

Wrocław, 10.11.2022

Szanowny Pan
Prof. dr hab. n. farm. Grzegorz Nałęcz-Jawecki
Przewodniczący
Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
02-091 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 61

Recenzja pracy doktorskiej mgr **Magdaleny Bodnar-Broniarczyk** pod tytułem „**Dystrybucja takrolimusu podczas monitorowanej terapii immunosupresyjnej u pacjentów po przeszczepieniach narządowych**”.

Szanowny Panie Przewodniczący,

Leczenie immunosupresyjne pacjentów po przeszczepieniu narządów, jako dziedzina angażująca niemałą rzeszę chirurgów, nefrologów i transplantologów różnych specjalności, jak również farmaceutów, farmakologów i diagnostów laboratoryjnych, doświadcza na początku XXI-ego wieku pewnej stagnacji, która wynika z braku nowych leków wartych choćby przeprowadzeniach wstępnych faz badań klinicznych, jak również zapowiadanego niegdyś szumnie przez sir Petera Medawara przełomu w zakresie wywoływania tolerancji alloprzeszczepu. Jednocześnie, o niewykorzystanym potencjale dostępnych środków świadczą ostatnie postępy w zakresie ksenotransplantacji, gdzie dzięki umiejętnej kompozycji istniejących leków uzupełniającej modyfikację genetyczną hodowanych w charakterze dawców świń uzyskano taką poprawę długości przeżycia w modelu zwierzęcym, że zdecydowano się również na leczenie eksperymentalne człowieka. Nie oznacza to, że wszystkie problemy związane z konwencjonalnym leczeniem immunosupresyjnym zostały rozwiązane: świetnie znany wszystkim transplantologom klinicznym fakt, iż grupie młodszych biorców utrzymuje się zwiększone ryzyko odrzucania przeszczepu, a u starszych pomimo nielicznych epizodów odrzucania dużo większe jest prawdopodobieństwo zgonu z powodu infekcji, dobitnie pokazuje że nadal mamy kłopot z indywidualizacją leczenia immunosupresyjnego, a pomiary stężenia podstawowego takrolimusu we krwi pełnej nie jest idealną metodą monitorowania.

Z tego powodu bardzo wysoko oceniam wybór tematu pracy doktorskiej mgr Magdaleny Bodnar-Broniarek, która zrezygnowała z podążania utartymi ścieżkami i opracowała nowatorskie metody monitorowania terapii takrolimusem nie tylko na podstawie stężenia leku we krwi pełnej, ale również jego obecności w tkankach przeszczepionych narządów i jego wolnej frakcji osoczowej.

Powierzona mojej ocenie praca doktorska ma charakter cyklu 3 publikacji anglojęzycznych, które odpowiadają świetnie zaplanowanym i konsekwentnie zrealizowanym trzem etapom badań, poświęconych kolejno precyzyjnym pomiarom stężenia takrolimusu we krwi pełnej, w tkance nerkowej i wątrobowej przeszczepionych narządów i osoczu. Prezentowane są one w oryginalnej wersji językowej jako kolejne załączniki, do których dołączono również oświadczenia pozostałych współautorów potwierdzające walny wkład doktorantki w powstanie prezentowanych prac i zgody

komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań. Trzon pracy stanowi 96-stronicowe omówienie w języku polskim, które zawiera wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy, wstęp, cel, materiał i metody, wyniki połączone z dyskusją, wnioski, piśmiennictwo i wreszcie streszczenia w języku polskim i angielskim.

Wszystkie trzy publikacje mają charakter prac oryginalnych, zamieszczone zostały w renomowanych czasopismach recenzowanych: pierwsza w *Journal of Chromatography B* (IF: 3,004), a dwie kolejne w *Pharmaceutics* (IF: 6,321), mają zbliżoną wagę merytoryczną i odpowiadają trzem etapom badań, nakreślonym przez doktorantkę w celach pracy. Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich trzech publikacji. Łączna punktacja prac składających się na rozprawę to 15,646 punktów IF i 270 punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki, a deklarowany przez doktorantkę i potwierdzony przez współautorów udział w ich powstaniu to 60% w przypadku pierwszych dwóch publikacji i 70% przy tworzeniu ostatniej. Zarówno wyrażona punktami waga gatunkowa zaaprobowanych do publikacji prac, jak i udział doktorantki w ich powstaniu, w mojej opinii z nadatkiem spełniają wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Ocenę merytoryczną zacznę od tytułu, który w niezwykle ogólnikowy sposób informuje o zagadnieniach poruszonych w pracy. W dzisiejszych czasach, kiedy zalewani jesteśmy gigantycznymi ilościami publikacji tytuł stanowi formę mini-streszczenia, również tytuł rozprawy doktorskiej powinien zachęcać do zapoznania się z jej treścią. Zdaję sobie sprawę, że w przypadku wyboru wspólnego tytułu dla cyklu prac publikowanych jest to zadanie czysto akademickie, jednak nadal uważam że doktorantka powinna w tytule wyeksponować najważniejsze walor lub walory praktyczne swoich prac, a skoro tego nie zrobiła to mam pytanie jak jednym zdaniem chciałaby zachęcić zainteresowanych do ich przeczytania?

Wstęp stanowi ponad połowę tekstu polskiego omówienia, co mocno zaburza proporcje rozprawy, sam jest natomiast przytłoczony Tabelami 1-4, które w sumie zajmują 17 stron. Oczywiście tabele te stanowią świadectwo bogatej wiedzy merytorycznej doktorantki, jej umiejętności pozyskiwania cennych wskazówek praktycznych z literatury, a zapewne również mrówczej pracowitości, jednak jestem ciekaw jak broni ona ich wyeksponowania w takiej objętości i w tym miejscu? Rolą wstępu jest zwięzłe przedstawienie stanu wiedzy w dziedzinie, w której doktorantka podejmuje badania, i przekonanie czytelnika o jej dobrej orientacji w poruszanych zagadnieniach, jednak rolą rozprawy doktorskiej jest wyeksponowanie własnych wyników i osiągnięć, po pierwsze zatem, nie zachęca do zapoznania się z wynikami doktorantki konieczność „przebijania się” przez rozbudowany wstęp, a po drugie, zaistniała dysproporcja sugeruje że doktorantka pewniej czuje się omawiając wyniki innych autorów, niż swoje własne. Jeżeli natomiast celem wyliczenia znanych doktorantce metod było podjęcie dyskusji z jej autorami, to może lepiej byłoby umieścić wspomniane tabele w dyskusji i uzupełnić jej o elementy porównania ze stosowanymi przez siebie metodami.

W Tabeli 1 opisano 35 metod oznaczania stężenia takrolimusu we krwi pełnej metodami chromatograficznymi i trudno dojść do tego, czy konieczność przedstawienia ich w takiej liczbie wynika z ich równorzędności, czy ich kolejność wyznacza jakąś ewolucję. W szczególności z omówienia tego nie wynika dlaczego doktorantka przy tej wielości uznała że potrzebna jest kolejna, opracowywana przez nią metoda. Wydaje się, że nie powinno nastęrczyć trudności w wyselekcjonowaniu 5, może 10 najważniejszych metod i skrócenie tabeli do 2-3 stron. Natomiast pomimo tego, iż doktorantka sama wspomina że metody chromatograficzne stosowane są jedynie w połowie światowych laboratoriów, powszechnie wykorzystywane testy immunoenzymatyczne są

przez nią zaledwie wzmiankowane. Już na tym etapie chciałbym wspomnieć, że doktorantka wydaje się nie uważać za istotny parametr charakteryzujący przydatność testu czas od pobrania próbki krwi do momentu uzyskania wyniku przez lekarza zlecającego, w związku z czym chciałbym zwrócić uwagę, że możliwość przedstawienia pacjentowi zaleceń dotyczących sposobu dawkowania takrolimusu w trakcie jednej wizyty i bezpośrednio przez lekarza dysponującego wynikiem znacznie poprawia ich skuteczność, stanowi zatem istotny element wpływający na skuteczność TDM.

Część poświęconą oznaczaniu stężeń takrolimusu w tkance nerkowej i wątrobowej doktorantka w pierwszej 1/3 poświęca żółci, co jakkolwiek samo w sobie interesujące, nie wnosi wiele do zasadniczego tematu tej części rozprawy. Doktorantka nie tłumaczy na jakiej podstawie teoretycznej opiera przekonanie, że oznaczanie stężeń leków immunosupresyjnych w tkankach narządów przeszczepionych może mieć znaczenie dla oceny ryzyka odrzucania: biorąc pod uwagę że podstawowe procesy zmierzające do wygenerowania odrzucania komórkowego na które wpływ ma takrolimus mają miejsce poza przeszczepionym narządem, a rolą takrolimusu jest zapobieganie, a nie leczenie odrzucania, pytanie brzmi czy doktorantka przypisuje przeszczepionej tkance jakąś szczególną rolę w tym procesie, czy też po prostu wykorzystuje fakt częstego pobierania biopsji przeszczepionego narządu, traktując uzyskaną informację o stężeniu leku za reprezentatywną dla wszystkich tkanek organizmu (czyli np. węzłów chłonnych). Bardziej oczywista wydaje się korelacja pomiędzy stężeniem takrolimusu w tkance nerkowej (a może również wątrobowej), a jego nefrotoksycznością, ale tego zagadnienia doktorantka nie porusza.

Doktorantka wydaje się mocno zainspirowana koncepcją, że stężenia takrolimusu oznaczone w przeszczepionych tkankę lepiej oddają poziom zabezpieczenia narządu przed odrzucaniem niż wyniki ich pomiaru we krwi pełnej, jednak w przypadku traktowanych przez nią jako kluczowe dwóch prac klinicznych dotyczących przeszczepiania wątroby wskazane wydaje się bardziej krytyczne podejście do publikowanych wyników. Praca Sandborna i wsp. z 1995 roku (w zestawieniu cytowanego piśmiennictwa pozycja 150, a nie jak błędnie podano 149) oparta jest na 38 przypadkach pacjentów poddanych transplantacji na przełomie lat 1990/91, czyli w okresie pionierskim, kiedy FK506 (jeszcze nie takrolimus) był lekiem eksperymentalnym, a o braku ugruntowanych standardów najlepiej świadczy to, że stężenia tkankowe korelowano z oznaczeniami w osoczu (a nie jak doktorantka podaje: we krwi pełnej). Również wnikliwa lektura pracy Caprona i wsp. (doktorantka odsyła do nr. 143 w zestawieniu, w rzeczywistości powinien to być nr 144) sugeruje możliwość, iż mimo upływu 10-15 lat umiejętność posługiwania się takrolimusem nie stała jeszcze na wysokim poziomie, o czym świadczy obecność cech istotnego odrzucania w ponad połowie bioptatów pobranych 7 dni po zabiegu, podczas gdy doktorantka sama pisze w innym miejscu, że odsetek ten u pacjentów leczonych takrolimusem nie powinien przekraczać 20%, a wg innych źródeł co najwyżej 30%. Dodatkowo, stężenia tkankowe są korelowane z wynikami oznaczeń komercyjnym testem immunoenzymatycznym we krwi pełnej (o czym doktorantka wspomina), której próbki pobierano w okresie przed pozyskaniem materiału biopsyjnego (czyli do siódmej doby po transplantacji) – na stronie 20-tej doktorantka sama tłumaczy dlaczego te wyniki nie są wartościowe.

Z uwag drobnych:

- Nie bardzo rozumiem w jaki sposób doktorantka odróżnia proaktywne działanie takrolimusu w atopowym zapaleniu skóry od jego aktywności immunosupresyjnej, zwłaszcza że w przypadku leczenia chorych po transplantacjach narządowych również mamy do czynienia z działaniem wyprzedzającym (odrzucanie).

- Tabele 2-4 powinny zostać umieszczone po podrozdziałach, których dotyczą, a nie zbite w całość z i tak monumentalną Tabelą 1.
- Nie wszystkie skróty zostały wytłumaczone (LCPT, MS). Nawet jeżeli rozwinięto je w przypadku, kiedy stanowią część dłuższego skrótu, to skoro zostały użyte samodzielnie, również osobno powinny zostać przedstawione w spisie skrótów.

Cel pracy został sformułowany poprawnie, a podział na trzy etapy badań jest klarowny i logiczny. W przypadku etapu drugiego został on zmieniony w stosunku do źródłowej publikacji został on zmieniony, ale przez to lepiej funkcjonuje jako element cyklu prac. Niestety, w stosownym wykazie nie znalazłem wytłumaczenia skrótu LADME.

Jakkolwiek diagnostyka laboratoryjna nie jest dziedziną bliską recenzentowi, to jednak trudno mu nie zauważyć, że to praca w laboratorium stanowi prawdziwy żywioł doktorantki. Opisy metodyki, zarówno słusznie umieszczone w rozdziale Materiał i metody, jak i nie zawsze szczęśliwie w pozostałych rozdziałach, są napisane z wielką znajomością przedmiotu, w sposób wyczerpujący, a o osobistej pasji autorki świadczy to, iż miejscami przybierają one formę fabularyzowaną, co nie pozostawia wątpliwości nie tylko co do osobistego udziału doktorantki w przeprowadzonych badaniach, ale również jej samodzielności jako badacza. Biorąc pod uwagę samo omówienie w języku polskim, są to te fragmenty pracy które najbardziej przekonują o tym, że autorka zasługuje na stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Rozdział Wyniki i dyskusja wypada dosyć skromnie, zwłaszcza biorąc pod uwagę, że doktorantka mogła pełnymi garściami czerpać z publikacji źródłowych. Zwłaszcza w zakresie syntetycznego podsumowania zalet (i ewentualnych wad) opracowanych przez siebie metod diagnostycznych, jak również ich konfrontacji z bogato prezentowanymi propozycjami konkurencyjnymi, czytelnikowi pozostaje niedosyt. O ile moich większych zastrzeżeń nie budzą omówienia publikacji pierwszej i trzeciej, to mam istotne uwagi do sposobu prezentacji publikacji nr 2:

- Pomimo bardzo długiego rozdziału zatytułowanego „Wstęp”, w którym zawarte są również zagadnienia dotyczące oznaczenia stężeń w tkankach narządów przeszczepionych, doktorantka rozpoczyna to omówienie bez mała dwustronicowym wstępem, natomiast w ogóle brak jest jakiegokolwiek dyskusji.
- Doktorantka podejmuje niezrozumiałą dla mnie próbę dyskredytowania wartości pomiaru stężenia takrolimusu we krwi pełnej, przytaczając pojedynczą pracę w której pacjenci doświadczający odrzucania wątroby charakteryzowali się wyższymi stężeniami leku niż chorzy wolni od odrzucania, a czytelnika odsyła do publikacji nr 9, która nie ma z tym zagadnieniem nic wspólnego. Recenzent zrezygnował z próby odnalezienia właściwego źródła cytowania, ponieważ nawet jeśli taka publikacja istnieje, to w jego opinii nie podważa ona doświadczeń kilkudziesięciu lat, obejmujących dziesiątki tysięcy pacjentów, których dzięki tak niedoskonałemu narzędziu jak pomiar stężenia takrolimusu we krwi pełnej jednak udało utrzymać się przy życiu.

Wnioski sformułowane są poprawnie, z wyjątkiem pierwszego wniosku w grupie P2, co do którego nie wiadomo nawet czy odnosi się on do wyników doktorantki, czy przeglądu literatury.

Spis piśmiennictwa obejmuje 172 pozycje, obejmujących publikacje z lat 1995-2022, przy czym przeważają prace z drugiej dekady XXI-wieku. Nie budzi zastrzeżeń ani ich dobór pod względem merytoryki i aktualności, ani niewątpliwie doskonała orientacja doktorantki w literaturze obejmującej

przedmiot jej zainteresowań. Recenzent przyjąłby natomiast z wdzięcznością większą staranność w adresowaniu odnośników.

Pomimo naturalnego charakteru recenzji, która siłą rzeczy skupia uwagę na elementach krytykowanych, chciałbym w tym miejscu podkreślić ogrom pracy wykonanej przez autorkę w trakcie prowadzenia badań laboratoryjnych i wyrazić dla niej swoje uznanie. O samodzielności naukowej doktorantki najlepiej świadczy szeroki wachlarz zastosowanych przez nią i swobodnie modyfikowanych metod laboratoryjnych i wartościowe publikacje przyjęte do druku w renomowanych czasopismach recenzowanych. Ponadto głęboko wierzę w wymierny walor praktyczny wykonanej przez nią pracy i mam nadzieję, że będzie ona szeroko wykorzystywana dla poprawy jakości TDM u pacjentów po transplantacjach narządowych nie tylko w Polsce.

Wszystkie przedstawione przeze mnie krytyczne uwagi nie wpływają na wysoką ocenę przedstawionej pracy, w związku z czym z satysfakcją stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim, a jej autorka, pani mgr Magdalena Bodnar-Broniarczyk, udowodniła w ten sposób, że zasługuje na stopień doktora nauk medycznych. Wobec powyższego, z przyjemnością wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,



prof. dr hab. med. Michał Zakliczyński

Kierownik Kliniki Transplantacji Serca i Mechanicznego Wspomagania Krążenia,
Katedra Kardiologii i Transplantologii, Instytut Chorób Serca Wydziału
Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu