (oznaczania inhibitorów proteazy – poprawne byłoby stwierdzenie - oznaczania stężenia inhibitorów proteazy); używania bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego słowa *level* jako poziom – zamiast stężenie; niewłaściwej kolejności umieszczenia w pracy słów kluczowych w języku angielskim (powinna odpowiadać kolejności w języku polskim); braku umieszczenia w rozdziale Materiały i metoda danych dotyczących wykorzystanych metod do przeprowadzenia analizy statystycznej wyników, zostały one zawarte w tekście; braku jednostek m.in. w tabelach 7, 10, 11, 12, 14, 16, 20, 22, 24, 26; nie zamieszczenia informacji w tytule podrozdziału 5.2.5 o porównywanych

grupach; braku umieszczenia w tytule podrozdziału 5.3 informacji, iż darunawir pacjenci przyjmowali z rytonawirem; braku tytułu pierwszej kolumny w tabeli 34.

Wspomniane przez mnie uwagi, głównie natury redakcyjnej, nie obniżają wartości ostatecznej rozprawy.

Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział dysertacji „Wstęp” zawiera szereg informacji istotnych dla podsumowania stanu wiedzy na opracowywany temat. Pani mgr Beata Gralak-Dąbrowska rozpoczęła go od krótkiego wprowadzenia obejmującego zdefiniowanie ludzkiego wirusa upośledzenia odporności (HIV), następnie przedstawiła dane epidemiologiczne dotyczące zespołu nabytego upośledzenia odporności (AIDS) oraz przyczyny stosowania terapii monitorowanej stężeniem leków antyretrowirusowych. Dokładnie scharakteryzowała wirus HIV, opisała klasyfikację stadiów zakażenia oraz leczenie antyretrowirusowe HIV/AIDS, z uwzględnieniem ośmiu grup leków, które przedłużają życie pacjentów i poprawiają ich jakość życia. Szczegółowo przedstawiła poszczególne leki w grupie inhibitorów proteazy oraz ich interakcje. W drugim rozdziale noszącym tytuł „Terapeutyczne monitorowanie leków” Autorka stwierdziła, iż obecnie metoda ta wykorzystywana jest tylko w przypadku nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy i inhibitorów proteazy. Jej stosowanie może pomóc w ocenie przestrzegania zaleceń lekarskich, kontrolowania interakcji między lekami, jak również monitorowania np. niepowodzenia wirusologicznego. Uważam za cenną inicjatywę umieszczenie w pracy tabeli zestawiającej dane dotyczące metod oznaczania stężeń inhibitorów proteazy przy użyciu wysokosprawnej chromatografii ciekowej opisane w 29 publikacjach. Po przeczytaniu tego rozdziału, czytelnik nie ma wątpliwości, co do zasadności podjętych badań. W części teoretycznej pracy, napisanej prawidłowo i rzeczowo, Doktorantka wykazała się wymaganą od kandydata na stopień doktora nauk farmaceutycznych wiedzą związaną z przedmiotem badań własnych.

Przedstawione treści ściśle wiążą się ze sformułowanymi dalej celami pracy, obejmującymi opracowanie i walidację metody analitycznej wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detektorem UV pozwalającej na równoczesne oznaczanie stężenia czterech inhibitorów proteazy (sakwinawiru, lopinawiru, indinawiru, nelfinawiru) oraz przygotowania zwalidowanej metody HPLC-UV do oznaczania stężenia inhibitora proteazy drugiej generacji – darunawiru. W koncepcji badań Kandydatka ujęła też

określenie wartości wybranych parametrów farmakokinetycznych sakwinawiru i lopinawiru, wyznaczenie przedziału terapeutycznego stężeń darunawiru u pacjentów poddanych monoterapii podtrzymującej oraz wskazanie optymalnego wskaźnika prognostycznego dla skutecznej terapii darunawirem.

W rozdziale „Materiały i metoda” Doktorantka szczegółowo omówiła metody oznaczania stężeń ww. inhibitorów proteazy, nie zapominając o prezentacji procesu ich walidacji. Opis metodyki badań jest dokładny i przedstawiony w sposób umożliwiający powtórzenie doświadczeń przez inne zainteresowane tym zespoły. Słowa uznania należą się Pani Magister za opracowanie i przeprowadzenie stosownych procedur. Bezcenna była niewątpliwie pomoc doświadczonego Promotora.

Badania 24-godzinnych profili farmakokinetycznych lopinawiru i lopinawiru w terapii skojarzonej z sakwinawirem zostały wykonane z wykorzystaniem materiału biologicznego w postaci próbek krwi pobranych w 11 punktach czasowych odpowiednio od 8 i 10 pacjentów hospitalizowanych w Wojewódzkim Szpitalu Zakaźnym w Warszawie w Centrum Diagnostyki i Terapii AIDS oraz w Klinice Chorób Zakaźnych dla Dorosłych. Wartości parametrów farmakokinetycznych (AUC_{0-24} , C_{min} , C_{max}) lopinawiru w monoterapii oraz w leczeniu skojarzonym z sakwinawirem Kandydatka zestawiała z poziomem wirerii, liczbą limfocytów $CD4+$ i $CD8+$ obserwowanymi w 4 tygodniu stosowania leków, jak również wartością stosunku $CD4+/CD8+$. Istotna statystycznie okazała się odwrotnie proporcjonalna zależność między AUC_{0-24} a liczbą limfocytów $CD4+$. Autorka porównywała także stężenia minimalne i maksymalne w obu wymienionych grupach. Statystycznie istotną różnicę wykazała tylko w przypadku monoterapii, stężenie lopinawiru było ponad 2-krotnie mniejsze niż podczas stosowania tego leku z sakwinawirem.

Badania 24-godzinnych profili farmakokinetycznych darunawiru zostały wykonane z uwzględnieniem 9 punktów czasowych u 372 pacjentów otrzymujących terapię skojarzoną z rytonawirem. Okazało się, iż u 13 pacjentów nie wykryto obecności darunawiru pomimo deklaracji przyjmowania leku. Doktorantka zaobserwowała istotną statystycznie różnicę wartości $CD4+$ i $CD8+$ przed i po jego podaniu, odpowiednio mniejszą i większą przed rozpoczęciem terapii. Dodatkowo przeprowadziła obserwacje różnicując dawki darunawiru 88 i 600 mg. Uzyskane wyniki były podobne jak dla grupy wszystkich pacjentów. Do innych aspektów badań uwzględnionych przez Panią mgr Beatę Gralak-Dąbrowską należało wykazanie różnic stężeń leku ze względu na występowanie lub nie antygenu HBs, przeciwciał anty HBs i przeciwciał anty HCV. Średnie stężenia

darunawiru były statystycznie istotnie większe przy obecności antygenu HBs i przeciwciał anty HCV. Podobnie jak poprzednio zróżnicowanie obserwacji dotyczyło stosowanych dawek. Statystyczną istotność różnic średnich wartości stężenia leku Kandydatka stwierdziła tylko w odniesieniu do dawki 800 mg u pacjentów, u których występował antygen HBs. Stężenia leku były też analizowane w aspekcie płci pacjentów i stosowanej dawki.

Oceniając część doświadczalną uważam, że Kandydatka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem do podjętych zadań, trafnie dobrała i umiejętnie zastosowała metody i narzędzia, które pozwoliły na realizację zaplanowanego zakresu badań. Proces walidacji, przeprowadzony według wytycznych zawartych w dokumencie International Conference of Harmonization (ICH) May 2001, potwierdził możliwość zastosowania opracowanych metod w ilościowym oznaczaniu wybranych inhibitorów proteazy w osoczu krwi pacjentów.

Wyniki analizy farmakokinetycznej i obliczeń zostały przedstawione przejrzysto i zrozumiale w klasycznej formie tabel, rycin i opisów. W aspekcie wykonawczym praca zasługuje na uznanie. Wymagała od Autorki dużego zaangażowania w proces zbierania wielu danych, ich analizy oraz znajomości farmakokinetyki i metod służących indywidualizacji terapii. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki są oryginalnym i interesującym wkładem Doktorantki w rozszerzenie wiedzy na temat optymalizacji stosowania inhibitorów proteazy.

W rozdziale „Dyskusja” Pani mgr Beata Gralak-Dąbrowska omówiła w dojrzały sposób uzyskane przez siebie wyniki, zestawiając je z szerokim kontekstem obserwacji innych autorów, co świadczy o znakomitej wiedzy Doktorantki w zakresie zagadnień będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Rzeczowość w prowadzeniu wielowątkowej analizy, krytyczna interpretacja danych, świadomość ograniczeń zaplanowanych badań wskazują na dojrzałość naukową Kandydatki.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji Autorka sformułowała sześć wniosków zgodnych z celami pracy i uzyskanymi wynikami, które wskazały na m.in. opracowanie i zwalidowanie metod chromatograficznych oznaczania stężeń sakwinawiru i lopinawiru oraz darunawiru wobec diazepamu jako standardu wewnętrznego, którego zaletą jest mały koszt i jego ogólnodostępność, ponadto dużą międzyosobniczą zmienność farmakokinetyki sakwinawiru i lopinawiru, szczególnie w zakresie stężeń minimalnych. W grupie pacjentów leczonych darunawirem z rytonawirem Doktorantka zidentyfikowała przedziały stężeń terapeutycznych dla wybranych zakresów. Pani mgr Beata Gralak-

Dąbrowska potwierdziła też skuteczność terapii antyretrowirusowej z wykorzystaniem populacyjnej średniej wartości stężenia darunawiru u pacjentów z koinfekcją HIV/HCV, a także osób powyżej 50 r.ż. Zamieszczone w pracy wnioski wykazują charakter rozwojowy, świadczą o kompetencjach Kandydatki oraz umiejętności rozwiązywania trudnych problemów badawczych. Dostarczają one cennych informacji i wskazówek do prowadzenia dalszych badań, które mogą przyczynić się do optymalizacji terapii antyretrowirusowej. Co ważne, Doktorantka nie zapomniała o wskazaniu ograniczeń opracowanych przez nią metod.

Podsumowanie

Stwierdzam, że wyniki pracy doktorskiej Pani mgr Beaty Gralak-Dąbrowskiej są wartościowe merytorycznie, zawierają niewątpliwy element nowatorstwa i stanowią rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego. Przyjęto poprawną metodykę i przeprowadzono właściwą analizę wyników. Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy badawczej oraz rozwiązywania problemów naukowych. Całość opracowania wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w reprezentowanej dziedzinie naukowej. Podkreślana przez nią możliwość i konieczność prowadzenia dalszych badań celem głębszego wyjaśnienia postawionych zadań badawczych świadczy o kreatywności.

Uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Beaty Gralak-Dąbrowskiej spełnia warunki określone w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018, poz. 261) oraz Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1669). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie uwzględniając wartości praktyczne i poznawcze przedstawionych badań wnoszę o jej wyróżnienie. Ze względu na rangę podjętej tematyki, nowatorski charakter prowadzonych badań, doskonale opanowanie warsztatu naukowego, umiejętność prowadzenia dyskusji i formułowania wniosków oraz znaczenie

uzyskanych wyników dla rozwoju nauki i praktyki klinicznej – zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Gralak-Dąbrowskiej, zatytułowanej „Farmakokinetyczne monitorowanie inhibitorów proteazy w terapii antyretrowirusowej”, wykonanej pod kierownictwem naukowym Promotora – Pana dr hab. Tomasza Pawińskiego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
FARMAKOLOGII KLINICZNEJ
kierownik
prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska