



**Zastosowanie alternatywnych strategii pobierania próbek
w terapii monitorowanej stężeniem leku, ze szczególnym
uwzględnieniem leków immunosupresyjnych –
od strategii analitycznych do zastosowań klinicznych**

dr n. med. i n. o zdr. Arkadiusz Jan Kocur

Zakład Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej

Wydział Farmaceutyczny

Warszawski Uniwersytet Medyczny

AUTOREFERAT

Załącznik nr 3 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

Warszawa 2026

Spis treści

| | |
|--|-----------|
| SPIS ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW | 4 |
| 1. DANE PERSONALNE..... | 6 |
| 2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ | 6 |
| 3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH..... | 7 |
| 4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŻN. ZM.)..... | 7 |
| 4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO BĘDĄCEGO PODSTAWĄ POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO | 7 |
| 4.2. WYKAZ PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE BĘDĄCE PODSTAWĄ POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO | 7 |
| 4.3. WSTĘP DO OPISU OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO | 12 |
| 4.4. CELE PRACY..... | 12 |
| 4.5. WSTĘP TEORETYCZNY DO TEMATYKI OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO | 14 |
| 4.6. PRACE W KRĘGU TEMATYCZNYM OSIĄGNIĘCIA HABILITACYJNEGO OPUBLIKOWANE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA | 23 |
| 4.7. OMÓWIENIE PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU HABILITACYJNEGO | 24 |
| 4.8. WNIOSKI Z CAŁEGO CYKLU PUBLIKACJI | 52 |
| 4.9. DODATKOWE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA | 54 |
| 4.10. LITERATURA | 59 |
| 5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ | 62 |
| 5.1. PRACE REALIZOWANE W RAMACH ZATRUDNIENIA INSTYTUCIE „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA” W WARSZAWIE | 62 |
| 5.2. STAŻE NAUKOWE I WIZYTY STUDYJNE ZA GRANICĄ | 64 |
| 5.3. WSPÓLPRACA W KRAJU I ZA GRANICĄ | 65 |
| 5.4. WSPÓLPRACA W OBRĘBIE JEDNOSTEK NAUKOWYCH I KLINICZNYCH IP-CZD..... | 66 |
| 5.5. WSPÓLPRACA W OBRĘBIE JEDNOSTEK NAUKOWYCH I SZPITALI PODLEGŁYCH WUM | 66 |
| 6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ..... | 67 |
| 6.1. REALIZOWANE OBOWIĄZKI DYDAKTYCZNE..... | 67 |
| 6.2. PROWADZONE SZKOLENIA W RAMACH KSZTAŁCENIA PODYPLOMOWEGO | 68 |
| 6.3. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA..... | 69 |
| 6.4. DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZATORSKA | 69 |
| 6.5. CZŁONKOSTWO W TOWARZYSTWACH NAUKOWYCH | 69 |
| 6.6. NADZÓR NAD REALIZOWANYMI (LUB PLANOWANYMI) PRACAMI DOKTORSKIMI | 70 |
| 7. INNE NIŻ WYMIENIONE W PKT. 1-7 INFORMACJE DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ..... | 70 |
| 7.1. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH I NAUK O ZDROWIU W DYSCYPLINIE NAUKI FARMACEUTYCZNE – WYKAZ PUBLIKACJI | 70 |
| 7.2. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH I NAUK O ZDROWIU W DYSCYPLINIE NAUKI FARMACEUTYCZNE Z WYŁĄCZENIEM PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA HABILITACYJNEGO– WYKAZ PUBLIKACJI | 71 |
| 7.3. DZIAŁALNOŚĆ KLINICZNA | 72 |
| 7.4. UCZESTNICTWO W KONGRESACH, ZJAZDACH I KONFERENCJACH | 73 |
| 7.5. REALIZOWANE GRANTY NAUKOWE – KIEROWNIK LUB WYKONAWCA | 78 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 7.6. | DZIAŁALNOŚĆ RECENZENCKA | 81 |
| 7.7. | PRYZNANE NAGRODY I WYRÓŻNIENIA | 81 |
| 7.8. | SZKOLENIA I CERTYFIKATY | 82 |
| 7.9. | RANKINGI PRACOWNIKÓW NAUKOWYCH WUM..... | 83 |
| 8. | PODSUMOWANIE CAŁKOWITEGO DOROBKU NAUKOWEGO – WSKAŹNIKI BIBLIOMETRYCZNE..... | 83 |

Spis zastosowanych skrótów

| | |
|---------------------|--|
| ACMIA | metoda immunochemiczna z przeciwciałami sprzężonymi z cząstkami magnetycznymi, ang. <i>antibody-conjugated magnetic immunoassay</i> |
| ACN | acetonitryl |
| ACV | acyklowir |
| AUC | pole pod krzywą zależności stężenia od czasu, ang. <i>area under the curve</i> |
| AUC ₀₋₂₄ | pole pod krzywą stężenie–czas w przedziale 0–24 h |
| C ₀ | stężenie minimalne leku w próbce pobranej przed podaniem kolejnej dawki |
| C ₂ | stężenie leku oznaczane w próbce pobranej 2 godziny po podaniu dawki |
| CI | przedział ufności, ang. <i>confidence interval</i> |
| CMV | cytomegalowirus, ang. <i>cytomegalovirus</i> |
| CRE | kreatynina |
| CsA | cyklosporyna A |
| CV | współczynnik zmienności, ang. <i>coefficient of variation</i> |
| CYP3A4 | izoenzym 3A4 cytochromu P450 |
| DAMPA | metabolit metotreksatu, kwas 2,4-diamino-N ¹⁰ -metylopteroinowy |
| DBS | suszone plamki krwi, ang. <i>dried blood spots</i> |
| DLLME | dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz–ciecz, ang. <i>dispersive liquid–liquid microextraction</i> |
| DPBS | buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco, ang. <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> |
| DPS | suszone plamki osocza, ang. <i>dried plasma spots</i> |
| DSS | suszone plamki surowicy, ang. <i>dried serum spots</i> |
| EDTA | kwas etylenodiaminotetraoctowy |
| EMA | Europejska Agencja Leków, ang. <i>European Medicines Agency</i> |
| EMIT | immunoenzymatyczna technika oznaczeń, ang. <i>enzyme multiplied immunoassay technique</i> |
| EVE | ewerolimus |
| FDA | Agencja Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych, ang. <i>Food and Drug Administration</i> |
| GCP | dobra praktyka kliniczna, ang. <i>Good Clinical Practice</i> |
| GCV | gancyklowir |
| HILIC | chromatografia oddziaływań hydrofilowych, ang. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> |
| HPLC/UV | wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV, ang. <i>high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection</i> |
| HQC | kontrola jakości na wysokim poziomie stężenia, ang. <i>high quality control</i> |
| IATDMCT | Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Monitorowanej i Toksykologii Klinicznej, ang. <i>International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology</i> |
| ICH | Międzynarodowa Rada Harmonizacji, ang. <i>International Council for Harmonization</i> |
| IPT | międzynarodowy program kontroli biegłości, ang. <i>international proficiency testing</i> |
| IS | standard wewnętrzny, ang. <i>internal standard</i> |
| ISR | ponowna analiza próbek rzeczywistych, ang. <i>incurred sample reanalysis</i> |
| LC–MS/MS | chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas, ang. <i>liquid chromatography–tandem mass spectrometry</i> |
| LLOQ | dolna granica oznaczalności, ang. <i>lower limit of quantification</i> |
| LOD | granica wykrywalności, ang. <i>limit of detection</i> |
| LoA | kryterium zgodności analitycznej, ang. <i>limits of agreement</i> |
| LoC | kryterium zgodności klinicznej, ang. <i>limit of clinical acceptance</i> |
| LQC | kontrola jakości na niskim poziomie stężenia, ang. <i>low quality control</i> |
| LSS | strategia ograniczonego pobierania próbek, ang. <i>limited sampling strategy</i> |
| MPA | kwas mykofenolowy, ang. <i>mycophenolic acid</i> |
| MPAG | glukuronid kwasu mykofenolowego, ang. <i>mycophenolic acid glucuronide</i> |
| MQC | kontrola jakości na średnim poziomie stężenia, ang. <i>medium quality control</i> |

| | |
|----------|---|
| mTOR | ssaczy cel rapamycyny, ang. <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| MTX | metotreksat |
| MTXPG | poliglutaminiany metotreksatu, ang. <i>methotrexate polyglutamates</i> |
| PK/PD | zależność farmakokinetyczno-farmakodynamiczna |
| qDBS | ilościowe suszone plamki krwi, ang. <i>quantitative dried blood spots</i> |
| qDPS | ilościowe/odpowiadające osoczu suszone plamki, ang. <i>quantitative/plasma-equivalent dried spots</i> |
| QC | kontrola jakości, ang. <i>quality control</i> |
| QuEChERS | technika przygotowania próbki: szybka, prosta, tania, skuteczna, odporna i bezpieczna, ang. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe |
| RBC | krwinki czerwone, ang. <i>red blood cells</i> |
| RZS | reumatoidalne zapalenie stawów |
| SIR | sirolimus (rapamycyna) |
| SOT | przeszczepienie narządów litych, ang. <i>solid organ transplantation</i> |
| SPE | ekstrakcja do fazy stałej, ang. <i>solid-phase extraction</i> |
| TDM | terapia monitorowana stężeniem leku, ang. <i>therapeutic drug monitoring</i> |
| VAMS | mikropróbkowanie objętościowo-absorpcyjne, ang. <i>volumetric-absorptive microsampling</i> |
| WB | krw pełna, ang. <i>whole blood</i> |

1. Dane personalne

| | |
|----------------------|---|
| Imię i nazwisko | Arkadiusz Jan Kocur |
| Stopień naukowy | doktor nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne |
| Zajmowane stanowisko | adiunkt badawczo-dydaktyczny Zakład Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej |
| Adres służbowy | Warszawski Uniwersytet Medyczny ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa |
| E-mail | arkadiusz.kocur@wum.edu.pl |
| Numer ORCID | 0000-0002-4833-8532 |

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2a. Stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne nadany 20.12.2023 r. przez Radę Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny; tytuł pracy doktorskiej: *Terapeutyczne monitorowanie stężeniem takrolimusu i kwasu mykofenolowego z zastosowaniem mikropróbkowania objętościowo-absorpcyjnego połączonego z techniką LC-MS/MS u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki.*

Praca została zrealizowana w Zakładzie Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Promotor pracy: dr hab. n. farm. Tomasz Pawiński

Promotor pomocniczy pracy: dr n. farm. Dorota Marszałek

Recenzenci pracy: prof. dr hab. n. farm. Anna Gumieniczek; dr hab. n. med. Dorota Kamińska, prof. UMW; dr hab. n. farm. Andrzej Czyrski

Praca otrzymała wyróżnienie *summa cum laude*

2b. Tytuł zawodowy magistra farmacji nadany 31.03.2020 r., tytuł pracy magisterskiej: *Farmakodynamiczne monitorowanie kwasu mykofenolowego w terapii immunosupresyjnej.*

Praca zrealizowana została w Zakładzie Chemii Leków, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Promotor pracy: dr hab. n. farm. Tomasz Pawiński

Bezpośredni opiekun pracy: dr n. farm. Dorota Marszałek

Recenzent pracy: prof. dr hab. n. farm. Grzegorz Nałęcz-Jawecki

2c. Dyplom ukończenia studiów podyplomowych z zakresu prowadzenia i monitorowania badań klinicznych z dnia 26.06.2024 r., Akademia Leona Koźmińskiego w Warszawie

2d. W roku 2026 rozpocząłem szkolenie specjalizacyjne z zakresu farmacji klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi – opiekun specjalizacji: dr n. med. i n. o zdr. Alicja Sztokfisz-Ignasiak

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

| | |
|-----------------------------|---|
| od 11.2024 | adiunkt badawczo-dydaktyczny, Zakład Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny |
| od 07.2024 (część etatu) | kierownik-koordynator części farmakokinetycznej eksperymentu medycznego <i>AntiSepsis</i> , Pracownia Terapii Monitorowanej, Farmakokinetyki Klinicznej i Toksykologii (poprzednio Pracownia Farmakokinetyki), Zakład Biochemii Klinicznej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie |
| od 03.2023 (część etatu) | młodszy asystent-farmaceuta, Pracownia Terapii Monitorowanej, Farmakokinetyki Klinicznej i Toksykologii (poprzednio Pracownia Farmakokinetyki), Zakład Biochemii Klinicznej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie |
| 01.2022 – 10.2024 | asystent badawczo-dydaktyczny, Zakład Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej (poprzednio Zakład Chemii Leków), Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny |
| 10.2021 – 12.2022 | asystent dydaktyczny, Zakład Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny |
| 02.2018 – 09.2020 | pracownik inżynieryjno-techniczny, Zakład Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny |

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego będącego podstawą postępowania habilitacyjnego

Zastosowanie alternatywnych strategii pobierania próbek w terapii monitorowanej stężeniem leku, ze szczególnym uwzględnieniem leków immunosupresyjnych – od strategii analitycznych do zastosowań klinicznych

4.2. Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe będące podstawą postępowania habilitacyjnego

Na wskazany w osiągnięciu naukowym monotematyczny cykl publikacji składa się łącznie: **7 prac oryginalnych** oraz **1 praca przeglądowa**, o łącznej punktacji MNiSW **850 pkt** oraz sumarycznym współczynniku Impact Factor **32,20**. Punktacja MNiSW została określona na podstawie analizy bibliometrycznej przygotowanej przez Bibliotekę Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. We wszystkich pracach oryginalnych (**H1–H7**) jestem

pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym (☒), natomiast w pracy przeglądowej (H8) jestem pierwszym autorem.

H1. praca oryginalna: Kocur A. ☒, Kot B., Moczulski M., Czajkowska A., Rubik J., Sierakowski M., Pawiński T. A novel approach to therapeutic drug monitoring of Ciclosporin in pediatric renal transplant recipients using volumetric absorptive microsampling (VAMS)-Teaching old dog new tricks. *Clinica Chimica Acta*, 2024, tom 562, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119877>.


- 100 pkt. MNiSW, IF₂₀₂₄ = 2.9, najwyższy kwartył: Q2, czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był wiodący i obejmował wszystkie główne etapy przeprowadzonych prac. Byłem autorem koncepcji badania, określiłem jego cele naukowe i założenia metodologiczne oraz opracowałem strategię walidacyjną metody LC–MS/MS oznaczania cyklosporyny w pełnej krwi oraz w próbkach VAMS. Przeprowadziłem analizę LC–MS/MS próbek walidacyjnych i klinicznych. Wykonałem wszystkie analizy statystyczne, a także zebrałem wyniki oznaczeń uzyskanych w ramach zewnętrznego programu badania biegłości laboratorium. Byłem wiodącym autorem manuskryptu oraz autorem korespondencyjnym. Odpowiadałem za przygotowanie pierwszej wersji pracy, jej redakcję, korektę merytoryczną i językową, a także kontakt z redakcją czasopisma oraz przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H2. praca oryginalna: Kocur A. ☒, Czajkowska A., Rębis K., Rubik J., Moczulski M., Kot B., Sierakowski M., Pawiński T. Personalization of pharmacotherapy with sirolimus based on volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients-from LC–MS/MS method validation to clinical application. *Pharmacological Reports*, 2024, tom 76, nr 6, str.: 1443-1455. <https://doi.org/10.1007/s43440-024-00663-9>.


- 100 pkt. MNiSW, IF₂₀₂₄ = 3.8, najwyższy kwartył: Q2, czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był wiodący i obejmował wszystkie główne etapy przeprowadzonych prac. Byłem odpowiedzialny za opracowanie koncepcji badania, określenie jego celów naukowych i założeń metodologicznych, a także przygotowanie strategii walidacyjnej metod LC–MS/MS oznaczania sirolimusu w pełnej krwi oraz w próbkach VAMS. Opracowałem protokół przygotowania próbek VAMS z wykorzystaniem dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz–ciecz (DLLME). Przeprowadziłem analizę LC–MS/MS próbek walidacyjnych i klinicznych. Zajmowałem się analizą danych, interpretacją wyników oraz oceną zgodności metod z zastosowaniem analiz porównawczych. Uczestniczyłem również w organizacji materiału klinicznego. Ponadto pełniłem funkcję wiodącego autora manuskryptu oraz autora korespondencyjnego. Odpowiadałem za przygotowanie pierwszej wersji pracy, jej redakcję, korektę merytoryczną i językową, kontakt z redakcją czasopisma oraz opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H3. praca oryginalna: Kocur A. , Czajkowska A., Moczulski M., Kot B., Rubik J., Pawiński T. Assessment of Dried Serum Spots (DSS) and Volumetric-Absorptive Microsampling (VAMS) Techniques in Therapeutic Drug Monitoring of (Val)Ganciclovir- Comparative Study in Analytical and Clinical Practice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, tom 25, nr 16, str.: 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms25168760>.


- 140 pkt. MNiSW, IF₂₀₂₄ = 4.9, najwyższy kwartyl: Q1, czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był wiodący i obejmował wszystkie główne etapy przeprowadzonych prac. Byłem pomysłodawcą badania, odpowiadałem za cele naukowe, założenia metodologiczne oraz strategię walidacji. Przeprowadziłem walidację metod LC–MS/MS do oznaczania gancyklowiru w surowicy, suchych plamach surowicy oraz surowicy pobranej za pomocą systemu VAMS-Mitra™. Opracowałem procedury bioanalityczne, analizowałem dane, interpretowałem wyniki, jak również oceniałem zgodność metod, korzystając z analiz porównawczych. Uczestniczyłem w organizacji materiału klinicznego, koordynacji badania i przygotowaniu materiałów graficznych. Pełniłem funkcję wiodącego o autora manuskryptu, przygotowując pierwszą wersję oraz dokonując korekty merytorycznej i językowej. Jako autor korespondencyjny kontaktowałem się z redakcją czasopisma, a także opracowywałem odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H4. praca oryginalna: Kocur A. , Moczulski M., Czajkowska A., Częczek A., Rubik J. The comparison of two volumetric microsampling devices (qDBS and VAMS) for determining ganciclovir levels in capillary blood using the LC–MS/MS technique in pediatric renal transplant recipients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, tom 212, str.: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107200>.

- 100 pkt. MNiSW, IF₂₀₂₅ = 4.7, najwyższy kwartyl: Q1, czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był wiodący i obejmował wszystkie główne etapy przeprowadzonych prac. Byłem pomysłodawcą badania, odpowiedzialnym za opracowanie koncepcji badania, zaplanowanie celów naukowych oraz założeń metodologicznych, a także za strategię walidacyjną i przeprowadzenie walidacji wielomatrixowej metody LC–MS/MS do oznaczania gancyklowiru w osoczu, pełnej krwi oraz próbkach krwi włośniczkowej pobranych technikami VAMS i qDBS. W ramach pracy opracowałem metodologię oraz zwalidowałem procedury bioanalityczne dla różnych matryc biologicznych, przeprowadziłem analizę danych, interpretację wyników oraz ocenę zgodności metod. Pełniłem funkcję wiodącego autora manuskryptu oraz autora korespondencyjnego, odpowiadając za przygotowanie wersji roboczej, redakcję, korektę merytoryczną i językową, kontakt z redakcją czasopisma oraz przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H5. praca oryginalna: Kocur A. , Olkowski B., Moczulski M., Miszewska-Szyszkowska D., Rostkowska O.M., Polak K., Korniluk K., Bączkowska T., Durlik M., Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus Using Volumetric Absorptive Microsampling and Quantitative Dried Blood Spot Methods with LC–MS/MS in Adult Solid Organ

Transplant Recipients: An Analytical and Clinical Comparative Study. *Molecules*, 2025, tom 30, nr 15, str.: 1-22. <https://doi.org/10.3390/molecules30153139>.

- 140 pkt. MNiSW, IF₂₀₂₅ = 4.6, najwyższy kwartyl: Q2, czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był wiodący i obejmował wszystkie główne etapy przeprowadzonych prac. Byłem współautorem koncepcji badania, odpowiadałem za zaplanowanie jego celów naukowych i założeń metodologicznych, opracowanie strategii walidacyjnej oraz przeprowadzenie walidacji metody LC–MS/MS oznaczania ewerolimusu w pełnej krwi oraz w próbkach VAMS i qDBS. W ramach pracy opracowałem metodologię badania, zoptymalizowałem i zwalidowałem procedury bioanalityczne dla klasycznej matrycy referencyjnej oraz alternatywnych metod mikroprobkowania, przeprowadziłem analizę danych, interpretację wyników oraz ocenę zgodności metod z wykorzystaniem analiz porównawczych. Uczestniczyłem także w organizacji materiału klinicznego, koordynacji przebiegu badania oraz przygotowaniu materiałów graficznych. Ponadto pełniłem funkcję wiodącego autora manuskryptu oraz autora korespondencyjnego. Odpowiadałem za przygotowanie pierwszej wersji pracy, jej redakcję, korektę merytoryczną i językową, kontakt z redakcją czasopisma oraz opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H6. praca oryginalna: **Kocur A.**✉, Sobiak J., Czajkowska A., Rubik J., Pawiński T. Volumetric Absorptive Microsampling of Saliva for Pharmacokinetic Evaluation of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Metabolite in Pediatric Renal Transplant Recipients: Bioanalytical Method Validation and Clinical Feasibility Evaluation. *Pharmaceuticals*, 2025, tom 18, nr 11, str.: 1-21. <https://doi.org/10.3390/ph18111744>.

- 100 pkt. MNiSW, IF₂₀₂₅ = 4.8, najwyższy kwartyl: Q1, czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był kluczowy i obejmował wszystkie główne etapy realizacji projektu. Byłem pomysłodawcą badania, współodpowiedzialnym za określenie jego celów naukowych i założeń metodologicznych, a także za przygotowanie strategii walidacyjnej oraz przeprowadzenie walidacji metody LC–MS/MS do oznaczania kwasu mykofenolowego i jego metabolitu glukuronidowego w próbkach suszonej śliny pobieranych techniką VAMS. Koordynowałem współpracę z ośrodkiem współpracującym, w którym wykonano oznaczenia stężenia analitów w klasycznych próbkach śliny. W ramach pracy opracowałem metodologię, zoptymalizowałem i zwalidowałem procedury bioanalityczne dla próbek śliny pobieranych za pomocą urządzeń Mitra™ VAMS. Przeprowadziłem analizę LC–MS/MS próbek osocza i ultrafiltratu osocza, jak również analizę danych, interpretację wyników oraz ocenę zgodności oznaczeń uzyskanych w badanych matrycach biologicznych. Przeprowadziłem pełną analizę farmakokinetyczną oraz przygotowałem materiały graficzne. Ponadto pełniłem funkcję wiodącego autora manuskryptu oraz autora korespondencyjnego. Odpowiadałem za przygotowanie pierwszej wersji pracy, jej redakcję, korektę merytoryczną i językową, kontakt z redakcją czasopisma oraz opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H7. praca oryginalna: **Kocur A.**[✉], Moczulski M., Michalczuk P., Miszewska-Szyszkowska D., Bączkowska T., Durlik M., Pawiński T. Surrogate-based LC–MS/MS quantification of endogenous creatinine in plasma, plasma-equivalent dried spots (qDPS), and volumetric absorptive microsampling (VAMS): an ICH M10-compliant bridging study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2026, tom 221, str.: 107523. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2026.107523>.

- 100 pkt. MNiSW, IF₂₀₂₆ = 4.7, najwyższy kwartyl: Q1, czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był kluczowy i obejmował wszystkie główne etapy realizacji projektu. Byłem inicjatorem badania, współtworzyłem koncepcję, cele oraz metodologię. Opracowałem strategię walidacyjną w oparciu o analizę zastępczą oraz przeprowadziłem walidację metody LC–MS/MS do oznaczania kreatyniny w osoczu, próbkach qDPS i VAMS. Zoptymalizowałem i zwalidowałem procedury bioanalityczne, analizowałem dane, interpretowałem wyniki oraz oceniłem zgodność metod w ramach analiz porównawczych. Przeprowadziłem walidację kliniczną metody oszacowania stężenia kreatyniny w osoczu metodą qDPS oraz opracowałem równanie korekcyjne dla wyników VAMS. Brałem udział w organizacji materiału klinicznego, koordynacji badania i przygotowaniu materiałów graficznych. Byłem wiodącym autorem manuskryptu; zajmowałem się redakcją, korektą, kontaktami z redakcją oraz odpowiadaniem na recenzje.

H8. praca przeglądowa: **Kocur A.**, Pawiński T[✉]. Microsampling techniques and patient-centric therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Bioanalysis*, 2025, tom 17, nr 6, str.: 413-427. <https://doi:10.1080/17576180.2025.2477976>.

- 70 pkt. MNiSW, IF₂₀₂₅ = 1.8, najwyższy kwartyl: Q3, czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie publikacji miał charakter kluczowy i obejmował wszystkie główne etapy przygotowania pracy przeglądowej. Byłem współautorem koncepcji artykułu oraz odpowiadałem za zaplanowanie jego zakresu merytorycznego, struktury i głównych założeń dotyczących omówienia technik mikropróbkiowania. Przeprowadziłem analizę i syntezę piśmiennictwa, opracowałem zagadnienia związane z technikami DBS, VAMS, qDBS oraz urządzeniami umożliwiającymi separację osocza, a także opisałem aspekty przedanalityczne, analityczne i postanalityczne związane z ich zastosowaniem. Szczególnie istotny był mój udział w przygotowaniu rekomendacji praktycznych dotyczących wdrażania mikropróbkiowania w monitorowaniu leków immunosupresyjnych, obejmujących m.in. samodzielne pobieranie próbek w warunkach domowych, stabilność próbek, wpływ hematokrytu, walidację kliniczną, ocenę zgodności metod oraz kontrolę jakości. Byłem odpowiedzialny za przygotowanie kluczowych części pierwszej wersji pracy, jej redakcję, korektę merytoryczną i językową, przygotowanie materiałów graficznych oraz udział w opracowaniu ostatecznej wersji publikacji.

4.3. Wstęp do opisu osiągnięcia naukowego

Cykl publikacji koncentruje się na alternatywnych strategiach pobierania próbek w terapii monitorowanej stężeniem leku w odniesieniu do leków immunosupresyjnych stosowanych u pacjentów po przeszczepieniu narządów litych (ang. *solid organ transplantation*, SOT). Główną osią cyklu jest przejście od opracowania koncepcji analitycznych i walidacji metod opartych na chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC–MS/MS), poprzez ocenę zmiennych przedanalitycznych i ograniczeń mikropróbkowania, aż po ich zastosowanie kliniczne w rzeczywistych populacjach pacjentów. **Głównym osiągnięciem naukowym przedstawionego cyklu habilitacyjnego było opracowanie, walidacja i kliniczna ocena zintegrowanego modelu terapeutycznego monitorowania leków z wykorzystaniem technik mikropróbkowania, obejmującego zarówno aspekty bioanalityczne, jak i kliniczne oraz organizacyjne.**

Przedstawiony cykl publikacji obejmuje trzy komplementarne obszary badawcze, które łącznie tworzą spójne osiągnięcie naukowe ukierunkowane na rozwój i kliniczne wdrożenie nowoczesnych, pacjentocentrycznych strategii terapeutycznego monitorowania leków:

- **Opracowanie oraz walidacja metod LC–MS/MS oznaczania stężenia wybranych analitów z uwzględnieniem technik mikropróbkowania.** Obszar ten obejmuje m.in. oznaczanie cyklosporyny, sirolimusu, ewerolimusu, kwasu mykofenolowego i jego metabolitu, gancyklowiru oraz kreatyniny w różnych matrycach biologicznych.
- **Kliniczna ocena przydatności alternatywnych matryc biologicznych i strategii pobierania próbek w odniesieniu do klasycznych metod terapeutycznego monitorowania leków.** Ten zakres obejmuje badania pomostowe (ang. *bridging study*), ocenę zgodności metod, analizę błędu systematycznego, analizę wpływu hematokrytu oraz stabilności próbek, a także interpretację wyników oznaczeń stężenia analitów z mikropróbek w kontekście ustalonych zakresów terapeutycznych dla rutynowo stosowanych w TDM matryc biologicznych.
- **Rozwój pacjentocentrycznego modelu terapeutycznego monitorowania leków,** obejmującego możliwość samodzielnego pobierania próbek przez pacjentów lub pobierania wspomaganego przez opiekunów, ograniczenie inwazyjności procedur, decentralizację badań z zakresu TDM oraz zastosowanie mikropróbkowania w długoterminowej opiece nad pacjentami po transplantacji.

4.4. Cele pracy

W mojej pracy naukowej skupiłem się na opracowaniu, walidacji i zastosowaniu klinicznym alternatywnych metod pobierania próbek w terapii monitorowanej stężeniem leku we krwi. Szczególną uwagę zwróciłem na leki immunosupresyjne, ponieważ stanowią grupę związków o wąskim przedziale terapeutycznych stężeń, dużej zmienności farmakokinetycznej oraz bezpośrednim wpływem na skuteczność leczenia pacjentów po przeszczepieniach. Obszarami moich badań były leki stosowane w immunosupresji, takie jak cyklosporyna, sirolimus,

ewerolimus i kwas mykofenolowy, jak również leki przeciwwirusowe stosowane u pacjentów po transplantacji, głównie gancyklowir, oraz biomarker funkcji przeszczepionej nerki, którym jest kreatynina. Testowałem różne warianty w ramach mikropróbkowania: suche plamy krwi na bibule (ang. *dried blood spots*, DBS), suche plamy surowicy na bibule (ang. *dried serum spots*, DSS), ilościowe plamy krwi na bibule (ang. *quantitative dried blood spots*, qDBS), ilościowe/odpowiadające osoczu suszone plamki na bibule (ang. *quantitative plasma spots*, qDPS) oraz mikropróbkowanie objętościowo-absorpcyjne (ang. *volumetric absorptive microsampling*, VAMS). Wspólnym elementem tych badań było zastosowanie nowoczesnych strategii mikropobierania oraz metod LC–MS/MS, które mają na celu wspieranie indywidualizacji farmakoterapii oraz rozwijanie bardziej dostępnego, mniej inwazyjnego i skoncentrowanego na pacjencie monitorowania leczenia.

Przeprowadzając badania w ramach cyklu, określiłem następujące cele badawcze:

1. **Opracowanie i zwalidowanie metod LC–MS/MS umożliwiających oznaczenie leków o wąskim indeksie terapeutycznym w mikropróbkach biologicznych**, w tym we krwi włośniczkowej pobieranej techniką VAMS i qDBS oraz w wysuszonych próbkach surowicy, osocza lub śliny.
2. **Ocenienie, czy alternatywne strategie pobierania próbek mogą zastąpić lub uzupełnić klasyczne pobieranie krwi żyłnej w terapeutycznym monitorowaniu leków**, poprzez porównanie wyników uzyskanych w mikropróbkach z wynikami metod referencyjnych we krwi pełnej, osoczu lub surowicy.
3. **Zweryfikowanie wpływu czynników przedanalitycznych na jakość oznaczeń**, w szczególności w odniesieniu do: hematokrytu, stabilności analitu w mikropróbkach, czasu suszenia, warunków przechowywania i procesowania, sposobu ekstrakcji oraz rodzaju zastosowanego urządzenia do mikropobierania.
4. **Opracowanie strategii przeliczania wartości stężenia analitów oznaczonych w mikropróbkach na wartości odpowiadające matrycom rutynowym**, szczególnie gdy interpretacja kliniczna wymaga odniesienia do osocza lub surowicy, jak w przypadku kwasu mykofenolowego, jego glukuronidu oraz kreatyniny.
5. **Przeprowadzenie klinicznej walidacji opracowanych metod w rzeczywistych populacjach pacjentów**, obejmujących przede wszystkim pediatrycznych i dorosłych biorców przeszczepów narządowych, z zastosowaniem analiz regresji, oceny zgodności metod, błędu systematycznego oraz kryteriów akceptacji zgodnych z wytycznymi.
6. **Ocenienie praktycznych możliwości zastosowania mikropróbkowania w modelu pacjentocentrycznym**, w tym w kontekście samodzielnego pobierania próbek, ograniczenia liczby wizyt w ośrodku transplantacyjnym oraz poprawy komfortu pacjentów i ich opiekunów.
7. **Zaproponowanie ram wdrożeniowych i rekomendacji bezpośrednio wynikających z nabytych doświadczeń dla alternatywnych strategii pobierania próbek w rutynowym TDM**, obejmujących etap optymalizacji metody, walidację

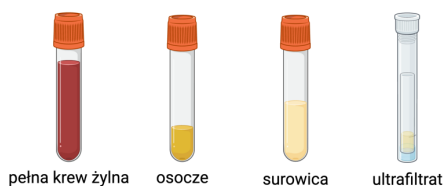
bioanalityczną, walidację kliniczną, kontrolę jakości, udział w badaniach biegłości oraz interpretację wyników przez zespół kliniczno-laboratoryjny.

4.5. Wstęp teoretyczny do tematyki osiągnięcia naukowego

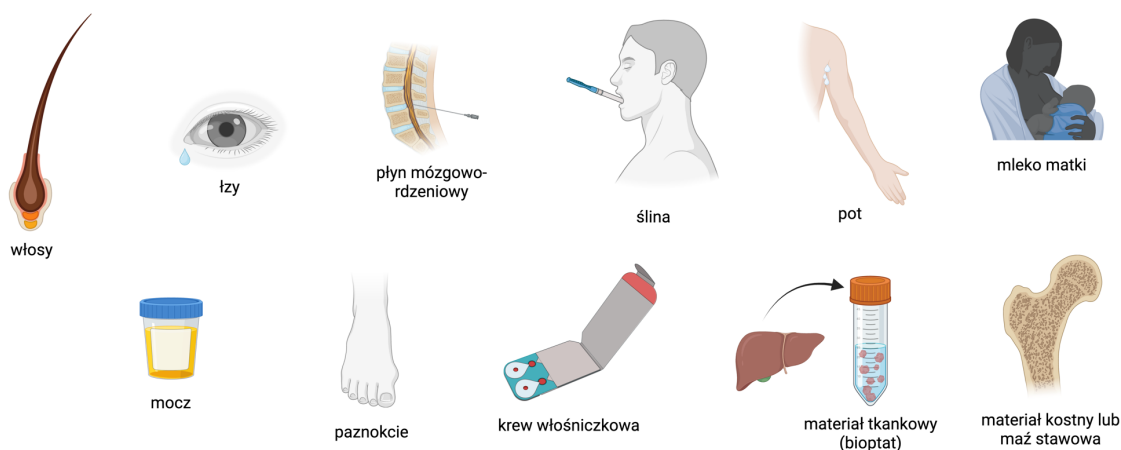
Terapia monitorowana stężeniem leku (*therapeutic drug monitoring*, TDM) stanowi jedno z podstawowych narzędzi indywidualizacji farmakoterapii. Jej istotą jest ilościowe oznaczanie stężenia leku lub jego aktywnych metabolitów w materiale biologicznym pacjenta, a następnie interpretacja uzyskanego wyniku w odniesieniu do zakresu terapeutycznego, stanu klinicznego chorego, dawkowania, czasu pobrania próbki krwi oraz czynników wpływających na farmakokinetykę leku [1]. TDM znajduje szczególne zastosowanie w przypadku leków o wąskim przedziale terapeutycznych stężeń, dużej zmienności międzyosobniczej i wewnątrzosobniczej, istotnym ryzyku toksyczności oraz dobrze udokumentowanej zależności między stężeniem leku a skutecznością lub bezpieczeństwem terapii. Do tej grupy należą między innymi leki immunosupresyjne, wybrane antybiotyki, leki przeciwpadaczkowe, leki przeciwpsychotyczne, leki przeciwwirusowe oraz wybrane leki stosowane w onkologii [1-2].

Jednym z najważniejszych obszarów zastosowania TDM jest transplantologia kliniczna [3]. U pacjentów po przeszczepieniu narządów litych utrzymanie właściwej ekspozycji na leki immunosupresyjne ma bezpośrednie znaczenie dla przeżycia przeszczepionego narządu oraz bezpieczeństwa pacjenta. Zbyt niskie stężenia leków (subterapeutyczne) mogą prowadzić do niedostatecznej immunosupresji, rozwoju ostrego lub przewlekłego odrzucania oraz utraty funkcji narządu przeszczepionego. Z kolei nadmierna ekspozycja (toksyczne stężenia leku) zwiększa ryzyko działań toksycznych, w tym nefrotoksyczności, neurotoksyczności, mielosupresji, zaburzeń metabolicznych, powikłań infekcyjnych oraz nowotworowych [1-3]. Z tego względu TDM jest integralną częścią opieki nad pacjentem transplantacyjnym, szczególnie w przypadku inhibitorów kalcyneuryny, takich jak takrolimus i cyklosporyna, inhibitorów mTOR, takich jak sirolimus i ewerolimus, oraz leków antyproliferacyjnych, w tym aktywnego metabolitu mykofenolanu mofetylu, tj. kwasu mykofenolowego.

MATERIAŁ RUTYNOWO STOSOWANY W TERAPEUTCZNYM MONITOROWANIU LEKÓW



ALTERNATYWNY MATERIAŁ BIOLOGICZNY STOSOWANY W TERAPEUTCZNYM MONITOROWANIU LEKÓW



Rycina 1. Materiał biologiczny rutynowo i alternatywnie stosowany w terapeutycznym monitorowaniu stężenia leku we krwi [3-6].

Klasyczne terapeutyczne monitorowanie leków opiera się najczęściej na oznaczaniu stężenia we krwi pełnej, osoczu lub surowicy uzyskanych z próbki krwi żyłnej (Rycina 1). W przypadku większości leków immunosupresyjnych, takich jak takrolimus, cyklosporyna, sirolimus i ewerolimus, rutynową matrycą pozostaje krew pełna, co wynika z ich istotnej dystrybucji do elementów morfotycznych krwi, zwłaszcza erytrocytów [3]. Natomiast w przypadku kwasu mykofenolowego standardową matrycą jest osocze lub surowica, ponieważ interpretacja kliniczna stężenia tego leku oraz dostępne zakresy terapeutyczne odnoszą się przede wszystkim do tych matryc [3-6]. Odpowiedni dobór materiału biologicznego stanowi zatem warunek prawidłowej interpretacji wyników TDM, zwłaszcza w sytuacjach, gdy stężenie leku oznaczane w danej matrycy biologicznej pozostaje w ścisłym związku z jego efektem farmakodynamicznym w miejscu zakażenia, jak ma to miejsce m.in. w przypadku wybranych antybiotyków [6].

Pomimo ugruntowanej roli klasycznego pobierania krwi żyłnej, ta strategia ma istotne ograniczenia. Pobranie wymaga obecności wykwalifikowanego personelu, odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego lub punktu pobrań, transportu próbki w określonych warunkach oraz często osobistej wizyty pacjenta w ośrodku klinicznym. Problem ten jest szczególnie istotny u dzieci, u których częste pobieranie krwi wiąże się z bólem, stresem, trudnościami technicznymi oraz ograniczeniem dopuszczalnej objętości pobieranego materiału [6-7]. Podobne ograniczenia dotyczą pacjentów przewlekle leczonych, osób starszych, pacjentów z utrudnionym dostępem żylnym, chorych mieszkających daleko od ośrodków

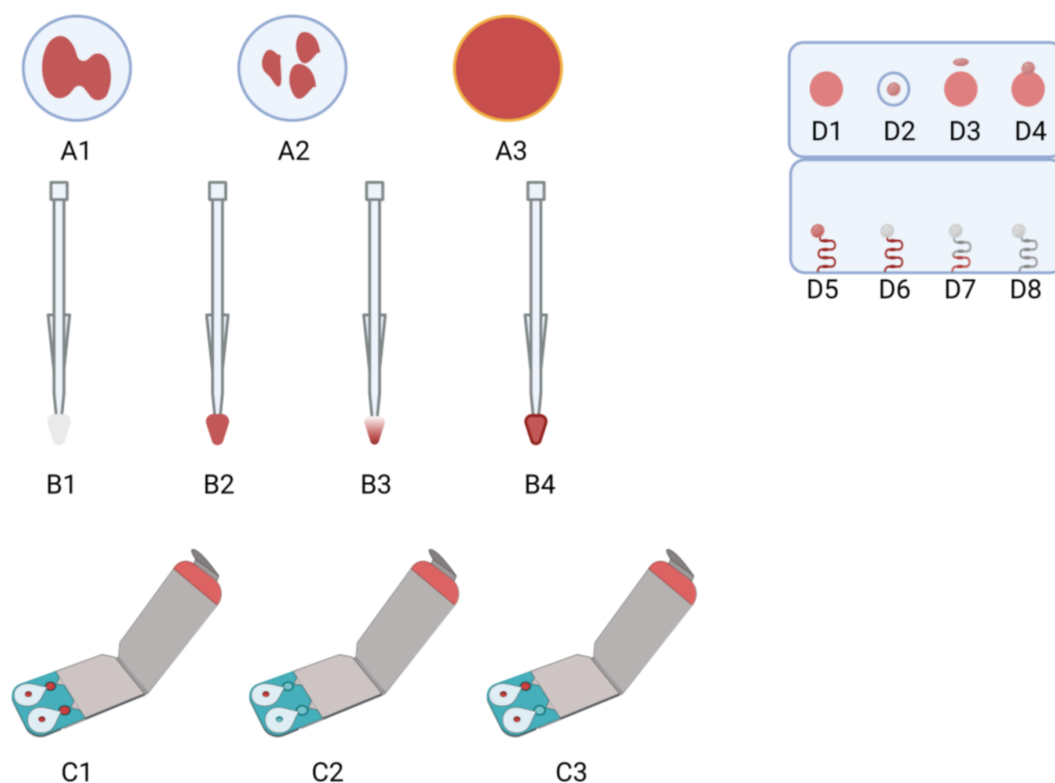
transplantacyjnych oraz osób wymagających częstych oznaczeń w celu oceny profilu farmakokinetycznego leku.

W odpowiedzi na te ograniczenia w ostatnich latach dynamicznie rozwijają się alternatywne strategie pobierania próbek, obejmujące przede wszystkim techniki mikropróbkowania. Wspólną cechą jest możliwość uzyskania bardzo małej ($\leq 50 \mu\text{L}$), coraz częściej ściśle określonej lub kontrolowanej objętości materiału biologicznego, najczęściej krwi włośniczkowej, pobieranej po nakłuciu opuszki palca lub pięty [5-7]. Podstawowy podział tych technik opiera się na stopniu kontrolowania objętości pobieranego materiału (Rycina 2).



Rycina 2. Przykłady technik mikropróbkowania oraz ich podstawowa klasyfikacja w oparciu o kontrolę objętości pobieranego materiału [4-8]. (a) Mitra™ (Neoteryx, Trajan); (b) hemaPEN™ (Neoteryx, Trajan); (c) urządzenia Capitainer® (Capitainer AB); (d) HemaXis™ DB10 (DBS system SA); (e) tasso-M20™ (Tasso Inc.).

Klasyczna technika DBS, znana od wielu dekad również jako karty Guthrie, m.in. z badań przesiewowych noworodków, polega na naniesieniu kropli krwi na specjalną kartę filtracyjną, wysuszeniu próbki i późniejszej analizie wyciętego fragmentu plamki [7]. Mimo licznych zalet, takich jak prostota, niski koszt i dobra stabilność wielu analitów, technika DBS ma ograniczenia w analizie ilościowej. Najważniejsze z nich to niekontrolowana objętość próbki, niejednorodność plamki, wpływ hematokrytu na wielkość i rozkład kropli, efekt chromatograficzny oraz możliwość błędów związanych z wyborem miejsca wycięcia dysku do analizy (Rycina 3) [7]. Oczywiście, znanych jest kilka podejść, które umożliwiają estymację objętości pobranego materiału na podstawie metod instrumentalnych opartych na analizie w podczerwieni, oznaczeniu stężenia hemoglobiny czy jonów potasu; niemniej jednak są one często skomplikowane, pracochłonne i nieosiągalne w rutynowych laboratoriach klinicznych [7-9]. Ograniczenia te są szczególnie ważne w TDM leków o wąskim indeksie terapeutycznym, gdzie nawet niewielkie odchylenia wyników mogą mieć znaczenie kliniczne.



Rycina 3. Typowe błędy charakterystyczne dla technik mikropróbkiwania [7-9]. Potencjalne problemy typowe dla wybranych urządzeń do mikrosamplowania. (a) Suche plamki krwi (DBS), (b) Mitra™, (c) Capitainer®, oraz (d) HemaXis™. Opis problemów: (A1) warstwowanie próbki; (A2) wielokrotne pobieranie próbki; (A3) oddzielenie frakcji osocza (efekt chromatograficzny); (B1) niezaladowany pusty próbnik Mitra™; (B2) poprawnie pobrana próbka; (B3) niepoprawnie załadowany krwią próbnik Mitra™; (B4) przepełniony próbnik Mitra™; (C1) poprawnie pobrana próbka; (C2) niezaladowany qDBS; (C3) próbki pobrane poprawnie (lewo) i niepoprawnie (prawo); (D1, D3, D5) próbka poprawnie załadowana i wycięta na papierze DBS Whatman 903™; (D2, D4, D6, D7) problemy związane z procesem pobierania próbki; (D8) nienapełniony system kapilarny do celów porównawczych. Utworzono w oprogramowaniu graficznym BioRender.

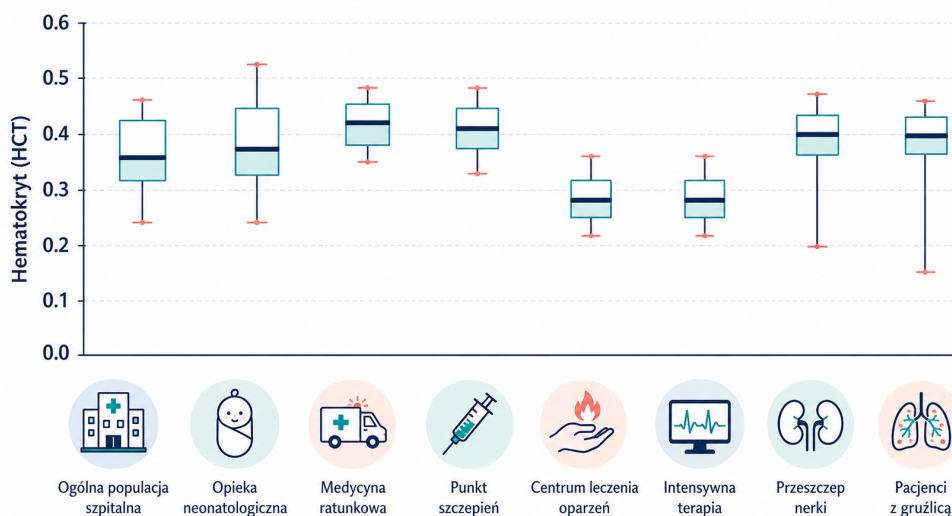
Nowoczesne metody, takie jak VAMS i qDBS, zostały opracowane, by przewyciężyć wspomniane problemy. VAMS używa porowatej końcówki absorpcyjnej, która pobiera ustaloną objętość krwi (zazwyczaj 10, 20 lub 30 μL), co zmniejsza zmienność wyników związanych z objętością próbki i ułatwia standaryzację pobrania. qDBS natomiast korzysta z rozwiązań mikrokapilarnych pozwalających na wygenerowanie kontrolowanej plamki krwi na papierowym nośniku [8-9]. Obie techniki zachowują wiele zalet tradycyjnego DBS, takich jak możliwość suszenia, przechowywania i transportu próbki, a jednocześnie zwiększają precyzję pomiarów ilościowych. W tabeli 1. przedstawiono podsumowanie podejść stosowanych w mikropróbkiwaniu.

Tabela 1. Zalety, ograniczenia, nazwy handlowe oraz informacje regulacyjne różnych technik mikropobierania dostępnych na rynku. Przygotowano na podstawie publikacji H8.

| Nazwa handlowa / producent | Technologia pobierania | Zalety | Ograniczenia | Status regulacyjny w wybranych regionach | Dostępne objętości |
|---|------------------------|---|---|--|---------------------|
| Urządzenia nieobjętościowe | | | | | |
| Whatman 903™, FTA® DMPK-B, PerkinElmer 226®, Ahlstrom 226® | DBS | Stosunkowo tańsze i łatwiej dostępne niż urządzenia objętościowe. Dobrze znane urządzenia, szeroko opisane w piśmiennictwie (w tym z potencjałem do automatyzacji). | Problemy charakterystyczne dla techniki DBS (tj. wpływ hematokrytu, efekt „wulkanu” i efekty chromatograficzne). | IVDR globalnie | ND |
| HemaSpot™ HF | DBS | Niska ochrona przed kontaminacją karty papierowej. Do sześciu równoważnych próbek z jednego urządzenia. | Urządzenie nieobjętościowe | EMA (IVDR) | ND |
| Urządzenia objętościowe | | | | | |
| Mitra™ | VAMS | Możliwość kontroli jakości próbki. Stosunkowo łatwe do samodzielnego pobierania próbek. | Ryzyko nadmiernego napełnienia próbki. Odczyt oznaczonego analitu zależy od wartości HCT. | EMA (IVDR); FDA (RUO); Kanada (IVDR); Australia (IVDR) | 10, 20 i 30 µL |
| Capitainer® | qDBS | Możliwość kontroli jakości i objętości próbki. Wysoki stopień ochrony przed kontaminacją próbki. Dwie próbki z jednego urządzenia. | Niska ochrona przed kontaminacją końcówki próbującej. Kształk próbki należy usunąć ręcznie pęsetą przed ekstrakcją. | EMA (IVDR); FDA (DC1) | 10 lub 50* µL |
| hemaPEN™ | qDBS | Cztery równoważne próbki z jednego urządzenia. Wysoki stopień ochrony przed kontaminacją próbki (odblokowanie urządzenia możliwe wyłącznie w laboratorium przy użyciu specjalnego narzędzia). | Pełna kontrola jakości i objętości próbki nie jest możliwa. Do uzyskania dostępu do wysuszonych plamek wymagane jest dodatkowe wyposażenie laboratoryjne. | EMA (IVDR); FDA (IVDR) | 4 plamki po 2,74 µL |
| hemaXis™ DB10 | qDBS | Pięć próbek z jednego urządzenia. Format karty DBS połączony z objętościowym pobieraniem próbki. Możliwość kontroli jakości próbki. | Ograniczona ochrona przed kontaminacją papieru DBS. | EMA (IVDR); FDA (DC1) | 10 µL |
| Tasso-M20™ | VAMS | Możliwość kontroli jakości próbki. Wysoki stopień ochrony przed kontaminacją próbki. Nakłuwacz do pobierania z ramienia jest zintegrowany z urządzeniem do pobierania krwi. Nie jest wymagany osobny etap suszenia. | Do prawidłowego przygotowania próbki konieczne są manualne etapy postępowania. | EMA (CE); FDA (RUO) | 4 próbki po 17,5 µL |
| Urządzenia objętościowe z wytwarzaniem osocza <i>in situ</i> | | | | | |
| Capitainer SEP10 | qDBS z separacją krwi | Możliwość pobierania próbek typu „plasma-like”. Zaawansowana kontrola jakości próbki i objętości*. Dwie próbki z jednego urządzenia. | Do wygenerowania jednej plamki osocza o objętości 10 µL wymagane jest co najmniej 70 µL krwi włośniczkowej. | EMA (IVDR); FDA (DC1) | 10 µL |
| Tellimmune (dawniej Noviplex) | qDBS z separacją krwi | Możliwość pobierania próbek typu „plasma-like”. Dwie próbki z jednego urządzenia. | Do wygenerowania jednej plamki osocza o objętości 3 µL wymagane jest co najmniej 25–60 µL krwi włośniczkowej. | EMA (RUO); FDA (DC1) | 3 µL |

ND – nie dotyczy; qDBS – ilościowe suche plamki krwi; DBS – suche plamki krwi; VAMS – objętościowo absorcyjne mikropobieranie; IVDR – rozporządzenie dotyczące wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*; RUO – wyłącznie do celów badawczych; DC1 – wyrób klasy 1.

Szczególnie istotnym zagadnieniem w przypadku mikropobierania jest efekt hematokrytu. Hematokryt wpływa na gęstość i lepkość krwi, migrację próbki w materiale nośnikowym, szybkość suszenia, rozkład analitu oraz skuteczność ekstrakcji [7,9]. W klasycznych DBS efekt ten może prowadzić do istotnych błędów ilościowych. Chociaż w technikach mikropobierania objętościowych jego wpływ na objętość pobrania jest ograniczony, nadal może wpływać na odzysk analitu z próbki oraz na efektywność ekstrakcji. Dlatego każda metoda oparta na mikropobieraniu wymaga indywidualnej oceny wpływu hematokrytu w zakresie właściwym dla danej populacji docelowej. Ma to szczególne znaczenie u pacjentów pediatrycznych i transplantacyjnych, u których niedokrwistość, przewlekła choroba nerek, leczenie immunosupresyjne lub stan zapalny mogą istotnie wpływać na osobnicze wartości hematokrytu (Rycina 4) [9].



Rycina 4. Typowe wartości hematokrytu obserwowane w populacjach pacjentów oraz ich indywidualna zmienność, opracowane na podstawie pracy De Kesel PM et al. [10].

Drugim kluczowym aspektem jest stabilność analitu w mikropróbce. Wsuszenie materiału biologicznego często zwiększa trwałość wielu związków w porównaniu z klasycznymi próbkami płynnymi, co sprzyja transportowi pocztowemu oraz przechowywaniu w temperaturze pokojowej. Nie dotyczy to jednak wszystkich analitów w takim samym stopniu. Stabilność zależy od właściwości chemicznych związku, rodzaju matrycy, zastosowanego urządzenia, warunków suszenia, temperatury, wilgotności, dostępu światła oraz czasu transportu. W przypadku niektórych leków lub ich metabolitów możliwe są degradacja, przemiany enzymatyczne albo konwersja metabolitów do wolnych leków, co może prowadzić do wyników fałszywie zaniżonych lub zawyżonych [6-8].

Z tego względu ocena stabilności w warunkach symulujących rzeczywiste pobranie, przechowywanie i transport są niezbędnym elementem walidacji metod mikropobierania. Wprowadzenie alternatywnych strategii pobierania próbek wymaga również odpowiedniej walidacji bioanalitycznej. Obejmuje ona ocenę selektywności, liniowości, dokładności, precyzji, dolnej granicy oznaczalności, efektu matrycowego, odzysku, stabilności, efektu przeniesienia oraz powtarzalności oznaczeń w próbkach rzeczywistych. W przypadku metod LC-MS/MS szczególne znaczenie ma dobór standardu wewnętrznego, optymalizacja ekstrakcji z mikropróbki oraz ograniczenie supresji lub wzmocnienia jonizacji [11-13]. Po raz pierwszy w wytycznych ICH M10, zaadaptowanych m.in. przez EMA pojawiły się wzmianki dotyczące odrębności procesu walidacji w przypadku technik mikropróbkowania [11]. W analizie leków immunosupresyjnych preferowane jest stosowanie wysokoselektywnych metod chromatograficznych sprzężonych z tandemową spektrometrią mas, ponieważ metody immunochemiczne mogą być podatne na interferencje wynikające z metabolitów lub związków o podobnej strukturze [14].

Sama walidacja analityczna nie jest jednak wystarczająca do wdrożenia metody mikropobierania w praktyce klinicznej. Konieczne jest przeprowadzenie badania pomostowego (ang. *bridging study*), które pozwala ocenić zgodność wyników uzyskiwanych z mikropróbek z wynikami uzyskiwanymi z matrycy rutynowej [7-8,13]. Ocena taka nie powinna opierać się wyłącznie na korelacji, ponieważ wysoki współczynnik korelacji nie oznacza automatycznie zgodności metod. Niezbędne są analizy regresji, takie jak Passinga-Babloka lub Deminga, ocena błędu systematycznego metodą Blanda-Altmana, analiza granic zgodności oraz określenie odsetka sparowanych wyników mieszczących się w przyjętych kryteriach akceptacji klinicznej i analitycznej (Tabela 2). **Dopiero połączenie walidacji bioanalitycznej i klinicznej pozwala ocenić, czy dana technika może zastąpić klasyczne pobieranie krwi czy jedynie ją uzupełnia** [8-9].

Tabela 2. Kryteria akceptacji przyjęte w walidacji krzyżowej i klinicznej technik alternatywnych [7-8, 13, 15-17].

| Element oceny porównawczej | Zalecany rodzaj analizy (testu) | Kryterium akceptacji | Interpretacja |
|---|---|---|---|
| Korelacja wyników | Współczynnik korelacji Pearsona lub Spearmana | Parametr pomocniczy; wysoka korelacja nie stanowi samodzielnego kryterium zgodności | Może wskazywać na współzmienną wyników, ale nie potwierdza zamienności metod |
| Zgodność proporcjonalna i stała | Regresja Passinga–Babloka lub Deminga | Nachylenie regresji bliskie 1, a punkt przecięcia bliski 0; 95% CI dla współczynnika kierunkowego powinien obejmować 1, a dla wyrazu wolnego 0 | Brak istotnego błędu proporcjonalnego i stałego między metodą referencyjną a alternatywną |
| Błąd systematyczny | Analiza błędów metodą Blanda–Altmana | Średni błąd (bias) powinien mieścić się w granicach akceptacji klinicznej, najczęściej $\pm 15\%$, a w mniej restrykcyjnych podejściach $\pm 20\%$ | Pozwala ocenić, czy metoda alternatywna systematycznie zawyża lub zaniża wyniki |
| Odsetek sparowanych wyników spełniających kryterium zgodności | Analiza sparowanych wyników względem wartości referencyjnej lub średniej obu pomiarów | Co najmniej 67% wyników powinno mieścić się w granicach $\pm 20\%$; w przypadku bardziej restrykcyjnych założeń można przyjąć $\pm 15\%$ | Kryterium praktycznej zamienności metod w badaniach pomostowych (ang. <i>bridging study</i>) |
| Ocena końcowa przydatności klinicznej | Łączna interpretacja wyników walidacji bioanalitycznej i klinicznej | Spełnienie kryteriów analitycznych oraz brak klinicznie istotnych odchyleń względem matrycy rutynowej | Pozwala stwierdzić, czy technika alternatywna może zastąpić metodę klasyczną, czy jedynie ją uzupełniać |

Innym wyzwaniem jest sytuacja, gdy mikroprobka i matryca rutynowa nie są bezpośrednio porównywalne pod względem stężenia analitów. Dotyczy to głównie leków, dla których interpretacja kliniczna dokonywana jest na podstawie zdefiniowanych zakresów terapeutycznych stężenia w osoczu lub surowicy, podczas gdy mikroprobka pochodzi z krwi pełnej włośniczkowej [7-8]. W takich przypadkach może być konieczne opracowanie strategii przeliczeniowej. Może ona obejmować użycie prostego współczynnika korekcyjnego, wzoru zależnego od hematokrytu lub populacyjnego równania konwersji, wyprowadzonego na podstawie badań prowadzonych w grupie walidacyjnej pacjentów i potwierdzonych w niezależnej grupie weryfikacyjnej (Rycina 5) [8]. Przykładami takich problemów są kwas mykofenolowy oraz kreatynina, dla których kliniczna interpretacja również opiera się na oznaczeniach w surowicy lub osoczu.

$$\frac{C_{bl}}{C_{pl}} = (1 - Hct) + Hct \times \rho \times f_u \quad \text{Równanie 1}$$

$$\frac{C_{cap}}{C_{pl}} = (1 - Hct) + Hct \times \rho \times f_u \quad \text{Równanie 2}$$

$$EC_{pl} = \frac{C_{cap}}{(1 - Hct) + Hct \times \rho \times f_u} \quad \text{Równanie 3}$$

$$EC_{pl} = \frac{C_{cap}}{1 - Hct} \quad \text{Równanie 4}$$

$$C_{cap,corrected} = \frac{C_{cap}}{1 - (Hct_{cal} - Hct_{indiv})} \quad \text{Równanie 5}$$

$$EC_{pl} = \frac{C_{cap,corrected}}{1 - Hct_{indiv}} = \frac{C_{cap}}{1 - (Hct_{cal} - Hct_{indiv})} \times \frac{1}{1 - Hct_{indiv}} \quad \text{Równanie 6}$$

$$EC_{pl} = \frac{C_{cap}}{(1 - Hct) + Hct \times K_{rbc/pl}} \quad \text{Równanie 7}$$

$$EC_{pl} = C_{cap} \times \frac{1}{\frac{C_{bl}}{C_{pl}}} \quad \text{Równanie 8}$$

$$EC_{pl} = C_{cap} \times \frac{1}{\left(\frac{C_{bl}}{C_{pl}}\right)(T_x)} \quad \text{Równanie 9}$$

$$EC_{pl} = C_{cap} \times \frac{1}{\frac{C_{cap}}{C_{pl}}} \quad \text{Równanie 10}$$

$$EC_{pl} = \frac{C_{cap}}{\text{slope}} \quad \text{Równanie 11}$$

$$EC_{pl} = \frac{C_{cap} - \text{intercept}}{\text{slope}} \quad \text{Równanie 12}$$

$$EC_{pl} = \frac{C_{cap}}{1 - Hct} \times \text{współczynnik konwersji} \quad \text{Równanie 13}$$

$$MPPE (\%) = \text{median} \left(\frac{EC_{pl} - C_{pl}}{C_{pl}} \right) \times 100\% \quad \text{Równanie 14}$$

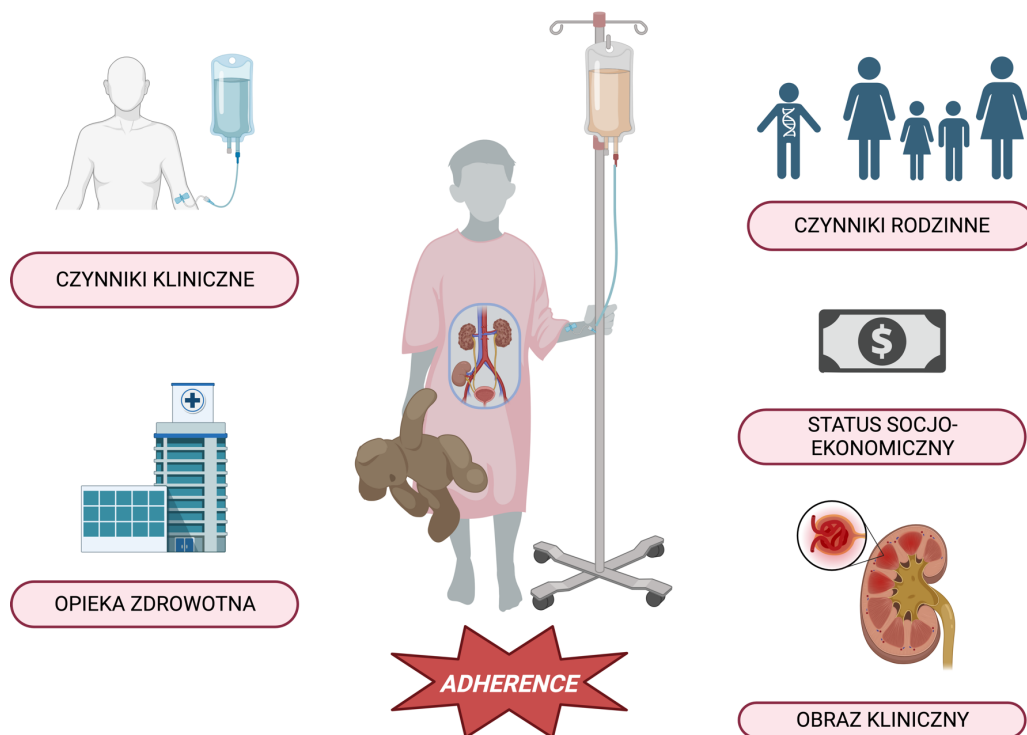
$$MAPE (\%) = \text{median} \left(\frac{|EC_{pl} - C_{pl}|}{C_{pl}} \right) \times 100\% \quad \text{Równanie 15}$$

Rycina 5. Strategie konwersji stężonych oznaczonych w mikropóbkach krwi włośniczkowej do oszacowanych stężonych w osoczu żylnym. Zestawienie obejmuje podejścia oparte na hematokrycie, parametrach farmakokinetycznych, współczynnikach konwersji oraz modelach regresyjnych. Opracowano na podstawie wytycznych IATDMCT według Boffel i wsp. [8]. Objasnienia: C_{bl} — stężenie we krwi żylniej; C_{cap} — stężenie we krwi włośniczkowej; C_{pl} — stężenie w osoczu żylnym; EC_{pl} — estymowane stężenie w osoczu; Hct — hematokryt; Hct_{cal} — hematokryt kalibratorów; Hct_{indiv} — hematokryt próbki indywidualnej; f_u — frakcja niezwiązana analitu; ρ — stosunek stężenia we krwinkach czerwonych do stężenia niezwiązanego w osoczu; $K_{rbc/pl}$ — współczynnik podziału krwinki czerwone/osocze; MPPE — mediana procentowego błędu predykcji; MAPE — mediana bezwzględnego procentowego błędu predykcji.

Rozwój mikropobierania wpisuje się w szerszą koncepcję pacjentocentrycznej diagnostyki laboratoryjnej. Zakłada ona, że sposób pobrania materiału powinien być dostosowany nie tylko do wymagań analitycznych, ale również do potrzeb pacjenta, jego wieku, stanu klinicznego, miejsca zamieszkania, możliwości samodzielnego wykonania procedury oraz częstotliwości monitorowania [18-21]. W transplantologii ma to szczególne znaczenie, ponieważ pacjenci wymagają wieloletniej, często dożywotniej kontroli farmakoterapii immunosupresyjnej, a same ośrodki transplantacyjne działają w sposób zcentralizowany. Możliwość samodzielnego pobierania próbek w domu może ograniczyć liczbę wizyt w ośrodku transplantacyjnym, zmniejszyć obciążenie pacjentów i ich opiekunów, ułatwić wykonywanie profili farmakokinetycznych oraz poprawić dostępność TDM poza dużymi ośrodkami klinicznymi.

Mikropóbkowanie w warunkach domowych może również wspierać ocenę stopnia przestrzegania zaleceń terapeutycznych (*adherence*), co jest jednym z istotnych czynników wpływających na długoterminowe wyniki transplantacji. Nieregularne przyjmowanie leków immunosupresyjnych prowadzi do zwiększonej zmienności stężenia leku, co zwiększa ryzyko

odrzućcia przeszczepionego narządu oraz jego utraty. Częstsze, mniej uciążliwe i możliwe do wykonania zdalnie oznaczanie stężenia leków może pozwolić na wcześniejsze wykrycie problemów z adherencją oraz na lepszą współpracę pacjenta z zespołem transplantacyjnym. Jest to szczególnie istotne u młodzieży i młodych dorosłych, u których nieadekwatna adherencja stanowi istotny problem kliniczny, powiązany z różnymi czynnikami determinującymi stopień nieprzestrzegania zaleceń (Rycina 6) [18-21].



Rycina 6. Czynniki wpływające na stopień nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych w grupie pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu narządowym [21].

Wdrożenie mikropóbkowania do praktyki wymaga jednak nie tylko opracowania metody analitycznej, ale również stworzenia całego systemu organizacyjnego. Obejmuje ono:

- wybór odpowiedniego urządzenia,
- przygotowanie instrukcji dla pacjentów,
- szkolenie personelu i opiekunów,
- kontrolę jakości pobranych próbek,
- procedury transportu,
- kryteria odrzucenia materiału z powodu błędów przedanalitycznych,
- sposób raportowania wyników,
- udział laboratorium w zewnętrznych programach kontroli jakości.

Dopiero taki kompleksowy model pozwala traktować mikropobieranie jako realne narzędzie kliniczne. Na tym tle przedstawiony przeze mnie cykl publikacji obejmuje pełną ścieżkę translacyjną — od identyfikacji problemu klinicznego, przez opracowanie i walidację metod LC–MS/MS, ocenę stabilności, hematokrytu i efektów matrycowych, po porównanie z metodami rutynowymi oraz zastosowanie w rzeczywistych populacjach pacjentów.

W centrum tych badań stoi pytanie:

Czy alternatywne strategie pobierania próbek mogą zachować wymaganą jakość analityczną, a jednocześnie poprawić dostępność, komfort i praktyczną użyteczność terapeutycznego monitorowania leków?

Odpowiedź na to pytanie ma znaczenie nie tylko dla bioanalizy i farmakokinetyki, lecz także dla organizacji nowoczesnej, zdecentralizowanej opieki nad pacjentem przewlekle leczonym, zwłaszcza po transplantacji narządów.

4.6. Prace w kręgu tematycznym osiągnięcia habilitacyjnego opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

Moje zainteresowania optymalizacją terapii immunosupresyjnej ukształtowały się już na etapie realizacji pracy magisterskiej, poświęconej farmakodynamicznemu monitorowaniu kwasu mykofenolowego. Zostały one następnie rozwinięte w ramach badań dotyczących stosowania leków towarzyszących oraz ich potencjalnego wpływu na wyniki terapeutycznego monitorowania stężeń leków immunosupresyjnych (prace **D2** i **D3**). Badania dotyczące zastosowania alternatywnych strategii próbkowania w terapii monitorowanej zostały przeze mnie zapoczątkowane podczas realizacji pracy doktorskiej (prace **D4** – **D6**). W tym okresie opracowałem referencyjną metodę oznaczania takrolimusu w pełnej krwi żyłnej, zgodną z wytycznymi IATDMCT oraz ICH M10 w zakresie walidacji metod bioanalitycznych [12,22]. Doświadczenia zdobyte podczas opracowania i walidacji tej metody stanowiły podstawę do opracowania oraz klinicznego zastosowania kolejnej procedury analitycznej, ograniczonej już do mikróbkowania objętościowo-absorpcyjnego. Metoda ta spełniła wszystkie przyjęte kryteria akceptacji i do chwili obecnej jest stosowana zarówno w rutynowej diagnostyce pacjentów, jak i w oznaczeniach wykonywanych w ramach działalności naukowej (projekt **GP6**). Co więcej, metoda ta pozytywnie przechodzi sprawdziany biegłości laboratoriów w zakresie oznaczania stężenia takrolimusu. Wyniki tych badań zostały przedstawione w pracy oryginalnej [**D5**].

Pozytywne opinie pacjentów dotyczące sposobu pobierania próbki, a także możliwość wykonania tej procedury zdalnie, w warunkach domowych i samodzielnie przez pacjenta lub jego opiekuna, zachęciły mnie do opracowania kolejnej metody, tym razem służącej oznaczaniu kwasu mykofenolowego — leku stanowiącego integralny element większości schematów immunosupresyjnych, stosowanego jako prolek, tj. mykofenolan mofetylu, lub jako sól sodowa, tj. mykofenolan sodu. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań, opracowałem referencyjną metodę LC–MS/MS oznaczania kwasu mykofenolowego w osoczu i surowicy. Następnie podjąłem się opracowania metody oznaczania tego leku we krwi włośniczkowej pobranej za pomocą systemu Mitra™ (wyniki opublikowane w pracy **D6**).


W przypadku kwasu mykofenolowego sama metodyka analityczna oraz czułość oznaczenia nie stanowiły zasadniczego ograniczenia, ze względu na stosunkowo wysokie stężenia leku obserwowane w stanie stacjonarnym, oznaczane jako stężenie minimalne przed podaniem porannej dawki. Kluczowym wyzwaniem było natomiast opracowanie wiarygodnej metody

przeliczania stężenia oznaczonego we krwi włósniczkowej na stężenie estymowane w osoczu, ponieważ dostępne zakresy terapeutyczne kwasu mykofenolowego odnoszą się do osocza lub surowicy. W tym celu zastosowałem dwa podejścia: pierwsze, powszechnie opisywane w literaturze, oparte na pomiarze hematokrytu oraz drugie, bardziej złożone, polegające na wyprowadzeniu populacyjnego równania przeliczeniowego. Najpierw opracowałem współczynnik konwersji na podstawie analizy regresji Passing–Babloka, a następnie przeprowadziłem jego walidację kliniczną. **Warto podkreślić, że w momencie publikacji była to pierwsza praca w światowej literaturze dotycząca zastosowania techniki mikropróbkowania objętościowo-absorpcyjnego u dzieci w celu oznaczania kwasu mykofenolowego. Ponadto po raz pierwszy zaprezentowano udany współczynnik przeliczeniowy, który spełnił wszystkie kryteria akceptacji walidacji klinicznej zarówno w grupie badanej, jak i w grupie weryfikacyjnej [9, 23-24].**

Metoda ta, po wprowadzeniu modyfikacji obejmujących ilościowy pomiar metabolitu, została wykorzystana w części pracy habilitacyjnej [H6]. Opracowana procedura zostanie również zastosowana w projekcie wewnętrznym **GP10**, realizowanym w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie. W tym projekcie planowana jest weryfikacja współczynnika konwersji stężenia włósniczkowego na estymowane stężenie osoczowe, ponieważ populacją docelową będą dzieci z zespołem nerczycowym, leczone mykofenolanem mofetylu.

4.7. Omówienie prac wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego

Doświadczenia zdobyte podczas realizacji pracy doktorskiej, a także zainteresowanie lekarzy, pacjentów pediatrycznych i ich opiekunów alternatywnymi strategiami pobierania próbek wyznaczyły dalszy kierunek mojej działalności naukowej. **Po uzyskaniu stopnia doktora rozszerzyłem pierwotny obszar badań nad mikropróbkowaniem w TDM takrolimusu i MPA na kolejne klasy analitów, w tym inhibitory kalcyneuryny, inhibitory mTOR, leki przeciwwirusowe oraz biomarkery funkcji nerek. Pozwolilo to przejść od pojedynczych metod analitycznych do spójnego modelu walidacji oraz klinicznego wdrażania alternatywnych strategii pobierania próbek.**

Praca oryginalna H1: Kocur A. , Kot B., Moczulski M., Czajkowska A., Rubik J., Sierakowski M., Pawiński T. A novel approach to therapeutic drug monitoring of Ciclosporin in pediatric renal transplant recipients using volumetric absorptive microsampling (VAMS) - Teaching old dog new tricks. *Clinica Chimica Acta*, 2024, tom 562, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119877>.

Cyklosporyna A (CsA) jest cyklicznym polipeptydem, inhibitorem kalcyneuryny. Chociaż w wielu schematach immunosupresji, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych po przeszczepieniu narządów, jest coraz częściej zastępowana przez takrolimus, ten lek nadal odgrywa ważną rolę w terapii w wybranych przypadkach klinicznych. CsA może być stosowana *de novo* u pacjentów, u których takrolimus jest przeciwwskazany lub mniej korzystny, na przykład w przypadku padaczki lekoopornej albo cukrzycy, a także w ramach konwersji leczenia w przypadku wystąpienia nasilonych działań niepożądanych takrolimusu, takich jak neurotoksyczność, trombocytopenia czy mikroangiopatia [25].

W pracy **H1** włączonej do prezentowanego cyklu habilitacyjnego przedstawiłem podejście do monitorowania stężenia CsA w zakresie kalibracyjnym 1–2000 ng/mL zarówno w próbkach krwi pełnej (metoda referencyjna), jak i w mikropórkach krwi włośniczkowej pobranych za pomocą systemu mikropórkowania objętościowo-absorpcyjnego Mitra™ (metoda alternatywna). Rutynowo stężenie CsA oznaczane jest w próbkach pobranych bezpośrednio przed kolejną dawką leku, czyli jako stężenie minimalne w stanie stacjonarnym (C_0). W części zaleceń oraz publikacji klinicznych wskazuje się jednak również na możliwość oznaczania stężenia cyklosporyny w punkcie C_2 , tj. około 2 godzin po podaniu dawki leku. Wynika to z faktu, że C_2 może lepiej odzwierciedlać fazę wchłaniania leku i korelować z ekspozycją ogólnoustrojową, szczególnie z polem pod krzywą stężenie–czas w początkowym okresie po podaniu dawki [3,25]. Parametr ten bywa zatem wykorzystywany jako dodatkowe narzędzie optymalizacji dawkowania cyklosporyny, zwłaszcza w sytuacjach, w których samo C_0 może nie odzwierciedlać w pełni zmienności ekspozycji pacjenta na lek. W pracy **H1** próbki w punkcie C_2 nie były pobierane, ponieważ w ośrodku transplantacyjnym współpracującym przy badaniu standardem monitorowania cyklosporyny było oznaczanie minimalnego stężenia C_0 . Niemniej jednak metody zwalidowałem w zakresie obejmującym przewidywane stężenia w punkcie C_2 , co przekłada się na potencjalną uniwersalność ich zastosowania.

W ramach pracy opracowałem i zwalidowałem dwie metody oznaczania CsA z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC–MS/MS): metodę referencyjną dla krwi pełnej oraz metodę alternatywną dla próbek krwi włośniczkowej pobranej systemem Mitra™. Ze względu na charakter mikropórek – jest to wysuszona krew włośniczkowa – dokonano rekonstrukcji matrycy wodą. Dla obydwu matryc ekstrakcję CsA przeprowadzono z wykorzystaniem roztworu precypitacyjnego zawierającego 0,1M CuSO_4 oraz ACN (1:1, v/v). Takie podejście zapewniło zadowalający odzysk analitu, odpowiednie oczyszczenie próbki analizowanej w systemie LC–MS/MS oraz skuteczną kompensację efektów matrycowych. Co ciekawe, inkubacja próbki w temperaturze $-40\text{ }^\circ\text{C}$, przez 10 minut po ekstrakcji i wytrącaniu białka znacznie poprawiła stopień odzysku analitu oraz stopień oczyszczenia próbki. Schematyczne protokoły przygotowania próbek do analizy przedstawiono na rycinie 7.

Protokół metody WB-LC-MS/MS



Protokół metody VAMS-LC-MS/MS



Rycina 7. Protokoły przygotowania próbek krwi pełnej i Mitra™ do analizy LC–MS/MS w celu oznaczenia cyklosporyny A.

Obie metody zwalidowano w zakresie kalibracyjnym 1–2000 ng/mL, uzyskując odpowiednią czułość, selektywność, liniowość, precyzję, dokładność oraz stabilność analitu. Szczególne znaczenie miało wykazanie, że metoda VAMS spełnia wymagania bioanalityczne zgodne z wytycznymi EMA oraz zaleceniami IATDMCT dotyczącymi oznaczania leków immunosupresyjnych [3,11,13]. Zastosowanie próbników o objętości 10 µL oznaczało około 120-krotne zmniejszenie objętości próbki w porównaniu z próbką krwi żyłnej rutynowo pobieraną w ośrodku transplantacyjnym o objętości 1,2 ml. Tak znaczne ograniczenie objętości pobieranego materiału ma szczególne znaczenie w populacji pediatrycznej ze względów klinicznych, etycznych i praktycznych.

Istotnym elementem pracy było również wykazanie, że askomycyna (jako strukturalny analog makrolidowych leków immunosupresyjnych), zastosowana jako standard wewnętrzny, zapewniła korzystniejsze wyniki walidacyjne niż znakowany izotopowo analog cyklosporyny, CsA-d₄. Prawdopodobnie wynikało to z ograniczonej czystości izotopowej deuterowanego analogu, którym dysponowałem na etapie opracowywania metody. Dodatkowo wykazałem, że komercyjnie dostępne materiały kontroli jakości w postaci lizatów pełnej krwi mogą zostać z powodzeniem zastosowane w codziennej pracy laboratorium, co zwiększa praktyczną użyteczność opracowanej procedury.

Ważną częścią publikacji była ocena przydatności metody w materiale klinicznym. Badaniem objęto 20 pediatrycznych pacjentów po przeszczepieniu nerki, od których pobrano próbki krwi pełnej oraz krwi włośniczkowej (Mitra™-VAMS). Łącznie wykonałem 180 oznaczeń z zastosowaniem trzech podejść analitycznych: opracowanej metody WB-LC–MS/MS, opracowanej metody VAMS-LC–MS/MS oraz rutynowo stosowanej komercyjnej metody immunochemicznej ACMIA (metoda immunochemiczna z przeciwciałami sprzężonymi z cząstkami magnetycznymi, ang. *antibody-conjugated magnetic immunoassay*). Średnie stężenie cyklosporyny oznaczone metodą WB-LC–MS/MS wynosiło $139,99 \pm 95,26$ ng/mL, metodą VAMS-LC–MS/MS $140,17 \pm 102,24$ ng/mL, natomiast metodą ACMIA $145,30 \pm 103,73$ ng/mL. Porównanie wyników wykazało bardzo dobrą zgodność między metodą referencyjną LC–MS/MS we krwi pełnej a metodą VAMS-LC–MS/MS. Analiza regresji Passinga–Babloka potwierdziła wymiennosc obu metod, zgodnie z równaniem: $VAMS_{CsA} = 0,98 \times WB_{CsA} - 1,16$; przy wysokim współczynniku korelacji $r = 0,99$ ($p < 0,0001$; 95% CI: 0,964–0,998). Analiza Blanda–Altmana wykazała niski średni błąd systematyczny wynoszący $-1,68\%$ (95% CI: $-5,14$ do $1,78\%$), a 100% porównywanych próbek spełniało kryteria akceptacji EMA oraz IATDMCT (odpowiednio: $<20\%$ oraz $<15\%$).

Dodatkowo przeprowadziłem porównanie z rutynowo stosowaną metodą immunochemiczną ACMIA. Dla sparowanych wyników relacji ACMIA *versus* WB-LC–MS/MS średni błąd (*bias*) wynosił $-3,96\%$ (95% CI: $-7,29$ do $-0,65\%$), natomiast dla relacji ACMIA *versus* VAMS-LC–MS/MS $-1,68\%$ (95% CI: $-5,15$ do $1,78\%$). Mimo że analiza regresji Passinga–Babloka wykazała brak pełnej równoważności metod immunochemicznych i chromatograficznych, ponad 67% wyników mieściło się w granicach $\pm 15\%$, spełniając kryteria EMA oraz IATDMCT dla porównań między metodami. Wykazano również wysoką

korelację pomiędzy ACMIA a WB-LC-MS/MS ($r = 0,964$; 95% CI: 0,939–0,979) oraz pomiędzy ACMIA a VAMS-LC-MS/MS ($r = 0,952$; 95% CI: 0,919–0,971).

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że opracowana metoda została dodatkowo zweryfikowana w ramach międzynarodowego programu kontroli jakości (ang. *international proficiency testing*, IPT) w zakresie oznaczania cyklosporyny. Wykazano wysoką zgodność wyników uzyskanych metodą VAMS-LC-MS/MS z wynikami referencyjnymi, co znacznie podnosi wiarygodność opracowanej procedury i potwierdza zasadność jej wdrożenia w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej. Jest to istotne, ponieważ sama walidacja analityczna nie zawsze wystarcza do potwierdzenia przydatności metody w praktyce klinicznej, natomiast udział w zewnętrznym systemie kontroli jakości stanowi dodatkowy poziom standaryzacji oraz obiektywnej oceny jakości oznaczeń.

Ograniczeniem badania było włączenie sparowanych próbek pochodzących od 20 pacjentów, pobieranych w różnych punktach obserwacji klinicznej. Należy jednak podkreślić, że łączna liczba sparowanych wyników była wystarczająca do przeprowadzenia oceny klinicznej zgodności metod, a uzyskane wyniki spełniły przyjęte kryteria akceptacji w porównaniu metody alternatywnej z metodą referencyjną. Ponadto zastosowanie zarówno analizy korelacyjnej, jak i analizy zgodności, a także potwierdzenie jakości oznaczeń w zewnętrznym programie IPT, znacząco podnoszą wiarygodność uzyskanych wniosków.

Podobnie jak metody opracowane przeze mnie w trakcie realizacji pracy doktorskiej, metoda oznaczania cyklosporyny A w próbkach krwi włośniczkowej pobieranej za pomocą systemu VAMS jest obecnie wykorzystywana w terapii monitorowanej pacjentów po przeszczepieniu nerki i wątroby leczonych w IP-CZD w Warszawie, w tym w ramach kierowanego przeze mnie projektu VAMS-LTX (projekt **GP6**).

Praca **H1** stanowi zatem ważny element mojego cyklu habilitacyjnego, ponieważ dokumentuje przejście od opracowania i walidacji metody bioanalitycznej do jej zastosowania klinicznego oraz potwierdza możliwość wdrożenia mikropróbki objętościowo-absorpcyjnego dla cyklosporyny A jako realnej alternatywy dla klasycznego pobierania krwi żyłnej w terapeutycznym monitorowaniu leków immunosupresyjnych u pacjentów pediatrycznych. **Na moment publikacji pracy H1 było to pierwsze badanie oceniające zastosowanie VAMS w terapeutycznym monitorowaniu cyklosporyny u pediatrycznych biorców przeszczepu nerki, co podkreśla oryginalny wkład pracy w rozwój pacjentocentrycznego TDM leków immunosupresyjnych.**

Praca oryginalna H2: Kocur A. [✉], Czajkowska A., Rębis K., Rubik J., Moczulski M., Kot B., Sierakowski M., Pawiński T. Personalization of pharmacotherapy with sirolimus based on volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients—from LC-MS/MS method validation to clinical application. *Pharmacological Reports*, 2024, tom 76, nr 6, str.: 1443-1455. <https://doi.org/10.1007/s43440-024-00663-9>.

Naturalną kontynuacją prowadzonych badań było rozszerzenie zastosowania mikropróbki objętościowo-absorpcyjnego na kolejny lek immunosupresyjny wymagający terapeutycznego monitorowania stężenia — sirolimus (rapamycyna). Wyniki tych badań zostały przedstawione w pracy **H2** włączonej do składu osiągnięcia

habilitacyjnego. Praca ta wpisuje się bezpośrednio w główny nurt mojego cyklu habilitacyjnego, ponieważ dotyczy opracowania, walidacji oraz klinicznego zastosowania metody LC–MS/MS umożliwiającej oznaczanie leku immunosupresyjnego w mikropróbkach krwi włośniczkowej u dzieci po transplantacji nerki.

Sirolimus (rapamycyna) jest inhibitorem szlaku mTOR stosowanym w immunosupresji po transplantacji narządów, w tym u biorców przeszczepu nerki. Ze względu na wąski indeks terapeutyczny, dużą zmienność międzyosobniczą i wewnątrzosobniczą parametrów farmakokinetycznych oraz ryzyko poważnych konsekwencji klinicznych zarówno niedostatecznej, jak i nadmiernej ekspozycji, lek ten wymaga indywidualizacji dawkowania na podstawie terapeutycznego monitorowania stężenia [3]. Rutynowo sirolimus monitorowany jest poprzez oznaczanie stężenia minimalnego C_0 we krwi pełnej, a typowy zakres stężeń obserwowany w praktyce klinicznej wynosi około 3–20 ng/mL, w zależności od rodzaju przeszczepionego narządu [3, 26]. Sirolimus wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do elementów morfotycznych krwi, przede wszystkim erytrocytów (>95%), dlatego pełna krew pozostaje właściwą matrycą referencyjną do jego oznaczania. Jednocześnie w populacji pediatrycznej szczególnie istotne jest ograniczenie objętości pobieranej krwi oraz uproszczenie procedury przedanalizycznej, co uzasadnia zastosowanie technik mikropróbki, takich jak VAMS [3,8].

W pracy **H2** opracowałem i zwalidowałem dwie metody oznaczania sirolimusu z zastosowaniem LC–MS/MS: metodę referencyjną dla próbek krwi pełnej oraz metodę alternatywną dla mikropróbek krwi włośniczkowej pobieranych za pomocą systemu VAMS-Mitra™ o objętości 10 μ L.

W odróżnieniu od pracy **H1**, w której dla próbek VAMS zastosowano prostszą procedurę przygotowania, w pracy **H2** konieczna była dalsza optymalizacja ekstrakcji ze względu na niższe stężenia terapeutyczne sirolimusu. Przygotowanie próbek krwi pełnej oparto na hemolizie indukowanej wodą oraz precypitacji białek w mieszaninie 0,1 M CuSO_4 : ACN w stosunku 1:1 (v/v). Natomiast w przypadku próbek VAMS zastosowałem bardziej zaawansowaną procedurę obejmującą ekstrakcję analitu z końcówki VAMS wodą, wspomaganą sonikacją i wytrząsaniem, a następnie oczyszczanie i zateżenie próbki z wykorzystaniem dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz–ciecz (DLLME) z użyciem mieszaniny eteru *tert*-butylo-metylowego i ACN. DLLME jest nowoczesną techniką mikroekstrakcyjną opartą na szybkim rozproszeniu niewielkiej objętości rozpuszczalnika ekstrahującego w próbce ciekłej, co umożliwia efektywne zateżenie analitu oraz poprawę odzysku przy jednoczesnym ograniczeniu zużycia rozpuszczalników organicznych i objętości materiału biologicznego. **W przypadku próbek VAMS było to pierwsze przedstawione w literaturze rozwiązanie metodyczne dla matrycy tego typu i pozwoliło uzyskać odpowiednią czułość metody przy bardzo małej objętości materiału biologicznego.**

Obie metody zostały zwalidowane zgodnie z wytycznymi EMA, FDA oraz zaleceniami IATDMCT dotyczącymi oznaczania leków immunosupresyjnych [12-14]. Zakres kalibracyjny metody obejmował 0,25–60 ng/mL, co pozwalało na oznaczanie sirolimusu zarówno w typowych stężeniach terapeutycznych, jak i w próbkach o bardzo niskim lub podwyższonym stężeniu leku. Granica wykrywalności dla obu metod wynosiła 0,10 ng/mL,

co potwierdza wysoką czułość opracowanych procedur. Podobnie jak w pracy **H1**, szczególną uwagę poświęciłem doborowi standardu wewnętrznego. Porównywano zastosowanie trzech podejść w odniesieniu do zastosowanego standardu wewnętrznego: analogu strukturalnego (temsirolimus), standardu niepowiązanego strukturalnie w sposób ścisły (askomycyna) oraz analogu znakowanego izotopowo (d_3 -sirolimus). Pomimo zbliżonych wyników walidacyjnych uzyskanych w metodzie opartej na krwi pełnej dla dwóch ostatnich standardów wewnętrznych, do walidacji metody VAMS-LC-MS/MS wybrano askomycynę, która zapewniała odpowiednią kompensację efektów matrycowych, dobrą stabilność oraz korzystny profil użytkowy w rutynowej pracy laboratoryjnej ze względu na stosunkowo niski koszt. Miało to znaczenie praktyczne, ponieważ metoda miała nie tylko spełniać kryteria określone w odpowiednich wytycznych, ale również być możliwa do wdrożenia w realnych warunkach laboratorium TDM.

Metoda VAMS-LC-MS/MS spełniła wszystkie kryteria akceptacji pod względem dokładności i precyzji. Dla oznaczeń wewnątrzdziennej (w tym przypadku również wewnątrzseryjnych) dokładność wynosiła od 98,51% do 102,82%, a nieprecyzyjność od 1,88% do 7,08%. Dla oznaczeń międzydniowych (w tym przypadku również międzyseryjnych) dokładność mieściła się w zakresie 96,20–101,12%, a nieprecyzyjność wynosiła 1,56–4,54%. Wyniki te potwierdziły wysoką powtarzalność i odtwarzalność metody, także przy najniższych poziomach kontroli jakości. Nie stwierdzono istotnego efektu przeniesienia: dla sirolimusu w metodzie VAMS-LC-MS/MS wynosił on $0,522 \pm 0,091\%$, a dla askomycyny $0,093 \pm 0,071\%$. Analogicznie, w metodzie WB-LC-MS/MS efekt przeniesienia również był nieistotny i wynosił $0,643 \pm 0,120\%$ dla sirolimusu.

Ważnym elementem pracy była również ocena efektu matrycowego, odzysku oraz wydajności procesu przygotowania próbki. W przypadku metody VAMS-LC-MS/MS odzysk bezwzględny sirolimusu dla poziomu LQC wynoszącego 0,35 ng/mL wynosił $74,21 \pm 3,01\%$, a dla poziomu HQC wynoszącego 45 ng/mL – $75,11 \pm 4,12\%$. Wartości współczynnika matrycowego znormalizowanego względem standardu wewnętrznego były bliskie 100%, co potwierdzało skuteczną kompensację efektów matrycowych przez askomycynę. Dla LQC współczynnik ten wynosił $101,36 \pm 11,01\%$, natomiast dla HQC $99,02 \pm 6,33\%$. Dane te wskazują, że mimo niewielkiej objętości próbki oraz konieczności ekstrakcji analitu z materiału wysuszonego na końcówce VAMS, opracowana procedura zapewniała stabilne i wiarygodne wyniki ilościowe.

Szczególnie istotna była ocena wpływu hematokrytu, ponieważ zmienność hematokrytu jest jednym z głównych potencjalnych ograniczeń technik opartych na wysuszonej krwi. Efekt hematokrytowy oceniono na trzech poziomach hematokrytu: 0,24, 0,43 i 0,64, oraz dla dwóch poziomów kontroli jakości. Dla LQC odzysk wynosił odpowiednio $96,78 \pm 3,23\%$, $101,11 \pm 1,41\%$ oraz $103,45 \pm 1,06\%$, natomiast dla HQC odpowiednio $98,98 \pm 4,06\%$, $100,87 \pm 2,03\%$ oraz $98,96 \pm 1,98\%$. Ponadto w części klinicznej nie wykazano istotnej zależności pomiędzy różnicami stężenia sirolimusu oznaczonych w próbkach krwi pełnej i VAMS a osobniczymi wartościami hematokrytu pacjentów. Współczynnik korelacji Spearmana wynosił 0,2740, przy $p = 0,0621$, co wskazuje na brak istotnego klinicznie wpływu hematokrytu na wynik oznaczenia.

Przeprowadzono również ocenę stabilności sirolimusu w mikropróbkach VAMS oraz w przetworzonych próbkach do analiz LC–MS/MS. próbki przechowywane w autosamplerze w temperaturze 5°C zachowywały odpowiednią stabilność przez 7 dni. Dla poziomu LQC stabilność po 7 dniach wynosiła 86,49%, natomiast dla HQC 97,17%, co mieściło się w przyjętych kryteriach akceptacji. W badaniu długoterminowym wykazano, że próbki VAMS po pobraniu pozostawały stabilne przez miesiąc w temperaturze –20°C, w temperaturze pokojowej w ciemności oraz w temperaturze 4°C, osiągając odpowiednio $98,43 \pm 1,33\%$, $90,15 \pm 1,67\%$ oraz $95,33 \pm 2,01\%$. Stabilność w temperaturze 60°C była akceptowalna jedynie przez 3 dni, co wskazuje na konieczność kontrolowania ewentualnych skrajnych warunków transportu w przypadku potencjalnego wdrożenia pobierania próbek w warunkach domowych.


Opracowane metody zostały następnie zastosowane klinicznie u 25 pediatrycznych pacjentów po przeszczepieniu nerki, leczonych sirolimusem w ramach zindywidualizowanego schematu immunosupresyjnego. Łącznie pobrano i oznaczono 140 próbek: 70 próbek krwi pełnej oraz 70 próbek VAMS. Średni wiek pacjentów wynosił $13,46 \pm 2,99$ lat, a średnia dawka dobową sirolimusu wynosiła $3,54 \pm 0,50$ mg. Wszystkie próbki pobierano przed pierwszą dawką dobową leku, co odpowiadało oznaczeniu minimalnego stężenia C_0 . Średnie stężenie sirolimusu oznaczone metodą WB-LC–MS/MS wynosiło $7,11 \pm 4,26$ ng/mL (w zakresie 0,32–22,98 ng/mL), natomiast metodą VAMS-LC–MS/MS $7,33 \pm 4,41$ ng/mL (w zakresie 0,32–25,42 ng/mL).

Ocena zgodności metod wykazała bardzo dobrą równoważność między metodą referencyjną WB-LC–MS/MS a metodą VAMS-LC–MS/MS. W analizie regresji Passinga–Babloka uzyskano równanie $SIR_{VAMS} = 1,01(SIR_{WB}) + 0,18$, przy czym przedział ufności dla wyrazu wolnego obejmował 0, a dla nachylenia był bliski 1. Oznacza to brak istotnego błędu stałego i proporcjonalnego. Średni błąd systematyczny w analizie Blanda–Altmana wynosił –3,30%. Kryteria EMA, tj. błąd poniżej 20%, spełniły 89,33% sparowanych próbek, natomiast kryteria IATDMCT, tj. błąd poniżej 15%, spełniły 76,00% sparowanych próbek. Uzyskano również bardzo wysoką zgodność korelacyjną między metodami: współczynnik korelacji Pearsona wynosił $R^2 = 0,9892$, współczynnik korelacji rang Spearmana wynosił 0,9820, a współczynnik korelacji wewnątrzklasowej wynosił 0,9893.

Dodatkową wartością pracy H2 była ocena metod w ramach wstępnych rund zewnętrznego programu kontroli jakości LGC – wyniki przedstawiono w materiale uzupełniającym do pracy H2. Zarówno metoda WB-LC–MS/MS, jak i VAMS-LC–MS/MS uzyskały akceptowalne wyniki, co potwierdziło ich poprawność nie tylko w warunkach walidacji wewnętrznej, ale również w ramach niezależnej oceny jakości zewnętrznej. Jest to szczególnie ważne w kontekście potencjalnego rutynowego stosowania metody w laboratorium terapeutycznego monitorowania leków, gdzie walidacja analityczna powinna być uzupełniona o systematyczny udział w badaniach biegłości.

Praca H2 dokumentuje pełną drogę translacyjną — od identyfikacji problemu klinicznego i opracowania strategii analitycznej, poprzez walidację bioanalityczną i badania pomostowe, aż do oceny użyteczności klinicznej w rzeczywistej populacji pediatrycznych biorców przeszczepu nerki. W porównaniu z klasycznym pobieraniem krwi

zylnej opracowana metoda znacząco ogranicza objętość pobieranego materiału, zachowując jednocześnie równowagę kliniczną z metodą referencyjną LC–MS/MS we krwi pełnej. Wyniki tej pracy potwierdzają, że mikropóbkowanie objętościowo-absorpcyjne może być skutecznie wykorzystane nie tylko do monitorowania inhibitorów kalcyneuryny, takich jak takrolimus i cyklosporyna, ale również inhibitorów mTOR, takich jak sirolimus.

Praca oryginalna H3: Kocur A. , Czajkowska A., Moczulski M., Kot B., Rubik J., Pawiński T. Assessment of Dried Serum Spots (DSS) and Volumetric-Absorptive Microsampling (VAMS) Techniques in Therapeutic Drug Monitoring of (Val)Ganciclovir-Comparative Study in Analytical and Clinical Practice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, tom 25, nr 16, str.: 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms25168760>.

Kolejnym etapem moich badań nad alternatywnymi strategiami próbkowania w monitorowaniu leków były prace, których wyniki przedstawiłem w publikacji **H3**. Artykuł ten poszerza zakres mojego cyklu habilitacyjnego poza klasyczne leki immunosupresyjne i dotyczy monitorowania farmakoterapii przeciwwirusowej u pacjentów pediatrycznych po transplantacji narządów, zwłaszcza w kontekście leczenia i profilaktyki zakażeń cytomegalowirusem (CMV).

Gancyklowir (GCV) oraz jego prolek, walgancyklowir ((V)GCV), stanowią podstawę leczenia i profilaktyki zakażeń CMV u pacjentów po przeszczepieniu narządów litych. W tej grupie chorych zakażenie CMV może prowadzić do poważnych konsekwencji klinicznych, w tym ostrego i przewlekłego odrzucania przeszczepionego narządu, a w ciężkich przypadkach również do zapalenia płuc o wysokiej śmiertelności. Jednocześnie terapia gancyklowirem wiąże się z ryzykiem istotnych działań niepożądanych, zwłaszcza mielosupresji i trombocytopenii. Zbyt niskie stężenia leku mogą natomiast skutkować nieskutecznością terapii przeciwwirusowej, utrzymywaniem się wirerii CMV oraz ryzykiem selekcji szczepów opornych, między innymi związanych z mutacjami w genach wirusowych: UL97 i UL54. Z tego względu terapeutyczne monitorowanie gancyklowiru jest szczególnie uzasadnione u dzieci, u których dawkowanie zależy od wielu zmiennych osobniczych, takich jak powierzchnia ciała, czynność nerek, klirens kreatyniny oraz wskazanie do terapii — profilaktyka, strategia wyprzedzająca lub aktywne zakażenie CMV [27-31]. Przyjęte zakresy terapeutyczne dla gancyklowiru wynoszą zwykle 1–3 mg/L (0,5–1 mg/L w leczeniu profilaktycznym) dla C_0 oraz 5–12 mg/L dla C_{max} , natomiast docelowa ekspozycja AUC_{0-24} powinna mieścić się w zakresie 40–60 mg·h/L [29–31].

W pracy **H3** opracowałem i zwalidowałem trzy metody LC–MS/MS oznaczania gancyklowiru: metodę referencyjną w surowicy, metodę w próbkach dried serum spots (DSS) oraz metodę w wysuszonej surowicy pobranej na próbnikach VAMS-Mitra™ (s-VAMS). W odróżnieniu od prac **H1** i **H2**, w których technika VAMS była wykorzystywana do pobierania krwi włośniczkowej, w pracy **H3** oceniano przede wszystkim możliwość stabilizacji i transportu próbek surowicy w formie wysuszonej. Takie podejście ma istotne znaczenie logistyczne, ponieważ oznaczanie gancyklowiru nie jest dostępne w każdym laboratorium TDM (w Polsce badanie wykonywane jest jedynie w Pracowni Terapii Monitorowanej, Farmakokinetyki Klinicznej i Toksykologii IP-CZD w Warszawie),

a wysuszenie próbki może znacząco ułatwić jej przechowywanie i przesyłanie do ośrodka referencyjnego.

W publikacji kluczową rolę odgrywała ocena dwóch metod standaryzacji wewnętrznej w technice LC–MS/MS. Porównano deuterowany standard wewnętrzny GCV-d₅ z analogiem strukturalnym acyklowiru — ACV. Chociaż wytyczne ICH M10 zalecają stosowanie znakowanych izotopowo standardów wewnętrznych, w tej pracy acyklowir wykazał bardzo dobre, a w praktyce korzystniejsze parametry walidacji, co spowodowało, że zastosowałem go również w metodach DSS-LC–MS/MS i s-VAMS-LC–MS/MS [11].

Metody zoptymalizowałem i zwalidowałem w zakresie kalibracyjnym 0,1–25 mg/L, obejmującym zarówno stężenia minimalne, jak i maksymalne zwykle obserwowane we krwi po 2 godzinach od przyjęcia doustnej postaci leku. W ramach optymalizacji warunków chromatograficznych uzyskano bardzo krótki czas analizy — całkowity czas programu LC–MS/MS wynosił 2 minuty, a czas retencji gancyklowiru oraz deuterowanego standardu wewnętrznego GCV-d₅ wynosił 0,63 min, natomiast acyklowiru 0,72 min. Dzięki temu opracowane metody charakteryzowały się wysoką przepustowością, potencjalnie umożliwiając wykonanie ok. 30 analiz na godzinę.

W toku optymalizacji przygotowania próbki wykazałem, że najlepszą ekstrakcję gancyklowiru z DSS i s-VAMS zapewnia mieszanina metanol/woda 50:50 (v/v), wspomagana sekwencyjną ultrasonikacją i wytrząsaniem. Do oczyszczania próbek zastosowałem precypitację białek mieszaniną 0,1 M ZnSO₄ i acetonitrylu (1:1, v/v). Takie rozwiązanie było proste, szybkie i możliwe do rutynowego zastosowania w laboratorium. W pracy wykazano również, że zastosowanie sonikacji zwiększało odzysk analitu z próbek DSS i s-VAMS, co miało kluczowe znaczenie dla uzyskania stabilnej czułości i powtarzalności metody.

Wszystkie opracowane metody spełniły kryteria walidacyjne w zakresie selektywności, czułości, liniowości, dokładności, precyzji oraz stabilności [11-13]. Nie obserwowano istotnych interferencji, a sygnały pochodzące od związków endogennych były niższe niż 15% sygnału analitu na poziomie LLOQ. Granicę wykrywalności ustalono na 0,008 mg/L, a dolną granicę oznaczalności na 0,05 mg/L dla wszystkich walidowanych metod. Dokładność i precyzję oceniano przy kontrolnych wartościach stężenia GCV: 0,10 mg/L, 0,75 mg/L, 7,50 mg/L oraz 20,00 mg/L. W większości poziomów precyzja była wyraźnie niższa niż 15%, a dla LLOQ mieściła się w dopuszczalnym zakresie do 20%. Przykładowo, dla metody s-VAMS-LC–MS/MS dokładność wewnątrzseryjna wynosiła 99,86–103,96%, a precyzja 1,33–14,33%, natomiast dokładność międzyseryjna wynosiła 99,48–105,59%, przy precyzji 0,99–13,64%.

Ważnym aspektem pracy **H3** była ocena efektu matrycowego, wydajności procesu oraz bezwzględnego odzysku. Pomimo że w niektórych przypadkach obserwowano efekt matrycowy przekraczający wartość $\pm 15\%$ dla samego analitu lub standardu wewnętrznego, po normalizacji względem standardu wewnętrznego współczynnik GCV/IS spełniał kryteria akceptacji. Dla metody s-VAMS-LC–MS/MS wartości współczynnika normalizowanego względem ACV były bliskie wartości oczekiwanej na wszystkich poziomach kontroli jakości; przykładowo wynosiły $102,62 \pm 10,23$ dla LLOQ, $97,01 \pm 5,89$ dla MQC1, $98,94 \pm 6,12$ dla

MQC2 oraz $97,56 \pm 8,56$ dla HQC. Wyniki te potwierdziły, że zastosowany standard wewnętrzny skutecznie kompensował wpływ matrycy w próbkach wysuszonej surowicy.

Jednym z kluczowych wyników pracy było wykazanie znacznie wydłużonej stabilności gancyklowiru w próbkach DSS i s-VAMS. Stabilność długoterminową oceniałem przez 49 dni w temperaturze pokojowej. Po 49 dniach stabilność w próbkach DSS wynosiła 87,79% dla poziomu MQC1 oraz 89,41% dla poziomu MQC2. W przypadku próbek s-VAMS po 49 dniach stabilność wynosiła odpowiednio 85,86% i 87,28%. Oznacza to, że obie techniki umożliwiają przechowywanie i potencjalny transport próbek surowicy w formie wysuszonej przez co najmniej 7 tygodni bez utraty zgodności z kryteriami akceptacji [7,13]. Wynik ten ma szczególne znaczenie praktyczne, ponieważ klasyczne próbki surowicy lub osocza wymagają bardziej restrykcyjnych warunków przechowywania i transportu, a oznaczanie gancyklowiru może być realizowane centralnie w wybranych laboratoriach referencyjnych.

Opracowane metody zostały następnie zastosowane do oznaczania gancyklowiru w materiale klinicznym. Do badania włączono 80 próbek surowicy pochodzących od 40 pediatrycznych pacjentów po przeszczepieniu nerki, pobranych przed podaniem doustnej dawki walgancyklowiru oraz 2 godziny po jej podaniu, co odpowiadało oznaczeniom C_0 i C_{max} . Pozostałość materiału rutynowo wykorzystywanego do oznaczania gancyklowiru metodą HPLC/UV posłużyła do przygotowania próbek DSS i s-VAMS. DSS przygotowałem, nanesząc 35 μ L surowicy na kartę Whatman 903 Protein Saver™, natomiast próbki s-VAMS przygotowałem, absorbując 10 μ L surowicy za pomocą końcówki próbnika Mitra™.

W odniesieniu do zakresów terapeutycznych wykazano, że odsetek próbek mieszczących się w zakresie C_0 1–3 mg/L wynosił od 40% dla metody oznaczania GCV w surowicy z zastosowaniem GCV-d₅ do 45% dla metod s-VAMS-LC-MS/MS i HPLC/UV. Dla zakresu C_{max} 5–12 mg/L odsetek próbek mieszczących się w zakresie docelowym wynosiły 57,5% dla serum-LC-MS/MS z GCV-d₅, 65% dla serum-LC-MS/MS z ACV, 70% dla DSS-LC-MS/MS, 75% dla s-VAMS-LC-MS/MS oraz 77,5% dla HPLC/UV. Dane te pokazują, że opracowane metody pozwalały na klinicznie użyteczną klasyfikację ekspozycji pacjentów w odniesieniu do przyjętych zakresów terapeutycznych.

Ocena zgodności metod została przeprowadzona z wykorzystaniem regresji Passinga-Babloka oraz analizy Blanda-Altmana. Porównanie metody oznaczania GCV w surowicy (dalej: serum-LC-MS/MS z ACV) z metodą DSS-LC-MS/MS opisano równaniem $y = 1,048x - 0,013$, a błąd systematyczny wyniósł 3,56%. Dla porównania, dla serum-LC-MS/MS z ACV z metodą s-VAMS-LC-MS/MS uzyskano równanie $y = 1,072x - 0,011$, przy błędzie systematycznym wynoszącym -3,61%. Z kolei porównanie DSS-LC-MS/MS z s-VAMS-LC-MS/MS opisano równaniem $y = 1,019x + 0,019$, przy błędzie systematycznym wynoszącym -9,06%. Wartości te potwierdzają dobrą zgodność metod opartych na wysuszonej surowicy z metodą referencyjną LC-MS/MS. Szczególnie istotne jest, że dla porównania serum-LC-MS/MS z ACV względem DSS-LC-MS/MS kryterium EMA dotyczące błędu poniżej 20% spełniło 72,50% sparowanych próbek, natomiast dla porównania z s-VAMS-LC-MS/MS 82,50% próbek. Najwyższą zgodność odnotowano dla porównania DSS-LC-MS/MS z s-VAMS-LC-MS/MS, gdzie kryterium EMA spełniło 86,25% sparowanych wyników.

W pracy **H3** wykazano również, że metody LC–MS/MS oparte na DSS i s-VAMS mogą stanowić bardziej czułą alternatywę dla rutynowej metody HPLC/UV. Porównanie serum-LC–MS/MS z GCV-d₅ względem HPLC/UV dało równanie $y = 0,997x + 0,021$, natomiast porównanie *serum*-LC–MS/MS z ACV względem HPLC/UV dało równanie $y = 1,009x - 0,075$. Mimo wysokich współczynników korelacji odsetek próbek spełniających kryterium EMA była niższa niż w porównaniach między metodami LC–MS/MS i wynosiła odpowiednio 63,25% oraz 61,25%. Wynik ten potwierdza, że chociaż metoda HPLC/UV pozostaje użyteczna rutynowo, LC–MS/MS zapewnia lepszą czułość i bardziej wiarygodne oznaczanie niskich stężeń gancyklowiru, co ma znaczenie szczególnie przy oznaczeniach C₀.

Ograniczeniem pracy **H3** jest fakt, że techniki DSS i s-VAMS wymagały wcześniejszego uzyskania surowicy, a zatem nie stanowiły rozwiązania umożliwiającego bezpośrednie domowe samopobieranie krwi przez pacjenta. Próbki DSS i s-VAMS były przygotowywane ręcznie w laboratorium z pozostałości materiału klinicznego. Niemniej jednak, celem tej pracy nie było zastąpienie pobrania krwi włóścikowej w warunkach domowych, lecz ocena alternatywnych form stabilizacji i transportu surowicy do oznaczania gancyklowiru. W tym kontekście uzyskane wyniki są szczególnie istotne, ponieważ pokazują, że próbki surowicy w formie wysuszonej mogą być stabilne przez wiele tygodni i nadawać się do centralizacji oznaczeń TDM. Jest to istotne w realiach polskich, gdzie TDM dla gancyklowiru jest prowadzony wyłącznie w jednym ośrodku klinicznym – IP-CZD w Warszawie.

Praca H3 stanowi ważny element cyklu habilitacyjnego, ponieważ rozszerza koncepcję alternatywnego próbkowania i stabilizacji materiału biologicznego na obszar terapii przeciwwirusowej u dzieci po transplatacji. Najważniejszym osiągnięciem pracy było wykazanie, że surowica w formie wysuszonej może stanowić stabilną i klinicznie użyteczną alternatywę dla klasycznych próbek płynnych w TDM gancyklowiru. Opracowane metody DSS-LC–MS/MS i s-VAMS-LC–MS/MS umożliwiły szybkie, czułe i wiarygodne oznaczanie GCV przy jednoczesnym znacznym wydłużeniu stabilności próbki oraz uproszczeniu logistyki jej transportu. Wyniki te wskazują, że strategie stabilizacji materiału biologicznego mogą stać się istotnym elementem nowoczesnych, scentralizowanych modeli TDM, szczególnie tam, gdzie dostęp do specjalistycznych oznaczeń jest ograniczony.

Praca oryginalna H4: Kocur A. [✉], Moczulski M., Czajkowska A., Częczek A., Rubik J. The comparison of two volumetric microsampling devices (qDBS and VAMS) for determining ganciclovir levels in capillary blood using the LC–MS/MS technique in pediatric renal transplant recipients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, tom 212, str.: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107200>.

Praca ta stanowi bezpośrednią kontynuację badań opisanych w **H3**, w których oceniałem przydatność wysuszonych próbek surowicy. DSS oraz s-VAMS do oznaczania gancyklowiru. W przeciwieństwie do wcześniejszego podejścia, w tej publikacji skoncentrowałem się już na pełnym modelu pacjentocentrycznym, tj. na oznaczaniu gancyklowiru bezpośrednio w wysuszonych mikropróbkach krwi włóścikowej pobieranej po nakłuciu opuszki palca. Porównano dwa nowoczesne urządzenia wolumetryczne: Mitra™, reprezentujące technikę

VAMS, oraz Capitainer B[®], reprezentujące technikę ilościowej suchej kropli krwi, czyli qDBS.

W pracy opracowałem i zwalidowałem wielomatrixową metodę LC–MS/MS oznaczania gancyklowiru w czterech typach materiału: osoczu, krwi pełnej, próbkach VAMS oraz próbkach qDBS. Metoda została zwalidowana zgodnie z wytycznymi ICH M10, oraz zaleceniami IATDMCT dotyczącymi technik mikropobierania [7, 11-13]. Zakres kalibracyjny wynosił 0,01–25 mg/L, co stanowiło istotne rozszerzenie w porównaniu z wcześniejszą pracą dotyczącą surowicy wysuszonej. Szerszy zakres kalibracyjny umożliwia oznaczanie zarówno bardzo niskich stężeń minimalnych, obserwowanych u pacjentów leczonych wyprzedzająco, jak i potencjalnie wysokich stężeń szczytowych po podaniu leku.

W toku optymalizacji warunków chromatograficznych wykazałem, że najlepsze warunki rozdziału zapewnia kolumna Luna Omega Polar C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA), pracująca w systemie izokratycznym. Całkowity czas analizy wynosił 2 minuty, co czyni tę metodę szczególnie przydatną w rutynowej pracy laboratorium TDM. W odróżnieniu od metod wymagających trybu HILIC, zastosowane rozwiązanie pozwoliło uniknąć czasochłonnego równoważenia układu chromatograficznego, przy zachowaniu odpowiedniego czasu retencji oraz kształtu piku chromatograficznego odpowiadającego hydrofilowemu GCV. W metodzie zastosowano znakowany izotopowo standard wewnętrzny GCV-d₅, zgodnie z wytycznymi ICH M10 [11].

Przygotowanie próbek oparto na prostej precypitacji białek oraz na wspomaganiej ultradźwiękami ekstrakcji gancyklowiru z mikropróbek. Dla osocza i krwi pełnej zastosowano mieszaninę acetonitrylu i 0,1 M siarczanu cynku, wspieraną separacją faz w niskiej temperaturze. W przypadku mikropróbek VAMS i qDBS oceniono różne rozpuszczalniki ekstrakcyjne, a najlepsze wyniki uzyskano przy zastosowaniu wody z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego; dla qDBS w celu ograniczenia efektów matrycowych, zastosowano mieszaninę woda/metanol z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego. Dodatkowo wykazano, że czas suszenia mikropróbek od 1 do 24 godzin nie powodował istotnych różnic w odzysku, dlatego w procedurach walidacyjnych przyjęto czas suszenia wynoszący 1 godzinę.

Wyniki walidacji potwierdziły bardzo dobrą liniowość metody we wszystkich ocenianych matrycach. Średnie równania kalibracji wynosiły: dla osocza $y = 0,2788x + 0,0045$ przy $R^2 = 0,9961$, dla krwi pełnej $y = 0,2641x - 0,0007$ przy $R^2 = 0,9976$, dla VAMS $y = 0,6793x - 0,0039$ przy $R^2 = 0,9986$, a dla qDBS $y = 0,6814x - 0,0138$ przy $R^2 = 0,9975$. Dolną granicę oznaczalności ustalono na 0,01 mg/L, natomiast granica wykrywalności wynosiła 0,005 mg/L dla osocza, krwi pełnej i VAMS oraz 0,008 mg/L dla qDBS.

Dokładność i precyzja metody spełniły kryteria akceptacji dla wszystkich matryc. Walidację przeprowadzono na czterech poziomach kontroli jakości: 0,025 mg/L, 0,25 mg/L, 3,50 mg/L oraz 15,00 mg/L. Zarówno w ocenie wewnątrzseryjnej, jak i międzyseryjnej, dokładność mieściła się w granicach akceptacji, a wartości precyzji nie przekraczały 15%. Przykładowo, dla metody VAMS dokładność wewnątrzserii wynosiła od 98,69% do 107,23%, a precyzja od 3,79% do 14,44%. Dla qDBS dokładność wewnątrzserii mieściła się w zakresie 104,23–108,98% dla niższych poziomów oraz 104,80–105,22% dla wyższych poziomów, a precyzja wynosiła 4,03–13,99%.

Nie obserwowano istotnego efektu przeniesienia. Dla metody osoczkowej efekt przeniesienia wynosił 2,01% dla gancyklowiru i 0,75% dla standardu wewnętrznego, dla krwi pełnej odpowiednio 1,99% i 0,62%, dla VAMS 0,98% i 0,31%, a dla qDBS 0,76% i 0,28%. Wszystkie wartości były znacząco niższe niż dopuszczalne kryteria akceptacji, tj. 20% dla analitu i 5% dla standardu wewnętrznego.

Ważnym elementem pracy była ocena stabilności gancyklowiru w różnych typach próbek. Wykazano, że próbki VAMS i qDBS zachowują stabilność umożliwiającą ich przechowywanie i transport do laboratorium w standardowych warunkach pocztowych. Po 2 tygodniach przechowywania w temperaturze pokojowej stabilność w próbkach VAMS wynosiła od 93,54% do 97,42% w zależności od poziomu QC, natomiast w próbkach qDBS od 91,27% do 96,02%. W tym samym czasie klasyczne próbki krwi pełnej i osocza nie były już oceniane w temperaturze pokojowej, co podkreśla przewagę wysuszonych mikropróbek w zakresie logistyki transportu i przechowywania.

Specyficznym parametrem walidacyjnym dla mikropróbek była ocena wpływu hematokrytu. Wartości hematokrytu oceniano na trzech poziomach: 0,32, 0,52 i 0,68 L/L. Odzysk analitu wynosił 93,60–106,00% dla qDBS oraz 92,40–104,40% dla VAMS, co potwierdziło brak istotnego wpływu hematokrytu na odzysk gancyklowiru. Jest to istotne, ponieważ klasyczne DBS są obciążone efektem hematokrytowym, natomiast zastosowane urządzenia wolumetryczne, tj. VAMS i qDBS w praktyce ograniczają ten problem.

W ramach walidacji powtórnego oznaczania próbek rzeczywistych przeprowadzono również eksperyment ISR. Ponownie oznaczono 10% próbek klinicznych dla każdej matrycy. Wszystkie ponownie analizowane próbki spełniły kryteria akceptacji, a średnie różnice wynosiły: $-1,06 \pm 0,33\%$ dla osocza, $-2,01 \pm 0,56\%$ dla krwi pełnej, $-4,26 \pm 0,90\%$ dla VAMS oraz $-5,01 \pm 1,13\%$ dla qDBS. Wyniki te potwierdziły wysoką odtwarzalność metody w próbkach rzeczywistych.

Opracowana metoda została następnie zastosowana klinicznie u 50 pediatrycznych biorców przeszczepu nerki, w tym 27 dziewcząt i 23 chłopców w wieku od 5 do 17 lat, leczonych w IP-CZD w Warszawie w okresie od czerwca 2023 do czerwca 2024 roku. Pacjenci otrzymywali walgancyklowir w ramach terapii wyprzedzającej lub profilaktycznej, w dawkach dobowych 450–900 mg. Łącznie pobrano 200 próbek, po 50 dla każdej matrycy: osocza, krwi pełnej, VAMS i qDBS. Próbki VAMS i qDBS (po 10 μ L) były pobierane z krwi włośniczkowej po nakłuciu palca, a ze względu na wcześniejsze przeszkolenie populacji badanej część pobrań wykonywali sami pacjenci pod nadzorem personelu medycznego.

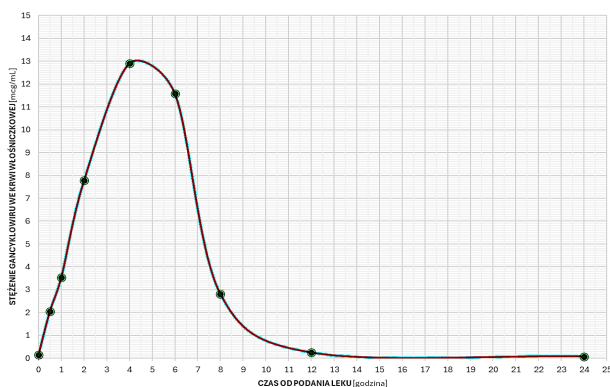
Średnie stężenia gancyklowiru oznaczone w materiale klinicznym były zbliżone w różnych matrycach. Dla osocza wynosiły $0,856 \pm 0,484$ mg/L w zakresie 0,207–2,210 mg/L, dla krwi pełnej $0,923 \pm 0,524$ mg/L w zakresie 0,304–2,880 mg/L, dla VAMS $0,895 \pm 0,499$ mg/L w zakresie 0,277–2,430 mg/L, a dla qDBS $0,889 \pm 0,503$ mg/L w zakresie 0,270–2,520 mg/L. **Po raz pierwszy przedstawiono dane kliniczne uzyskane w odpowiednio licznej populacji pediatrycznych biorców przeszczepu nerki, potwierdzające wysoką zgodność wyników oznaczeń wykonywanych w mikropróbkach krwi włośniczkowej z wynikami uzyskiwanymi w klasycznych matrycach referencyjnych [27-31].**

Ocena zgodności metod została przeprowadzona z wykorzystaniem regresji Passinga–Babloka, analizy Blanda–Altmana oraz analizy korelacji. Dla porównania krwi pełnej (WB) z VAMS uzyskano równanie $WB_{GCV} = 1,0160(VAMS_{GCV}) + 0,0392$, średni błąd systematyczny wynoszący 4,59%, spełnienie kryterium analitycznego LoA <20% przez 96,00% sparowanych próbek oraz kryterium klinicznego LoC <15% przez 84,00% próbek. Współczynnik korelacji Pearsona wynosił 0,991 przy $p < 0,0001$. Dla porównania krwi pełnej z qDBS uzyskano równanie $WB_{GCV} = 1,0063(qDBS_{GCV}) + 0,0146$, ze średnim błędem 3,70%, spełniające kryterium LoA dla 98,00% próbek oraz kryterium LoC dla 92,00% próbek, przy korelacji Pearsona wynoszącej 0,989.

Szczególnie istotne było bezpośrednie porównanie obu technik mikropobierania. Dla relacji VAMS względem qDBS uzyskano równanie $VAMS_{GCV} = 1,0090(qDBS_{GCV}) - 0,0097$, a średni błąd systematyczny wynosił zaledwie 0,90% przy 95% CI od -0,68% do 2,48%. Kryterium LoA < 20% spełniło 100,00% próbek, natomiast bardziej restrykcyjne kryterium kliniczne LoC < 15% spełniło 98,00% próbek. Wynik ten potwierdza bardzo wysoką zgodność między urządzeniami Mitra™ i Capitainer® oraz wskazuje, że obie techniki mogą być stosowane wymiennie do oznaczania gancyklowiru w mikropróbkach krwi włośniczkowej.

Wyniki pracy wykazały również, że stężenia gancyklowiru w osoczu, krwi pełnej i krwi włośniczkowej są porównywalne, co sugeruje, że nie jest konieczne stosowanie wzoru konwersji stężenia z krwi włośniczkowej na osocze. Jest to istotne klinicznie, ponieważ upraszcza interpretację wyników uzyskiwanych z mikropróbek. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tej obserwacji jest bardzo słabe wiązanie gancyklowiru z białkami osocza, wynoszące około 1–2%, oraz swobodna dystrybucja leku między osoczem a elementami morfotycznymi krwi.

Ograniczeniem badania było to, że oceniano przede wszystkim minimalne stężenie C_0 , a nie pełne profile farmakokinetyczne. Jednocześnie szeroki zakres kalibracyjny metody, obejmujący do 25 mg/L, umożliwia jej zastosowanie również w przyszłych badaniach obejmujących punkty C_{max} lub profile AUC. Chociaż nie zostało to ujęte w publikacji H4, wykonano oznaczenie profilu farmakokinetycznego w zakresie pilotażowym (Rycina 8). Pomimo niskiej wartości rutynowo oznaczanego stężenia w punkcie C_0 , całkowita ekspozycja na GCV znajdowała się w zdefiniowanym zakresie akceptacji klinicznej. **Uzyskane wyniki pilotażowego profilu farmakokinetycznego wskazują, że techniki mikropobierania mogą być wykorzystane nie tylko do oznaczania stężenia minimalnego, ale również do wyznaczania parametrów ekspozycji całkowitej, w tym AUC_{0-24} , co otwiera możliwość rozwoju modelowo wspieranego dawkowania gancyklowiru (MIPD).**




PRZYKŁADOWY PROFIL PK w VAMS - WYNIKI

- Dawka leku Valhit 900 mg/doba.
- Oznaczone C_0 wyniosło **0,16 mg/L** (poniżej celowego zakresu 0,5-1 mg/L).
- $AUC = 57,72 \text{ mg} \times \text{h} / \text{L}$
- $C_{\max} = 13,12 \text{ mg/L}$, które zostało osiągnięte po 4h15'
- Po 24h od podania leku oznaczone stężenie wyniosło **0,08 mg/L**
- Na podstawie obserwacji najlepszym punktem korelującym z całkowitym AUC jest pobranie po 4 h od podania leku, należy wykonać badania populacyjne

Próbki krwi włośniczkowej pobierane w punktach czasowych: 0, ½, 1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24-godziny od podania leku

Rycina 8. Przykładowy profil farmakokinetyczny gancyklowiru, wyznaczony z zastosowaniem techniki VAMS, u pacjenta otrzymującego walgancyklowir. Próbki krwi włośniczkowej pobierano w następujących punktach czasowych: 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24 h od podania leku. Na podstawie uzyskanego profilu oznaczono $C_0 = 0,16 \text{ mg/L}$, $C_{\max} = 13,12 \text{ mg/L}$ po 4 h, $AUC_{0-24} = 57,72 \text{ mg} \times \text{h/L}$ oraz stężenie po 24 h wynoszące 0,08 mg/L. Wyniki wskazują, że punkt 4 h po podaniu leku może najlepiej korelować z całkowitą ekspozycją na lek i może być użyteczny w ograniczonych strategiach pobierania próbek.

Publikacja ta stanowi ważny element mojego cyklu habilitacyjnego, ponieważ po raz pierwszy w literaturze wykazano analityczną i kliniczną przydatność dwóch nowoczesnych wolumetrycznych urządzeń do mikropobierania – VAMS i qDBS – w rutynowym monitorowaniu stężenia gancyklowiru we krwi włośniczkowej u pediatrycznych biorców przeszczepu nerki. W odróżnieniu od wcześniejszej pracy **H3**, w której stabilizowano surowicę w formie wysuszonej, tutaj oceniono rzeczywisty model pobierania krwi włośniczkowej z palca, potencjalnie możliwy do zastosowania w warunkach domowych. Praca ta potwierdza więc przejście od laboratoryjnej stabilizacji materiału biologicznego do praktycznego, pacjentocentrycznego modelu terapeutycznego monitorowania leku. Dodatkowo, praca przyczyniła się do realizacji późniejszego projektu **GP7** w populacji noworodków z wrodzonym zakażeniem cytomegalowirusowym, leczonych doustnym walgancyklowirem. **Najważniejszym osiągnięciem pracy H4 było wykazanie, że techniki VAMS i qDBS mogą być stosowane wymiennie w rutynowym oznaczaniu gancyklowiru w mikropróbkach krwi włośniczkowej przy zachowaniu wysokiej zgodności analitycznej i klinicznej.** Praca H4 stanowi również istotny krok w kierunku standaryzacji wolumetrycznych technik mikropobierania w klinicznym TDM, ponieważ porównano dwa konkurencyjne urządzenia wykorzystujące odmienne mechanizmy kontroli objętości próbek.

Praca oryginalna H5: Kocur A. , Olkowski B., Moczulski M., Miszewska-Szyszkowska D., Rostkowska O.M., Polak K., Korniluk K., Bączkowska T., Durlik M., Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus Using Volumetric Absorptive Microsampling and Quantitative Dried Blood Spot Methods with LC–MS/MS in Adult Solid Organ Transplant Recipients: An Analytical and Clinical Comparative Study. *Molecules*, 2025, tom 30, nr 15, str.: 1-22. <https://doi.org/10.3390/molecules30153139>.

Kolejnym etapem rozwijanej przeze mnie platformy alternatywnego mikropobierania w terapeutycznym monitorowaniu leków była praca **H5**, dotycząca oznaczania ewerolimusu u dorosłych pacjentów po przeszczepieniu narządów litych. Publikacja ta stanowi istotne rozszerzenie wcześniejszych badań prowadzonych w populacji pediatrycznej, ponieważ przenosi opracowywane przeze mnie rozwiązania mikropobierania do populacji dorosłych pacjentów transplantacyjnych oraz obejmuje bezpośrednie porównanie dwóch nowoczesnych urządzeń wolumetrycznych o objętości pobieranego materiału równej 10 µL: Mitra™ VAMS i Capitainer B® qDBS.

Ewerolimus (EVE) jest inhibitorem mTOR stosowanym w immunosupresji po przeszczepieniu narządów litych. Ze względu na wąski indeks terapeutyczny, znaczną zmienność farmakokinetyczną oraz zależność metabolizmu od CYP3A4 i transportu przez glikoproteinę P, lek ten wymaga monitorowania stężenia w trakcie terapii. Oznaczanie minimalnego stężenia C₀ pozwala identyfikować ekspozycję subterapeutyczną, nadmierną ekspozycję oraz ryzyko toksyczności, a także wspiera ocenę adherencji i indywidualizację dawkowania. W zależności od rodzaju transplantacji i schematu leczenia docelowe zakresy terapeutyczne ewerolimusu różnią się, co dodatkowo uzasadnia potrzebę precyzyjnego TDM [32-34].

W pracy **H5** opracowałem i zwalidowałem metodę LC–MS/MS oznaczania ewerolimusu w trzech matrycach: klasycznej krwi pełnej żyłnej, mikropróbkach krwi włośniczkowej pobranych przy użyciu systemu VAMS-Mitra™ oraz mikropróbkach qDBS-Capitainer B®. Zastosowanie obu urządzeń umożliwiło pobranie 10 µL krwi włośniczkowej, co stanowiło ważny element podejścia pacjentocentrycznego i może wspierać zdecentralizowane monitorowanie leczenia po transplantacji. W badaniu porównano nie tylko zgodność wyników uzyskanych w mikropróbkach z metodą referencyjną we krwi pełnej, ale również bezpośrednią zgodność między urządzeniami Mitra™ i Capitainer B®.

Metoda została zwalidowana zgodnie z wytycznymi EMA oraz zaleceniami IATDMCT. Zakres kalibracyjny wynosił 1,27–64,80 ng/mL dla krwi pełnej oraz 0,50–60 ng/mL dla próbek VAMS i qDBS. Jako standard wewnętrzny zastosowano znakowany izotopowo d₄-ewerolimus, który wykazywał korzystniejszy profil analityczny niż alternatywny, komercyjnie dostępny standard ¹³C,_d₂-EVE. W przypadku ¹³C,_d₂-EVE obserwowano istotny sygnał interferencyjny pochodzący od nieznakowanego EVE, wynoszący 16,37 ± 2,58%, podczas gdy dla d₄-EVE był on znacząco niższy i wynosił 1,76 ± 0,21%. Wyniki te uzasadniały wybór d₄-ewerolimusu jako standardu wewnętrznego do dalszej walidacji metody.

W części analitycznej wykazano bardzo dobrą liniowość metod. Dla krwi pełnej średnie równanie kalibracji wynosiło $y = 0,6227x - 0,02702$, przy $R^2 = 0,9996$. Dla metody VAMS uzyskano równanie $y = 0,08093x + 0,00374$, przy $R^2 = 0,9989$, natomiast dla qDBS $y = 0,07539x + 0,00935$, przy $R^2 = 0,9959$. Granicę wykrywalności ustalono na 0,13 ng/mL dla krwi pełnej oraz 0,15 ng/mL dla metod VAMS i qDBS. Uzyskane wartości potwierdziły odpowiednią czułość metody do oznaczania ewerolimusu w zakresie klinicznie istotnych stężeń.

Opracowane procedury przygotowania próbek były dostosowane do charakterystyki każdej matrycy. Dla krwi pełnej zastosowano precypitację białek mieszaniną siarczanu cynku, metanolu i acetonitrylu. Dla próbek VAMS ekstrakcję prowadzono z wykorzystaniem metanolu, zgodnie z procedurami mikropobierania przeze mnie wcześniej opracowanymi. Natomiast próbki qDBS wymagały bardziej złożonej procedury oczyszczania ze względu na potencjalne interferencje związane z elementami urządzenia Capitainer B[®], dlatego zastosowano dodatkowy etap, z wykorzystaniem metody QuEChERS (technika przygotowania próbki: szybka, prosta, tania, skuteczna, odporna i bezpieczna, ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), z użyciem siarczanu magnezu i octanu sodu. Takie podejście pozwoliło ograniczyć efekt matrycowy i uzyskać ekstrakty odpowiednie do analizy LC–MS/MS.

Wyniki walidacji potwierdziły wysoką dokładność i precyzję oznaczeń. Dla wszystkich matryc wartości CV mieściły się w kryteriach akceptacji EMA i były niższe niż 10%, zgodnie z bardziej restrykcyjnymi zaleceniami IATDMCT dotyczącymi oznaczania leków immunosupresyjnych [3]. Przykładowo, dla VAMS dokładność wewnątrzdziennej mieściła się w zakresie 98,98–105,55%, a precyzja w zakresie 2,01–8,61%. Dla qDBS dokładność wewnątrzdziennej wynosiła 94,94–103,28%, a precyzja 1,92–7,77%. W eksperymentach międzydniowych dokładność i precyzja również spełniały kryteria walidacyjne.

Nie zaobserwowano istotnego efektu przeniesienia ani istotnych interferencji matrycowych. Dla krwi pełnej efekt przeniesienia wynosił $0,97 \pm 1,08\%$ dla EVE i $0,33 \pm 0,61\%$ dla standardu wewnętrznego. W przypadku VAMS wartości te wynosiły odpowiednio $0,25 \pm 0,43\%$ i $0,33 \pm 0,61\%$, natomiast dla qDBS $0,31 \pm 0,50\%$ i $0,29 \pm 0,28\%$. Współczynniki efektu matrycowego, odzysku bezwzględnego (AR, ang. *absolute recovery*) i wydajności procesu (PE, ang. *process efficiency*), po normalizacji względem standardu wewnętrznego, pozostawały w zakresie akceptacji, co potwierdzało skuteczną kompensację wpływu matrycy.

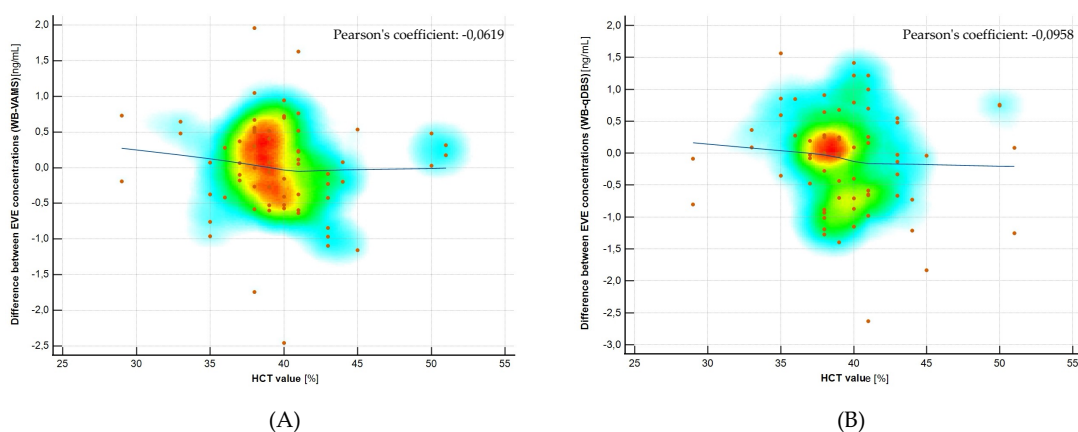
Szczególne znaczenie praktyczne miała ocena stabilności ewerolimusu w wysuszonych mikropróbkach. Wykazano, że analit pozostawał stabilny w próbkach VAMS i qDBS przez 6 miesięcy podczas przechowywania w temperaturze pokojowej w woreczkach z desykanem. Po 6 miesiącach stabilność w VAMS wynosiła 89,39% dla LQC i 90,81% dla HQC, natomiast w qDBS wynosiła 93,23% dla LQC i 94,56% dla HQC. Stabilność była zachowana również w temperaturze 40°C przez 6 miesięcy, natomiast w temperaturze 60°C była ograniczona i akceptowalna tylko krótkoterminowo. Wyniki te wskazują, że obie technologie mogą ułatwiać transport próbek oraz wspierać zdecentralizowane monitorowanie leczenia.

Część kliniczna objęła 33 dorosłych pacjentów po przeszczepieniu narządów litych (wątroby lub nerki), u których pobrano łącznie 66 zestawów próbek: krew pełną, VAMS oraz qDBS.

Większość pacjentów stanowili biorcy nerki, ale włączono także pacjentów po transplantacji wątroby i trzustki. Średni wiek pacjentów wynosił 60,88 lat, średnia wartość hematokrytu wynosiła 39,78%, a średnia dawka dobowa ewerolimusu wynosiła 1,82 mg. EVE był najczęściej włączany w celu zmniejszenia ekspozycji na inhibitory kalcyneuryny, głównie w związku z nefropatią indukowaną zakażeniem wirusem BK lub nowotworem po transplantacji. Średnie stężenia EVE oznaczone w materiale klinicznym były bardzo zbliżone między matrycami: $4,696 \pm 1,967$ ng/mL dla krwi pełnej, $4,707 \pm 1,960$ ng/mL dla VAMS oraz $4,820 \pm 2,118$ ng/mL dla qDBS. Zakresy oznaczonych stężeń wynosiły odpowiednio 0,800–10,895 ng/mL, 0,710–10,895 ng/mL oraz 0,877–11,897 ng/mL. Wyniki te wskazywały na dobrą zgodność oznaczeń uzyskanych z mikropróbek z oznaczeniami klasycznej krwi żywej.


Analizę zgodności metod przeprowadziłem z wykorzystaniem regresji Passinga–Babloka oraz analizy Blanda–Altmana. Dla porównania krwi pełnej względem VAMS uzyskano równanie $EVE_{WB} = 1,017(EVE_{VAMS}) - 0,040$, a średni błąd systematyczny wyniósł $-0,68\%$. Dla porównania krwi pełnej względem qDBS uzyskano równanie $EVE_{WB} = 0,938(EVE_{qDBS}) + 0,143$, przy średnim błędzie $-1,73\%$. Dla bezpośredniego porównania qDBS i VAMS równanie wynosiło: $EVE_{qDBS} = 1,064(EVE_{VAMS}) - 0,193$, a średni błąd wynosił $-1,00\%$. Kryterium analityczne $LoA < 20\%$ spełniło 83,33% sparowanych wyników dla WB–VAMS, 77,27% dla WB–qDBS oraz 75,76% dla VAMS–qDBS. Kryterium kliniczne $CoA < 15\%$ spełniono w porównaniach WB–VAMS i WB–qDBS, natomiast bezpośrednie porównanie obu technik mikropobierania osiągnęło 62,12% (nieznacznie poniżej progu 67%).

Ważnym elementem pracy było wykazanie braku istotnego wpływu hematokrytu. Efekt hematokrytowy oceniono zarówno eksperymentalnie, przy poziomach 23%, 37% i 58% dla próbek wzbogaconych EVE, jak i klinicznie poprzez korelację różnic stężenia między metodą referencyjną a mikropróbkami z osobniczą wartością hematokrytu pacjenta (Rycina 9). Nie stwierdzono istotnej zależności, co potwierdza, że zarówno VAMS jak i qDBS umożliwiają hematokrytowo niezależne oznaczanie ewerolimusu w badanym zakresie.



Rycina 9. Wykresy rozrzutu przedstawiają brak istotnej zależności pomiędzy indywidualną wartością hematokrytu a różnicą stężeń ewerolimusu (EVE) oznaczanych metodą referencyjną LC–MS/MS we krwi pełnej oraz metodami mikropróbkowania: **(A)** krew pełna vs VAMS oraz **(B)** krew pełna vs qDBS. Na każdym wykresie przedstawiono współczynniki korelacji Pearsona oraz linię trendu, która obrazuje kierunek zależności między analizowanymi parami danych.

Praca H5 potwierdziła możliwość rozszerzenia opracowywanej platformy mikropobierania z populacji pediatrycznej na dorosłych biorców przeszczepów narządów litych, co istotnie zwiększa potencjał kliniczny i wdrożeniowy proponowanego rozwiązania. Uzyskane wyniki wskazują, że technologie VAMS i qDBS mogą stanowić podstawę zdecentralizowanego modelu TDM ewerolimusu, umożliwiającego pacjentowi samodzielne pobieranie mikropróbek poza ośrodkiem transplantacyjnym. Praca H5 stanowi również ważny krok w kierunku standaryzacji wolumetrycznych metod mikropobierania w transplantologii klinicznej poprzez bezpośrednie porównanie dwóch niezależnych platform technologicznych wykorzystujących odmienne mechanizmy kontroli objętości próbki.

Praca oryginalna H6: Kocur A. , Sobiak J., Czajkowska A., Rubik J., Pawiński T. Volumetric Absorptive Microsampling of Saliva for Pharmacokinetic Evaluation of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Metabolite in Pediatric Renal Transplant Recipients: Bioanalytical Method Validation and Clinical Feasibility Evaluation. *Pharmaceuticals*, 2025, tom 18, nr 11, str.: 1-21. <https://doi.org/10.3390/ph18111744>.

Publikacja **H6** stanowi odrębny, ale logicznie powiązany etap mojego cyklu habilitacyjnego, ponieważ rozszerza koncepcję alternatywnych matryc i strategii mikropobierania poza krew oraz jej frakcje. W tej pracy oceniłem możliwość wykorzystania śliny pobieranej objętościowo-absorpcyjnie za pomocą systemu VAMS-Mitra™ do oceny farmakokinetyki kwasu mykofenolowego oraz jego głównego metabolitu glukuronidowego, czyli MPAG, u pediatrycznych biorców przeszczepu nerki.

Kwas mykofenolowy jest jednym z podstawowych leków immunosupresyjnych stosowanych po transplantacji nerki. Charakteryzuje się wąskim zakresem terapeutycznym, znaczną zmiennością farmakokinetyczną oraz bardzo wysokim stopniem wiązania z białkami osocza, zwykle wynoszącym 97–99%. Ze względu na te właściwości interpretacja całkowitego stężenia w osoczu bywa utrudniona, a szczególne znaczenie może mieć frakcja wolna leku. Teoretycznie ślina mogłaby stanowić atrakcyjną alternatywną matrycę, ponieważ w wielu przypadkach stężenia leków w ślinie odzwierciedlają frakcję niezwiązaną z białkami. Dotychczasowe dane literaturowe dotyczące MPA były jednak niejednoznaczne – część badań wskazywała na dobrą korelację między śliną a osoczem, podczas gdy inne nie potwierdzały tej zależności [35-40].

Celem pracy **H6** było zatem nie tylko opracowanie metody LC–MS/MS do oznaczania MPA i MPAG w wysuszonej ślinie pobranej za pomocą VAMS, ale również krytyczna ocena, czy ślina może rzeczywiście zastąpić osocze w rutynowym TDM mykofenolanu. W badaniu porównano wiele matryc: osocze, krew włośniczkową pobraną VAMS, ultrafiltrat osocza reprezentujący frakcję wolną (fMPA i fMPAG), klasyczną „mokrą” ślinę (sMPA i sMPAG) oraz wysuszoną ślinę (vsMPA i vsMPAG) pobraną przy użyciu Mitra™. Tak szeroki zakres porównań pozwolił ocenić zarówno aspekt bioanalityczny, jak i kliniczno-farmakokinetyczny zastosowania śliny w monitorowaniu MPA i MPAG.

W części analitycznej opracowałem i zwalidowałem nową metodę LC–MS/MS oznaczania MPA i MPAG w wysuszonej ślinie pobranej za pomocą VAMS-Mitra™. Zakres kalibracyjny

metody wynosił 1–700 µg/L, a granicę wykrywalności ustalono na 0,25 µg/L. Średnie równanie kalibracyjne dla MPA wynosiło: $y = 0,1098x + 0,0098$, natomiast dla MPAG: $y = 0,1453x - 0,0882$. Średnia precyzja całej metody wynosiła 5,804% dla MPA oraz 5,347% dla MPAG, co potwierdziło dobrą charakterystykę analityczną tej procedury.

W ramach optymalizacji procedury pobierania i przygotowania próbki wykazano, że gęstość śliny oraz powtarzalność pobrania za pomocą VAMS pozwalają na objętościowe traktowanie tej matrycy. Średnia masa „mokrej” śliny wynosiła $0,9913 \pm 0,035$ g/mL, natomiast dla dziesięciu próbek VAMS wynosiła $1,0012 \pm 0,021$ g/mL, co odpowiada wartościom opisywanym dla śliny. Oceniono również czas suszenia próbek po pobraniu (1, 2 i 4 godziny) i nie wykazano istotnych różnic w odzysku MPA ani MPAG. Z tego względu jako praktyczny czas suszenia przyjęto 1 godzinę.

Najlepsze wyniki ekstrakcji analitów z końcówki Mitra™ uzyskano z zastosowaniem mieszaniny woda/acetonytryl/metanol 5:4:1, v/v, w połączeniu z wytrząsaniem, sonikacją oraz inkubacją w temperaturze -40°C . Tak zoptymalizowana procedura zwiększyła odzysk z 89,99% do 101,00% dla MPA oraz z 84,41% do 98,22% dla MPAG na poziomie LQC. Wykazano również brak istotnego efektu przeniesienia: $0,984 \pm 0,416\%$ dla MPA, $1,003 \pm 0,518\%$ dla MPAG oraz $0,223 \pm 0,082\%$ dla standardu wewnętrznego.

Metoda spełniła kryteria walidacyjne w zakresie dokładności i precyzji. Dla MPA dokładność wewnątrzserijna wynosiła 98,83–106,65%, a precyzja 2,54–9,62%. Dla MPAG dokładność wewnątrzserijna wynosiła 94,01–109,64%, a precyzja 2,72–10,94%.

Istotnym praktycznym wynikiem była stabilność MPA i MPAG w wysuszonej ślinie. Próbki pozostawały stabilne przez co najmniej 2 tygodnie w różnych warunkach przechowywania, w tym w temperaturze pokojowej z dostępem światła i bez dostępu światła. Stabilność ekstraktów w autosamplerze w temperaturze 15°C również była akceptowalna przez 24 i 72 godziny. Dane te wskazują, że zastosowanie VAMS do pobierania śliny może rozwiązać część problemów związanych z transportem klasycznej „mokrej” śliny, która zwykle wymaga szybszego przetworzenia i wirowania.

Część kliniczna objęła 20 pediatrycznych pacjentów po przeszczepieniu nerki, u których wykonano oznaczenia w punktach 0, 0,5, 1, 2 i 4 godziny po podaniu dawki. Oceniano MPA i MPAG w osoczu, krwi włośniczkowej, ultrafiltracie osocza, mokrej ślinie oraz wysuszonej ślinie VAMS. Średni wiek pacjentów wynosił 13,64 lat, średni czas od transplantacji 3,15 roku, a średnia wartość hematokrytu wynosiła 37,60%. Wszyscy pacjenci otrzymywali mykofenolan mofetylu w preparacie CellCept®, równolegle z takrolimusem (Prograf®).

Najważniejszym wynikiem pracy było wykazanie bardzo dobrej zgodności między klasyczną mokrą śliną a wysuszoną śliną pobraną za pomocą VAMS. Dla MPA uzyskano równanie regresji Passinga–Babloka $s\text{MPA} = 1,00(\text{vsMPA}) + 0,17$; średni błąd 3,30% oraz współczynnik korelacji rang Spearmana 0,990. Dla MPAG uzyskano równanie $s\text{MPAG} = 1,03(\text{vsMPAG}) + 0,95$, z średnim błędem 6,49% oraz współczynnikiem korelacji 0,981. Oznacza to, że VAMS-Mitra™ może być skutecznym narzędziem do standaryzowanego pobierania i stabilizacji śliny, a wyniki uzyskane z wysuszonej śliny są porównywalne z wynikami uzyskiwanymi z klasycznej śliny płynnej.

Jednocześnie zasadniczy wniosek kliniczny był negatywny w odniesieniu do możliwości zastąpienia osocza śliną w rutynowym TDM. Zarówno mokra, jak i wysuszona ślina VAMS słabo korelowały z całkowitymi oraz wolnymi stężeniami MPA i MPAG w osoczu. Dla porównania, dla sMPA względem fMPA współczynnik korelacji wynosił $r = 0,376$, przy $p = 0,1036$; dla sMPA względem tMPA $r = 0,305$, przy $p = 0,1904$; dla sMPAG względem fMPAG $r = 0,205$, przy $p = 0,3851$; natomiast dla sMPAG względem tMPAG $r = 0,472$, przy $p = 0,0012$. Wyniki te wskazują, że ślina, pomimo łatwego i nieinwazyjnego pobierania, nie odzwierciedla w wystarczająco wiarygodny sposób ekspozycji osoczowej na MPA i MPAG.


Analiza farmakokinetyczna potwierdziła rozbieżności między śliną a osoczem. Wykazano, że średnie wiązanie MPA z białkami osocza wynosiło 98,83%, natomiast MPAG 81,15%. Korelacje wartości AUC_{0-4} po normalizacji do dawki były nieco lepsze niż korelacje pojedynczych stężeń, ale nadal pozostawały ograniczone. Wskazuje to, że ślina może dostarczać informacji badawczych o pewnych aspektach dystrybucji leku, ale nie jest wystarczająco wiarygodna jako samodzielna matryca do rutynowej indywidualizacji dawkowania mykofenolanu u dzieci po transplantacji nerki.

W pracy oceniono także akceptowalność pobierania próbek przez pacjentów. W części ankietowej 70% pacjentów preferowało możliwość samodzielnego pobierania próbek w warunkach domowych, 75% uznało pobieranie śliny za łatwe, a 90% wskazało preferencję dla techniki VAMS. Jednocześnie z 40 pacjentów pierwotnie włączonych do badania aż 20 wykluczono z analizy farmakokinetycznej z powodu trudności w pobraniu śliny, odruchu wymiotnego podczas używania urządzenia Salivette® lub odmowy oddania śliny. Wynik ten pokazuje, że choć ślina jest teoretycznie atrakcyjną matrycą nieinwazyjną, jej pobieranie nie zawsze jest praktycznie łatwe w populacji pediatrycznej.

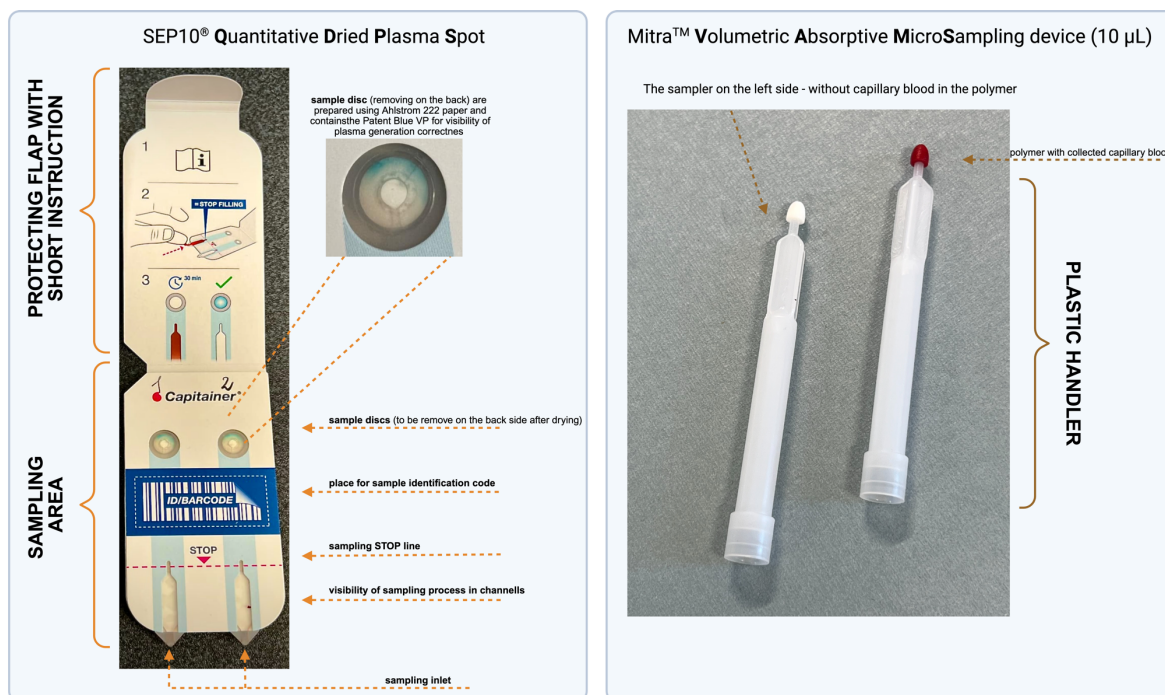
Praca **H6** ma szczególne znaczenie w cyklu habilitacyjnym, ponieważ pokazuje nie tylko pozytywne wdrożenie nowej metody bioanalitycznej, ale również krytyczną ocenę granic zastosowania alternatywnych matryc w TDM. Opracowana metoda VAMS-LC-MS/MS dla wysuszonej śliny jest poprawna analitycznie, stabilna i zgodna z wymaganiami walidacyjnymi, jednak wyniki kliniczne jednoznacznie wskazują, że ślina nie może zastąpić osocza w rutynowym monitorowaniu MPA i MPAG. **Z drugiej strony, istotnym elementem nowości pracy było również wykazanie możliwości standaryzowanego, objętościowego pobierania i stabilizacji śliny przy użyciu technologii VAMS-Mitra™, co może mieć znaczenie dla przyszłych badań nad innymi analitami oznaczanymi w ślinie.** Jednocześnie praca potwierdza, że krew włośniczkowa pobierana metodą VAMS pozostaje bardziej obiecującą alternatywą do długoterminowego monitorowania mykofenolanu u dzieci.

Włączenie tej publikacji do cyklu habilitacyjnego jest istotne, ponieważ dokumentuje kompleksowy proces translacyjny: od hipotezy o możliwościach zastosowania nieinwazyjnej matrycy, przez opracowanie i walidację metody LC-MS/MS, aż po ocenę kliniczną i farmakokinetyczną. Szczególną wartością jest to, że jej wynik nie ogranicza się tylko do potwierdzenia przydatności nowego narzędzia, ale także wskazuje, które rozwiązanie – mimo jego atrakcyjności przedanalizycznej – nie powinno być bezkrytycznie wdrażane w rutynowym TDM. W ten sposób **H6** podnosi naukową wiarygodność całego cyklu,

pokazując, że rozwój alternatywnych strategii próbkowania wymaga nie tylko walidacji analitycznej, lecz także potwierdzenia ich rzeczywistej użyteczności klinicznej.

Praca oryginalna H7: Kocur A. , Moczulski M., Michalczuk P., Miszewska-Szyszkowska D., Bączkowska T., Durlik M., Pawiński T. Surrogate-based LC–MS/MS quantification of endogenous creatinine in plasma, plasma-equivalent dried spots (qDPS), and volumetric absorptive microsampling (VAMS): an ICH M10-compliant bridging study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2026, tom 221, str.: 107523. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2026.107523>.

Publikacja H7 rozszerza mój cykl habilitacyjny spoza tradycyjnego monitorowania leków na rzecz zdecentralizowanego nadzoru funkcji narządu przeszczepionego, wykorzystując techniki mikropobierania. Przedstawiłem i zweryfikowałem metodę LC–MS/MS do oznaczania kreatyniny w osoczu, w próbkach qDPS wyprodukowanych za pomocą Capitainer SEP10[®] oraz w mikropórkach krwi pełnej pobieranych metodą VAMS-Mitra[™] (Rycina 10). Ta praca ma duże znaczenie translacyjne, ponieważ kreatynina to jeden z głównych markerów monitorowania funkcji nerek po transplantacji. Jej oznaczenie w warunkach domowego lub zdecentralizowanego pobierania może znacznie ułatwić długoterminową opiekę nad pacjentami po przeszczepie nerki.



Rycina 10. Porównanie urządzeń do mikropobierania zastosowanych w badaniu: qDPS (Capitainer SEP10[®]) oraz VAMS (Mitra[™]). Na rycinie przedstawiono elementy konstrukcyjne odpowiedzialne za kontrolę objętości pobieranej próbki, sposób nanoszenia materiału biologicznego oraz obszary przeznaczone do przygotowania próbki do dalszej analizy LC–MS/MS.

Kreatynina jest endogennym związkami obecnym w każdej próbce biologicznej, co powoduje istotne ograniczenia analityczne. W przeciwieństwie do oznaczania leków egzogennych, nie jest możliwe zastosowanie klasycznej matrycy kontrolnej pozbawionej analitu [40]. Z tego względu w pracy H7 zastosowałem podejście oparte na analitycznym surowcu,

wykorzystując znakowaną izotopowo kreatyninę d_3 -CRE jako analit zastępczy do kalibracji. Jednocześnie jako standardy wewnętrzne oceniono inne izotopowo znakowane analogi kreatyniny, tj. d_5 -CRE oraz ^{13}C -CRE, przy czym do właściwej walidacji wybrano d_5 -CRE ze względu na korzystniejsze właściwości jonizacyjne. Takie podejście pozwoliło opracować metodę zgodną z wymaganiami ICH M10 do oznaczania związku endogennego w kilku matrycach biologicznych [11].

W artykule porównano dwa różne podejścia do mikropobierania próbki biologicznej. Pierwszym z nich było VAMS-Mitra™, które pozwala na pobranie 10 μ L krwi pełnej włośniczkowej bez potrzeby separacji elementów morfotycznych. Drugim rozwiązaniem jest urządzenie Capitainer SEP10®, które umożliwia uzyskanie wysuszonej próbki osocza, czyli qDPS, po oddzieleniu składników komórkowych krwi. Z perspektywy klinicznej porównanie tych metod ma istotne znaczenie, ponieważ system Mitra™ jest prostszy w odniesieniu do pobierania próbki i bardziej komfortowy dla pacjenta, podczas gdy SEP10® dostarcza próbkę, którą można bezpośrednio porównać z rutynowymi testami kreatyniny w osoczu.

Metoda LC-MS/MS została zwalidowana w zakresie kalibracyjnym od 0,025 do 100 mg/L dla osocza, qDPS oraz VAMS. Uzyskano bardzo dobrą liniowość we wszystkich matrycach: dla osocza równanie kalibracji to $y = 4,1355x - 0,1387$, z $R^2 = 0,9982$; dla qDPS: $y = 3,9884x - 0,4957$, z $R^2 = 0,9964$; a dla VAMS: $y = 3,8653x - 0,1211$, z $R^2 = 0,9971$. Tak szeroki zakres kalibracyjny obejmował stężenia klinicznie istotne zarówno dla pacjentów z prawidłową lub umiarkowanie obniżoną funkcją nerek, jak i dla tych z poważniejszym pogorszeniem filtracji.

Walidacja analityczna potwierdziła spełnienie kryteriów ICH M10 w zakresie dokładności i precyzji. Dla wszystkich matryc wartości dokładności pozostawały w granicach $\pm 15\%$, a na poziomie LLOQ w granicach $\pm 20\%$. Precyzja również spełniała wymagania walidacyjne. Przykładowo, dla osocza precyzja wewnątrzdzienna wynosiła od 2,63% do 7,97%, dla VAMS od 5,52% do 9,51%, a dla qDPS od 3,61% do 13,16%. W ocenie międzydniowej precyzja wynosiła odpowiednio od 1,21% do 6,04% dla osocza, od 2,76% do 7,39% dla VAMS oraz od 3,15% do 8,80% dla qDPS. Wyniki te potwierdziły, że metoda jest wystarczająco precyzyjna do ilościowego oznaczania kreatyniny zarówno w klasycznej matrycy osoczowej, jak i w mikropróbkach.

Szczególnym elementem badania była ocena zgodności analitycznej kreatyniny z zastosowanym analitem zastępczym, d_3 -CRE. Wykazałem, że przy równych stężeniach 10 mg/l obu związków stosunek ich sygnałów był zbliżony do 1 w różnych matrycach, takich jak DPBS, osocze, krew włośniczkowa i wysuszone osocze, osiągając odpowiednio wartości 1,03, 0,98, 0,92 i 0,97. W związku z tym nie było konieczne używanie dodatkowego współczynnika korekcyjnego. Ponadto stosunek nachyleń krzywych kalibracyjnych wynosił 0,906 i mieścił się w dopuszczalnym zakresie 0,85–1,15. Równoległość odpowiedzi kreatyniny i d_3 -CRE została również potwierdzona w zakresie hematokrytu od 0,21 do 0,68 L/L, co jest istotne dla wiarygodności oznaczeń w mikropróbkach krwi.

W pracy oceniłem również stabilność kreatyniny i odpowiadającego analitu zastępczego w różnych warunkach. Zarówno kreatynina, jak i d_3 -CRE pozostawały stabilne w analizowanych matrycach przez 5 godzin w temperaturze 60°C, co symulowało potencjalne

krótkotrwałe narażenie próbek na warunki stresowe podczas transportu. Ekstrakty pozostawały stabilne w autosamplerze w temperaturze 5°C przez 5 dni, a mikropróbki VAMS i qDPS wykazywały stabilność podczas długoterminowego przechowywania przez 3 miesiące w temperaturze pokojowej, 4°C oraz -20°C. Wyniki te potwierdzają praktyczną przydatność opracowanej metody do zdecentralizowanego pobierania i przesyłania próbek.

Część kliniczna obejmowała 61 dorosłych biorców nerki, u których porównano wyniki pomiarów kreatyniny w osoczu, qDPS oraz VAMS. Próbkę żylną pobierano do probówek z K₃-EDTA, a krew włośniczkową po nakłuciu palca, korzystając z urządzeń Mitra™ i Capitainer SEP10®. Badanie przeprowadzono w grupie pacjentów po transplantacji nerki, w której regularne i wiarygodne monitorowanie kreatyniny jest kluczowe dla oceny funkcji przeszczepu oraz wczesnego wykrycia ewentualnego pogorszenia jej czynności.

Średnie stężenie kreatyniny w osoczu wynosiło 1,57 mg/dL, w zakresie od 0,63 do 3,58 mg/dL. Dla qDPS średnia wartość to 1,54 mg/dL (zakres 0,60–3,68 mg/dL), a dla niekorygowanych wyników VAMS 1,26 mg/dL (zakres 0,47–2,74 mg/dL). Te dane pokazują, że qDPS generuje wyniki bardzo zbliżone do pomiarów z osocza, bez potrzeby korzystania z dodatkowych przeliczników, podczas gdy Mitra™ VAMS zazwyczaj zawyża wartości w porównaniu z osoczem i wymaga użycia modelu konwersji.

W analizie porównawczej zastosowałem regresję Passinga–Babloka oraz analizę Blanda–Altmana. Dla porównania osocza i VAMS wyznaczono równanie $PL_{CRE} = 1,197 \times VAMS_{CRE} + 0,053$, z średnim błędem systematycznym wynoszącym 19,90%. Wynik ten potwierdza, że niekorygowane wartości VAMS nie powinny być bezpośrednio interpretowane jako wartości osocza. Dla porównania, z osocza i qDPS uzyskano natomiast równanie $PL_{CRE} = 0,978 \times qDPS_{CRE} + 0,099$, z błędem systematycznym 5,50%, co potwierdza odpowiadający osoczu charakter próbek qDPS. Na podstawie uzyskanych danych opracowałem model przeliczeniowy dla VAMS: $PL_{CRE} = 1,197 \times VAMS_{CRE} + 0,053$. Średni współczynnik korekcyjny VAMS/osocze wynosił 0,835 przy CV wynoszącym 7,99%. Następnie zwalidowałem ten model w niezależnym zestawie 21 sparowanych próbek. Po zastosowaniu korekcy średnie stężenie kreatyniny VAMS wynosiło 1,56 mg/dL, czyli było bardzo zbliżone do wartości osoczowej. Dla porównania, dla osocza z korygowanym VAMS uzyskałem równanie $PL_{CRE} = 0,934 \times VAMS_{CRE_corrected} + 0,064$, a średni błąd systematyczny zmniejszył się do -1,20%. Z kolei zgodność korygowanego VAMS z qDPS była bardzo dobra: $VAMS_{CRE_corrected} = 1,016 \times qDPS_{CRE} - 0,011$, a błąd wyniósł 0,80%.

Wyniki te pozwoliły mi sformułować ważny wniosek metodologiczny: qDPS może być traktowany jako matryca równoważna osoczu bez konieczności przeliczania, natomiast VAMS wymaga *post*-analizy korekty do wartości osoczowej. Ma to istotne znaczenie praktyczne. qDPS upraszcza interpretację laboratoryjną i może być bezpośrednio odnoszony do wartości referencyjnych stosowanych w osoczu. VAMS jest natomiast prostszy i bardziej intuicyjny dla pacjenta, ale wymaga zatwierdzonego modelu obliczeniowego. Praca **H7** pokazuje zatem, że wybór techniki mikropobierania zależy od kompromisu między prostotą pobrania a łatwością interpretacji wyniku. **Warto zaznaczyć, że jest to jak dotąd pierwsza opublikowana praca obejmująca ilościowy pomiar analitu w próbkach pobranych za pomocą systemu SEP10®.**

Ograniczeniem badania było objęcie analizą jednej kohorty dorosłych biorców przeszczepu nerki oraz brak zewnętrznej walidacji modelu korekcyjnego VAMS w innych populacjach, takich jak dzieci, pacjenci dializowani lub chorzy z bardzo niskimi albo bardzo wysokimi stężeniami kreatyniny. Mimo to praca przedstawia kompletny schemat walidacji oznaczeń związku endogennego w technikach mikropobierania i wskazuje kierunek dalszych badań nad zdalnym monitorowaniem funkcji nerek.

Publikacja **H7** stanowi ważny element mojego cyklu habilitacyjnego, ponieważ poszerza zakres opracowywanej przeze mnie platformy mikropobierania z monitorowania leków o monitorowanie biomarkerów narządowych. W pracy wykazałem, że techniki mikropobierania mogą być użyteczne nie tylko w TDM leków immunosupresyjnych i przeciwwirusowych, ale również w ocenie funkcji przeszczepionej nerki. Szczególne znaczenie ma opracowanie metody zgodnej z ICH M10 oznaczania endogennej kreatyniny z wykorzystaniem strategii surogatu analitycznego, a także jednoznaczne rozróżnienie dwóch modeli interpretacyjnych: bezpośredniego, odpowiadającego osoczu oznaczania qDPS, oraz oznaczania VAMS, wymagającego walidowanej korekcji do wartości osoczkowych.

Włączenie pracy **H7** do cyklu habilitacyjnego jest uzasadnione, ponieważ dokumentuje przejście od klasycznego terapeutycznego monitorowania leków do szerszego, pacjentocentrycznego modelu monitorowania po transplantacji, obejmującego zarówno ekspozycję na leki, jak i funkcję narządu przeszczepionego. Tym samym publikacja ta wzmacnia główną koncepcję cyklu, zgodnie z którą odpowiednio zwalidowane techniki mikropobierania mogą stanowić realne narzędzie decentralizacji opieki transplantacyjnej i zwiększenia dostępności monitorowania laboratoryjnego poza wyspecjalizowanym ośrodkiem klinicznym.

Praca przeglądowa H8: Kocur A., Pawiński T. [✉] Microsampling techniques and patient-centric therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Bioanalysis*, 2025, tom 17, nr 6, str.: 413-427. <https://doi: 10.1080/17576180.2025.2477976>.

Publikacja **H8** ma charakter eksperckiej pracy przeglądowo-koncepcyjnej i stanowi syntetyczne podsumowanie oraz uogólnienie doświadczeń zdobytych w ramach badań eksperymentalnych i klinicznych przedstawionych w pozostałych publikacjach cyklu habilitacyjnego. Praca ta powstała na zaproszenie redakcji czasopisma *Bioanalysis*, skierowane do mnie oraz współautora publikacji, dr hab. Tomasz Pawińskiego, co stanowiło potwierdzenie rozpoznawalności prowadzonych przez nas badań w zakresie mikropobierania oraz pacjentocentrycznego terapeutycznego monitorowania leków immunosupresyjnych. W tej pracy omówiłem znaczenie technik mikropobierania w pacjentocentrycznym monitorowaniu leków immunosupresyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania tych rozwiązań u biorców narządów litych. Publikacja porządkuje zagadnienia przedanalizyczne, analityczne, kliniczne i organizacyjne związane z wdrażaniem mikropobierania do praktyki TDM, a jednocześnie proponuje praktyczny model przejścia od opracowania metody w laboratorium do jej zastosowania przy łóżku pacjenta i w warunkach domowych.

Podstawą tej pracy była obserwacja, że farmakoterapia immunosupresyjna po przeszczepie narządów litych wymaga ciągłej indywidualizacji dawkowania, ponieważ większość leków z tej grupy ma wąski indeks terapeutyczny, duże zróżnicowanie przebiegu farmakokinetyki oraz ryzyko zarówno niedostatecznej immunosupresji, jak i toksyczności. W rutynowej praktyce laboratoryjnej oznaczanie takrolimusu, cyklosporyny, sirolimusu i ewerolimusu odbywa się głównie na podstawie krwi pełnej, natomiast kwasu mykofenolowego najczęściej oznaczają w osoczu lub surowicy [3-8]. Podkreślono, że tradycyjne pobieranie krwi żyłnej, mimo swojej wartości diagnostycznej, jest obciążeniem dla pacjentów, którzy muszą poddawać się wieloletniemu monitorowaniu, zwłaszcza u dzieci, osób starszych, osób z ograniczoną mobilnością oraz chorych mieszkających z dala od ośrodków transplantacyjnych.

W tym kontekście mikropobieranie zostało przedstawione jako technologia umożliwiająca rzeczywistą decentralizację TDM. Techniki takie jak klasyczne DBS, VAMS, qDBS, hemaPEN™, HemaXis™, Tasso-M20™ oraz urządzenia umożliwiające separację osocza, np. Capitainer SEP10® pozwala na pobieranie niewielkich objętości materiału biologicznego, zwykle rzędu 10–20 µL, po nakłuciu palca [1-10,41]. Szczególne znaczenie przypisałem technologiom wolumetrycznym, ponieważ ograniczają one podstawowe problemy klasycznego DBS, tj. niejednorodność plamki, efekt hematokrytowy, zmienną objętość próbki oraz błędy wynikające z nieprawidłowego nasączenia bibuły.

W pracy **H8** szczegółowo omówiono kluczowe technologie mikropobierania. Zaznaczono, że Mitra™ VAMS umożliwia pobranie ustalonej objętości krwi na porowatą końcówkę z polimeru, co można wizualnie ocenić dzięki kontrastowi między białą końcówką a krwią. Urządzenia Capitainer® qDBS wykorzystują procesy mikrokapilarne do wytworzenia określonej objętości wysuszonej plamki krwi, zwykle 10 µL, co minimalizuje ryzyko kontaminacji próbki. Przedstawiono także urządzenia kapilarne, takie jak hemaPEN™, oraz systemy do separacji frakcji osoczowych, które mają szczególne znaczenie przy monitorowaniu leków w osoczu, na przykład kwasu mykofenolowego.

W publikacji szczególną uwagę zwrócono na analizę fazy przedanalizycznej, która jest kluczowa dla jakości wyników w przypadku mikropobierania. Podkreśliłem, że opracowanie czulej metody LC–MS/MS samo w sobie nie wystarczy, aby bezpiecznie wdrożyć mikropobieranie w praktyce klinicznej. Niezbędne jest również przeszkolenie pacjentów i opiekunów, przygotowanie jasnych instrukcji pobierania próbek – najlepiej z ilustracjami lub materiałami wideo – oraz regularna ocena jakości pobranych mikropróbek. W pracy przedstawiłem swoje doświadczenia z badań klinicznych u pediatrycznych biorców nerki w IPCZD, gdzie mniej niż 2% mikropróbek – 35 z 1720 – nie spełniło kryteriów jakości. Wynik ten dowodzi, że po odpowiednim szkoleniu pacjentów i ich rodzin mikropobieranie może skutecznie funkcjonować w praktyce klinicznej.

Osobną kwestią jest problem hematokrytu. W pracy podkreślono, że klasyczne DBS są szczególnie wrażliwe na ten czynnik, ponieważ lepkość krwi wpływa na średnicę plamki, migrację komórek i osocza w materiale nośnikowym, czas suszenia oraz jednorodność próbki. Technologie wolumetryczne, takie jak VAMS i qDBS, znacznie ograniczają ten problem, zapewniając pobranie stałej objętości krwi. Jednocześnie zauważono, że nawet w przypadku

urządzeń wolumetrycznych hematokryt może wpływać na odzysk analitu, dlatego każda metoda powinna być odpowiednio walidowana na różnych poziomach hematokrytu, odpowiadających populacji docelowej. Jest to szczególnie istotne w populacjach pediatrycznych i transplantacyjnych, gdzie wartości hematokrytu mogą się zmieniać.

W części dotyczącej fazy analitycznej zaznaczono, że LC-MS/MS odgrywa kluczową rolę jako metoda referencyjna do oznaczania leków immunosupresyjnych w mikropróbkach. Wynika to z małej objętości próbki oraz niskiego stężenia wielu immunosupresantów, takich jak takrolimus, cyklosporyna, sirolimus i ewerolimus. Omówiono również istotność odpowiedniego doboru rozpuszczalników ekstrakcyjnych, metody wprowadzania standardu wewnętrznego, oceny efektu matrycowego oraz optymalizacji etapów oczyszczania próbek. Wskazałem, że mieszaniny siarczynu cynku z acetonitrylem są powszechnie stosowane w ekstrakcji immunosupresantów z krwi pełnej, a w przypadku mikropróbek konieczne może być wsparcie ekstrakcji poprzez sonikację, wytrząsanie, ekstrakcję ciecz-ciecz, ekstrakcję do fazy stałej (SPE) lub inne techniki oczyszczania.

W publikacji **H8** położono szczególny nacisk na fazę postanalityczną, czyli kliniczną interpretację wyników z mikropróbek. Wykazałem, że wdrożenie mikroprobowania nie może opierać się wyłącznie na porównywaniu korelacji między metodami. Należy przeprowadzić pełne badanie pomostowe, które obejmuje analizę regresji, ocenę błędu systematycznego, wyznaczenie granic zgodności oraz sprawdzenie klinicznej akceptowalności różnic. W pracy zaproponowano praktyczne kryteria porównawcze: nachylenie regresji Passing-Bablok lub Deminga zbliżone do 1, przedział ufności dla nachylenia obejmujący 1, przedział dla wyrazu wolnego zawierający 0, średni błąd w analizie Blanda-Altmana mieszczący się w granicach $\pm 15\%$, a także co najmniej 67% sparowanych próbek w granicach $\pm 20\%$ dla zgodności analitycznej i $\pm 15\%$ dla zgodności klinicznej.

Ważnym zagadnieniem była również konwersja wyników uzyskanych we krwi włośniczkowej na matryce tradycyjne. W pracy wskazano, że dla leków, których stosunek krew/osocze jest bliski 1, stężenia we krwi włośniczkowej mogą dobrze odzwierciedlać stężenia osoczowe. Natomiast dla leków silnie związanych z erytrocytami, takich jak inhibitory kalcyneuryny i mTOR, krew pełna pozostaje właściwą matrycą referencyjną. W przypadku kwasu mykofenolowego, dla którego rutynowo stosuje się zakresy terapeutyczne w osoczu lub surowicy, konieczne może być przeprowadzenie przeliczenia. Omówiono trzy strategie: użycie średniego współczynnika korekcyjnego, zastosowanie wzoru zależnego od hematokrytu oraz opracowanie i walidację wzoru populacyjnego na podstawie badania pomostowego.

W pracy **H8** przedstawiono również potencjał mikropobierania w ocenie adherencji do leczenia. Nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych pozostaje jedną z istotnych przyczyn utraty przeszczepu, szczególnie u dzieci i młodzieży. Możliwość samodzielnego, domowego pobierania próbek oraz częstszego monitorowania stężenia leków może ułatwiać wykrywanie dużej zmienności wewnątrzosobniczej, stanowiącej pośredni wskaźnik nieprzestrzegania zaleceń (*non-adherence*). W pracy przytoczono moje obserwacje z pilotażowej oceny pediatrycznych biorców nerki leczonych takrolimusem i kwasem mykofenolowym: przy przyjęciu odcięcia CV < 30% dla stabilności ekspozycji, wskaźnik adherencji wynosił 90%

w grupie standardowego pobierania krwi żyłnej oraz 96% w grupie domowego pobierania VAMS (dane przygotowywane do kolejnej publikacji).

W osobnym fragmencie publikacji omówiono badania dotyczące biegłości laboratoriów. Podkreśliłem, że rutynowe stosowanie mikropobierania w TDM wymaga uczestnictwa w zewnętrznych programach kontroli jakości, ponieważ wewnętrzna walidacja nie gwarantuje pełnej porównywalności wyników między laboratoriami. Przedstawiono pilotażowe programy badania biegłości laboratoriów dla mikropróbek immunosupresantów oraz wskazano, że istnieją już schematy umożliwiające kontrolę oznaczeń takrolimusu, cyklosporyny, sirolimusu, ewerolimusu, kwasu mykofenolowego, kreatyniny i hematokrytu w różnych typach mikropróbek. Z punktu widzenia wdrożenia jest to kluczowy etap w dążeniu do standaryzacji i harmonizacji wyników między laboratoriami.

Najważniejszym elementem pracy **H8** jest opracowanie praktycznego modelu wdrożenia mikropobierania w TDM leków immunosupresyjnych. Model ten obejmuje wybór odpowiedniego urządzenia w zależności od populacji i analitu, ocenę czułości platformy analitycznej, optymalizację procesu suszenia, przechowywania oraz ekstrakcji, walidację zgodną z międzynarodowymi wytycznymi, ocenę wpływu hematokrytu, badanie pomostowe na próbkach klinicznych, kliniczną walidację na niezależnym zestawie danych oraz udział w zewnętrznych programach kontroli jakości. Takie kompleksowe podejście tworzy ramy interpretacyjne dla wszystkich moich prac eksperymentalnych realizowanych w ramach cyklu habilitacyjnego.

Publikacja **H8** pełni rolę pracy koncepcyjnej i integracyjnej. W przeciwieństwie do prac **H1–H7**, które opisują opracowanie, walidację i kliniczne zastosowania konkretnych metod oznaczania cyklosporyny, sirolimusu, ewerolimusu, gancyklowiru, kwasu mykofenolowego czy kreatyniny, **H8** prezentuje szerszą perspektywę kliniczną i organizacyjną. Ukazuje, jakie warunki muszą zostać spełnione, aby mikropobieranie mogło zostać bezpiecznie przeniesione z etapów badań analitycznych do codziennej opieki transplantacyjnej.

Znaczenie pracy **H8** w cyklu habilitacyjnym polega na tym, że porządkuje ona i uzasadnia główną koncepcję całego osiągnięcia naukowego: mikropróbkowanie, jeśli zostanie prawidłowo zwalidowane analitycznie, klinicznie i organizacyjnie, może stać się realnym narzędziem pacjentocentrycznego monitorowania farmakoterapii po transplantacji. Publikacja ta wzmacnia translacyjny charakter cyklu, ponieważ łączy zagadnienia chemii analitycznej, bioanalizy, farmakokinetyki, transplantologii, monitorowania adherencji oraz organizacji zdecentralizowanej diagnostyki laboratoryjnej. Wskazuje również kierunek dalszego rozwoju: standaryzację metod, rozszerzenie zastosowań na kolejne populacje i leki oraz wykorzystanie mikropobierania do domowych profili farmakokinetycznych, które wcześniej były trudne lub niemożliwe do wykonania w rutynowej praktyce klinicznej.

4.8. Wnioski z całego cyklu publikacji

Realizacja przedstawionego cyklu publikacji pozwoliła na opracowanie spójnej, translacyjnej koncepcji wykorzystania technik mikropobierania w terapeutycznym monitorowaniu leków oraz monitorowaniu funkcji narządu po transplatacji. Przeprowadzone badania wykazały, że odpowiednio zwalidowane techniki mikropróbki mogą stanowić nie tylko alternatywę analityczną dla klasycznych metod pobierania krwi żyłnej, lecz także podstawę zdecentralizowanego, pacjentocentrycznego modelu opieki transplantacyjnej.

Na podstawie prac włączonych do cyklu sformułowałem następujące wnioski:

- 1. Techniki mikropobierania mogą być skutecznie wykorzystywane do indywidualizacji farmakoterapii leków o wąskim indeksie terapeutycznym, pod warunkiem opracowania odpowiednio zoptymalizowanych i zwalidowanych metod LC–MS/MS.** Wykazałem, że oznaczanie leków immunosupresyjnych i przeciwwirusowych w mikropróbkach wymaga indywidualnej optymalizacji procedury analitycznej dla każdego analitu, matrycy oraz urządzenia pobierającego próbkę. Proste zastosowanie klasycznej metody z krwi pełnej, osocza lub surowicy w próbkach VAMS, qDBS, DSS lub qDPS nie jest wystarczające. Należy dostosować etap ekstrakcji, wybór standardu wewnętrznego, oczyszczanie próbki oraz warunki LC–MS/MS do specyfiki mikropróbek.
- 2. Walidacja metod bioanalitycznych opartych na mikropobieraniu powinna uwzględniać dodatkowe parametry specyficzne dla próbek wysuszonych oraz o małej objętości.** Wykazałem, że oprócz klasycznych elementów walidacji, takich jak liniowość, selektywność, dokładność, precyzja, efekt matrycowy i stabilność, konieczna jest również ocena czynników specyficznych dla mikropobierania. Do nich należą wpływ hematokrytu, czas suszenia, warunki przechowywania i transportu, skuteczność ekstrakcji z urządzenia, możliwość przepełnienia lub niedopełnienia próbki oraz odtwarzalność oznaczenia w próbkach rzeczywistych. Uwzględnienie tych parametrów jest warunkiem bezpiecznego przejścia od metody analitycznej do zastosowania w praktyce klinicznej.
- 3. Nowoczesne techniki wolumetryczne, takie jak VAMS i qDBS, rozwiązują najważniejsze problemy klasycznego DBS, choć wciąż wymagają oceny wpływu hematokrytu.** Przeprowadzone badania wykazały, że pobieranie krwi w stałej objętości znacząco zwiększa powtarzalność wyników i minimalizuje ryzyko błędów przedanalizacyjnych. Zauważyłem też, że hematokryt może mieć wpływ nie tylko na objętość i rozkład próbki, lecz także na odzysk analitu i skuteczność ekstrakcji. W związku z tym, nawet przy użyciu urządzeń wolumetrycznych, ocena wpływu hematokrytu powinna być standardową częścią procesu walidacyjnego, zwłaszcza w populacjach pediatrycznych i po transplatacjach.
- 4. Alternatywne metody pobierania próbek mogą zastąpić lub uzupełnić tradycyjne pobieranie krwi żyłnej, pod warunkiem przeprowadzenia pełnego badania pomostowego.** Wyniki tego cyklu jasno pokazują, że sama korelacja między metodą

mikropobierania a metodą referencyjną nie wystarcza jako dowód klinicznej równoważności. Przydatność metody ocenia się na podstawie zgodności wyników, wielkości błędu systematycznego, obecności lub braku błędu proporcjonalnego, odsetka próbek mieszczących się w ustalonych granicach akceptacji oraz możliwości podejmowania tych samych decyzji terapeutycznych na podstawie obu metod. Dlatego też badanie pomostowe powinno być traktowane jako niezbędny etap wdrożenia mikropobierania w TDM.

5. **Interpretacja wyników z mikropróbek zależy od zgodności matrycy alternatywnej z matrycą rutynową oraz od właściwości farmakokinetycznych badanego związku.** W przypadku leków, dla których rutynową matrycą jest krew pełna, takich jak inhibitory kalcyneuryny i mTOR, krew włośniczkowa pobrana technikami wolumetrycznymi może stanowić bezpośrednią alternatywę dla tradycyjnego materiału pochodzącego z krwi żyłnej. Natomiast dla analitów interpretowanych klinicznie w osoczu lub surowicy, takich jak kwas mykofenolowy czy kreatynina, może być konieczne zastosowanie przeliczenia, modelu konwersji lub urządzenia generującego próbkę równoważną z osoczem. Wnioski te mają kluczowe znaczenie dla przyszłego projektowania metod mikropobierania.
6. **Nie każda atrakcyjna analitycznie matryca alternatywna jest wystarczająco użyteczna do rutynowego TDM.** Cykl wykazał, że minimalna inwazyjność i łatwość pobrania nie mogą być jedynymi kryteriami wyboru matrycy. Przykładem jest ślina, która może być wygodna dla pacjenta i możliwa do standaryzowanego pobrania metodą VAMS, ale nie musi wiarygodnie odzwierciedlać ekspozycji osoczowej na lek. Tym samym każdy nowy materiał biologiczny wymaga nie tylko walidacji analitycznej, lecz przede wszystkim potwierdzenia klinicznej użyteczności w odniesieniu do parametrów farmakokinetycznych istotnych dla dawkowania.
7. **Mikropobieranie może wspierać decentralizację terapeutycznego monitorowania przyjmowania leków oraz rozwój domowego modelu opieki nad pacjentem po transplantacji.** Prace w cyklu wykazały, że odpowiednio zwalidowane mikropróbki mogą być stabilne w warunkach umożliwiających ich transport do laboratorium referencyjnego. Procedura pobierania może być wykonywana przez pacjenta lub opiekuna po odpowiednim przeszkoleniu. To otwiera możliwość zmniejszenia liczby wizyt w ośrodku transplantacyjnym, przeprowadzania domowych profili farmakokinetycznych, szybszego reagowania na zmiany w ekspozycji oraz lepszego dostosowania monitorowania do potrzeb pacjentów leczonych przewlekle.
8. **Wprowadzenie mikropobierania do rutynowego TDM wymaga zintegrowanego modelu analityczno-kliniczno-organizacyjnego.** Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że skuteczne wykorzystanie mikropobierania wymaga współdziałania laboratorium, klinicystów, pacjentów oraz opiekunów. Niezbędne są: walidacja bioanalityczna, walidacja kliniczna, procedury oceny jakości próbki, instrukcje pobierania, kryteria akceptacji i odrzucenia materiału, udział w zewnętrznych badaniach biegłości oraz jasny sposób raportowania i interpretacji

wyników. Mikropobieranie nie jest wyłącznie zmianą techniki pobrania, lecz zmianą całego procesu diagnostycznego.

9. **Rozszerzenie mikropobierania z monitorowania leków na monitorowanie biomarkerów funkcji narządu przeszczepionego stanowi podstawę szerszego modelu opieki po transplantacji.** Włączenie do cyklu badań dotyczących kreatyniny pokazało, że alternatywne strategie pobierania próbek mogą służyć nie tylko ocenie ekspozycji na leki, ale także monitorowaniu funkcji przeszczepionego narządu. Tym samym mikropobieranie może stać się elementem kompleksowego nadzoru nad pacjentem po transplantacji, łączącego TDM, ocenę bezpieczeństwa farmakoterapii oraz kontrolę parametrów klinicznie istotnych dla funkcji przeszczepu.
10. **Całość cyklu potwierdza, że prawidłowo zwalidowane techniki mikropobierania są realnym narzędziem indywidualizacji farmakoterapii, a nie jedynie alternatywą techniczną dla klasycznego pobierania krwi.** Najważniejszym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest to, że mikropobieranie może zmienić sposób organizacji terapeutycznego monitorowania leków: z modelu scentralizowanego, opartego na pobraniu krwi żyłnej w ośrodku klinicznym, na model bardziej elastyczny, zdecentralizowany i dostosowany do pacjenta. Warunkiem takiej zmiany jest jednak zachowanie pełnej wiarygodności analitycznej i klinicznej wyników.
11. **Prezentowany cykl publikacji wpisuje się w aktualny światowy trend rozwoju zdecentralizowanej i pacjentocentrycznej medycyny laboratoryjnej, w której część procedur monitorowania farmakoterapii może być realizowana poza klasycznym laboratorium szpitalnym.** Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszego rozwoju nowoczesnych modeli TDM integrujących mikropróbki, farmakokinetykę kliniczną oraz narzędzia wspomagania decyzji terapeutycznych.

Podsumowując, przedstawiony cykl publikacji doprowadził do opracowania spójnego modelu translacyjnego wykorzystania technik mikropobierania w terapeutycznym monitorowaniu leków i opiece nad pacjentem po transplantacji. Osiągnięcia te obejmują nie tylko rozwój i walidację metod LC-MS/MS dla alternatywnych mikropróbek biologicznych, lecz również stworzenie praktycznych zasad ich wdrażania klinicznego – od optymalizacji procesu pobrania i walidacji bioanalitycznej, poprzez badania pomostowe i ocenę kliniczną równoważności, aż po zastosowanie w modelu pacjentocentrycznym i *home-based* TDM. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że mikropobieranie może stać się jednym z kluczowych elementów przyszłych, zdecentralizowanych modeli monitorowania farmakoterapii i funkcji przeszczepionego narządu.

4.9. Dodatkowe osiągnięcia naukowe po uzyskaniu stopnia doktora

Poza cyklem publikacji stanowiącym osiągnięcie naukowe, prowadzę oraz współrealizuję również inne działania badawcze z zakresu terapii monitorowanej stężeniem leku we krwi, farmakokinetyki klinicznej oraz bioanalizy. Skupiają się one głównie na terapii monitorowanej i farmakokinetyce klinicznej metotreksatu (**OD1**) oraz na bioanalizie i

farmakokinetyce klinicznej leków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych u pacjentów w stanie krytycznym (**OD2**).

Poniżej przedstawiłem osiągnięcia naukowe, których wyniki zostały opublikowane w pracach oryginalnych oraz zaprezentowane jako doniesienia konferencyjne.

OD1. Terapeutyczne monitorowanie stężeniem leku w protokołach niskich i wysokich dawek metotreksatu (i jego metabolitów)

Metotreksat pozostaje jednym z kluczowych leków stosowanych zarówno w leczeniu chorób autoimmunologicznych, jak i w terapii onkologicznej. W praktyce klinicznej wykorzystywane są dwa zasadnicze schematy jego stosowania: protokoły niskich dawek (*ang. low-dose methotrexate, LDMTX*) oraz wysokich dawek (*ang. high-dose methotrexate, HDMTX*). LDMTX znajduje szerokie zastosowanie w leczeniu chorób zapalnych i autoimmunologicznych, w tym reumatoidalnego zapalenia stawów oraz łuszczycy, natomiast HDMTX jest stosowany przede wszystkim w chemioterapii nowotworów, zwłaszcza w onkologii i hematologii dziecięcej [42-44].

W przypadku HDMTX monitorowanie stężenia leku odgrywa kluczową rolę kliniczną, umożliwiając ocenę eliminacji metotreksatu, optymalizację leczenia ratunkowego leukoworyną oraz ograniczenie ryzyka poważnych działań toksycznych. Zazwyczaj stężenie MTX jest oznaczane w próbkach krwi pobranych w różnych punktach czasowych po rozpoczęciu infuzji, takich jak 24, 48 i 72 godziny, a decyzje terapeutyczne są podejmowane na podstawie szybkości jego eliminacji [45]. Ważnym aspektem tych badań było opracowanie i walidacja metody LC-MS/MS do oznaczania metotreksatu w surowicy oraz porównanie jej z komercyjnymi metodami immunochemicznymi stosowanymi rutynowo w laboratoriach. Wykazano, że choć wyniki uzyskiwane metodami immunochemicznymi i LC-MS/MS wykazują dobrą korelację, metody te mogą być obarczone błędem z powodu reaktywności krzyżowej z metabolitami metotreksatu, takimi jak DAMPA i 7-OH-MTX. To może prowadzić do zawyżenia stężenia MTX i tym samym do niepotrzebnego przedłużenia leczenia leukoworyną [45]. Wyniki pokazują, że LC-MS/MS, ze względu na wyższą swoistość i precyzję, powinien być metodą referencyjną w sytuacjach klinicznych, szczególnie u pacjentów z opóźnioną eliminacją MTX, zaburzeniami funkcji nerek lub wysokim ryzykiem toksyczności (prace **P1** i **P4**). Wyniki tej części dodatkowego osiągnięcia były również prezentowane na zjazdach krajowych i zagranicznych (**KK2**, **KM3**) oraz realizowane częściowo w ramach projektu **MG2**.

Drugim aspektem moich badań było monitorowanie terapeutyczne niskich dawek metotreksatu, ze szczególnym uwzględnieniem oceny ekspozycji na lek, skuteczności terapii i przestrzegania zaleceń. W odróżnieniu od HDMTX, w terapii LDMTX oznaczanie samego metotreksatu w osoczu ma ograniczone znaczenie, ponieważ lek jest szybko eliminowany z krwiobiegu. Dużą rolę odgrywają poliglutaminiany metotreksatu (MTXPG), które gromadzą się wewnątrzkomórkowo, głównie w erytrocytach, i mogą odzwierciedlać długoterminową ekspozycję na ten lek [46].

W tym zakresie moje badania obejmowały analizę zmiennych przedanalitycznych, problemów bioanalitycznych oraz możliwości klinicznego wykorzystania oznaczania MTXPGs w terapii LDMTX (praca **P3**). Kluczowym etapem było opracowanie i walidacja wielomatrixowej metody LC-MS/MS do oznaczania metotreksatu i jego poliglutaminianów w różnych matrycach biologicznych, takich jak erytrocyty, pełna krew, próbki VAMS i DBS. Badanie objęło pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów leczonych niskimi dawkami metotreksatu, z zamiarem oceny, czy techniki mikropróbki mogą zastąpić tradycyjne pobieranie krwi żyłnej w monitorowaniu długoterminowej ekspozycji na MTX. Metoda została zwalidowana zgodnie z wytycznymi ICH M10 w czterech typach matryc: erytrocytach, pełnej krwi, VAMS i DBS. W materiale klinicznym oznaczano MTX, MTXPG₂₋₅ oraz całkowite stężenie MTXPG, natomiast MTXPG₆₋₇ nie wykrywano w badanych próbkach (praca **P7**). Tak zaprojektowane badanie umożliwiło nie tylko ocenę poprawności analitycznej metody, ale także porównanie wyników uzyskiwanych z klasycznych i alternatywnych strategii pobierania materiału biologicznego. W pracy wykazano wysoką zgodność między wynikami z próbek VAMS i DBS. Analizy Passinga-Babloka, Blanda-Altmana i korelacje Spearmana potwierdziły bardzo dobrą porównywalność obu technik mikropróbki, z nachyleniami regresji bliskimi jedności, niskim błędem systematycznym i wysokimi korelacjami dla analizowanych analitów. Szczególnie silna zgodność zaobserwowana była dla całkowitego stężenia MTXPG, co wskazuje, że ten parametr może być najbardziej stabilnym i użytecznym wskaźnikiem w porównaniach między matrycami kapilarnymi.

Wyniki badania wykazały, że wartości oznaczane w próbkach VAMS i DBS nie można bezpośrednio porównywać ze stężeniami w erytrocytach. Stężenia MTXPG w erytrocytach były zazwyczaj wyższe niż w próbkach kapilarnych, podczas gdy wyniki z VAMS i DBS lepiej odzwierciedlały stężenia we krwi pełnej. To sugeruje, że VAMS i DBS powinny być traktowane jako matryce kapilarne podobne do pełnej krwi, a nie jako bezpośrednie zastępstwo frakcji erytrocytarnej. Ma to kluczowe znaczenie dla interpretacji, ponieważ progi terapeutyczne i zakresy ekspozycji ustalone dla erytrocytów nie powinny być automatycznie stosowane do próbek VAMS lub DBS bez oddzielnej walidacji klinicznej. Wyniki tej pracy mają znaczenie zarówno analityczne, jak i kliniczno-organizacyjne. Z jednej strony potwierdzają możliwość wiarygodnego oznaczania MTXPG z wykorzystaniem małych objętości krwi kapilarnej, z drugiej zaś wskazują na konieczność raportowania i interpretacji wyników w sposób zależny od zastosowanej matrycy, np. jako całkowite MTXPG w VAMS lub całkowite MTXPG w DBS, bez bezpośredniego przeliczania ich na wartości równoważne dla erytrocytów. To podejście zmniejsza ryzyko błędnej interpretacji wyniku i stanowi podstawę dla kolejnych badań nad określeniem matrycowo-swoistych zakresów referencyjnych lub decyzyjnych w monitorowaniu LDMTX. Istotnym aspektem pracy była również ocena stabilności analitów oraz powtarzalności oznaczeń w rzeczywistych warunkach klinicznych. Wykazano, że stabilność MTXPG zależy od rodzaju matrycy oraz długości łańcucha poliglutaminianowego, przy czym większą podatność na degradację obserwowano u dłuższych homologów. Wyniki ponownej analizy próbek klinicznych

(ang. *incurred sample reanalysis*, ISR) mieściły się w zakresie 84–95%, co potwierdziło przydatność metody do analizy próbek klinicznych, ale jednocześnie wskazało na konieczność ścisłego kontrolowania warunków przedanalizacyjnych, szczególnie w kontekście potencjalnego wykorzystania mikropróbek w zdalnym monitorowaniu leczenia. Wyniki tej części dodatkowego osiągnięcia były również prezentowane na zjazdach krajowych i zagranicznych (**KK5**, **KM6**, **KM18**) oraz realizowane częściowo w ramach projektu **MG2**.

Ten obszar mojej aktywności naukowej stanowi rozwinięcie głównego nurtu badań nad pacjentocentrycznymi strategiami terapeutycznego monitorowania przyjmowania leków. W przypadku metotreksatu obejmuje on zarówno klasyczne monitorowanie stężenia w protokołach HDMTX, ukierunkowane na bezpieczeństwo chemioterapii i indywidualizację leczenia ratunkowego, jak i rozwój metod oceny długoterminowej ekspozycji na lek w protokołach LDMTX. Łącznie wyniki tych prac wpisują się w szerszy kierunek personalizacji farmakoterapii, w którym odpowiednio dobrana metoda bioanalityczna, właściwa matryca biologiczna i znajomość ograniczeń przedanalizacyjnych warunkują prawidłową interpretację wyniku oraz jego użyteczność kliniczną.

OD2. Zastosowanie alternatywnych metod mikropróbkowania w ocenie farmakokinetyki klinicznej leków przeciwdrobnoustrojowych u krytycznie chorych pacjentów pediatrycznych

Kolejnym ważnym aspektem mojej działalności naukowej jest stosowanie alternatywnych metod mikropróbkowania w ocenie farmakokinetyki klinicznej leków przeciwdrobnoustrojowych u dzieci w stanie krytycznym. Rozwijam ten obszar głównie w ramach projektu *AntiSepsis*, mającego na celu wspieranie indywidualizacji farmakoterapii przeciwdrobnoustrojowej u pacjentów poddawanych intensywnej terapii (projekt **GP3**). Ten kierunek jest naturalnym rozszerzeniem moich wcześniejszych badań nad technikami mikropróbkowania i metodami LC–MS/MS, koncentrując się na populacji klinicznie szczególnie wrażliwej, u której zmienność farmakokinetyczna leków może być znacząca.

W populacji pediatrycznej, zwłaszcza u noworodków, niemowląt oraz dzieci krytycznie chorych, klasyczne schematy dawkowania leków przeciwdrobnoustrojowych często nie pozwalają na przewidywalne osiągnięcie docelowej ekspozycji terapeutycznej. Wynika to z dynamicznych zmian masy ciała, dojrzewania czynności nerek i wątroby, zmiennej objętości dystrybucji, hipoalbuminemii, zaburzeń perfuzji narządowej, stosowania leczenia wspomagającego oraz zwiększonego klirensu nerkowego. W konsekwencji pacjenci otrzymujący tę samą dawkę, przeliczoną na kilogram masy ciała, mogą osiągać istotnie różne stężenia leku, co zwiększa ryzyko nieskuteczności terapii lub toksyczności [47-48].

W tym obszarze opracowałem i zwalidowałem kilka metod LC–MS/MS do oznaczania antybiotyków, chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych, leków przeciwgrzybiczych

oraz leków przeciwwirusowych (łącznie ponad 40 analizów). Opracowałem również, we współpracy z ośrodkiem w Limoges, protokoły farmakokinetyczne dla tych leków, na których częściowo opiera się część kliniczna badania (rekrutacja pacjentów rozpoczęła się w marcu 2025). Dotychczasowe wyniki badań były prezentowane głównie na zjazdach o charakterze międzynarodowym (**KM13, KM14, KM16, KM23**).

Ze względu na prospektywny charakter badania, opublikowano do tej pory jedną pracę dotyczącą oznaczania cefazoliny metodą LC–MS/MS w trzech istotnych klinicznie matrycach: osoczu, ultrafiltracie osocza oraz mikropróbkach krwi pełnej pobieranych techniką VAMS (praca **P5**). Cefazolina jest jednym z najczęściej stosowanych antybiotyków cefalosporynowych pierwszej generacji w populacji pediatrycznej, szczególnie w profilaktyce okołoperacyjnej oraz leczeniu wybranych zakażeń skóry, tkanek miękkich, kości i stawów. Ze względu na istotne wiązanie z białkami osocza oraz zależność skuteczności od stężenia wolnej frakcji leku, jednoczesna możliwość oznaczania stężenia całkowitego i wolnego ma istotne znaczenie dla interpretacji farmakokinetyczno-farmakodynamicznej [49]. Opracowana metoda została zwalidowana zgodnie z wytycznymi ICH M10 [11]. Walidacja obejmowała ocenę selektywności, liniowości, dokładności, precyzji, efektu przeniesienia, efektu matrycowego, odzysku, stabilności oraz parametrów specyficznych dla techniki VAMS, takich jak wpływ hematokrytu i czasu suszenia próbki. Zakres kalibracyjny metody wynosił 0,5–200 mg/L dla wszystkich analizowanych matryc, a dolna granica oznaczalności wynosiła 0,5 mg/L. Całkowity czas analizy chromatograficznej wynosił 3 minuty, co czyni metodę potencjalnie użyteczną w warunkach rutynowego laboratorium TDM, gdzie szybkość uzyskania wyniku ma znaczenie dla decyzji terapeutycznych. Istotnym elementem pracy było wykazanie, że cefazolina pozostaje stabilna w próbkach VAMS w badanych warunkach przedanalizacyjnych, a zmiany hematokrytu w zakresie klinicznie istotnym nie wpływały istotnie na uzyskiwane wyniki. Potwierdzono również, że czas suszenia próbek VAMS w zakresie od 1 do 24 godzin nie powodował istotnych różnic w oznaczanym stężeniu cefazoliny. Wyniki te mają duże znaczenie praktyczne, ponieważ wskazują na możliwość wykorzystania VAMS nie tylko w badaniach farmakokinetycznych, ale potencjalnie również w zdecentralizowanym modelu pobierania próbek u pacjentów pediatrycznych.

Metoda została następnie zastosowana w pilotażowej grupie pacjentów pediatrycznych otrzymujących cefazolinę w ramach profilaktyki okołoperacyjnej. Próbkę pobierano w określonych punktach czasowych z wykorzystaniem klasycznego pobrania krwi żyłnej oraz jednoczesnego pobrania mikropróbki VAMS. W analizie uwzględniono stężenia cefazoliny w osoczu, ultrafiltracie osocza oraz krwi pełnej pobranej techniką VAMS, co umożliwiło ocenę zarówno stężenia całkowitego jak i wolnej frakcji leku. Wstępne wyniki kliniczne wykazały znaczną zmienność stężenia cefazoliny pomiędzy pacjentami, co potwierdza zasadność dalszych badań nad terapeutycznym monitorowaniem stężenia antybiotyków β -laktamowych u dzieci w stanie krytycznym.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że według dostępnych danych była to pierwsza szeroka walidacja zgodna z ICH M10 metody LC–MS/MS umożliwiającej oznaczanie

cefazoliny w mikropórkach krwi pełnej pobieranych techniką VAMS u krytycznie chorych pacjentów pediatrycznych. Praca ta pokazuje, że możliwe jest połączenie klasycznej oceny stężenia całkowitego w osoczu, oznaczania wolnej frakcji leku w ultrafiltracie oraz małoinwazyjnego pobierania krwi pełnej z wykorzystaniem mikropórkowania objętościowo-absorpcyjnego.

W mojej ocenie rozwijany projekt *AntiSepsis* stanowi istotne rozszerzenie wcześniejszych badań nad mikropórkowaniem i LC–MS/MS w kierunku modelowo wspieranej indywidualizacji farmakoterapii przeciwdrobnoustrojowej u dzieci w stanie krytycznym. Integruje on elementy bioanalizy, farmakokinetyki klinicznej, mikropórkowania oraz nowoczesnych strategii TDM i może stanowić podstawę dalszego rozwoju zdecentralizowanego monitorowania ekspozycji na leki przeciwdrobnoustrojowe w populacji pediatrycznej.

4.10. Literatura

1. Dasgupta A. Introduction to Therapeutic Drug Monitoring: Frequently and Less Frequently Monitored Drugs. W: Dasgupta A., red. *Therapeutic Drug Monitoring: Newer Drugs and Biomarkers*. Boston: Academic Press; 2012. s. 1–29.
2. Saint-Marcoux F. Current Practice of Therapeutic Drug Monitoring: Dose Adjustment of Drugs using Pharmacokinetic Models. W: Dasgupta A., red. *Therapeutic Drug Monitoring: Newer Drugs and Biomarkers*. Boston: Academic Press; 2012. s. 103–119.
3. Seger C., Shipkova M., Christians U., Billaud E.M., Wang P., Holt D.W., Brunet M., Kunicki P.K., Pawiński T., Langman L.J., Marquet P., Oellerich M., Wieland E., Wallemacq P. Assuring the proper analytical performance of measurement procedures for immunosuppressive drug concentrations in clinical practice: recommendations of the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Immunosuppressive Drug Scientific Committee. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2016, tom 38, nr 2, str.: 170–189.
4. Delahaye L., Veenhof H., Koch B.C.P., Alffenaar J.C., Linden R., Stove C. Alternative sampling devices to collect dried blood microsamples: state-of-the-art. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2021, tom 43, nr 3, str.: 310–321.
5. Deprez S., Stove C.P. Dried blood microsampling-assisted therapeutic drug monitoring of immunosuppressants: an overview. *Journal of Chromatography A*, 2023, tom 1689, str.: 463724.
6. Boffel L., Van Mensel A., Pauwels J., Den Hond E., Bessems J., Van Uytvanghe K., Stove C.P. Self-sampling by adolescents at home: Assessment of the feasibility to successfully collect blood microsamples by inexperienced individuals. *AAPS Journal*, 2024, tom 26, str.: 75.
7. Capiou S., Veenhof H., Koster R.A., Bergqvist Y., Boettcher M., Halmingh O., Keevil B.G., Koch B.C.P., Linden R., Pistos C., Stolk L.M., Touw D.J., Stove C.P., Alffenaar J.C. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology guideline: development and validation of dried blood spot-based methods for therapeutic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2019, tom 41, nr 4, str.: 409–430.
8. Boffel L., De Baets H., Heughebaert L., Rispens T., Åsberg A., Shipkova M., de Winter B.C.M., Moes D.J.A.R., de Vries A., Alffenaar J.W.C., Stove C.P. To convert or not to convert? Official International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology guideline: considerations and recommendations for converting capillary blood microsampling concentrations to plasma concentrations. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2025, tom 00, str.: 1–26.
9. Capiou S., Stove C. Hematocrit prediction in volumetric absorptive microsamples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, tom 190, str.: 113491.
10. De Kesel P.M., Capiou S., Lambert W.E., Stove C.P. Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis*. 2014; tom 6(14), str.:1871-4.

11. European Medicines Agency. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022.
12. Protti M., Mandrioli R., Mercolini L. Tutorial: Volumetric absorptive microsampling (VAMS). *Analytica Chimica Acta*, 2019, tom 1046, str.: 32–47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.004>.
13. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Analytical Chemistry*, 2003, tom 75, nr 13, str.: 3019–3030.
14. Avataneo V., D’Avolio A., Cusato J., Cantù M., De Nicolò A. LC-MS application for therapeutic drug monitoring in alternative matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, tom 166, str.: 40–51.
15. Passing H., Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, part I. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1983, tom 21, nr 11, str.: 709–720.
16. Passing H., Bablok W. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, part II. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1984, tom 22, nr 6, str.: 431–445.
17. CLSI, EP09cED. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples. *CLSI guideline EP09c*, 2018, 16-17.
18. Koster R.A. Have we got ‘patient-centric sampling’ right? *Bioanalysis*, 2020, tom 12, nr 13, str.: 869–872.
19. Vethe N.T., Åsberg A., Bergan S., Robertsen I., Midtvedt K. Implementation of volumetric finger-prick self-sampling for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants after kidney transplantation: lessons learned from the practice. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2025, tom 47, str.: 98–104.
20. Lei B.U.W., Prow T.W. A review of microsampling techniques and their social impact. *Biomedical Microdevices*, 2019, tom 21, nr 4, str.: 81.
21. Killian M.O., Little C.W., Mayewski S.E., Brumm S.E., Hirani V. Growth Trajectories of Medication Adherence in Pediatric Organ Transplantation and Their Relationship to Posttransplant Health Outcomes. *Transplantation Direct*, 2026, tom 12, nr 3, str.: 1907.
22. Brunet M., van Gelder T., Åsberg A., Haufroid V., Hesselink D.A., Langman L., Lemaitre F., Marquet P., Seger C., Shipkova M., Vinks A., Wallemacq P., Wieland E., Woillard J.B., Barten M.J., Budde K., Colom H., Dieterlen M.T., Elens L., Johnson-Davis K.L., Kunicki P.K., MacPhee I., Masuda S., Mathew B.S., Millán O., Mizuno T., Moes D.A.R., Monchaud C., Noceti O., Pawiński T., Picard N., van Schaik R., Sommerer C., Vethe N.T., de Winter B., Christians U., Bergan S. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus — Personalized Therapy: Second Consensus Report. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2019, tom 41, nr 3, str.: 261–307.
23. Leino A.D., Takyi-Williams J., Pai M.P. Volumetric absorptive microsampling to enhance the therapeutic drug monitoring of tacrolimus and mycophenolic acid: a systematic review and critical assessment. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2023, tom 45, nr 4, str.: 463–478.
24. Paniagua-González L., Lendoiro E., Otero-Antón E., Molina-Pérez E., Varo-Pérez E., López-Rivadulla M., Cruz A., de-Castro-Ríos A. A Multidrug LC–MS/MS Method for the Determination of Five Immunosuppressants in Oral Fluid. *Bioanalysis*, 2019, tom 11, str.: 1509–1521.
25. Midtvedt K. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplantation Proceedings*, 2004, tom 36, nr 2 Suppl, str.: 430S–433S.
26. Morath C., Arns W., Schwenger V., Mehrabi A., Fonouni H., Schmidt J., Zeier M. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2007, tom 22, Suppl 8, str.: viii61–viii65.
27. Åsberg A., Hansen C.N., Reubsæet L. Determination of ganciclovir in different matrices from solid organ transplanted patients treated with a wide range of concomitant drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, tom 43, str.: 1039–1044.
28. Franck B., Autmizguine J., Marquet P., Ovetchkine P., Woillard J.B. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and therapeutic drug monitoring of valganciclovir and ganciclovir in

- transplantation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2022, tom 112, nr 2, str.: 233–276. <https://doi.org/10.1002/cpt.2431>.
29. Kotton C.N., Kumar D., Caliendo A.M., Huprikar S., Chou S., Danziger-Isakov L., Humar A., The Transplantation Society International CMV Consensus Group. The Third International Consensus Guidelines on the management of Cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*, 2018, tom 102, nr 6, str.: 900–931.
 30. Märtson A.G., Edwina A.E., Burgerhof J.G.M., Berger S.P., de Joode A., Damman K., Verschuuren E.A.M., Blokkzijl H., Bakker M., Span L.F., et al. Ganciclovir therapeutic drug monitoring in transplant recipients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2021, tom 76, str.: 2356–2363.
 31. Märtson A.G., Edwina A.E., Kim H.Y., Knoester M., Touw D.J., Sturkenboom M.G.G., Alffenaar J.C. Therapeutic Drug Monitoring of Ganciclovir: Where Are We? *Therapeutic Drug Monitoring*, 2022, tom 44, str.: 138–147.
 32. Masuda S., Lemaitre F., Barten M.J., Bergan S., Shipkova M., van Gelder T., Vinks A., Wieland E., Bornemann-Kolatzki K., Brunet M., et al. Everolimus Personalized Therapy: Second Consensus Report by the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2025, tom 47, str.: 4–31.
 33. Yoo S., Kim G., Kim S., Ha J., Cho B.S., Joo D.J., Lee J.I. Volumetric absorptive microsampling for the therapeutic drug monitoring of everolimus in patients who have undergone liver transplant. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2023, tom 45, nr 2, str.: 223–228.
 34. Bergan S., Brunet M., Hesselink D.A., Johnson-Davis K.L., Kunicki P.K., Lemaitre F., Marquet P., Molinaro M., Noceti O., Pattanaik S., et al. Personalized Therapy for Mycophenolate: Consensus Report by the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2021, tom 43, nr 2, str.: 150–200.
 35. Alsmadi M.M., Alfarah M.Q., Albderat J., Alsalaita G., AlMardini R., Hamadi S., Al-Ghazawi A., Abu-Duhair O., Idkaidek N. The Development of a Population Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Mycophenolic Mofetil and Mycophenolic Acid in Humans Using Data from Plasma, Saliva, and Kidney Tissue. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2019, tom 40, str.: 325–340.
 36. Cossart A.R., Staatz C.E., Gorham G., Barraclough K.A. Comparison of Free Plasma versus Saliva Mycophenolic Acid Exposure Following Mycophenolate Mofetil Administration in Adult Kidney Transplant Recipients. *Clinical Biochemistry*, 2022, tom 100, str.: 78–81.
 37. Ferreira P.C.L., Thiesen F.V., de Araujo T.T., D'Ávila D.O., Gadonski G., de Oliveira C.S.A., Zimmer A.R. Comparison of Plasma and Oral Fluid Concentrations of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Metabolite by LC–MS in Kidney Transplant Patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2019, tom 75, str.: 553–559.
 38. Shen B., Li S., Zhang Y., Yuan X., Fan Y., Liu Z., Hu Q., Yu C. Determination of Total, Free, and Saliva Mycophenolic Acid with an LC–MS/MS Method: Application to Pharmacokinetic Study in Healthy Volunteers and Renal Transplant Patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, tom 50, str.: 515–521.
 39. Wiesen M.H., Farowski F., Feldkötter M., Hoppe B., Müller C. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantification of Mycophenolic Acid and Its Phenolic Glucuronide in Saliva and Plasma Using a Standardized Saliva Collection Device. *Journal of Chromatography A*, 2012, tom 1241, str.: 52–59.
 40. Deprez S., Van Uytvanghe K., Stove C.P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants and creatinine from a single dried blood spot using the Capitainer® qDBS device. *Analytica Chimica Acta*, 2023, tom 1242, str.: 340797.
 41. Thakare R., Chhonker Y.S., Gautam N., Alamoudi J.A., Alnouti Y. Quantitative analysis of endogenous compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, tom 128, str.: 426–437.
 42. Szpak E., Lewandowski K., Kowalski R., Bogomas-Woźnicka B., Irga-Jaworska N. Therapeutic monitoring of methotrexate in chemotherapy. *Diagnostyka Laboratoryjna*, 2017, tom 53, str. 241–246.
 43. Smolen J.S., Landewé R.B.M., Bergstra S.A., Kerschbaumer A., Sepriano A., Aletaha D., Caporali R., Edwards C.J., Hyrich K.L., Pope J.E., et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2023, tom 82, str. 3–18.

44. Čalasan M.B., den Boer E., de Rotte M.C., Vastert S.J., Kamphuis S., de Jonge R., Wulffraat N.M. Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with lower disease activity in juvenile idiopathic arthritis patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2015, tom 74, str. 402–407.
45. Patel H., Giri P., Ghoghari A., Delvadia P., Syed M., Srinivas N.R. Review of the bioanalytical methods for the determination of methotrexate and its metabolites in in vitro, preclinical and clinical studies: case studies and perspectives. *Biomedical Chromatography*, 2017, tom 31, e3849.
46. Marras C., Monteagudo I., Salvador G., de Toro F.J., Escudero A., Sancho J.J.A., Raya E., Ortiz A., Carmona L., Mestre Y., et al. Identification of patients at risk of non-adherence to oral antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis using the Compliance Questionnaire in Rheumatology: an ARCO sub-study. *Rheumatology International*, 2017, tom 37, str. 1195–1202.
47. Gijssen M., Vlasselaers D., Spriet I., Allegaert K. Pharmacokinetics of antibiotics in pediatric intensive care: fostering variability to attain precision medicine. *Antibiotics*, 2021, tom 10, nr 10, 1182.
48. Hartman S.J.F., Brüggemann R.J., Orriëns L., Dia N., Schreuder M.F., de Wildt S.N. Pharmacokinetics and target attainment of antibiotics in critically ill children: a systematic review of current literature. *Clinical Pharmacokinetics*, 2020, tom 59, nr 2, str. 173–205.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

5.1. Prace realizowane w ramach zatrudnienia Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

W ramach pracy jako farmaceuta w Pracowni Terapii Monitorowanej, Farmakokinetyki Klinicznej i Toksykologii Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie (w opisach przyjęto skrót IP-CZD), biorę udział w realizacji następujących prac badawczych:

- Jestem kierownikiem części farmakokinetycznej projektu *AntiSepsis (GP3)* finansowanego przez Agencję Badań Medycznych na lata 2024-2030 (kierownik projektu: dr n. med. Małgorzata Mikaszewska-Sokolewicz). Jestem współautorem koncepcji i protokołu badania, brałem aktywny udział w konstruowaniu wniosku o przyznanie dofinansowania, opracowałem metody analityczne LC–MS/MS oraz protokoły farmakokinetyczne dla ponad 40 leków przeciwdrobnoustrojowych (oznaczanych również w mikropróbkach) stosowanych parenteralnie w oddziałach intensywnej terapii IP-CZD. Na ten moment zrekrutowano około 25% zaplanowanej liczby (5000) pacjentów w badaniu. Badanie ma charakter prospektywny, a uzyskiwane wyniki są na bieżąco prezentowane na zjazdach międzynarodowych (**KM13, KM14, KM16, KM23**) oraz publikowane (**P5**). Wyniki uzyskane w pierwszym roku realizacji części klinicznej badania zostały zaprezentowane również podczas **posiedzenia klinicznego** dla lekarzy i personelu medycznego IP-CZD (03.02.2026 r.). W tym roku kalendarzowym planowane jest opublikowanie kolejnych dwóch oryginalnych prac na podstawie uzyskanych wyników z badania, jak również wygłoszenie doniesienia ustnego nt. walidacji nowej metody oznaczania wankomycyny i teikoplaniny w próbkach VAMS w celu oceny farmakokinetyki – na zjeździe IATDMCT we wrześniu 2026 w Rennes, we Francji.

- Współprowadziłem prace z zakresu oceny *adherence* u pacjentów po przeszczepieniu nerki metodami: pomiaru stężenia leków, oceny *adherence* za pomocą kwestionariuszy oraz aplikacji mobilnej (współpraca ze *start-upem WisePatient*) – obserwacja roczna w dwóch podgrupach– wyniki badań były prezentowane podczas wykładów **WZ5**, **WZ6** oraz **WZ8**, jak również podczas **posiedzenia klinicznego** dla lekarzy i personelu medycznego IP-CZD (09.04.2024 r.). Szersze wyniki badania obserwacyjnego w dwóch kohortach pacjentów pozostają obecnie w opracowaniu – planowane jest opublikowanie manuskryptu w II połowie 2026 roku.
- Jestem głównym wykonawcą grantu wewnętrznego w IP-CZD, finansowanego z subwencji MNiSW (kierownik: dr n. med. Jacek Rubik). Projekt dotyczy monitorowania leczenia immunosupresyjnego (schemat terapeutyczny: takrolimus + mykofenolan mofetylu) w oparciu o oznaczenia skróconego i pełnego profilu farmakokinetycznego w warunkach szpitalnych i domowych za pomocą techniki VAMS-Mitra™ (**GP2**). W tym projekcie włączono już 45 pacjentów (100% zakładanej liczby), a zakończenie obserwacji pacjentów planowane jest na czerwiec 2026. Opracowałem metodykę laboratoryjną i farmakokinetyczną w tym badaniu. Pilotażowe wyniki badań były prezentowane podczas wykładów **WZ5**, **WZ6** oraz **WZ8**, jak również na międzynarodowych zjazdach – **KM9** i **KM12**.
- Jestem kierownikiem grantu wewnętrznego w IP-CZD, finansowanego z subwencji MNiSW – projekt VAMS-LTx. Projekt polega na opracowaniu strategii przewlekłego monitorowania leczenia immunosupresyjnego (zarówno oznaczenia parametru C_0 , jak i całkowitego AUC) u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu wątroby leczonych w IP-CZD, w oparciu o techniki mikropróbkowania (**GP6**). Wyniki badań dotyczących reoptymalizacji metody oznaczania leków immunosupresyjnych w oparciu o technikę *QuEChERS* prezentowano podczas międzynarodowego zjazdu **KM22**. Kolejne wyniki zostaną zaprezentowane podczas kongresu IATDMCT w Rennes we Francji we wrześniu 2026 roku.
- Jestem głównym wykonawcą grantu wewnętrznego w IP-CZD, finansowanego z subwencji MNiSW (kierownik: prof. dr hab. Justyna Czech-Kowalska). Projekt dotyczy farmakokinetyki walgancyklowiru u noworodków z cytomegalią wrodzoną, w oparciu o dane kliniczne oraz pełny profil farmakokinetyczny w warunkach szpitalnych za pomocą techniki VAMS-Mitra™ (projekt: MICROGANC (**GP7**)). W projekcie jestem odpowiedzialny za oznaczenia stężenia gancyklowiru w mikropróbkach, obliczenia farmakokinetyczne oraz korektę dawki leku. Opracowałem strategię ograniczonej liczby próbek (ang. limited sampling strategy, LSS), co obniżyło liczbę pobieranych mikropróbek z 5 do 3. Obecnie trwa weryfikacja równań LSS w grupie weryfikacyjnej pacjentów. Pilotażowe wyniki badań były prezentowane na krajowych i międzynarodowych zjazdach – **KK7**, **KM17**, **KM19**, **KM26**.
- Jestem wykonawcą grantu wewnętrznego *MicroAntiPain* w IP-CZD (**GP9**), finansowanego z subwencji MNiSW (kierownik: mgr Agnieszka Czajkowska, opiekun: prof. dr hab. Dariusz Gruszczyński) – projekt dotyczy monitorowania leczenia

analgosedacyjnego deksmedetomidyną i ketaminą u noworodków w oparciu o technikę VAMS-Mitra™. Brałem udział w opracowaniu metodyki laboratoryjnej i farmakokinetycznej w tym badaniu. Obecnie rozpoczęto rekrutację pacjentów do badania. Pilotażowe wyniki badań były prezentowane na międzynarodowych zjazdach – **KM24** i **KM25**.

- Jestem wykonawcą grantu wewnętrznego *WilsonREC* w IP-CZD (**GP8**), finansowanego z subwencji MNiSW (kierownik: prof. dr hab. Piotr Socha). W badaniu pozostaję współodpowiedzialny za opracowanie metodyki oznaczenia względnej wymiennej miedzi (ang. *relative exchangeable copper*, REC) oraz wymiennej miedzi (ang. *exchangeable copper*) w diagnostyce i monitorowaniu leczenia choroby Wilsona metodą ICP-MS, a także stężenia D-penicylaminy w osoczu metodą LC-MS/MS.
- Jestem wykonawcą grantu wewnętrznego *MICRO-NEPH* w IP-CZD (**GP10**) finansowanego z subwencji MNiSW (kierownik: prof. dr hab. Mieczysław Litwin). W badaniu będę odpowiedzialny za opracowanie metodyki obliczeń farmakokinetycznych całkowitego AUC na podstawie oznaczeń stężenia kwasu mykofenolowego w mikropróbkach pobranych od pacjentów pediatrycznych z zespołem nerczycowym. MPA i jego metabolit będą oznaczane w mikropróbkach VAMS-Mitra™ metodą zwalidowaną przeze mnie podczas realizacji pracy doktorskiej (publikacja **D6**). W chwili obecnej trwają przygotowania do rozpoczęcia włączania pacjentów do badania.
- Biorę udział w prowadzeniu badań z zakresu dystrybucji sirolimusu w układzie nerwowym – opracowałem metodę LC-MS/MS do oznaczania tego leku w płynie mózgowo-rdzeniowym. Badania próbek klinicznych pacjentów z projektów *RaRE-TS* oraz *ViRap* są planowane na II połowę 2026 roku.

5.2. Staże naukowe i wizyty studyjne za granicą

Po obronie pracy doktorskiej odbyłem następujące staże naukowe (łącznie 4 tygodnie, tj. 1 miesiąc):

- INSERM unit 1248, University of Limoges, Department of pharmacology-toxicology, University Hospital, Limoges, Francja (prof. Pierre Marquet, prof. Jean-Baptiste Woillard) – **dwutygodniowy pobyt naukowy** w zakresie terapii monitorowanej i farmakokinetyki populacyjnej (6-19 stycznia 2025 r.). W trakcie tego pobytu stażowego zapoznałem się m.in. z zastosowaniem ekstrakcyjnej techniki QuEChERS w TDM, jak również pakietu R do wykonywania obliczeń farmakokinetycznych. Doświadczenia te zostały zastosowane podczas przygotowania prac **H5** i **H6**.
- Department of Pharmacy, Group of Clinical Pharmacometrics, Erasmus MC, Rotterdam, Holandia (prof. Birgit C. P. Koch) - **dwutygodniowy pobyt naukowy** w zakresie metod analitycznych w terapii monitorowanej farmacji klinicznej i farmakokinetyki populacyjnej (10-23 lutego 2025 r.). W trakcie pobytu stażowego w Erasmus MC zapoznałem się m.in. z zastosowaniem techniki IR do oceny poziomu hematokrytu w mikropróbce, a co za tym idzie, do oszacowania

liczby czerwonych krwinek w pobranej próbce. Doświadczenia te zostały przeniesione na techniki mikropróbkowania, szczególnie w oznaczeniu stężenia tiopuryn (które standaryzowane jest w liczbie RBC) podczas terapii azatiopryną (publikacja **P8***).

5.3. Współpraca w kraju i za granicą

W ramach działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora, nawiązałem następujące współprace z jednostkami klinicznymi i badawczymi z kraju i zza granicy:

- Klinika Wczesnego Zapalenia Stawów, Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher (prof. dr hab. n. med. Brygida Kwiatkowska, lek. Marek Kajfasz) – w zakresie badań nad zastosowaniem technik mikropróbkowania w oznaczeniu metabolitów metotreksatu i jego dystrybucją (publikacja **P7**, doniesienia konferencyjne **KK5**, **KM18**),
- Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (dr hab. n. farm. Joanna Sobiak) – w zakresie oznaczeń kwasu mykofenolowego i jego metabolitu w ślinie (praca **H6**),
- Laboratorium Toksykologii Środowiskowej, Centrum Laboratoryjne Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie (mgr Maciej Sierakowski) – w zakresie opracowania nowych metod LC–MS/MS (prace **H1**, **H2**, **P4**),
- Laboratorium LabExperts i firma Bioanalytic (dr Rafał Szewczyk, mgr Karina Izdebska, mgr Maciej Stopa) – w zakresie zastosowania nowych metod ekstrakcji (QuEChERS) leków immunosupresyjnych z pełnej krwi oraz w zakresie zastosowania komercyjnego zestawu IVDR do oznaczeń leków immunosupresyjnych w mikropróbkach Mitra™ VAMS (doniesienia konferencyjne **KM9**, **KM22**),
- INSERM unit 1248, University of Limoges, Department of pharmacology-toxicology, University Hospital, Limoges, Francja (prof. Pierre Marquet, prof. Jean-Baptiste Woillard) – w zakresie opracowania protokołów oraz modeli farmakokinetycznych w projekcie *AntiSepsis* (projekt **GP3**),
- Department of Pharmacology, Precision Pharmacotherapy Group, Oslo University Hospital, Norwegia (prof. Nils Tore Vethe) – w zakresie opracowania referencyjnej metodyki oznaczania busulfanu (projekt **GP11**),
- Clinical Pharmacology & Toxicology & General Biochemistry, St Vincent's Hospital, Sydney, Australia (dr Danijela Kocic) – w zakresie kierowania pracami naukowymi komitetu analitycznego IATDMCT oraz współpracy z zespołami rekomendacyjnymi dot. mikrosamplingu (kierujący: dr hab. Tomasz Pawiński/dr Arkadiusz Kocur) oraz dot. analitycznych aspektów oznaczania wolnych frakcji antybiotyków (kierująca zespołem: prof. Veronique Stove),
- Start-up SampleFacts AB/University of Uppsala, Szwecja (dr Frida Ekholm) – w zakresie opracowania metody oznaczania leków immunosupresyjnych

i klinicznego zastosowania nowego urządzenia do pobierania mikropróbek (InstaSep™) – pierwsze wyniki współpracy zostaną zaprezentowane podczas kongresu IATDMCT 2026,

- Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton, Kanada (dr Josko Ivica) – w zakresie terapii monitorowanej lewetiracetamu; praca zostanie opublikowana w czasopiśmie *Clinical Biochemistry* (na zaproszenie redakcji, prawdopodobnie w IV kwartale 2026).

5.4. Współpraca w obrębie jednostek naukowych i klinicznych IP-CZD

Po doktoracie, w ramach zatrudnienia w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie w ramach badań naukowych, nawiązałem następujące współpracy:

- Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii (dr n. med. Małgorzata Mikaszewska-Sokolewicz) – w ramach projektu *AntiSepsis* (projekt **GP3**),
- Klinika Chirurgii Dziecięcej i Transplantacji Narządów (dr hab. n. med. Małgorzata Markiewicz-Kijewska, prof. IPCZD) – w ramach projektu **GP6**,
- Klinika Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii (prof. dr hab. n. med. Piotr Socha, prof. dr hab. n. med. Irena Jankowska) – w ramach projektów **GP8**, **GP6**.
- Klinika Neonatologii, Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka i Niemowlęcia (prof. dr hab. n. med. Justyna Czech-Kowalska, prof. dr hab. n. med. Dariusz Gruszfeld) – w ramach projektów *MICROGANC* (projekt **GP7**) oraz *MicroAntiPain* (projekt **GP9**); wspólne doniesienia konferencyjne: **KK7**, **KM17**, **KM19**, **KM26** oraz **KM24** i **KM25**.
- Klinika Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego (prof. dr hab. n. med. Mieczysław Litwin) – w ramach projektu *MICRO-NEPH* (projekt **GP11**)
- Poradnia Transplantacji Nerek (dr n. med. Jacek Rubik) – w ramach publikacji **H1-H4**, **H6**, **P8***, **P9***; projektów: **GP1**, **GP2**, **GP4** oraz doniesień konferencyjnych: **KM4**, **KM8**, **KM12**
- Klinika Neurologii i Epileptologii (prof. dr hab. n. med. Katarzyna Kotulska-Jóźwiak) – w ramach projektów *ViRap* oraz *RaRE-TS*.

5.5. Współpraca w obrębie jednostek naukowych i szpitali podległych WUM

Po doktoracie, w ramach zatrudnienia w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, w ramach badań naukowych, nawiązałem następujące współpracy z:

- Kliniką Transplantologii, Immunologii, Nefrologii i Chorób Wewnętrznych (prof. dr hab. n. med. Magdalena Durlik, dr hab. Teresa Bączkowska, dr n. med. Olga Rostkowska, lek. Dorota Miszewska-Szyszkowska) – w zakresie zastosowania technik mikropróbkiowania w monitorowaniu leczenia immunosupresyjnego u pacjentów dorosłych po przeszczepieniach narządów litych; wspólne prace **H5** i **H7**,
- Katedrą i Kliniką Onkologii, Hematologii Dziecięcej, Transplantologii Klinicznej, Pediatrii i Chorób Rzadkich (prof. dr hab. n. med. Paweł Łaguna, prof. dr hab. n.

med. Iwona Malinowska, lek. Aleksandra Minkowska) – w zakresie zastosowania technik mikropróbkowania i metod farmakokinetycznych w terapeutycznym monitorowaniu busulfanu oraz innych leków stosowanych w leczeniu kondycjonującym przed przeszczepieniem krwiotwórczych komórek macierzystych; wspólny projekt **GP11**.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Realizowane obowiązki dydaktyczne

- Począwszy od roku akademickiego 2021/2022 prowadzę zajęcia seminaryjne i ćwiczenia laboratoryjne w ramach kursu *Chemia leków* dla studentów III roku kierunku farmacja (semestry 5. i 6.) na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
- Począwszy od roku akademickiego 2022/2023 prowadzę wykład *Podstawy chemicznego nazewnictwa leków* w ramach kursu *Chemia leków* dla studentów III roku kierunku farmacja (semestr 5.) na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
- Począwszy od roku akademickiego 2021/2022 jestem egzaminatorem w ramach egzaminów praktycznych przeprowadzanych po zakończeniu kursu *Chemia leków* dla studentów III roku kierunku farmacja (semestr 6.) na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
- Począwszy od roku akademickiego 2023/2024 prowadzę seminaria: *Terapeutyczne monitorowanie stężeniem leków w pediatrii na przykładzie leków przeciwdrobnoustrojowych oraz Alternatywne strategie pobierania próbek w terapeutycznym monitorowaniu leków*, w ramach kursu *Terapia Monitorowana* dla studentów IV roku kierunku farmacja (Fakultatywny Blok Programowy – Farmacja Analityczna, semestr 8.) na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
- Począwszy od roku akademickiego 2023/2024 prowadzę *Ćwiczenia specjalistyczne z metodologią badań*, w ramach których realizowane są prace magisterskie studentów V roku kierunku farmacja.
- Począwszy od roku akademickiego 2023/2024 byłem/jestem bezpośrednim opiekunem pięciu prac magisterskich studentów kierunku farmacja (2023/24– 1 praca, 2024/25– 2 prace, 2025/26– 2 prace). Prace te są tematycznie powiązane z prowadzoną przeze mnie działalnością naukową. Jedną z tych prac, *Personalizacja leczenia sirolimusem u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki– opracowanie i walidacja referencyjnej metody analitycznej w oparciu o technikę LC–MS/MS* (autor: mgr farm. Kamila Przydatek (Rębis)), zdobyła IV miejsce w Konkursie Prac Magisterskich organizowanym na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w marcu 2025 roku.
- W roku akademickim 2024/2025 wykonałem dwie recenzje prac magisterskich studentów z kierunku farmacja.

- Od roku 2021/2022 realizuję prace badawcze z studentami będącymi członkami Koła Naukowego *Lek* przy Zakładzie Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W latach 2024–2025 pod moją bezpośrednią opieką członkowie koła realizowali 3 mini-granty studenckie **MG1–MG3**. Czwarty grant **MG4** pozostaje obecnie w ocenie merytorycznej.
- Od roku akademickiego 2023/2024 prowadzę seminarium *Podstawy terapii monitorowanej stężeniem leku we krwi w transplantologii* w ramach kursu Transplantologia dla studentów V roku kierunku lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie.
- W latach 2024/2025 oraz 2025/2026 prowadziłem zajęcia z przedmiotów *Farmakologia z toksykologią* oraz *Farmakologia i toksykologia kliniczna* dla studentów kierunku ratownictwo medyczne (tryb niestacjonarny) Collegium Medicum Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.
- Byłem bezpośrednim opiekunem wolontariatu dwóch studentów kierunku farmacja, realizowanego w Pracowni Terapii Monitorowanej, Farmakokinetyki Klinicznej i Toksykologii Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie (01.01.2024 – 30.06.2024).
- Prowadzę szkolenia z zakresu terapii monitorowanej i farmakokinetyki klinicznej dla diagnostów laboratoryjnych i farmaceutów klinicznych w Pracowni Terapii Monitorowanej, Farmakokinetyki Klinicznej i Toksykologii Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” (łącznie 4 osoby w 2025 roku, z ośrodków w Krakowie i Opolu).
- Jestem opiekunem prac naukowych prowadzonych przez Pana Mateusza Moczulskiego (studenta kierunku farmacja) w latach akademickich 2024/2025 oraz 2025/2026 w trybie Indywidualnej Organizacji Studiów.
- Jestem współautorem dwóch skryptów dydaktycznych zatwierdzonych do kształcenia studentów w ramach kursu z *Chemii leków* (kierunek farmacja):
 - *Oznaczanie ilościowe substancji leczniczych z zastosowaniem analizy miareczkowej w preparatach jednoskładnikowych w postaci tabletek, drażetek i kapsulek*, pod red. Tomasza Pawińskiego (Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2023 – ukazał się po obronie mojej pracy doktorskiej)
 - *Oznaczanie substancji leczniczych w preparatach wieloskładnikowych*, pod red. Tomasza Pawińskiego (Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2024)

6.2. Prowadzone szkolenia w ramach kształcenia podyplomowego

Jestem wykładowcą z zakresu terapii monitorowanej i toksykologii w kursach prowadzonych w trybie podyplomowym:

- Specjalizacja: *farmacja szpitalna*, Centrum Kształcenia Podyplomowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego; wykłady i ćwiczenia: *Teoretyczne podstawy farmakokinetyki, biofarmacji i terapii monitorowanej, niezbędne w codziennej praktyce farmaceuty szpitalnego, oraz Farmakokinetyka kliniczna*

i optymalizacja farmakoterapii na przykładzie leków przeciwdrobnoustrojowych – praktyczne omówienie przypadków klinicznych (od 12.2025).

- Kurs podyplomowy z zakresu terapii monitorowanej, Centrum Studiów Podyplomowych i Kształcenia Ustawicznego, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu (program FERS) – wykład *Metody analityczne stosowane w TDM* (od 05.2026).

6.3. Działalność organizacyjna

- Byłem członkiem komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji *Interdisciplinary Conference on Drug Sciences (ACCORD 2024)* w Warszawie, 23–25 maja 2024 r.
- Byłem członkiem komitetu naukowego konferencji *Postępy w anestezjologii i intensywnej terapii dorosłych i dzieci – forum ekspertów i rezydentów*, Warszawa, 14–15 maja 2024 r.
- Od roku akademickiego 2024/2024 jestem członkiem Komisji Rady Dyscyplin Nauk Farmaceutycznych ds. Grantów Wewnętrznych, w ramach, których biorę udział w ocenie mini-grantów studenckich finansowanych przez Warszawski Uniwersytet Medyczny.

6.4. Działalność popularyzatorska

- W roku 2024 wygłosiłem wykład popularnonaukowy dotyczący projektu *AntiSepsis* w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie dla uczniów klas II i III Niepublicznego Liceum Ogólnokształcącego im. Janusza Korczaka w Warszawie.
- W latach 2023, 2024 oraz 2025 przeprowadziłem zajęcia dla uczniów klas maturalnych (profil biologiczno-chemiczny) XLIV Liceum Ogólnokształcącego im. Stefana Banacha w Warszawie z zakresu metod spektroskopowych: *Maturalnie o spektroskopii NMR, IR, UV/VIS i MS, czyli jak przeczytać widmo?*
- W styczniu 2026 roku wygłosiłem wykład: *„Alternatywne strategie pobierania próbek w terapii monitorowanej stężeniem leku – od wyzwań analitycznych do praktyki klinicznej”* w ramach Seminariów Nauk Farmaceutycznych organizowanych na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
- Jestem współautorem artykułu *„Trajan’s Mitra tech takes gentler blood testing mainstream”*, który ukazał się w czasopiśmie *The Australian*. W nim podzieliłem się doświadczeniami klinicznymi dotyczącymi zastosowania technik mikropróbkiowania.

6.5. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Jestem członkiem następujących organizacji i towarzystw naukowych:

- *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IATDMCT, członek komitetów: Anti-Infective Drugs, Immunosuppressive Drugs, Analytical)* Od grudnia 2025 roku pełnię funkcję **wiceprzewodniczącego (Vice-Chair)** Komitetu Analitycznego IATDMCT, a od września 2027 roku obejmę stanowisko **przewodniczącego** tego komitetu (*Chair-Elect*).
- *American Society for Mass Spectrometry (ASMS)*
- *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID, członek PK/PD of Anti-Infectives Study Group)*
- *Polskie Towarzystwo Farmacji Klinicznej (PTFK, członek sekcji TDM)*

6.6. Nadzór nad realizowanymi (lub planowanymi) pracami doktorskimi

- **[SD1]** Jestem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej lek. Aleksandry Minkowskiej (*Farmakokinetyczno-farmakogenetyczne podstawy indywidualizacji dawkowania busulfanu z uwzględnieniem monitorowania stężeń leku u dzieci poddawanych kondycjonowaniu przed przeszczepieniem hematopoetycznych komórek krwiotwórczych*); praca realizowana w Katedrze i Klinice Onkologii, Hematologii Dziecięcej, Transplantologii Klinicznej, Pediatrii i Chorób Rzadkich Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – planowane wszczęcie przewodu doktorskiego w roku 2027 (tryb eksternistyczny).
- **[SD2]** Jestem planowanym promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr farm. Pauliny Michalczuk (*Alternatywne metody monitorowania leczenia przeciwwgrzybiczego u pacjentów pediatrycznych leczonych hematoonkologicznie*); praca realizowana będzie w Zakładzie Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – planowane rozpoczęcie realizacji projektu doktorskiego: październik 2026 (Szkoła Doktorska).

7. Inne niż wymienione w pkt. 1-7 informacje dotyczące kariery zawodowej

7.1. Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne – wykaz publikacji

[D1] Pawłowska A., Kocur A., Siudem P.[✉], Paradowska K. Badanie stabilności oleju lnianego i oleju z czarnuszki. *Postępy Fitoterapii*, 2018, tom 19, nr 3, 157–163. <https://doi.org/10.25121/PF.2018.19.3.157>.

[D2] Kocur A.[✉], Marszałek D., Pawiński T. Zastosowanie metod analitycznych w oznaczaniu aktywności dehydrogenazy inozynomonofosforanowej (IMPDH) podczas terapii immunosupresyjnej. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*, 2020, tom 5, 40–49.

[D3] Kocur A., Kunicki P.K., Pawiński T.[✉] Generic Medicinal Products in Immunosuppressive Therapy—Should It Be a Challenge for Therapeutic Drug Monitoring? *Therapeutic Drug Monitoring*, 2023, tom 45, nr 2, 173–190. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000001041>.

[D4] Kocur A., Pawiński T. [✉] Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, tom 24, nr 1, 681. <https://doi.org/10.3390/ijms24010681>.

[D5] Kocur A. [✉], Marszałek D., Rubik J., Czajkowska A., Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC–MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application. *Pharmaceutics*, 2023, tom 15, nr 1, 299. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010299>.

[D6] Kocur A. [✉], Rubik J., Czarnowski P., Czajkowska A., Marszałek D., Sierakowski M., Górka M., Pawiński T. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid (MPA) using volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients: ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method development, cross-validation, and clinical application. *Pharmacological Reports*, 2023, tom 75, 1026–1042. <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00509-w>.

7.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego– wykaz publikacji

[P1] Mikulska A., Kocur A. [✉] Pharmacotherapy with High Doses of Methotrexate (HDMTX) in Oncology – How Should Chemotherapy Be Conducted Based on Therapeutic Drug Monitoring? *Prospects in Pharmaceutical Sciences*, 2023, tom 21, nr 4, 40–47. <https://doi.org/10.56782/pps.167>.

[P2] Kot B., Moczulski M., Czajkowska A., Kocur A. [✉] Pharmacotherapy of Apnea in the Premature Neonatological Subpopulation – Therapeutic Opportunities, Pharmacokinetic Implications and Recommendations for Therapeutic Drug Monitoring. *Prospects in Pharmaceutical Sciences*, 2024, tom 22, nr 2, 30–38. <https://doi.org/10.56782/pps.186>.

[P3] Kocur A. [✉], Mikulska A., Moczulski M., Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Low Methotrexate Doses for Drug Exposure and Adherence Assessment—Pre-Analytical Variables, Bioanalytical Issues, and Current Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, tom 25, nr 24, 13430. <https://doi.org/10.3390/ijms252413430>.

[P4] Czajkowska A., Mikulska A., Poniewierska M., Suchan A., Sierakowski M., Pawiński T., Kocur A. [✉] Novel LC–MS/MS method for measuring methotrexate in high-dose therapy: a comparative study with commercial EMIT and EIA immunoassays. *Pharmacological Reports*, 2026, tom 78, 327–340. <https://doi.org/10.1007/s43440-025-00807-5>.

[P5] Kocur A. [✉], Czajkowska A., Moczulski M., Częczek A., Mikaszewska-Sokolewicz M. Rapid, robust LC–MS/MS quantification of cefazolin in whole blood microsamples, plasma, and plasma ultrafiltrate: Analytical method validation and

preliminary clinical application in pediatric population. *Clinica Chimica Acta*, 2026, tom 582, 120808.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2025.120808>.

[P6] Kutty A., Kocur A.✉, Molasy B., Wrzosek M.✉ S-Adenosylmethionine (SAM) and S-Adenosylhomocysteine (SAH) Monitoring Using Analytical Methods in Clinical Laboratory Practice: Where Are We? *Biomedicines*, 2026, tom 14, nr 3, 632.

<https://doi.org/10.3390/biomedicines14030632>.

[P7] Kocur A.✉, Kajfasz M., Mikulska A., Michalczuk P., Kwiatkowska B., Pawiński T. Multi-Matrix LC–MS/MS Validation of Methotrexate Polyglutamates: Comparison of VAMS, DBS, and Conventional Blood Sampling in Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2026, tom 27, 4429.

[P8*] Kocur A.✉, Moczulski M., Czajkowska A., Pondel I., Górka M., Rubik J. Rapid LC–MS/MS quantification of thiopurine metabolites in whole blood, red blood cells, and two volumetric dried blood microsampling devices: Analytical validation and clinical application in pediatric renal transplant recipients. *Talanta*, **manuskrypt w recenzji na dzień 01.06.2026**

[P9*] Kocur A.✉, Czajkowska A., Rubik J. Plasma-First Microfluidic Microsampling Improves Agreement with Plasma Compared to Whole-Blood Sampling: Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Case. *Journal of Chromatography B*, **manuskrypt zaakceptowany do publikacji na dzień 01.06.2026**

7.3. Działalność kliniczna

- W ramach działalności klinicznej w Pracowni Terapii Monitorowanej, Farmakokinetyki Klinicznej i Toksykologii Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” prowadzę konsultacje dla pacjentów leczonych w Instytucie (jak również pacjentów ośrodków zewnętrznych zlecających realizację badań TDM w Instytucie) w zakresie terapii monitorowanej i farmakokinetyki klinicznej (indywidualizowane dostosowanie dawkowania leków).
- Dodatkowo konsultuję pacjentów Pododdziału Transplantacji Szpiku w Katedrze i Klinice Onkologii, Hematologii Dziecięcej, Transplantologii Klinicznej, Pediatrii i Chorób Rzadkich Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w zakresie farmakokinetyki klinicznej leków (szczególnie busulfanu) podawanych w trakcie kondycjonowania przed przeszczepieniem krwiotwórczych komórek macierzystych.
- Byłem jednym z wykładowców podczas posiedzenia klinicznego w Instytucie „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”: *Zastosowanie techniki mikropróbkiowania i alternatywnych matryc biologicznych w terapii monitorowanej leków o wąskim przedziale terapeutycznych stężeń w populacji pediatrycznej*, 09.04.2024 r.
- Byłem jednym z wykładowców podczas posiedzenia klinicznego w Instytucie „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”: *Optymalizacja terapii przeciwdrobnoustrojowej w oparciu o założenia farmakokinetyki klinicznej w intensywnej terapii dziecięcej: Perspektywa projektu AntiSepsis*, 03.02.2026 r.
- Wygłosiłem wykład dla lekarzy Katedry i Kliniki Onkologii, Hematologii Dziecięcej, Transplantologii Klinicznej, Pediatrii i Chorób Rzadkich

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego: *Terapia monitorowana w hematoonkologii dziecięcej*, 13.02.2026 r.

7.4. Uczestnictwo w kongresach, zjazdach i konferencjach

- **Wykłady i referaty ogłoszone na zaproszenie po uzyskaniu stopnia doktora:**
 - [WZ1] *Czy jesteśmy w stanie śledzić losy leku w organizmie? Postępy w anestezjologii i intensywnej terapii dorosłych i dzieci – forum ekspertów i rezydentów*, Warszawa, 14–15 maja 2024 r.
 - [WZ2] *Terapeutyczne monitorowanie stężeniem leków immunosupresyjnych z wykorzystaniem technik mikrosamplingu - od podstaw analityczno-diagnostycznych do praktyki klinicznej*. Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Medycyna Laboratoryjna 2024”, Mszczonów, 10-12 czerwca 2024 r.
 - [WZ3] *Terapeutyczne monitorowanie leków o krytycznym przedziale dawkowania w praktyce szpitala pediatrycznego – czy warto stosować metody chromatograficzne typu ready-to-use? Spotkanie użytkowników produktów firmy Chromsystems*, Łódź, 26 września 2024 r.
 - [WZ4] *Czy połączenie metod Chromsystems z platformą analityczną AB Sciex i techniką mikropróbkowania Mitra™, gwarantuje sukces w codziennej praktyce laboratorium TDM? Spotkanie użytkowników spektrometrów mas firmy SCIEX*, Łódź, 23-24 października 2024 r.
 - [WZ5] *Optymalizacja terapeutycznego monitorowania stężeniem leków immunosupresyjnych u pacjentów po przeszczepach narządowych z użyciem mikropróbkowania objętościowo-absorpcyjnego (VAMS) – zastosowanie kliniczne – szanse i zagrożenia*. 13. Symposium „Postępy w immunosupresji w przeszczepianiu narządów unaczynionych” Kraków, 13-14 grudnia 2024 r.
 - [WZ6] *Więcej niż wynik – czyli o współpracy pomiędzy diagnostą laboratoryjnym a farmaceutą klinicznym w zakresie terapeutycznego monitorowania leków*. Majowe Spotkania z Medycyną Laboratoryjną – w Roku Edukacji Zdrowotnej i Profilaktyki, Krynica, 8–9 maja 2025 r.
 - [WZ7] *Volumetric absorptive microsampling (VAMS): a novel tool for TDM in pediatric transplant recipients – lights and shadows*. Transplant Child Webinars, European Reference Networks, online, 9 września 2025 r.
 - [WZ8] *Nowe metody oceny stężenia leków immunosupresyjnych*. Konferencja „Postępy w nefrologii, dializoterapii i transplatacji nerek u dzieci”, Warszawa, 17 listopada 2025 r.
 - [WZ9] *TDM jako narzędzie wspierające terapię spersonalizowaną – doświadczenia kliniczne i laboratoryjne*. Seminarium naukowo-szkoleniowe „Technologia przyszłości w diagnostyce laboratoryjnej”, Kraków, 6 marca 2026 r.

- **[WZ10]** *Farmakokinetyka przy łóżku pacjenta – praktyczne zastosowanie TDM – warsztaty*. I Ogólnopolska Studencka Konferencja Farmacji Klinicznej, Poznań, 30 maja 2026 r.
- Uczestniczyłem w panelu dyskusyjnym „*Czułość to nie wszystko*” jako ekspert. Spotkanie użytkowników spektrometrów mas firmy SCIEX, Łódź, 23-24 października 2024 r.
- Na zaproszenie organizatorów międzynarodowej konferencji *21st Warsaw International Medical Congress– WIMC 2026* objąłem patronatem naukowym sesję *Pharmacy Session* (jako wiceprzewodniczący Komitetu Analitycznego Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Monitorowanej i Toksykologii Klinicznej), Warszawa, 17–19 kwietnia 2026 r.
- **Udział w konferencjach o zasięgu krajowym po uzyskaniu stopnia doktora** (autor prezentujący został zaznaczony podkreśleniem):
 - **[KK1]** B. Kot, M. Moczulski, **A. Kocur**, A. Czajkowska, T. Pawiński. *Terapeutyczne monitorowanie stężeniem cyklosporyny we krwi w oparciu o technikę LC–MS/MS u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki*. „II Ogólnopolskie Forum Młodych— Aktualne kierunki badań w naukach farmaceutycznych”, Lublin, 15 marca 2024 r. (wystąpienie ustne)
 - **[KK2]** A. Mikulska, **A. Kocur**, A. Czajkowska, T. Pawiński. *Opracowanie i walidacja nowej metody oznaczania stężenia metotreksatu w osoczu krwi pacjentów pediatrycznych leczonych onkologicznie*. „II Ogólnopolskie Forum Młodych— Aktualne kierunki badań w naukach farmaceutycznych”, Lublin, 15 marca 2024 r. (wystąpienie ustne)
 - **[KK3]** M. Moczulski, B. Kot, **A. Kocur**, A. Czajkowska, T. Pawiński. *Walidacja i opracowanie metody LC–MS/MS oznaczania gancyklowiru i walgancyklowiru u pacjentów leczonych wyprzedzająco po przeszczepieniu narządowym— zastosowanie w terapeutycznym monitorowaniu stężeniem leku we krwi*. „II Ogólnopolskie Forum Młodych— Aktualne kierunki badań w naukach farmaceutycznych”, Lublin, 15 marca 2024 r. (wystąpienie ustne)
 - **[KK4]** M. Moczulski, **A. Kocur**. *Zastosowanie metody QuEChERS w terapeutycznym monitorowaniu stężeniem leków przeciwgrzybiczych w osoczu krwi krytycznie chorych pacjentów*. X Minisymposium Młodych Naukowców na Wydziale Farmaceutycznym WUM, Warszawa, 03 kwietnia 2025 r. (wystąpienie ustne)
 - **[KK5]** A. Mikulska, **A. Kocur**. *Zastosowanie techniki mikropróbki wolumetryczno-absorpcyjnego (VAMS) w terapeutycznym monitorowaniu farmakoterapii reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS)– opracowanie, walidacja i zastosowanie kliniczne metody bioanalitycznej oznaczania metotreksatu i jego metabolitów*. X Minisymposium Młodych Naukowców na Wydziale

Farmaceutycznym WUM, Warszawa, 03 kwietnia 2025 r. (wystąpienie ustne)

- [KK6] P. Michalczuk, D. Marszałek, **A. Kocur**. *Opracowanie metody jednoczesnego oznaczania kofeiny i teofiliny w osoczu ludzkim z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)*. XI Minisymposium Młodych Naukowców na Wydziale Farmaceutycznym WUM, Warszawa, 20 maja 2026 r. (sesja posterowa)
- [KK7] M. Moczulski, **A. Kocur**, P. Michalczuk, J. Czech-Kowalska. *Opracowanie strategii ograniczonego pobierania próbek (LSS) dla terapeutycznego monitorowania stężeniem gancyklowiru u noworodków ze wrodzoną cytomegalią*. I Ogólnopolska Studencka Konferencja Farmacji Klinicznej, Poznań, 30 maja 2026 r. (sesja posterowa) – praca zajęła III miejsce.
- **Udział w konferencjach o zasięgu międzynarodowym po uzyskaniu stopnia doktora**
 - [KM1] M. Moczulski, **A. Kocur**, A. Czajkowska. *A simple LC–MS/MS method for determination of calcineurin inhibitors in Mitra and Capitainer microsampling systems — a pilot comparative study*. Interdisciplinary Conference on Drug Sciences, ACCORD 2024, Warszawa, 23–25 maja 2024 r. (sesja posterowa)
 - [KM2] M. Moczulski, **A. Kocur**, A. Czajkowska. *HPLC-DAD versus LC–MS/MS methods for (val)ganciclovir therapeutic drug monitoring in clinical practice— comparative study*. Interdisciplinary Conference on Drug Sciences, ACCORD 2024, Warszawa, 23–25 maja 2024 r. (sesja posterowa)
 - [KM3] **A. Kocur**, A. Mikulska, M. Moczulski, A. Czajkowska. *Novel volumetric microsampling device for methotrexate determination in capillary blood— LC–MS/MS method development and analytical validation*. Interdisciplinary Conference on Drug Sciences, ACCORD 2024, Warszawa, 23–25 maja 2024 r. (sesja posterowa)
 - [KM4] **A. Kocur**, M. Moczulski, A. Czajkowska, J. Rubik. *The novel LC–MS/MS method for mTOR inhibitors (sirolimus and everolimus) determination in human whole blood*. Interdisciplinary Conference on Drug Sciences, ACCORD 2024, Warszawa, 23–25 maja 2024 r. (sesja posterowa)
 - [KM5] A. Czajkowska, **A. Kocur**, A. Częczeek, B. Kot, M. Moczulski. *A Simple HPLC-UV Method for 6-Thioguanine Determination in Red Blood Cells During Pharmacotherapy with Azathioprine — Application to Therapeutic Drug Monitoring in Clinical Practice*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)

- [KM6] A. Czajkowska, M. Moczulski, B. Kot, A. Mikulska, M. Poniewierska, **A. Kocur**, T. Pawiński. *Clinical Comparison of EMIT and QMS Assays With LC–MS/MS Method for Methotrexate Determination — Application for Therapeutic Drug Monitoring*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)
- [KM7] B. Kot, M. Moczulski, A. Kocur, A. Czajkowska, J. Rubik, T. Pawiński. *Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine A in Pediatric Renal Transplant Recipients Using Volumetric Absorptive Microsampling With LC–MS/MS Technique— Cross- and Clinical Validation of the Bioanalytical Method*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)
- [KM8] A. Kocur, A. Czajkowska, K. Rębis, M. Moczulski, B. Kot, J. Rubik, T. Pawiński. *LC–MS/MS Determination of Rapamycin (Sirolimus) in Whole Blood and Volumetric Absorptive Microsamples — Assessment of Therapeutic Drug Monitoring in Immunosuppressive Therapy and Comparison with Applications of Immunochemical Techniques*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)
- [KM9] R. Szewczyk, **A. Kocur**, A. Czajkowska, K. Izdebska, M. Stopa. *From Venous Blood to VAMS — Adaptation of a Commercial CE-IVD Assay Kit for the Determination of Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus and Cyclosporin A*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)
- [KM10] A. Kocur, M. Moczulski, B. Kot, A. Czajkowska, M. Wildowicz, J. Suchota, T. Pawiński. *Concomitantly Determination of Mycophenolic Acid (MPA), Tacrolimus (TAC) and Creatinine (CRE) in Saliva Using LC–MS/MS — Analytical Method Development, Validation, and Clinical Application*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)
- [KM11] M. Moczulski, B. Kot, A. Czajkowska, **A. Kocur**. *A Simple LC–MS/MS Method for Ganciclovir Determination in Dried Plasma Collected by Mitra-VAMS and Its Application in Pediatric Renal Transplant Recipients and Neonates*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)
- [KM12] A. Czajkowska, **A. Kocur**, J. Rubik, J. Lesiak, B. Kot, M. Moczulski. *Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in Renal Transplant Pediatric Patients — Clinical Laboratory*

Perspective. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)

- [KM13] **A. Kocur**, A. Czajkowska, M. Mikaszewska-Sokolewicz. *Therapeutic Drug Monitoring of Selected Antibiotics Using the Volumetric Absorptive-Microsampling Device in the Pediatric Population with Sepsis: Bioanalytical and Pharmacokinetic Aspects of ANTISEPSIS Study*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)
- [KM14] **A. Czajkowska**, **A. Kocur**, M. Mikaszewska-Sokolewicz. *Therapeutic Drug Monitoring of Selected Antiviral and Antifungal Agents Using the Volumetric Absorptive-Microsampling Device (VAMS) in the Pediatric Population with Sepsis: Bioanalytical Aspects of ANTISEPSIS Study*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)
- [KM15] **A. Kocur**, B. Kot, M. Moczulski, A. Czajkowska. *Therapeutic Drug Monitoring of Apixaban Using Volumetric-Absorptive Microsampling and LC–MS/MS Technique — Method Development, Validation, and Clinical Application*. 22nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Banff, Alberta, Kanada, 15–18 września 2024 r. (sesja posterowa)
- [KM16] **A. Kocur**, M. Moczulski, A. Czajkowska, A. CzęczeK, M. Mikaszewska-Sokolewicz. *The micro-QuEChERS meets LC–MS/MS for the first time in antifungal drugs monitoring in capillary blood microsamples: ANTISEPSIS study*. The 73rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Baltimore, Maryland, USA, 1–5 czerwca 2025 r. (sesja posterowa)
- [KM17] **A. Kocur**, **M. Moczulski**, J. Czech-Kowalska. *Development and clinical application of HILIC-LC–MS/MS method for simultaneous determination of ganciclovir and creatinine in capillary blood microsamples*. The 73rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Baltimore, Maryland, USA, 1–5 czerwca 2025 r. (sesja posterowa)
- [KM18] **A. Kocur**, A. Mikulska, M. Moczulski, M. Kajfasz, B. Kwiatkowska, T. Pawiński. *Determination of methotrexate polyglutamates (MTXPGs) in VAMS microsamples for monitoring adult adherence*. 23rd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Singapur, 21–24 września 2025 r. (wystąpienie ustne)
- [KM19] **A. Kocur**, M. Moczulski, J. Czech-Kowalska. *VAMS is promising method for evaluating the pharmacokinetics of (val)ganciclovir in neonates*. 23rd International Congress of

Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Singapur, 21–24 września 2025 r. (wystąpienie ustne)

- [KM20] **A. Kocur**, M. Moczulski, A. Czajkowska, J. Rubik, T. Pawiński. Quantification of creatinine as an endogenous analyte in qDBS and VAMS microsampling devices. 23rd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Singapur, 21–24 września 2025 r. (wystąpienie ustne)
- [KM21] **A. Kocur**, M. Moczulski. *Determination of direct oral anticoagulants (DOACs) in qDBS and VAMS microsampling devices.* 23rd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Singapur, 21–24 września 2025 r. (sesja posterowa)
- [KM22] **A. Kocur**, M. Moczulski, A. Czajkowska, A. Częczek, R. Szewczyk, K. Izdebska, M. Stopa. *The QuEChERS method efficiently extracts immunosuppressants from whole blood for LC–MS/MS analysis.* 23rd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Singapur, 21–24 września 2025 r. (sesja posterowa)
- [KM23] **A. Kocur**, A. Czajkowska, M. Moczulski, A. Częczek, M. Mikaszewska-Sokolewicz. *Simultaneous determination of six cephalosporins in critically ill pediatric patients using VAMS.* 23rd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Singapur, 21–24 września 2025 r. (sesja posterowa)
- [KM24] A. Czajkowska, A. Częczek, D. Bulsiewicz, **A. Kocur**, D. Gruszfeld. *Keeping neonates calm and safe: a novel LC–MS/MS method for dexmedetomidine monitoring.* 23rd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Singapur, 21–24 września 2025 r. (sesja posterowa)
- [KM25] A. Czajkowska, A. Częczek, D. Bulsiewicz, **A. Kocur**, D. Gruszfeld. *Small Samples, Big Impact: LC–MS/MS Quantification of Ketamine in Neonates.* 23rd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Singapur, 21–24 września 2025 r. (sesja posterowa)
- [KM26] **A. Kocur**, J. Czech-Kowalska. *Volumetric-Absorptive Microsampling (VAMS) in Therapeutic Drug Monitoring of Valganciclovir in Infants with Congenital CMV Infection– Preliminary Results.* 4th CMV Congress, Neapol, Włochy, 20–21 listopada 2025 r. (sesja posterowa)

7.5. Realizowane granty naukowe – kierownik lub wykonawca

- Od momentu uzyskania stopnia doktora, byłem/jestem kierownikiem lub wykonawcą w następujących projektach i grantach:
 - [GP1] *Mikropróbki objętościowo-absorpcyjne (VAMS) podczas monitorowania stężenia takrolimusu jako nowe narzędzie do poprawy*

przestrzegania zaleceń lekarskich w populacji pediatrycznej – walidacja i opracowanie metody LC-MS/MS – **kierownik**, projekt wewnętrzny „Młody badacz” finansowany przez Warszawski Uniwersytet Medyczny (lata realizacji 2022–2023, projekt zakończony po obronie doktoratu).

- **[GP2]** *Mikropróbkowanie wolumetryczno-absorpcyjne (VAMS) jako nowe narzędzie służące do optymalizacji leczenia immunosupresyjnego i monitorowania czynności przeszczepu u dzieci po przeszczepieniu nerki – główny wykonawca*, grant wewnętrzny finansowany przez Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie (lata realizacji 2023–2026).
- **[GP3]** *Wpływ dawkowania ukierunkowanego na cel, opartego na modelu farmakokinetyki klinicznej leków przeciwdrobnoustrojowych, na wynik kliniczny i jakość życia dzieci i noworodków – analiza bezpieczeństwa, skuteczności i opłacalności – projekt AntiSepsis – kierownik części farmakokinetycznej eksperymentu*, eksperyment medyczny finansowany przez Agencję Badań Medycznych, realizowany w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie (lata realizacji 2024–2030).
- **[GP4]** *Badanie wpływu implikacji w fazie przedanalizycznej i analitycznej na przykładzie metody LC-MS/MS jednoczesnego oznaczania leków immunosupresyjnych połączonej z technikami mikropróbkowania objętościowo-absorpcyjnego (VAMS i qDBS) – kierownik*, projekt wewnętrzny „Młody badacz” finansowany przez Warszawski Uniwersytet Medyczny (lata realizacji 2024-2025).
- **[GP5]** *Personalizacja farmakoterapii doustnymi antykoagulantami nowej generacji w oparciu o alternatywne strategie pobierania próbek – badania in vitro/ex vivo jako wstęp do zdalnego monitorowania leczenia przeciwkrzepliwego – kierownik*, projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (konkurs: MINIATURA-8), realizowany w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (lata realizacji 2024-2025).
- **[GP6]** *Zastosowanie technik mikropróbkowania w terapeutycznym monitorowaniu leczenia immunosupresyjnego u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu wątroby – kierownik*, grant wewnętrzny finansowany przez Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie (lata realizacji 2024-2027)
- **[GP7]** *Optymalizacja farmakoterapii (wal)gancyklowirem z wykorzystaniem techniki mikropróbkowania wolumetryczno-absorpcyjnego (VAMS) u noworodków z zakażeniem CMV – główny wykonawca*, grant wewnętrzny finansowany przez Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie (lata realizacji 2024-2027)
- **[GP8]** *Ocena przydatności oznaczenia względnej wymiennej miedzi (REC-relative exchangable copper) oraz wymiennej miedzi*

- (*exchangable copper*) w diagnostyce i monitorowaniu leczenia choroby Wilsona (*WilsonREC*)– **wykonawca**, grant wewnętrzny finansowany przez Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie (lata realizacji 2024-2027)
- **[GP9]** Ocena skuteczności alternatywnych dróg podania deksmedetomidyny i ketaminy- badanie jednośrodkowe z elementami modelowania farmakodynamicznego (PK/PD) i wykorzystaniem techniki mikropróbkowania (*MicroAntiPain*)- **wykonawca**, grant wewnętrzny finansowany przez Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie (lata realizacji 2024-2027)
 - **[GP10]** Ocena zasadności i skuteczności badania stężenia kwasu mykofenolowego metodą mikropróbkowania u dzieci z często nawracającymi i/lub steroidozależnym zespołem nerczycowym. (*MICRO-NEPH*)– **wykonawca**, grant wewnętrzny finansowany przez Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie (lata realizacji 2026-2029)
 - **[GP11]** Opracowanie referencyjnej metody oznaczania busulfanu u pacjentów pediatrycznych w leczeniu kondycjo-nującym przed HSCT – **projekt w trakcie oceny, kierownik**, projekt wewnętrzny „Młody badacz” finansowany przez Warszawski Uniwersytet Medyczny (lata realizacji 2026–2027).
- W marcu 2026 roku razem z mgr Agnieszką Czajkowską, kierującą Pracownią Terapii Monitorowanej, Farmakokinetyki Klinicznej i Toksykologii Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, uzyskaliśmy finansowanie projektu: *Zakup wysokosprawnego chromatografu cieczowego sprzężonego z detekcją masową (LC MS/MS) na potrzeby optymalizacji terapii monitorowanej stężeniem leku we krwi w populacji pediatrycznej z zastosowaniem pobrań krwi metodą mikropróbkowania wolumetryczno-absorpcyjnego (VAMS)*, w ramach realizacji inwestycji (aparatura – zakup) związanej z działalnością naukową (finansowanie: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego).
 - Byłem również opiekunem minigrantów studenckich finansowanych przez Warszawski Uniwersytet Medyczny:
 - **[MG1]** *Zastosowanie alternatywnych strategii pobierania próbek w monitorowaniu stężenia kreatyniny jako biomarkera czynności nerek u pediatrycznych biorców przeszczepu narządowego*– kierownik: stud. Bartłomiej Kot, lata realizacji: 2024-2025;
 - **[MG2]** *Zastosowanie techniki mikropróbkowania wolumetryczno-absorpcyjnego (VAMS) w terapeutycznym monitorowaniu farmakoterapii reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS)*– opracowanie, walidacja i zastosowanie kliniczne metody bioanalitycznej oznaczania metotreksatu i jego metabolitów– kierownik: mgr farm. Aleksandra Mikulska, lata realizacji: 2024-2025;
 - **[MG3]** *Zastosowanie techniki suchej plamy osocza (qDPS) w terapeutycznym monitorowaniu leczenia wyprzedzającego*

(wal)gancyklowirem u pacjentów po przeszczepieniu nerki– opracowanie i walidacja metody analitycznej oraz badanie zależności farmakokinetyczno-farmakodynamicznych– kierownik: stud. Mateusz Moczulski, lata realizacji: 2024-2025.

- [MG4] *Terapeutyczne monitorowanie acyklowiru i jego metabolitu (9-karboksymetoksymetyloguaniny) u pacjentów pediatrycznych po transplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych lub transplantacji nerki w oparciu o alternatywne strategie pobierania próbek*– kierownik: stud. Mateusz Moczulski, **projekt w trakcie oceny**, planowane lata realizacji: 2026–2027.

7.6. Działalność recenzencka

- Począwszy od 2023 roku wykonałem łącznie 163 recenzji manuskryptów w czasopismach naukowych (uwzględniono również powtarzne recenzje danego manuskryptu): *Advances in Medical Sciences* (2x), *Analytical Biochemistry* (1x), *Antibiotics* (9x), *Bioanalysis* (10x), *Biomedicine and Pharmacotherapy* (1x), *Clinica Chimica Acta* (3x), *Clinical Biochemistry* (6x), *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (3x), *Current Pharmaceutical Analysis* (2x), *Diagnostics* (2x), *European Journal of Drug Metabolism* (3x), *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (1x), *Frontiers in Immunology* (1x), *Frontiers in Medicine* (1x), *Frontiers in Pediatrics* (1x), *Frontiers in Pharmacology* (2x), *Heliyon* (3x), *Immunotherapy* (1x), *International Journal of Molecular Sciences* (10x), *Journal of Chromatography B* (2x), *Journal of Chromatography Open* (1x), *Journal of Clinical Medicine* (19x), *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* (1x), *Journal of International Medical Research* (1x), *Journal of Personalized Medicine* (2x), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (20x), *Metabolites* (5x), *Personalized Medicine* (2x), *Pharmacogenomics* (2x), *Pharmaceutics* (9x), *Pharmaceuticals* (11x), *Prospects in Pharmaceutical Sciences* (23x), *Talanta* (4x), *Talanta Open* (1x), *Therapeutics and Clinical Risk Management* (1x), *Toxics* (4x).
- Byłem redaktorem gościnnym w wydaniu specjalnym *State-of-the-Art Molecular and Translational Medicine in Poland, 3rd Edition* w czasopiśmie *Biomedicines*.
- Recenzowałem streszczenia zgłoszeń komunikatów ustnych i posterowych na konferencję IATDMCT/SFPT 2026, która odbędzie się we wrześniu 2026 w Rennes, we Francji.

7.7. Przyznane nagrody i wyróżnienia

- Nagrody JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za działalność naukową i dydaktyczną:
 - **3 nagrody za rok 2024:**
 - za opracowanie dobrych praktyk w fazie przedanalitycznej, analitycznej i postanalitycznej służących opracowaniu nowych strategii monitorowania metotreksatu i jego metabolitów podczas

leczenia niskimi i wysokimi dawkami leku – nagroda naukowa zespołowa III stopnia.

- za opracowanie innowacyjnej metody terapeutycznego monitorowania stężeń (wal)gancyklowiru podczas terapii wyprzedzającej po przeszczepieniu nerki u pacjentów pediatrycznych – nagroda naukowa zespołowa III stopnia;
 - za opracowanie skryptu pt. *Oznaczanie substancji leczniczych w preparatach wieloskładnikowych* – nagroda dydaktyczna zespołowa II stopnia.
- **4 nagrody za rok 2023:**
- za opis analitycznych i klinicznych zastosowań mikropróbkowania objętościowo-absorpcyjnego podczas terapii monitorowanej stężeniem takrolimusu– nagroda naukowa zespołowa II stopnia
 - za publikację opisującą analityczne i kliniczne zastosowanie nowej, innowacyjnej techniki pobierania próbek krwi– nagroda naukowa zespołowa III stopnia
 - za publikację przeglądową opisującą zastosowanie technik mikropróbkowania w terapii monitorowanej leków immunosupresyjnych – nagroda naukowa zespołowa III stopnia
 - za opracowanie skryptu *Oznaczanie ilościowe substancji leczniczych, z zastosowaniem analizy miareczkowej, w preparatach jednoskładnikowych w postaci tabletek, drażetek i kapsulek* – nagroda dydaktyczna zespołowa II stopnia.
- Wyróżnienie za wdrożenie rozwiązania *Diagnostyka Małych Bohaterów–przełomowe możliwości microsamplingu w sepsie i chorobach przewlekłych u dzieci*, przyznane podczas 3. Kongresu „Nauka dla Społeczeństwa”.
 - W roku akademickim 2025/2026, ze względu na osiągnięcia i dorobek naukowy, zostałem uhonorowany stypendium JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dla Młodych Naukowców.
 - W latach akademickich 2023/24, 2024/25, 2025/26 byłem powoływany przez JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego do składu organu doradczego – Rady Młodych Naukowców WUM.
 - W roku akademickim 2024/2025 ze względu na wyróżniające się osiągnięcia naukowe, zostałem objęty programem mentoringowym przez JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W ramach programu otrzymałem wsparcie finansowe umożliwiające wyjazd na Kongres ASMS 2025 w Baltimore, USA.

7.8. Szkolenia i certyfikaty

Poniżej przedstawiono wykaz odbytych szkoleń i uzyskanych certyfikatów (wybrane, po obronie doktoratu):

- Szkolenie z zakresu obsługi, utrzymania i przeprowadzania analiz przy użyciu aparatury LC–MS/MS-IVDR (LabExperts/Bioanalytic, 2024)
- Certyfikat GCP ICH E6 (R2) (Agencja Badań Medycznych 2024)
- PX100VR | PKanalix® Summer School (Simulations Plus, 2024)
- ICH GCP E6 R3 – Summary of Changes (2025)
- *Antimicrobial resistance – theory and methods* (Technical University of Denmark, Coursera, 2025)
- *Pharmacokinetics* (Novartis/Coursera, 2025)
- Kurs: *Apiksaban i odwracalne inhibitory czynnika Xa – bezpieczeństwo, skuteczność i praktyczne aspekty stosowania w codziennej praktyce* (Okręgowa Izba Aptekarska w Krakowie, 2025)
- Certyfikat ICH E6 (R3) GCP, wersja 1.0. (Agencja Badań Medycznych, 2026)
- *Masterclass* Antybiotykoterapia dla farmaceutów - poziom podstawowy (Polskie Towarzystwo Farmacji Klinicznej, 2026)
- Udział w posiedzeniach klinicznych organizowanych przez Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie (lata 2024–2026, wybrane wykłady).
- Certyfikat *Zasady transportu materiału biologicznego zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi IATA w kontekście badań klinicznych* (Agencja Badań Medycznych, 2026)

7.9. Rankingi pracowników naukowych WUM

- Listy pracowników WUM najlepiej publikujących i najbardziej efektywnych w pozyskiwaniu środków w latach 2022–2025:
 - Lista ogólna: 139 miejsce (w skali uczelni)
 - Lista młodych naukowców: 18 miejsce (w skali uczelni), 2 miejsce (na Wydziale Farmaceutycznym WUM)
- Listy pracowników WUM najlepiej publikujących i najbardziej efektywnych w pozyskiwaniu środków w latach 2021–2024:
 - Lista ogólna: 170 miejsce (w skali uczelni)
 - Lista młodych naukowców: 16 miejsce (w skali uczelni), 4 miejsce (na Wydziale Farmaceutycznym WUM)

8. Podsumowanie całkowitego dorobku naukowego – wskaźniki bibliometryczne

- Impact Factor: 71,300
- Punktacja MNiSW: 1987
- Liczba cytowań w Web of Science (bez autocytowań): 81 (61)
- Liczba cytowań w Scopus (bez autocytowań): 79 (61)
- Liczba cytowań w Google Scholar: 125
- Indeks Hirscha: 5 (WoS)/ 5 (Scopus)/ 6 (Google Scholar)

.....
(podpis wnioskodawcy)