

Dr hab. n. med.  
Ilona Idasiak-Piechocka  
Katedra i Klinika Nefrologii,  
Transplantologii i Chorób Wewnętrznych  
Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Poznań, dnia 29 września 2020 roku

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DISCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	02-11-2020
L. dz. RN-BM/	1459/2020

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. Joanny Pondel

pt. „ Ocena przydatności klinicznej monitorowania stężenia mykofenolanu mofetylu w glomerulopatiach „

Zgodnie z powołaniem mnie na recenzenta przez Radę Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu mam zaszczyt przedstawić opinię powyższej rozprawy.

Kłębuszkowe zapalenie nerek (KZN) jest jedną z najczęstszych przyczyn schyłkowej niewydolności nerek . Dokładna patogenezę choroby wciąż nie jest jasna a wiele czynników genetycznych, hormonalnych i infekcyjnych indukuje zaburzenia odpowiedzi immunologicznej leżące u podstaw rozwoju choroby. Jej przebieg charakteryzuje postępujące upośledzenie czynności nerek związane z obserwowanymi w badaniach histopatologicznych: sklerotyzacją kłębuszków nerkowych, włóknieniem otaczającej tkanki śródmiąższowej i atrofią cewek. Nasilenie i szybkość spadku filtracji kłębuszkowej zależy od postaci morfologicznej KZN, aktywności procesów zapalnych toczących się w nerce oraz innych tzw. nieimmunologicznych czynników ryzyka jak białkomocz, nadciśnienie tętnicze, pobudzenie układu renina-angiotensyna, zaburzenia lipidowe, cukrzyca, otyłość. Wczesne rozpoznanie choroby i zastosowanie optymalnego sposobu leczenia immunosupresyjnego jest kluczowe dla uzyskania remisji choroby i opóźnienia rozwoju schyłkowej niewydolności nerek. Choroba ma charakter przewlekły, cechuje się epizodami remisji i nawrotów dlatego zastosowanie optymalnej dawki leków i adekwatnego czasu leczenia jest niezwykle istotne zarówno dla skuteczności terapii jak i dla zminimalizowania ryzyka zarówno wczesnych jak i późnych jej powikłań. Mimo wieloletnich badań nie ma złotego i skutecznego standardu terapii immunosupresyjnej glomerulopatii w tym pierwotnego KZN i nie ma też idealnych markerów, których monitorowanie pozwoliłoby na ocenę skuteczności leczenia. W dostępnym piśmiennictwie w terapii glomerulopatii pierwotnych i wybranych wtórnych zalecane jest stosowanie takich leków jak: leki z grupy glikokortykosteroidów, inhibitory kalcyneuryny, leki antyproliferacyjne w tym (mykofenolan mofetylu lub azatiopryna), a także

przeciwciała monoklonalne m.in. rytuksymab. Pochodne kwasu mykofenolowego są często stosowane w leczeniu przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek jako leki pierwszego lub drugiego rzutu w przypadkach opornych na wcześniejszą terapię. W literaturze znaczenie monitorowania stężeń kwasu mykofenolowego (MPA) u biorców przeszczepów narządowych jest dobrze opisane i odpowiednie dawki leku są ustalone i rekomendowane natomiast znaczenie monitorowania stężenia tego leku u chorych z glomerulopatiami jest nadal w zakresie badań i określenia przydatności.

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania podjęty przez lek. Joannę Pondel temat dotyczący monitorowania stężenia kwasu mykofenolowego i jego znaczenia dla przebiegu klinicznego glomerulopatii jest niezwykle istotny zarówno z punktu widzenia naukowego jak i praktyki klinicznej. Wobec nielicznych danych literaturowych podjęty przez Doktorantkę temat stanowi duże wyzwanie i ma charakter zdecydowanie nowatorski w kontekście analizowanych jednostek chorobowych.

Celem głównym pracy było poszukiwanie zależności pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi stosowanego w leczeniu kwasu mykofenolowego a wykładnikami aktywności kłębuszkowego zapalenia nerek oraz funkcją nerek. Dodatkowym założeniem pracy było określenie zależności pomiędzy stężeniami całkowitego MPA mierzonymi metodą EMIT a stężeniami wolnej frakcji MPA oznaczonymi za pomocą metody LC-MS/MS. Cel pracy został przejrzysto skonstruowany i konsekwentnie realizowany.

Przedstawiona do oceny praca rozmieszczona jest na 108 stronach, ma układ typowy dla rozpraw doktorskich i zawiera 12 rozdziałów, wykaz stosowanych skrótów i liczące 124 pozycji piśmiennictwo.

We wstępie, który liczy 24 strony, Autorka szczegółowo i profesjonalnie przedstawia charakterystykę mykofenolanu mofetylu (MMF), jego właściwości farmakodynamiczne, mechanizm działania oraz farmakokinetykę leku. W sposób obszerny świadczący o znajomości tematu i doskonałej orientacji Doktorantki w analizowanych zagadnieniach, trafnie charakteryzuje poszczególne pierwotne postaci morfologiczne przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek oraz wybrane wtórne kłębuszkowe zapalenia nerek przedstawiając ich patogenezę przebieg kliniczny, rokowanie i aktualne możliwości terapeutyczne. Przedstawiony wstęp bardzo dobrze uzasadnia celowość podjętej tematyki rozprawy doktorskiej i wskazuje na jej nowatorski charakter.

Grupę badaną stanowiło 52 pacjentów z kłębuszkowym zapaleniem nerek zakwalifikowanych na podstawie poniższych kryteriów: wiek powyżej 18 lat, rozpoznanie



KZN potwierdzone biopsyjnie, stadium przewlekłej choroby nerek (PChN) 1-4, terapia MMF co najmniej od 1 miesiąca, równy podział dawki dobowej na 2 lub 3 dawki. Wyłączono pacjentów, u których brakowało któregośkolwiek pomiaru stężenia MPA w założonym schemacie. Materiał jest zróżnicowany a kryteria kwalifikacji chorych jasne i właściwie wybrane, choć zwraca uwagę fakt, że liczba analizowanych chorych, w niektórych grupach jest mała co może utrudniać interpretację uzyskanych wyników. Metodologia badań i opisane techniki badawcze są nowoczesne, prawidłowe dobrane, zgodne ze współczesnymi standardami i opisane szczegółowo. Niezwykle cenne jest uwzględnienie zarówno oceny stężenia całkowitego MPA mierzonymi metodą EMIT jak i stężenia wolnej frakcji MPA oznaczonymi za pomocą metody LC-MS/MS. W ocenie farmakokinetyki terapii MMF uwzględniono oprócz wyznaczonych  $C_0$ ,  $C_{30}$  i  $C_{120}$ ,  $C_{max}$  (mg/l) – stężenie maksymalne, tj. najwyższa wartość spośród oznaczonych stężeń  $C_{30}$  lub  $C_{120}$ , oraz  $AUC_{0-2h}$  (mg x h/l) – wyznaczany za pomocą metody zliczania pól trapezów (ang. *linear trapezoidal rule*). Niezwykle istotne jest też uwzględnienie stosunku wymienionych parametrów do przyjmowanej dawki dobowej (g) oraz przyjmowanej dawki dobowej z uwzględnieniem masy ciała (mg/kg m.c.). W przypadku charakterystyki wolnej frakcji MPA stosowano analogiczne parametry. W pracy analizowano też wyniki badań biochemicznych takie jak: morfologia krwi, stężenie kreatyniny, mocznika, białka całkowitego i albumin, badanie ogólne moczu, szacunkowy białkomocz dobowy. Analizowane dane kliniczne obejmowały rozpoznanie histopatologiczne biopsji nerek, współchorobowość i stosowane schematy leczenia. Opisane powyżej parametry farmakokinetyki leku co jest dużym atutem pracy i jej elementem nowatorskim korelowano z przebiegiem klinicznym i aktywnością choroby z uwzględnieniem stopnia uszkodzenia funkcji nerek. Aktywność choroby określono na podstawie jasnych kryteriów wg punktacji opartej o ocenę wielkości białkomoczu i aktywnego osadu moczu. Funkcję nerek oceniano wg kryteriów podziału przewlekłej choroby nerek zgodnie z wytycznymi KDIGO 2012. Celem korelacji danych z przebiegiem klinicznym choroby dokonano podziału chorych na podgrupy pod względem płci, przyjmowanych leków immunosupresyjnych, funkcji nerek i aktywności KZN.

Zastosowane w analizie metody statyczne są adekwatne i nie budzą zastrzeżeń.

Wyniki badań, które są bardzo starannie opracowane przedstawiono szczegółowo w 40 tabelach a schemat stosowanej metody liczenia pola powierzchni pod krzywą stężenie/czas zilustrowano ryciną. Podkreślenia wymaga fakt bardzo dokładnego, umiejętnego i przejrzystego opracowania przez Doktorantkę obliczeń parametrów farmakokinetycznych w

oparciu nie tylko o stężenie całkowitych MPA oraz MPA AUC<sub>0-2h</sub>, ale także uwzględnienie tych wartości w przeliczeniu na dawkę stosowanego leku oraz masę ciała. Podkreślenia wymaga fakt wykorzystania takich przedziałów czasowych oznaczania stężenia leku, których ocena może być stosowana w praktyce klinicznej podczas rutynowych wizyt ambulatoryjnych. Weześniejsze standardowe oznaczenie wykonywane celem obliczenia pola pod krzywą wymagały kilkakrotnych pobrań krwi w 12-godzinnym przedziale czasowym. Analizując korelację pomiędzy stężeniami MPA a MPA AUC<sub>0-2h</sub> nie stwierdzono związków pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi a dawką poranną oraz dobową, stwierdzono natomiast istotne statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy C<sub>0</sub> a dawką dobową i poranną w przeliczeniu na kg m.c., a także pomiędzy C<sub>120</sub> i AUC<sub>0-2h</sub> a dawką dobową w przeliczeniu na kg m.c.. Ujawnienie tych korelacji podkreśla jak istotne było zaplanowane przez Doktorantkę uwzględnienie dawki dobowej leku i m.c. analizowanych pacjentów. Bardzo ciekawa jest też analiza związku liczby dawek MMF stosowanych na dobę tzn. podania tej samej dawki dobowej w 2 lub 3 dawkach z obserwowanymi poziomami MPA. W grupie chorych, którzy stosowali 3 dawki leku stężenia C<sub>0</sub> i C<sub>120</sub> w przeliczeniu na dawkę dobową związaną z masą ciała były istotnie statystycznie wyższe niż w grupie chorych otrzymujących 2 dawki. Natomiast analiza parametrów laboratoryjnych wykazała bardzo ważną z punktu widzenia klinicznego zależność, że chorzy, którzy przyjmowali MMF w 3 dawkach podzielonych mieli istotnie statystycznie wyższe stężenie kreatyniny i mocznika oraz niższe wartości eGFR niż pacjenci, którzy otrzymywali MMF w 2 dawkach na dobę. Niezwykle ważna jest podjęta analiza wpływu pozostałych leków immunosupresyjnych na zakresy stężenia MPA. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w zakresie wartości C<sub>0</sub> w przeliczeniu na dawkę dobową w gramach. U chorych, którzy przyjmowali cyklosporynę A lub takrolimus, stwierdzono istotnie statystycznie niższe stężenia C<sub>0</sub> w przeliczeniu na dawkę dobową niż u chorych, u których nie stosowano tych leków. W tym miejscu należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że zarówno analiza częstości dawek MMF jak i analiza jednoczesnego przyjmowania MMF i inhibitorów kalcyneuryny dotyczy podgrup o małej liczebności. Należy jednak zaznaczyć, że ta mała liczebność może wynikać z tego, że leczenie glomerulopatii szczególnie pierwotnego KZN w schematach immunosupresyjnych trójlekowych nie jest terapią standardową w odróżnieniu od leczenia chorych po przeszczepieniu narządów mięjszowych w tym nerki. W pracy wykazano też inne ciekawe słabe czy umiarkowane korelacje stężenia C<sub>0</sub> z parametrami biochemicznymi np. aminotransferazami.



Dowodem dużej umiejętności Doktorantki co do przeprowadzonej analizy danych jest przedstawienie zależności między stężeniami wolnej frakcji a stężeniami całkowitymi MPA oraz korelacja stężenia wolnej frakcji MPA a badanymi parametrami laboratoryjnymi. Warte zauważenia jest wykazano dodatnia korelacje pomiędzy stężeniem kreatyniny a  $fC_{120}$  oraz  $fC_{120}$ /dawkę dobową z uwzględnieniem masy ciała, a także pomiędzy stężeniem mocznika a  $fC_{120}$ ,  $Cf_{120}$ /dawkę dobową oraz  $fC_{120}$ /dawkę dobową z uwzględnieniem masy ciała. Wyniki przeprowadzonej analizy związku parametrów farmakokinetycznych oraz wykładników aktywności KZN wykazały istotną statystycznie dodatnią zależność pomiędzy  $fAUC_{0-2h}$  oraz stężeniami białka całkowitego i albumin. Te wnikliwe analizy pozwoliły też na wysunięcie bardzo istotnego wniosku, że wartości stężeń MPA oznaczanych metodą EMIT oraz wolnej frakcji MPA metodą LC-MS/MS są ze sobą silnie skorelowane, co wskazuje, że wykonywanie pomiaru wolnej frakcji MPA metodą LC-MS/MS nie jest konieczne w rutynowej ambulatoryjnej praktyce w populacji chorych z kłębuszkowymi zapaleniami nerek.

Z punktu widzenia klinicznego i przebiegu glomerulopatii istotny był podjęty przez Doktorantkę temat analizy zależności stężeń MPA i nasilenia aktywności choroby. Wykazano, że wartości maksymalne stężeń MPA ( $C_{30}$  i  $C_{max}$ ) oraz te stężenia w przeliczeniu na dawkę dobową i po uwzględnieniu masy ciała a także  $AUC_{0-2h}$  znormalizowane względem dawki dobowej oraz po uwzględnieniu masy ciała są istotnie statystycznie niższe w grupie aktywnego KZN w porównaniu do chorych, którzy zostali zakwalifikowani do grupy z nieaktywnym KZN. Chorzy nie różnili się wartościami  $C_0$ . Jest to cenna obserwacja sugerująca, że farmakokinetyka leku może mieć wpływ na skuteczność leczenia i że korzystniejszym markerem niż  $C_0$  może być monitorowanie wartości MPA ( $C_{30}$  i  $C_{max}$ ) oraz  $AUC_{0-2h}$ .

Ogromną wartość podjętego przez Doktorantkę tematu podkreśla niezwykle cenna w przedstawionej pracy długofalowa analiza danych i odniesienie parametrów farmakokinetycznych MPA, uzyskanych na początku obserwacji, do wykładników aktywności choroby po 3 i 12 miesiącach badania, w celu oceny przydatności pomiarów stężeń leku oraz  $AUC_{0-2h}$  i ich znormalizowanej formy do prognozowania stanu aktywności KZN. Analizując chorych pod względem aktywności stwierdzono istotne statystycznie różnice w zakresie wartości  $C_{30}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-2h}$ . Osoby z nieaktywnym, według założonych kryteriów, KZN miały istotnie statystycznie wyższe poziomy  $C_{30}$  i  $C_{max}$  względem chorych, u których proces chorobowy był aktywny. U osób uznanych w badaniu za nieaktywne po 12

miesiącach stwierdzano istotnie statystycznie wyższe poziomy  $AUC_{0-2h}$  w momencie włączenia do badania niż u chorych z aktywnym KZN. Jednocześnie co jest istotne z punktu widzenia klinicznego stwierdzono dodatnie korelacje pomiędzy  $C_{30}$  i  $C_{max}$ , także po normalizacji względem dawki dobowej i masy ciała, a stężeniem białka całkowitego i albumin a ilość białka w moczu porannym korelowała ujemnie w sposób istotny statystycznie z  $C_{max}$ ,  $C_{30}$  po uwzględnieniu dawki dobowej oraz MPA  $AUC_{0-2h}$ , także po normalizacji względem dawki dobowej. Te obserwacje mogą okazać się niezwykle przydatne w praktyce klinicznej. W tym miejscu należy też podkreślić, że tego typu analizy i wpływ ekspozycji na MPA w odniesieniu do chorych z pierwotnymi glomerulopatiami nie były wcześniej publikowane tym bardziej ich nowatorski charakter wymaga zaznaczenia. Przedstawione obserwacje są niezwykle cenne i być może przeprowadzone na większych grupach chorych wobec udowodnionej zmienności osobniczej będą podstawą dla indywidualizacji leczenia i modyfikacji dawki leku w trakcie terapii, w odróżnieniu od obecnie stosowanych stałych dawek leków, w celu poprawy skuteczności leczenia i rokowania.

W omówieniu Autorka umiejętnie dyskutuje swoje wyniki badań i różnice z doniesieniami z piśmiennictwa szczegółowo i szeroko je analizując. Niezwykle cenny jest fakt, że Doktorantka sama zwraca uwagę na to, że mała liczebność grup może być potencjalną przyczyną obserwowanych niekiedy rozbieżności uzyskanych wyników i nie pozwala na wysunięcie dodatkowych wniosków. Na koniec omówienia Doktorantka słusznie wskazuje, że obiecującymi wskaźnikami rokowniczymi wydają się być oznaczenia stężenia MPA:  $C_{30}$  lub  $C_{max}$  oraz MPA  $AUC_{0-2h}$ , znormalizowane względem dawki i masy ciała a ich ocena byłaby przydatna w praktyce klinicznej.

Prezentowane wnioski w liczbie 5 odpowiadają zaplanowanym celom pracy. Przedstawione wnioski zachęcają i są silną podstawą dla kontynuacji badań ze względu na ich dużą potencjalną przydatność kliniczną.

Piśmiennictwo w liczbie 124 pozycji jest właściwie dobrane i aktualne.


W podsumowaniu należy podkreślić, że praca napisana jest z niezwykłą starannością i cechuje się dużą estetyką wykonania. Przedstawioną rozprawę doktorską i podjęty przez Doktorantkę temat oceniam bardzo wysoko zarówno z punktu widzenia naukowego jak i klinicznego. Na szczególne podkreślenie zasługuje nowatorski charakter pracy, gdyż przedstawione analizy były przeprowadzone pierwszy raz w grupie chorych na pierwotne przewlekłe KZN. Zaprezentowane wyniki badań ze względu na ogromną przydatność

kliniczną stanowią też silną podstawą dla ich kontynuacji, co jak sama Doktorantka sugeruje pozwoli na ustalenie wartości granicznych, tzw. punktu odcięcia dla stężenia MPA a dzięki temu oznaczenia stężenia MPA mogłyby być zastosowane w praktyce klinicznej. Wyniki przedstawionych badań stanowią też dobry punkt wyjścia dla rozważenia konieczności monitorowania stężenia MPA celem modyfikacji dawki MMF w trakcie terapii glomerulopatii co może poprawić skuteczność leczenia i być niezwykle cennym narzędziem dla nefrologa, który często musi podjąć trudne decyzje terapeutyczne wpływające na przebieg choroby, powikłania i dalsze rokowanie.

Wobec przedstawionej analizy i podsumowania stwierdzam, że praca lek. Joanny Pondel w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, poz.959, z późn. Zm.), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosuję też do Wysokiej Rady o przyznanie wyróżnienia dla przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku

  
dr hab. n. med. Hona Idasiak-Piechocka