



Kraków, 16.07.2018 r.

UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

RECENZJA

pracy doktorskiej wykonanej przez

mgr farm. Paulinę Nosal

pt. „Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w osoczu chorych dzieci
i dorosłych z uwzględnieniem aspektów genetycznych”

Wydział Farmaceutyczny

Terapia monitorowana stężeniem leku we krwi jest od lat szeroko stosowana w licznych ośrodkach klinicznych na całym świecie celem zwiększenia skuteczności i bezpieczeństwa farmakoterapii. Rutynowo monitoruje się wiele leków z różnych grup terapeutycznych, a proponowane zakresy stężeń terapeutycznych odnoszą się często także do określonych subpopulacji chorych, tj. osoby starsze, dzieci, noworodki, czy stanu chorego. W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na nowe leki, których monitorowanie może przynieść wymierne korzyści dla pacjenta i szpitala. Należą do nich, między innymi, leki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Konieczność monitorowania stężeń tych leków, nawet jeśli posiadają szeroki indeks terapeutyczny, wynika z narastającej w ostatnim okresie oporności patogenów wywołujących zakażenie i braku zadowalającej odpowiedzi na standardowe leczenie. Niezmiernie ważna jest także identyfikacja czynników, które wpływają na profil farmakokinetyczny i przyczyniają się do dużej zmienności międzyosobniczej w wielkości parametrów farmakokinetycznych stosowanych leków, przez co dobór właściwego schematu dawkowania jest niekiedy dużym wyzwaniem dla klinicysty.

Zakład Farmakokinetyki
i Farmacji Fizycznej

Praca doktorska mgr Pauliny Nosal wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Franciszka Główni, przy udziale dr Matyldy Resztak jako promotora pomocniczego, wpisuje się w ten nurt tematyczny. Jej zasadniczym celem była analiza czynników, które mogą wpływać na skuteczność leczenia inwazyjnych zakażeń grzybiczych z wykorzystaniem worykonazolu, leku przeciwgrzybiczego II generacji. W tym celu Doktorantka użyła wielu nowoczesnych narzędzi analitycznych i obliczeniowych oraz zgromadziła niezwykle cenny materiał kliniczny. Praca realizowana była przy współpracy z ośrodkami klinicznymi

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 57 20

fax +48 12 620 57 30

farmakokinetyka@uj.edu.pl

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Szpitala Uniwersyteckiego w Bydgoszczy, Szpitalem Specjalistycznym im. Jana Pawła II w Krakowie oraz Szpitalem Klinicznym Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Badania prowadzone były za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Farmakokinetyka leku będącego przedmiotem badań - worykonazolu jest złożona i stosunkowo słabo poznana, a wyniki niektórych badań nad tym lekiem, zwłaszcza z udziałem ludzi, są niejednoznaczne i niekiedy trudne do interpretacji. Dane literaturowe jasno wskazują, że terapia pod kontrolą stężenia tego leku we krwi może prowadzić do zwiększenia skuteczności leczenia i bezpieczeństwa jego stosowania. W swojej pracy doktorskiej mgr farm. Paulina Nosal podejmuje próbę wyjaśnienia przyczyn zmienności w farmakokinetyce tego leku w oparciu o dane pochodzące od różnorodnej pod względem wieku i stanu klinicznego grupy chorych hospitalizowanych z powodu inwazyjnej infekcji grzybiczej występującej w wyniku choroby nowotworowej. Tematyka podjęta przez Doktorantkę jest niezmiernie ważna i aktualna, przede wszystkim ze względu na obserwowane w ostatnich latach narastanie oporności na leki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Wśród przyczyn tego zjawiska wymienia się często, obok przedwczesnego przerwania leczenia, stosowanie zbyt niskich dawek leku. Jak wskazują wyniki wielu badań, pomiar stężenia leków przeciwdrobnoustrojowych we krwi może przyczynić się do istotnego zmniejszenia częstości występowania tego zjawiska.

Rozprawa mgr Pauliny Nosal liczy łącznie 161 stron i ma układ klasyczny, czyli składa się z części teoretycznej, celu pracy, części doświadczalnej, wyników, omówienia i dyskusji wyników oraz wniosków, a także 141 pozycji literaturowych umiejętnie cytowanych w tekście. W części teoretycznej Doktorantka przedstawia etiologię i podział zakażeń grzybiczych, następnie szeroko opisuje worykonazol z uwzględnieniem jego struktury chemicznej, mechanizmu działania, preparatów tego leku zarejestrowanych na rynku polskim, wskazań do jego stosowania oraz sposobu dawkowania. Szeroko przedstawiono w pracy farmakokinetykę worykonazolu, analizując poszczególne procesy ADME. Omówiono też czynniki modyfikujące te procesy. Wiele uwagi Doktorantka poświęciła polimorfizmowi genetycznemu głównego enzymu metabolizującego ten lek, jakim jest CYP2C19.

Przeanalizowano dostępne dane literaturowe dotyczące wpływu genotypu na farmakokinetykę oraz efekt farmakologiczny i działania niepożądane obserwowane po podaniu tego leku. Szczególną uwagę zwrócono na zjawisko autoindukcji, które często jest przyczyną niepowodzeń terapeutycznych oraz interakcje z innymi lekami. Cel pracy został jasno sprecyzowany i, zważywszy na trudny materiał kliniczny jakim Doktorantka dysponowała, jest on bardzo ambitny. Zaplanowane zadania badawcze pozwalają na osiągnięcia zakładanego celu i zostały zrealizowane w całości. Analizując uzyskane wyniki, Doktorantka poszukiwała korelacji, m.in. pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi a podana dawką, czy stężeniami minimalnymi badanego leku, pomiędzy efektem klinicznym czy toksycznym a stężeniem minimalnym, czy pomiędzy genotypem CYP2C19*2 oraz CYP2C19*17 a stężeniami leku czy jego parametrami farmakokinetycznymi. Wyniki tych analiz zostały szczegółowo przedyskutowane w pracy. Omówienie i dyskusja wyników, które są rzeczowe i wnikliwe, świadczą o dużej wiedzy Doktorantki nie tylko na temat samej choroby, ale także farmakokinetyki klinicznej worykonazolu. Konsekwencją tych rozważań są wnioski, trafnie podsumowujące całą pracę. Potwierdzają one tezę, że stosowanie standardowych dawek worykonazolu nie gwarantuje skuteczności terapii przeciwgrzybiczej, której efekt zależy od stężenia leku we krwi. Doktorantka wykazała, że stosowanie takich dawek prowadziło do uzyskania stężeń subterapeutycznych u około 40% badanych dzieci i 32% dorosłych. W pracy doktorskiej nie wykazano zależności pomiędzy genotypem a stężeniami worykonazolu we krwi badanych chorych, prawdopodobnie ze względu na małą liczebność grup badanych oraz brak w badanej populacji chorych homozygot, nosicieli dwóch alleli zmutowanych *2 lub *17, warunkujących zmieniony metabolizm worykonazolu. Dodatkowo poszukiwanie tej korelacji utrudniła obecność innych równocześnie stosowanych leków – induktorów lub inhibitorów enzymatycznych, które niezależnie od mutacji genowych modyfikowały stężenia worykonazolu we krwi. Istotny wpływ na poziom worykonazolu miało zjawisko autoindukcji, a spośród leków stosowanych równocześnie – obecność karbamazepiny. Wyniki przeprowadzonych badań jasno wskazują na konieczność monitorowania stężeń worykonazolu, zwłaszcza u dzieci i pacjentów poddanych terapii wielolekowej.

Przeprowadzone badania dostarczają bardzo interesujących wyników, ukazując trudności na jakie napotyka lekarz czy farmaceuta kliniczny podczas

prowadzenia terapii worykonazolem u pacjentów z ciężkim zakażeniem grzybiczym i współistniejącą chorobą nowotworową. W opisanej populacji chorych stwierdzono występowanie wielu różnorodnych zjawisk, tj. nieliniowość farmakokinetyki badanego leku, głównie ze względu na występowanie autoindukcji, interakcje farmakokinetyczne z równocześnie stosowanymi lekami, zmiany poziomu leku we krwi pod wpływem uszkodzenia funkcji wątroby, czy polimorfizm enzymów odpowiedzialnych za jego metabolizm. Oznaczenie stężeń leku w osoczu chorych pozwoliło na wyjaśnienie podłoża zmienności w farmakokinetyce worykonazolu i umożliwiło zmianę dawkowania, co u wielu pacjentów spowodowało poprawę stanu klinicznego. Wyniki zgromadzone w ramach pracy doktorskiej mgr Pauliny Nosał, chociaż nie we wszystkich aspektach spójne, głównie ze względu na złożoność farmakokinetyki leku i ciężki stan pacjentów oraz prawdopodobnie niepełny dostęp do danych pacjentów, można uznać za unikatowe i to nie tylko w skali kraju. Co więcej, zebranie tak wielu danych wymagało od Doktorantki dużych umiejętności w zakresie współpracy z lekarzami z wielu ośrodków w Polsce. Uzyskane wyniki mają przede wszystkim charakter poznawczy, ale mogą być także praktyczną wskazówką dla lekarzy odnośnie sposobu dawkowania tego leku u kolejnych chorych oraz sposobu pobierania próbek do monitorowania stężeń worykonazolu w osoczu. Jeszcze jednym ważnym osiągnięciem Doktorantki było opracowanie i walidacja, zgodnie z wytycznymi EMA, metody analitycznej, która umożliwiła oznaczenie badanego leku w osoczu z niewielkiej objętości próbki krwi w krótkim czasie i może być wykorzystywana w przyszłości do monitorowania stężeń worykonazolu oraz badań farmakokinetycznych nad tym lekiem w Katedrze Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Praca napisana jest bardzo starannie, poprawnie pod względem stylistycznym i gramatycznym. Wyniki przedstawiono w postaci licznych tabel i rycin, których zawartość została właściwie zinterpretowana. Ponadto praca zawiera liczne załączniki, w tym indywidualne profile stężeń u badanych chorych, formularz świadomej zgody, procedurę pobierania próbek, czy kartę danych pacjenta. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i zostały trafnie dobrane do rodzaju zadań badawczych i zamierzonego celu. Do oznaczenia stężeń badanych związków Doktorantka zastosowała metodę HPLC z detekcją fluorymetryczną, którą opracowała w ramach swojej pracy magisterskiej. Identyfikację

polimorfizmów genu CYP2C19 przeprowadziła przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy połączonej z analizą długości fragmentów restrykcyjnych. Do analizy uzyskanych wyników zastosowała profesjonalne programy komputerowe, takie jak: WinNonlin, czy Statistica.

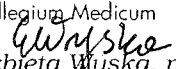
Po zapoznaniu się z przedstawioną do recenzji pracą nasuwają się następujące uwagi:

- Opracowując metodę analityczną nie przeprowadzono badań potwierdzających brak interferencji worykonazolu i standardu wewnętrznego z równocześnie stosowanymi lekami w opisanych warunkach analizy chromatograficznej. W ramach opisu walidacji metody analitycznej nie wspomniano o wynikach badań stabilności.
- Nie wyjaśniono, czym kierowano się przy wyborze standardu wewnętrznego. Ponadto, jak wynika z tabeli 26, amlodypina była stosowana u niektórych pacjentów w kombinacji z worykonazolem.
- Nie przedstawiono danych na temat przedziału dawkowania oraz wielkości dawki inicjującej worykonazolu (jeśli była stosowana) oraz opisu metody modyfikacji dawkowania worykonazolu celem uzyskania stężeń terapeutycznych.
- Szkoda, że nie udało się uzyskać wartości MIC dla poszczególnych pacjentów, co pozwoliłoby na porównanie tych wartości z uzyskanymi stężeniami leku w osoczu, a tym samym na uściślenie zależności stężenie-efekt.
- Oprócz analizy bezmodelowej, Doktorantka mogła pokusić się o przeprowadzenie analizy modelowej, przynajmniej dla podania dożylnego. Pozwoliłoby to na obliczenie jeszcze innych parametrów farmakokinetycznych, np. objętości dystrybucji czy klirensu.
- Nie podjęto próby oznaczenia metabolitu/ów worykonazolu. Znajomość stężeń tych związków mogła być pomocna w wyjaśnieniu przyczyn zmian w stężeniach badanego leku u niektórych chorych, zwłaszcza tych otrzymujących inhibitory enzymatyczne.
- W pracy można napotkać drobne błędy, głównie edytorskie np. takie jak: tabela 6 została zamieszczona zanim jej opis pojawił się w tekście, w metodyce badań nie wspomniano o badaniach biochemicznych, a metody obliczenia eGRF przedstawione w wynikach powinny raczej znaleźć się w rozdziale Część

doświadczalna, czas trwania analizy wg informacji zawartych w Omówieniu i dyskusji wyników to 12 min, tymczasem z chromatogramów (Ryc. 14 i 15) wynika, że analiza trwała co najmniej 15 min., krew pobierano od pacjentów leczonych przez minimum 6 dni (str. 39), tymczasem z Tabeli 19 wynika, że u niektórych chorych pomiary wykonywano wcześniej.

Przedstawione uwagi nie umniejszają w żadnym razie oceny merytorycznej pracy, która jest bardzo ambitna i nowatorska, a jej zawartość świadczy o dużej wiedzy i umiejętnościach Doktorantki, nie tylko w zakresie rozwoju i walidacji metod analitycznych, ale także analizy farmakokinetycznej i statystycznej. Ponadto Doktorantka doskonale posługuje się technikami biologii molekularnej, co umożliwiło jej poszerzenie badań o identyfikację polimorfizmów głównego enzymu odpowiedzialnego za metabolizm badanego leku. Realizacja pracy wymagała także umiejętności współpracy z lekarzami. Wyniki swoich badań Doktorantka przedstawiła w jednej pracy opublikowanej w czasopiśmie o zasięgu krajowym oraz trzech komunikatach na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

W posumowaniu należy stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca dostarcza wartościowych danych dotyczących farmakokinetyki worykonazolu u dzieci oraz osób dorosłych leczonych w polskich ośrodkach klinicznych z powodu inwazyjnych zakażeń grzybiczych. W trakcie realizacji pracy mgr Paulina Nosal wykazała się doskonałą znajomością warsztatu badawczego, umiejętnością właściwego doboru metod badawczych, dociekliwością i zdolnością prawidłowego formułowania wniosków z przeprowadzonych badań. Praca stanowi oryginalny i twórczy dorobek Doktorantki w zakresie nauk farmaceutycznych, ze szczególnym uwzględnieniem słabo reprezentowanej w Polsce dyscypliny, jaką jest farmakokinetyka kliniczna, oraz spełnia ustawowe wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi zmianami. W świetle powyższego, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr farm. Pauliny Nosal do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Zakładu
Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

dr hab. Elżbieta Wyśka, prof. UJ