



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel. 61 6418368

e-mail: aczyrski@ump.edu.pl



Poznań, 6.11.2023 r.

dr hab. n. farm. Andrzej Czyrski

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt. „Terapeutyczne monitorowanie stężeniem takrolimusu i kwasu mykofenolowego z zastosowaniem mikropróbkowania objętościowo-absorpcyjnego połączonego z techniką LC-MS/MS u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki” przedstawionej przez Pana mgr. farm. Arkadiusza Kocura

Pan mgr farm. Arkadiusz Kocur przedstawił do recenzji rozprawę doktorską wykonaną w Zakładzie Chemii Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotora Pana dr hab. n. farm. Tomasza Pawińskiego, prof. WUM oraz promotorki pomocniczej Pani dr n. farm. Doroty Marszałek

Doktorant jest członkiem 2 towarzystw naukowych. Swoją aktywność naukową rozwijał również poza Warszawskim Uniwersytetem Medycznym - odbył dwumiesięczny staż naukowy w pracowni w farmakokinetyki w Instytucie-Pomniku Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie. Pozwoliło to na rozszerzenie umiejętności z zakresu terapii monitorowanej stężeniem leku. Ponadto swojej działalności naukowej nie ograniczał tylko do prac nad doktoratem, czego wyraz znajduje autorstwo w czterech publikacjach poza cyklem. W dwóch z nich jest pierwszym, w jednej pracy jest ostatnim, a w kolejnej jest drugim autorem. Ponadto wyniki swoich badań zaprezentował na pięciu konferencjach naukowych w formie łącznie pięciu posterów, dwóch wystąpień ustnych oraz jednego wykładu plenarnego. Wykazywał aktywność w zakresie zdobywania środków na swoje badania - część pracy była finansowana przez Warszawski Uniwersytet Medyczny w ramach projektu „Młody Badacz”.

Był wykonawcą w projekcie finansowanym przez Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka. Na uznanie zasługuje również fakt, że wykonał już sześć recenzji artykułów naukowych, co świadczy o uznaniu jego pracy.

Rozprawa doktorska została przedstawiona jako cykl trzech prac, na który składają dwie prace oryginalne opublikowane w *Pharmaceutics* i *Pharmacological Reports* oraz jedna praca poglądowa opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences*. Wszystkie prace zostały opublikowane w 2023 roku. Łączny IF prac wynosi 15,40 punktów oraz 420 punktów MEiN na podstawie danych bibliometrycznych obowiązujących w dniu publikacji pracy. We wszystkich publikacjach doktorant jest pierwszym autorem, a w dwóch jest autorem korespondencyjnym. Znaczący wkład doktoranta w powstanie wszystkich prac cyklu potwierdzają oświadczenia złożone przez pozostałych współautorów publikacji. Natomiast całkowity dorobek publikacyjny wynosi IF = 17,90 oraz 437 MEiN. Warto zaznaczyć spójność tematyczną przedstawionych prac.

Publikacje wchodzące w skład cyklu opatrzone są 64-stronicowym komentarzem, na który składają się spis treści, podziękowania, biografia, opis dorobku naukowego, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, cel pracy, materiały i metody, omówienie wyników wraz z ich dyskusją, wnioski oraz perspektywy dalszych badań, spis literatury liczący 43 pozycje piśmiennictwa. Dołączono również kopie opublikowanych prac, zgód Komisji Bioetycznej oraz stosowne oświadczenia pozostałych Autorów.

Na podstawie przedstawionych jasno zdefiniowanych celów można stwierdzić, że doktorant konsekwentnie je realizował. Świadczy o tym kolejność publikacji. Przygotowanie pierwszej z nich (P1) miało na celu nabycie niezbędnej wiedzy do opracowania metod. Dzięki temu można było przystąpić do kolejnego etapu jakim było opracowanie metod analitycznych co dało wyraz publikacjom P2 i P3. W obu publikacjach (P2 i P3) zastosowano również opracowane metody w bioanalizie.

Doktorant, wraz z zespołem badawczym, podjął trud opracowania metod oznaczenia takrolimusu (TAC) oraz kwasu mykofenolowego (MPA) z zastosowaniem mikropróbkowania objętościowo-absorpcyjnego (VAMS). Jest to jedna z technik, które wymagają pobrania bardzo małej objętości próbki do badania, co jest niewątpliwie korzystne dla pacjenta. Warto dodać, że w niektórych grupach jak właśnie pacjenci pediatryczni, pobieranie dużych ilości materiału do badania może być uznane za nieetyczne. W tym przypadku mamy do czynienia z objętością rzędu 10 μ L. Pobranie tak małej ilości materiału wiąże się z koniecznością zastosowania odpowiednio czułego detektora. W przypadku obu leków zastosowano metodę LC-MS/MS, która zgodnie z danymi literaturowymi przytoczonymi w pracy jest złotym

standardem w takiej sytuacji. W obu metodach zastosowano elucję gradientową, która zapewniła bardzo szybki czas analizy. Opracowane metody zostały zwalidowane zgodnie z najnowszymi wytycznymi EMA. W ramach przeprowadzonych badań dokonano porównania z innymi stosowanymi w oznaczeniach TAC oraz MPA. Były to metody immunoenzymatyczne (TAC) jak i chromatograficzne z użyciem detektora DAD (MPA). Wykazano możliwość wymiennego stosowania pomiędzy metodą immunochemiczną jak i opartą na oznaczeniach w pełnej krwi żyłnej a metodą opartą na pobieraniu próbek za pomocą VAMS dla oznaczania TAC. Niemniej w przypadku tej pierwszej istnieje ryzyko interferencji z metabolitami, co wpływa na ryzyko zwiększenia odczytanego stężenia leku. W przypadku MPA wykazano równoważność metody opartej na oznaczeniu leku w pełnej krwi jak i w próbkach uzyskanych za pomocą techniki VAMS. Ponadto wykazano wymienialność metody oznaczania za pomocą HPLC-DAD jak i LC-MS/MS w osoczu.

W toku przeprowadzonej analizy statystycznej wykazano korelację pomiędzy stężeniem MPA w osoczu a stężeniem we krwi włośniczkowej. Opracowano równanie umożliwiające przeliczenie oznaczonego stężenia na stężenie w osoczu za pomocą równania regresji jak i równania opartego na poziomie hematokrytu.

Chciałbym również zauważyć, że analiza statystyczna została przeprowadzona bardzo starannie i szczegółowo. W jej toku wykazano, że hematokryt nie ma wpływu na odzysk obu badanych leków z matrycy, w przeciwieństwie do innych metod opartych na pobraniu próbki krwi o małej objętości. Powyższe obserwacje czynią opracowaną metodę obiecującą w analizie stężeń oraz w zastosowaniu w terapii monitorowanej. Odpowiednio poinstruowani pacjenci mogą pobierać próbki do badań u siebie w domu i przysyłać je do ośrodka monitorującego bez konieczności częstych wizyt u lekarza, co jest niewątpliwie korzystne dla pacjenta.

Przedstawione prace przeszły już proces recenzji i prezentują bardzo wysoki poziom, więc nie będę dokonywał ich szczegółowej recenzji, bo ta już została wcześniej wykonana. Podczas lektury zarówno rozprawy doktorskiej jak i publikacji nasunęło mi się kilka sugestii, które można potraktować jako wstęp do dalszej dyskusji:

1. W jaki sposób opracowane metody analityczne były optymalizowane w odniesieniu do zastosowanego gradientu czy też odzysku? Czy dokonywano analizy zmiany jednej zmiennej przy zachowaniu pozostałych na stałym poziomie, czy też analizowano proces, w którym zmieniano kilka zmiennych w jednym czasie?
2. W jaki sposób był obliczony odzysk analitów z matrycy?

3. W toku przeprowadzonych badań udało się zebrać dosyć pokaźne grupy pacjentów – po 50 dla obu badanych leków, z podobnymi proporcjami M/K. Taka ilość umożliwiłaby przeprowadzenie również analizy statystycznej, w której czynnikiem różnicującym byłaby płeć. Czy rozważano taką kwestię?
4. Czy w przypadku części klinicznej stosowano kryteria wyłączenia pacjenta z badania?
5. W rozdziale „Wprowadzenie” przy opisywaniu zalet metod VAMS oraz DBS (oznaczenia w suchej kropli krwi) jako wygodnych dla pacjenta, warto byłoby wspomnieć również o oznaczaniu substancji leczniczych w ślinie. Ten sposób pobrania próbki jest również wygodny dla pacjenta.
6. Unikałbym określenia „przeszczep” w odniesieniu do procedury. Użycie sformułowania „przeszczepienie” byłoby moim zdaniem właściwsze. „Przeszczep” odnosi się do przeszczepianego narządu.

Na podstawie lektury zarówno rozprawy doktorskiej jak i załączonych publikacji chciałbym stwierdzić, że podstawione powyżej pytania, w żaden sposób nie wpływają na wartość merytoryczną publikacji oraz opracowanego komentarza. Załączone publikacje dowodzą, że Pan mgr farm. Arkadiusz Kocur uzyskał umiejętności, które umożliwiają samodzielne planowanie i przeprowadzanie badań. Świadczy o tym również wspomniane przeze mnie wykonanie recenzji artykułów dla czasopism naukowych.

Podsumowując, ocena przedstawionej do oceny dysertacji jest wysoka. Prace oryginalne będące jej wynikiem są pierwszymi publikacjami obejmującymi opracowanie metody LC-MS/MS oznaczania TAC i MPA, jej walidację analityczną, krzyżową i kliniczną, z wykorzystaniem techniki VAMS dla populacji pediatrycznej. Przeprowadzone badania były zaplanowane prawidłowo. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska pod tytułem „Terapeutyczne monitorowanie stężeniem takrolimusu i kwasu mykofenolowego z zastosowaniem mikropróbki objętościowo-absorpcyjnego połączonego z techniką LC-MS/MS u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki” spełnia bez zastrzeżeń wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl obowiązującej Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie Pana mgr. farm. Arkadiusza Kocura do procedowania dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Czyszk