

Streszczenie rozprawy doktorskiej przygotowanej w oparciu o cykl publikacji

Terapeutyczne monitorowanie stężeniem takrolimusu i kwasu mykofenolowego z zastosowaniem mikropróbki objętościowo-absorpcyjnego połączonego z techniką LC-MS/MS u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki

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

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Dorota Marszałek

Transplantacja jest uważana za najlepszą metodę leczenia nerkozastępczego, szczególnie w schyłkowej fazie niewydolności nerek. Poza trudnościami wynikającymi z dostępności narządów, aspektów chirurgicznych, czy immunologicznych, w dalszym ciągu poszukuje się narzędzi pozwalających na optymalizację terapii immunosupresyjnej niezbędnej do końca życia biorcy. Szczególne trudności obserwuje się w grupie pacjentów pediatrycznych, u których brak przestrzegania zaleceń terapeutycznych (ang. *non-adherence*) dotyczących głównie przyjmowania leków, jest przyczyną ponad 70% epizodów odrzucania w pierwszym roku po transplantacji.

Podstawę leczenia immunosupresyjnego stanowi takrolimus (TAC), lek o budowie makrolidowej z grupy inhibitorów kalcyneuryny, który charakteryzuje się wąskim przedziałem terapeutycznych stężeń. Dodatkowym problemem jest duża zmienność w indywidualnej odpowiedzi na lek (zmienność wewnątrzsobnicza) oraz trudność w ustaleniu odpowiednich algorytmów populacyjnych dotyczących dopasowania dawki leku (zmienność międzysobnicza). Oznacza to, że dawka leku musi być dopasowana indywidualnie do pacjenta z zastosowaniem terapeutycznego monitorowania stężeniem leku (TML). TAC praktycznie całkowicie wiąże się z erytrocytami, dlatego w rutynowej praktyce klinicznej, oznacza się ilościowo progowe stężenie leku w pełnej krwi, tj. stężenie TAC przed przyjęciem porannej dawki leku (C_0), które powinno mieścić się w zakresie terapeutycznym 5-20 ng/ml.

Innym lekiem równie często stosowanym w terapeutycznym schemacie immunosupresyjnym jest inhibitor dehydrogenazy inozynomonofosforanowej (IMPDH), mykofenolan mofetylu (MMF), który jest prolekiem kwasu mykofenolowego (MPA).

Monitorowanie stężeń tego leku nie jest wykonywane rutynowo we wszystkich ośrodkach transplantacyjnych, nie mniej jednak jest rekomendowane ze względu na konieczność uniknięcia działań niepożądanych (toksyczność wobec szpiku kostnego, czy uporczywe biegunki). Pomimo tego, że przebieg farmakokinetyki MPA ma charakter liniowy, duża zmienność wewnątrzosobnicza i międzyosobnicza dodatkowo uzasadnia jego terapeutyczne monitorowanie. MPA wiąże się w dużym stopniu z białkami osocza i dlatego to ta frakcja krwi jest rekomendowaną matrycą biologiczną, w której oznacza się stężenie C_0 . Wartości stężeń C_0 powinny mieścić się w przedziale powinno mieścić się w zakresie 1-3,5 $\mu\text{g/ml}$.

W związku z tym, że TML oparte jest na częstych pobraniach próbek krwi, poszukuje się alternatywnej formy uzyskiwania materiału biologicznego, szczególnie dla dzieci, u których klasyczne pobranie jest wyjątkowo trudne i bolesne. Niedawno wprowadzona technika mikropróbki objętościowo-absorpcyjnego (VAMS) pozwala na pobranie określonej, relatywnie niewielkiej objętości krwi (10 - 30 μl), po nakłuciu palca lancetem, podobnie jak przy standardowym pomiarze glikemii. Pobrana próbka po suszeniu i użyciu odpowiednich odczynników ekstrakcyjnych poddawana jest właściwemu procesowi analitycznemu, najczęściej w oparciu o wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Dodatkowo, technika VAMS jest uznawana za niezależną od indywidualnego poziomu hematokrytu, w przeciwieństwie do bardziej popularnej techniki suchej plamy krwi (DBS, ang. *dried blood spot*).

Ze względu na specyfikę prowadzenia terapii immunosupresyjnej u pediatrycznych biorców przeszczepu nerki, nadrzędnym celem przedstawionej dysertacji było **opracowanie metod analitycznych LC-MS/MS służących oznaczaniu TAC i MPA w próbkach krwi włósniczkowej pobranej metodą VAMS w populacji pediatrycznej po przeszczepieniu nerki.**

Powyższy nadrzędny cel dopełniają cele szczegółowe: optymalizacja strategii pobrania materiału metodą VAMS u dzieci, dobranie warunków związanych z przygotowaniem próbki do oznaczenia LC-MS/MS, optymalizacja warunków chromatograficznych i pracy detektora MS, walidacja metod analitycznych LC-MS/MS oznaczania TAC w pełnej krwi i VAMS, oraz MPA w pełnej krwi, osoczu i VAMS, zgodnie z wytycznymi międzynarodowymi Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA). Dodatkowo, celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było badanie stabilności analitu w próbnikach VAMS w różnych warunkach przechowywania, ewaluacja potencjalnego, niepożądanego efektu hematokrytowego, jak również walidacja krzyżowa i kliniczna z rutynowo stosowanymi metodami oznaczania tych leków w diagnostyce laboratoryjnej.

Zaplanowane metody analityczne LC-MS/MS zostały z powodzeniem zwalidowane w odpowiednich zakresach kalibracji, zarówno dla TAC (0-60 ng/ml), jak również w przypadku MPA (0-15 µg/ml). Wyznaczone parametry walidacyjne spełniły kryteria akceptacji określone w wytycznych EMA i Międzynarodowego Towarzystwa Terapeutycznego Monitorowania Leków i Toksykologii Klinicznej (ang. *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*, IATDM&CT). W przypadku walidacji metod wykorzystujących VAMS nie zauważono wpływu poziomu hematokrytu na odzysk analitu z matrycy biologicznej. Opracowane metody zostały z powodzeniem wykorzystane w oznaczeniu stężeń TAC i MPA w próbkach pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki (n=50). Opisane protokoły walidacyjne zostały poddane walidacji krzyżowej, co dowiodło równoważności metod wykorzystujących pełną krew i VAMS dla TAC oraz MPA. Dodatkowo, ze względu na różnice w poziomach stężeń w osoczu i próbkach VAMS dokonano walidacji modelu korygującego stężenie z zastosowaniem regresji liniowej, co umożliwiło przeliczenie uzyskanego stężenia MPA oznaczonego w próbkach pobranych metodą VAMS, na przewidywane stężenie w osoczu. Jest to niezwykle ważne, że względu na fakt, iż obecne zakresy terapeutyczne dotyczą stężeń MPA w osoczu. Niniejszy model został dodatkowo zweryfikowany na grupie niezależnych próbek VAMS, co pozwoliło na uzyskanie pierwszej jak dotąd opisanej w literaturze formuły korelacyjnej spełniającej rygorystyczne kryteria akceptacji sformułowane przez IATDM&CT.

Prezentowana dysertacja oparta została na monotematycznym cyklu trzech publikacji, w tym dwóch prac eksperymentalnych, które w sposób wyczerpujący opisują opracowane metody LC-MS/MS oznaczania TAC i MPA, ich walidację analityczną, krzyżową i kliniczną. Opracowane protokoły analityczne zostały z powodzeniem zastosowane w terapeutycznym monitorowaniu leków immunosupresyjnych u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki leczonych w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” (IPCZD) w Warszawie.

Technika VAMS stwarza nowe możliwości w TML, nie tylko w przypadku leków immunosupresyjnych. Zarówno zalecenia producenta, jak i wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej świadczą o wysokiej stabilności pobranych próbek w różnych warunkach, co umożliwia samodzielne pobieranie próbek przez pacjenta lub jego opiekuna w domu bez obecności wykwalifikowanego personelu medycznego. Pobrana próbka po odpowiednim zabezpieczeniu może zostać przekazana do laboratorium diagnostycznego, a uzyskany wynik i rekomendacje terapeutyczne mogą zostać przekazane przez lekarza prowadzącego narzędziami teleinformatycznymi.

Technika VAMS może zostać użyta jako pewnego rodzaju strategia motywacyjna dla młodych pacjentów w zakresie przestrzegania zaleceń terapeutycznych, umożliwiającą częstsze kontrolowanie parametru C_0 leków immunosupresyjnych, którego fluktuacje są bezpośrednią konsekwencją zjawiska *non-adherence*. Dodatkowo zastosowanie VAMS w codziennej praktyce wydaje się atrakcyjne ze względu na niedawne ograniczenia w dostępie do opieki zdrowotnej w czasie pandemii SARS-CoV-2, jak również ze względu na nierzadkie trudności logistyczne z którymi muszą radzić sobie pacjenci i ich rodziny (jedyne pediatryczny ośrodek transplantacyjny w Polsce to IPCZD).

Według najlepszej wiedzy, opisane w niniejszej pracy zastosowanie techniki VAMS w populacji pediatrycznej w celu monitorowania leków immunosupresyjnych jest jednym z pierwszych opisanych w literaturze. Należy mieć nadzieję, że zapoczątkuje to szeroką optymalizację farmakoterapii i TML w oparciu o techniki mikropróbkowania.