UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD FARMACJI FIZYCZNEJ I FARMAKOKINETYKI

ul. Święcickiego 6
60-781 Poznań

tel. 061 854 64 37
fax 061 8546430
e-mail: glowka@ump.edu.pl

**Prof. dr hab. Franciszek Główka, prof. zw.**

Poznań, 4 września 2022 r.

**Ocena**

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Przejczowskiej-Pomierny: *Ocena wpływu sepsy na farmakokinetykę wybranych leków o różnych współczynnikach ekstrakcji wątrobowej u myszy,* w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Dokumentacja zawarta we wniosku Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, stanowiąca podstawę wykonania oceny, spełnia wymogi ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.).

Mgr Katarzyna Przejczowska-Pomierny rozprawę doktorską wykonała w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Elżbiety Wyski.
Wyniki badań stanowiące podstawę rozprawy zostały częściowo opublikowane w jednej pełnotekstowej pracy naukowej pt: *Enantioselective analysis of ibuprofen enantiomers in mice plasma and tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Application to a pharmacokinetic study* w renomowanym, czasopiśmie o cyrkulacji międzynarodowej, Chirality (2017). Ponadto część wyników stanowiących fragment niniejszej rozprawy, a dotycząca amin katecholowych była przedmiotem doniesienia prezentowanego na międzynarodowej konferencji (2013) oraz trzech komunikatów przedstawionych na krajowych konferencjach (2012, 2014, 2015). Tym samym Doktorantka wypełniła ustawowe wymogi dotyczące posiadania w dorobku artykułu naukowego opublikowanego w czasopiśmie naukowym i w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowej. Zastanawiający jest dość

długi czas między powstaniem publikacji, zwłaszcza doniesień zjazdowych, a przygotowaniem rozprawy w 2022 r.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Przejczowskiej-Pomierny posiada układ przyjęty dla tego typu prac. Na początku Doktorantka zamieściła temat rozprawy oraz informację o finansowaniu badań ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, następnie spis publikacji i doniesień zjazdowych będących efektem zrealizowanych badań. W dalszej części przedstawiła spis treści rozprawy. Dysertacja obejmuje 5 rozdziałów części teoretycznej, cel pracy, 6 rozdziałów części doświadczalnej oraz dyskusję wyników, wnioski w formie opisowej, streszczenia w języku polskim i angielskim. Znaczną część stanowią pomocne dla czytelnika materiały uzupełniające. Liczne prezentowane piśmiennictwo obejmuje 244 pozycje. W tym miejscu pragnę zaznaczyć, że tylko około 30% to pozycje najnowsze z ostatnich 10 lat. Całość rozprawy łącznie z materiałami uzupełniającymi, bibliografią została przedstawiona na 193 stronach. Wyniki badań wraz z obliczonymi parametrami farmakokinetycznymi i walidacyjnymi zostały zebrane w 42 tabelach i na 46 rycinach. Stanowi to bogaty materiał do oceny merytorycznej pracy. Problematyka badawcza realizacji, której podjęła się mgr Katarzyna Przejczowska-Pomierny dotyczyła wciąż aktualnego zagadnienia współczesnej cywilizacji, jakim jest złożony zespół chorobowy określany jako sepsa. Dużym problemem w przypadku sepsy jest jej wysoka śmiertelność przy stosunkowo często mało skutecznej terapii, stąd wybór tematyki jest w mojej ocenie w pełni uzasadniony.

W części teoretycznej Doktorantka zawarła zagadnienia ściśle związane z tematyką rozprawy. W czytelny i bardzo interesujący sposób przedstawiła zagadnienie patofizjologii sepsy oraz roli układu nerwowego i endokrynnego w tym procesie chorobowym. Wykazała się też dużą znajomością wiedzy dotyczącej tego zagadnienia na poziomie molekularnym. Nawiązując do tematu pracy Doktorantka przedstawiła priorytety w leczeniu sepsy oraz wpływ sepsy na poszczególne etapy losu leków w żywym ustroju ujęte skrótowo terminem ADME. Szczególnie interesująco i ze znawstwem, jak przystało na badacza zajmującego się farmakokinetyką leków omówiła proces metabolizmu leków i czynniki istotnie wpływające na ich klirens wątrobowy, koncentrując się na farmakokinetyce leków o dużym i małym współczynniku ekstrakcji wątrobowej. Jako związki modelowe do swoich badań wybrała ibuprofen i werapamil.

Szczegółowo scharakteryzowała chiralny ibuprofen, znany i powszechnie stosowany w lecznictwie lek o właściwościach przeciwzapalnych, przeciwbólowych, o małym współczynniku ekstrakcji oraz werapamil, lek o dużym współczynniku ekstrakcji wątrobowej. Opierając się na modelu zwierzęcym oceniała wpływ sepsy na farmakokinetykę enancjomerów tych leków.

Cel pracy obejmujący ocenę wpływu zaawansowanej sepsy na farmakokinetykę stereoizomerów ibubrofenu i werapamilu Doktorantka sformułowała czytelnie. Przekonująco przedstawiła sposób jego realizacji stosując w tym celu myszy rasy CD-1, a sepsę indukowano przez podwiązanie i nakłucie jelita ślepego. Oceniła też stopień nasilenia wywołanej sepsy poprzez analizę czynników biochemicznych. Do oznaczeń enancjomerów ibuprofenu i werapamilu w matrycach biologicznych: osocze i tkanki narządów opracowała i zwalidowała metodę HPLC z detektorem fluoroscencyjnym i gradientową elucją analitów. Stężenia amin katecholowych oznaczała metodą HPLC z detektorem elektrochemicznym. Wartościowym rozwiązaniem zastosowanym przez Doktorantkę było umieszczenie w paragrafie „Materiały uzupełniające" szczegółowego opisu stosowanych metod oznaczania amin katecholowych, enancjomerów werapamilu oraz ibuprofenu. Podała też parametry walidacyjne stosowanych metod potwierdzające ich przydatność do oznaczeń wybranych chiralnych analitów w płynach i tkankach ustrojowych. Na uwagę zasługuje szczegółowy opis metody oznaczania enancjomerów ibuprofenu i jej pełna walidacja w osoczu myszy, buforze PBS i poszczególnych tkankach narządów: wątrobie, mózgu, nerkach, sercu, płucach i śledzionie. Analizowała też poziomy analitów w moczu w celu określenia enancjoselektywności eliminacji formy wolnej i związanej enancjomerów. Tym samym Doktorantka potwierdziła swoje umiejętności analityczne i profesjonalne podejście do oznaczania związków chiralnych w złożonej matrycy biologicznej i zasługuje to na moje uznanie jako recenzenta i bioanalityka z wieloletnim doświadczeniem badawczym w zakresie farmakokinetyki i analizy leków chiralnych. Podsumowując należy stwierdzić, że eksperymenty badawcze zostały prawidłowo zaplanowane.

Na podstawie oznaczonych stężeń enancjomerów w osoczu i tkankach Doktorantka obliczyła parametry farmakokinetyczne enancjomerów ibuprofenu i werapamilu za pomocą uznanych programów farmakokinetycznych WinNonlin i ADAPT 5 wykazując się dużą umiejętnością ich zastosowania w praktyce. Poprawnie stosowała testy

statystyczne do oceny istotności wpływu sepsy na zmiany poziomów enancjomerów stosowanych leków w badanym materiale biologicznym.

Wartym podkreślenia jest też rozszerzenie założeń pracy o opracowanie modeli fizjologicznych oraz ich zastosowanie do symulacji poziomów wybranych leków we krwi i tkankach ludzi. Bardzo znaczącym zadaniem realizowanym przez Doktorantkę było dokonanie symulacji stężeń ibuprofenu i werapamilu we krwi i tkankach chorych ludzi z sepsą na podstawie zmian patomorfologicznych obserwowanych u myszy. Doktorantka bazowała na bardzo bogatym i zróżnicowanym „farmakokinetycznie" materiale biologicznym uzyskując wartościowe wyniki dyspozycji enancjomerów leków w poszczególnych tkankach grupy kontrolnej myszy, jak i z wywołaną sepsą. Do opisu farmakokinetyki zarówno racematu jak i enancjomerów ibuprofenu Doktorantka stosowała analizę bezmodelową jak i przy użyciu modelu dwukompartmentowego stosując odpowiednie testy dopasowania modelu. Do opisu zmian stężenia enancjomerów i racemicznego werapamilu w czasie zastosowała model dwukompartmentowy, który w sposób najbardziej poprawny opisywał przebieg zmian stężenia analitów w osoczu myszy.

Dyskusję wyników Doktorantka prowadzi w dojrzały sposób wykazując się znajomością farmakokinetyki w szerokorozumiany sposób starając odnieść uzyskane wyniki do farmakokinetyki klinicznej u ludzi. W dyskusji wyników nawiązuje do nowych osiągnięć badawczych jak i znacznie wcześniejszych. Analiza poszczególnych parametrów farmakokinetycznych wykazała, że indukowana sepsa istotnie hamowała chiralną inwersję enancjomeru (-)-R w (+)-S, powodując zwiększony poziom tego enancjomeru w osoczu jak i w tkankach w porównaniu z grupą kontrolną. W efekcie obserwowano wzrost AUC tego enancjomeru, co w konsekwencji skutkowało zmniejszeniem stosunku AUC(S)/AUC(R), który był różny w poszczególnych narządach. Klirens metaboliczny ibuprofenu uległ zmniejszeniu pod wpływem sepsy, wynikiem czego nastąpiło wydłużenie biologicznego okresu półtrwania enancjomerów. Podobnie sepsa wpływała też na zmniejszenie eliminacji enancjomerów werapamilu, w efekcie obserwowano znacząco zmniejszony ich klirens całkowity w porównaniu z grupą kontrolną. Porównanie parametrów farmakokinetycznych uzyskanych w grupie myszy z indukowaną sepsą i w grupie kontrolnej pozwoliło Kandydatce do stopnia doktora na wysunięcie prawidłowego wniosku o znacznym wpływie sepsy na

farmakokinetykę leków, zwłaszcza tych o dużym współczynniku ekstrakcji wątrobowej. Jako przyczynę słusznie podaje zmniejszenie szybkości przepływu leku przez wątrobę. Prawidłowo też stwierdza, że w przypadku leków o zmniejszonym współczynniku ekstrakcji wzrost ułamka leku wolnego powoduje konieczność modyfikacji dawki, podobnie jak zmniejszenie przepływu krwi przez narządy w przypadku leków o dużym współczynniku ekstrakcji wątrobowej. Uzyskane dane potwierdziły założenia teoretyczne dotyczące klirensu leków o różnych współczynnikach ekstrakcji wątrobowej, a znaczącym osiągnięciem pracy badawczej było wykazanie jednak zmienionej farmakokinetyki w organizmie z zagrażającą życiu sepsą. W mojej ocenie całość przedstawionej rozprawy doktorskiej tworzy spójny sposób realizacji postawionego celu badawczego.

Uważam, że realizacja problematyki zmierzającej do poszerzenia wiedzy dotyczącej wpływu sepsy na farmakokinetykę leków chiralnych różniących się znacząco współczynnikami ekstrakcji wątrobowej jest oryginalnym osiągnięciem Doktorantki, które może przyczynić się do skuteczności farmakoterapii sepsy.

Odnosząc się do formy zaprezentowanej pracy, stylu pisania, to uważam, że praca napisana jest poprawnym językiem naukowym i z dużym zainteresowaniem ją przeczytałem. Doktorantka swobodnie stosuje w pracy terminologię obejmującą zagadnienia farmakokinetyki, w tym farmakokinetyki klinicznej, czy terminologii biochemicznej. Z uwag jakie nasunęły mi się podczas lektury dysertacji oprócz już wcześniej wspomnianych, to wskazane było zamieszczenie na początku pracy spisu stosowanych skrótów, co znacznie ułatwiłoby studiowanie literatury. Znalazłem w tekście sporo błędów, tzw. literówek, począwszy od pierwszej strony pracy, które można było łatwo poprawić.

W uzupełnieniu do informacji o ibuprofenie (str. 26), można też dodać, że w celu poprawy rozpuszczalności jest też stosowany w formie soli lizynowej.

Trudno mi się jednoznacznie zgodzić, że stwierdzeniem zawartym w paragrafie 4.2. Właściwości farmakokinetyczne, str. 27, „Po podaniu doodbytniczym biodostępność ibuprofenu jest nieco mniejsza, a proces wolniejszy". W przypadku czopków Imbun z solą lizynową ibuprofenu podanym królikom, biodostępność ibuprofenu była całkowita, a proces wchłaniania ibuprofenu podanego w formie soli lizynowej był znacznie szybszy niż w przypadku formy kwasowej (Bioavailability of racemic ibuprofen and its

lysinate from suppositories in rabbits. Hermann, TW, Główka, FK, ; Garrett, ER , J. Pharm. Sci, 82, 1102-111, 1993).

W określeniu "Wpływ sepsy na wartość współczynnika krew/osocze" uzupełniłbym współczynnika podziału krew/osocze. Ponadto proponuję stosować termin detektor fluoroscencyjny zamiast fluorymetryczny.

Podsumowując całość, wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Katarzyny Przejczowskiej-Pomierny, a drobne uwagi nie umniejszają jej wartości merytorycznej. Praca zawiera oryginalne osiągnięcie naukowe obejmujące wykazanie wpływu sepsy na farmakokinetykę leków chiralnych, o bardziej złożonej farmakokinetyce, charakteryzujących się dużym i małym współczynnikiem ekstrakcji wątrobowej. Wyniki badań mają charakter poznawczy jak i potencjalnie praktyczny poprzez uzyskanie wiedzy, że sepsa wpływa istotnie na proces eliminacji enancjomerów ibuprofenu i werapamilu, a tym samym może przyczynić się do poprawy efektywności farmakoterapii sepsy poprzez modyfikację dawki leku indywidualnie dla chorego.

Uważam, że zostały spełnione wymogi stawiane rozprawom doktorskim zawarte w art. 185, 186 i 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dalsze procedowanie zmierzające do nadania mgr Katarzynie Przejczowskiej-Pomierny stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Kierownik Katedry i Zakładu
Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
*Prof. dr hab. Franciszek Główka*