



UNIwersYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Kałwak
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku,
Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
ul. Borowska 213, 50-368 Wrocław

Wrocław 31.08.2018

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr farmacji Pauliny Nosal

pt.: *Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w osoczu chorych dzieci i dorosłych z uwzględnieniem aspektów genetycznych.*

Inwazyjne zakażenia grzybicze należą do najcięższych powikłań u dzieci i dorosłych w przebiegu leczenia onkohematologicznego oraz po transplantacji komórek hematopoetycznych. Jednym z leków nowej generacji stosowanych zarówno w profilaktyce, jak i leczeniu infekcji grzybiczych jest worykonazol, który wykazuje szerokie spektrum działania i jest stosowany w leczeniu aspergilozy, kandydozy, fusariozy czy scedosporiozy. Wobec zmiennej i trudnej do przewidzenia farmakokinetyki leku oraz potencjalnie znacznej zmienności międzyosobniczej

w zakresie metabolizmu związanego z polimorfizmem genetycznym izoformy CYP2C19 terapeutyczne monitorowanie stężenia leku ma olbrzymie znaczenie. W tym kontekście pilotażowe badania Doktorantki są bardzo interesujące i wręcz nowatorskie z punktu widzenia poznawczego, jak i klinicznego, tym bardziej, że na chwilę obecną nie ma w Polsce laboratorium badawczego, w którym wykonywałoby się oznaczenia stężeń worykonazolu we krwi pacjentów. Dla Recenzenta to zatem wielki zaszczyt, by móc oceniać pracę dotyczącą tak istotnego naukowo i klinicznie tematu.

Przedłożona mi do oceny praca pt: „**Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w osoczu chorych dzieci i dorosłych z uwzględnieniem aspektów genetycznych**” liczy 161 stron i posiada typowy dla tego typu rozpraw układ. Składa się ze spisu treści oraz rozdziałów zatytułowanych: *Wykaz skrótów, Wstęp z Częścią Teoretyczną, Cele pracy, Część doświadczalna, Wyniki, Omówienie i dyskusja wyników oraz Wnioski*. W dalszej kolejności znajdują się: streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa, rycin i tabel oraz załączniki, które przedstawiają metodologię zbierania danych.

Spis treści jest bardzo przejrzysty i ułatwia czytanie pracy.

Całość *Wstępu* przedstawiona jest w sposób czytelny, w oparciu o najnowsze światowe publikacje. Jest on napisany zrozumiałym językiem i szczegółowo przedstawia zarówno elementy mikologiczne, jak i farmakologiczne, w tym farmakokinetyczne i farmakogenetyczne pracy. Nie mogę w pełni zgodzić się z Autorką pracy, iż infekcje grzybicze występują najczęściej do 30 dni po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Tak zachowują się jedynie zakażenia *Candida sp.*, zakażenia grzybami pleśniowymi (*Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Scedosporium*) często rozwijają się po 30 dniu od transplantacji w okresie leczenia immunosupresyjnego związanego z wystąpieniem choroby Przeszczep przeciwko Gospodarzowi. Recenzent znalazł we *Wstępie* bardzo cenną uwagę o znaczeniu limfocytów CD4+ w zwalczaniu zakażeń o etiologii *Aspergillus sp.* W aspergilozie worykonazol nie jest jednym z leków używanych do leczenia, a lekiem z wyboru o rekomendacji AI. Doktorantka we *Wstępie* porusza także problem skuteczności leczenia worykonazolem w zależności od stężenia leku we krwi. Warto wspomnieć, że o skuteczności leczenia może decydować bardziej stężenie leku w błonie

komórkowej pęcherzyka płucnego niż stężenie we krwi. Tu posakonazol ma zdecydowanie korzystniejszy profil farmakokinetyczny.

W Części teoretycznej jako Recenzent nie zgodziłbym się na uznanie utrzymującej się wysokiej gorączki mimo stosowanej szerokospektralnej antybiotykoterapii jako czynnika predysponującego do wystąpienia inwazyjnej grzybicy układowej. Jest to niewątpliwie jednak czynnik decydujący o konieczności wdrożenia terapii empirycznej. Niezwykle przejrzysta i bardzo informatywna jest Tabela 5, przedstawiająca warianty genotypów CYP2C19 i odpowiadającym im fenotypom. Rozdział 1.10 przedstawia problem autoindukcji worykonazolu jako jeden z powodów dużej zmienności międzyosobniczej w zakresie jego metabolizmu. Marzeniem Recenzenta byłoby przeprowadzenie badań nad autoindukcją w przypadku posakonazolu, który obecnie stosowany jest przewlekłe w profilaktyce pierwotnej i wtórnej grzybic układowych. Tabela 7 przedstawia najważniejsze interakcje worykonazolu z innymi lekami i jest ważna z punktu widzenia klinicysty. Trzeba pamiętać, że subterapeutyczne stężenia leku $< 1 \mu\text{g/ml}$ prowadzą do braku skuteczności terapii u 61% dzieci i aż u 86% u dzieci < 2 roku życia. Z całości Części teoretycznej jasno wynika, że terapeutyczne monitorowanie worykonazolu jest bardzo cennym narzędziem oceny skuteczności leczenia inwazyjnych grzybic, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych.

Doktorantka z niezwykłą starannością przedstawiła metodologię badań w Części Doświadczalnej. Dobór metod nie budzi zastrzeżeń, jest on adekwatny do postawionych konkretnych celów, a ich opis świadczy o bardzo dobrym opanowaniu praktycznym przez Doktorantkę. Do oznaczeń leku zastosowano opracowaną i zwalidowaną w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMP metodę HPLC z detektorem fluorescencyjnym. Przed zastosowaniem do analizy worykonazolu w próbkach biologicznych metoda poddana była częściowej walidacji, co świadczy o doskonałym „warsztacie badawczym” stworzonym przez Promotora pracy. Próby kontrolne w zakresie krzywej wzorcowej, a w szczególności próbki kliniczne potwierdziły przydatność metody do terapeutycznego monitorowania stężenia leku (TDM). Istotnym aspektem w opracowaniu metody z przeznaczeniem do badań farmakokinetycznych zarówno u dzieci jak i dorosłych było zastosowanie małej objętości osocza wynoszącej $100 \mu\text{l}$, stąd możliwe było ograniczenie ilości pobieranej krwi w każdym punkcie czasowym do 1 ml . Niezwykle wartościowym

elementem pracy jest analiza polimorfizmów genu CYP2C19 w zakresie CYP2C19*2 i CYP2C19*17 u 17 pacjentów. Z pozycji Recenzenta wydaje się, że zamiast „poziom” lepiej byłoby używać słowa „stężenie” worykonazolu w osoczu.

Ostatni cel pracy: „Ocena interakcji leków przyjmowanych przez pacjentów wraz z worykonazolem oraz ich potencjalnego wpływu na farmakokinetykę worykonazolu” to cel niezwykle ważny, ale bardzo trudny do zrealizowania z powodu heterogenności grupy i częstych zmian w politerapii pacjentów.

Wyniki badań zostały przedstawione opisowo oraz w formie przejrzystych tabel i rycin, w tym bardzo sugestywnych wykresów korelacji.

Badaniom stężeń worykonazolu w osoczu poddanych zostało 36 osób w tym 23 dzieci i 13 dorosłych. Choć liczba pacjentów wydaje się niewielka, pamiętać trzeba o specyfice pacjentów onkohematologicznych i o tym, że w celu realizacji pracy nawiązano kontakt z kilkoma ośrodkami w kraju. W rozprawie doktorskiej mgr farm. Pauliny Nosal znajdujemy bardzo wiele cennych spostrzeżeń o znaczeniu klinicznym. Analiza stężeń minimalnych worykonazolu wykazała poziomy subterapeutyczne poniżej $1 \mu\text{g/ml}$ w 40% wykonanych analiz u dzieci i 32% u dorosłych. Niezwykle cennym spostrzeżeniem Doktorantki jest stwierdzenie, że przyczyną niskich stężeń worykonazolu u chorych, wymagającą modyfikacji dawkowania, a nawet zmiany strategii terapeutycznych jest zjawisko autoindukcji metabolizmu leku oraz interakcja z karbamazepiną. Wysokie stężenie leku może być spowodowane uszkodzeniem wątroby poprzez np. długotrwałą terapię metotreksatem. Bardzo wartościowym elementem *Wyników* jest Tabela nr 27, przedstawiająca potencjalne interakcje leków stosowanych razem z worykonazolem u badanych pacjentów. Dobór metod statystycznych jest bardzo staranny i świadczy o doświadczeniu naukowym Doktorantki.

W *Omówieniu i Dyskusji Wyników* Doktorantka analizuje wyniki swoich badań konfrontując własne spostrzeżenia z wnioskami innych badaczy zajmujących się podobnymi zagadnieniami. Należy podkreślić umiejętność korzystania przez nią z piśmiennictwa naukowego oraz jej wiedzę teoretyczną dotyczącą badanych zagadnień. Doktorantka stara się nie tylko zinterpretować obserwacje własne, ale też wyjaśnić przyczyny zaobserwowanych zjawisk. Poczynione przez nią obserwacje i szczegółowe analizy statystyczne mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale również

kliniczno-praktyczne. Po przeczytaniu pracy czytelnik nie będzie miał wątpliwości, że terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w trakcie leczenia grzybic układowych stanowi dużą wartość kliniczną i powinno stanowić nieodzowny element terapii grzybic układowych w polskich ośrodkach leczniczych. Autorka wykazuje się także, godnym pochwały, samokrytycyzmem. Słusznie wnioskuję, że powodem braku zależności pomiędzy genotypami pacjentów a stężeniami leku może być mało liczna statystycznie grupa badana, jak również inne czynniki pozagenetyczne, wpływające na metabolizm worykonazolu np. stan fizjologiczny pacjenta czy przyjmowane leki.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr farm. Pauliny Nosal pt.: „**Terapeutyczne monitorowanie worykonazolu w osoczu chorych dzieci i dorosłych z uwzględnieniem aspektów genetycznych**” spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13 ust.1 „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym”, stawiane rozprawom doktorskim. Mam przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu o dopuszczenie mgr farmacji Pauliny Nosal do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Drobne uchybienia przedstawione w tekście recenzji w niczym nie obniżają olbrzymiej poznawczej wartości pracy, mającej istotne implikacje kliniczne. Wobec wysokich walorów rozprawy doktorskiej mgr farmacji Pauliny Nosal wnioskuję o nagrodzenie pracy.

Prof. dr hab. Krzysztof Kałwak


Krzysztof Kałwak

Prof. dr hab. Krzysztof Kałwak
Specjalista chorób dzieci
immunologii klinicznej,
transplantologii klinicznej,
onkologii i hematologii dziecięcej.
3470965