Oponentský posudek disertační práce v rámci kombinované formy doktorského studia, studijní program P5157 Lékařská farmakologie

Vypracoval:

MUDr.David Suchý, PhD

Oddělení klinické farmakologie FN Plzeň.

Název:

Terapeutické monitorování léčiv v klinické praxi a výzkumu

Nové možnosti TDM cyklosporinu A a jeho metabolitů po transplantaci ledvin

Doktorand: Mgr. Petra Halvová

(Oddělení klinické farmakologie, ÚLD FN Ostrava a Ústav klinické farmakologie Lékařské fakulty OU v Ostravě)

Školitel: Doc. MUDr. Milan Grundmann, CSc.

(Ústav klinické farmakologie Lékařské fakulty OU v Ostravě)

Předkládaná disertační práce Mgr. Halvové byla vypracována na Oddělení klinické farmakologie, ÚLD FN Ostrava a Ústavu klinické farmakologie Lékařské fakulty OU v Ostravě v rámci kombinované formy doktorského studia, studijní program P5157 Lékařská farmakologie.

Práce má 88 stran, 20 grafů, 92 literárních odkazů . V teoretických východiscích práce se autorka věnuje základním aspektům imunosupresivní léčby se zřetelem na použití kalcineurinových inhibitorů,cyklosporinu A(CsA) a jeho farmakokinetice, farmakodynamice, nežádoucím účinkům a lékovým interakcím CsA. Obsáhle je zpracována kapitola věnovaná metodám monitorování hladin CsA (TDM) prováděné s cílem optimalizovat imunosupresivní účinek cyklosporinu a snížit riziko nežádoucích lékových reakcí. V textu jsou rozebrány jednotlivé metody terapeutického monitorování cyklosporinu A , tj metody imunoanalytické, metody vysoko-účinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS, popř. LC-MS/MS). Zjevnou výhodou imunoanalytických metod je analýza velkého množství vzorků během krátkého času

a jednoduchost stanovení. Nicméně tyto metody nejsou dostatečně specifické a zkřížená reakce s četnými metabolity CsA způsobuje výrazné odchylky od skutečných hladin. HPLC metody jsou považovány za referenční metody stanovení CyA. Vyžadují však časově náročné extrakční postupy přípravy vzorků, které jsou důležité pro dobrou separaci. HPLC metody jsou také používány k měření CyA společně s jeho metabolity. V tom případě se pohybuje celkový čas analýzy v desítkách minut. Výhodnější ve stanovení CsA a jeho primárních metabolitů se jeví použití kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, tedy metodiky stanovení CsA v lynfocytech, která byla jako první na světě zavedena právě na pracovišti autorky.

V další části jsou definovány základní cíle práce:

1) zavést, optimalizovat a validovat metodu vysoko-účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí na stanovení cyklosporinu A a metabolitů AM1, AM9 a AM4N v plné krvi a separovaných periferních lymfocytech .
2) srovnat koncentrace cyklosporinu A a jeho metabolitů v krvi a lymfocytech .
3) sledovat vliv cyklosporinu A a jeho metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku.
4) využijí této metody pro terapeutické monitorování v běžné klinické praxi
5) sledovat vliv CsA a metabolitů na imunitní systém .

ad 1) Na pracovišti autorky byla vyvinuta a validována metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií ke stanovení koncentrace cyklosporinu A a jeho primárních metabolitů (AM1, AM4N a AM9) v krvi a lymfocytech

ad 2).srovnání TDM CsA a jeho metabolitů v C through, C2, C4 a AUC v krvi i v lymfocytech při dlouhodobém podávání. Byli sledováni pacienti s transplantací ledvin (n=14, skup.1), kde byly pacienti rozdělení i dle rychlosti nástupu funkce štěpu. Byli sledování i chroničtí pacienti dlouhodobě stabilní (n=54, skup.2). Byly monitorovány koncentrace CsA a metabolitů v krvi a lymfocytech a provedena korelaci koncentrací CsA a metabolitů analyzovaných v krvi a v lymfocytech.

ad 3). u 31 pacientů bylo provedeno 24-hodinové ambulantní monitorování krevního tlaku (ABPM) ve stejný den jako odběr krve na CsA. Sledování bylo provedeno 3x v 1-ročních intervalech. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin „dipper" či „non-dipper" (pokles nočního tlaku < 10%) a byl sledován vliv CsA a jeho primárních metabolitů na cirkadiální kolísání krevního tlaku.

ad 4) funkčnost imunitního systému byla na pacientech skupiny 1. testována testem transformace lymfocytů (TTL) po stimulaci fytohemaglutininem (PHA), pomocí produkce INF gamma po stimulaci PHA, antigenem cytomegaloviru a směsí antigenů M. tuberculosis za využití systému QuantiFERON firmy Cellestis.

Závěry práce:

1.Byla vyvinuta nová LC-MS/MS metoda vhodná pro terapeutické monitorování, tj pro stanovení koncentrace CsA a jeho primárních metabolitů nejen v krvi, ale i v lymfocytech,. Metoda LC-MS/MS je selektivní, velmi citlivá a specifická. Výhodou těchto metod oproti klasické HPLC je snadná příprava vzorku a krátký čas analýzy.

2. U skupiny s opožděným nástupem funkce štěpu byly v průběhu prvního týdne naměřeny signifikantně vyšší hladiny CsA před užitím v průměru o 50%, hladiny AM1 byly 5. den po transplantaci téměř trojnásobné. Byly nalezeny zejména významné rozdíly u AM4N -hladiny u DGF byly v prvním týdnu 15-20krat vyšší. Rozdíly u AM9 nebyly statisticky významné. Obdobné výsledky byly nalezeny i v lymfocytech.V rané fázi po transplantaci byla tedy zjištěna mj. významně vyšší koncentrace AM4N i AM1 v krvi i lymfocytech u pacientů , což souviset s opožděným nástupem normálních renálních funkcí po transplantaci ledvin

3. V souboru pacientů po transplantaci bylo zjištěno abnormální cirkadiální kolísání krevního tlaku téměř v 50% provedených měření. Velmi zajímavé je, že hladiny CsA a metabolitů AM1 a AM9 neovlivnily pokles nočního tlaku, statisticky významný rozdíl mezi skupinami „dipper" a „non-dipper" byl však nalezen u hladiny metabolitu AM4N v lymfocytech před užitím. Výsledek naznačuje, že zvýšená koncentrace výrazně lipofilního metabolitu AM4N v lymfocytech může být příčinou/ markerem „non-dippingu".

4. Použití QuantiFERON-CMV testu se zdá být v kombinaci s vyšetřením virové DNA jako zásadní k určení pacientů s rizikem CMV infekce.

Závěrečné zhodnocení:

Práce je standardně zpracována, použité metodiky jsou adekvátní a autorka získal celou řadu zajímavých a kvalitních údajů, které, pokud budou přeneseny do praxe, zlepší péči o pacienty

s IS terapií. Je třeba vyzvednout přehlednost adekvátní styl práce a rovněž kvalitní formální úpravu textu i příloh

Práce je tedy zdařilá, splnila svůj cíl a obsahuje řadu zajímavých a významných výsledků. Jako zásadní vnímám :

- V první řadě vývoj a použití nové selektivní, specifické citlivé analytické metody stanovení hladin CsA a metabolitů v krvi a lymfocytech , tedy LCMS/MS.
- popis farmakokinetiky CSA a jeho metabolitů v lymfocytech.
- Význam stanovení QTF pro predikci rizika CMV infekce
- V neposlední řadě i příspěvek práce k problematice cyklosporinem indikované hypertenze

. Rovněž oceňuji publikaci zásadních výsledků v časopisech s IF nebo recenzovaných časopisech(5 publikací , 2x jako spoluautor v časopise s IF, celkem 22 citací ve Web of Science) .

K obsahu práce nemám připomínky, mám tři otázky, které doporučuji v průběhu obhajoby vysvětlit.

1. TDM cyklosporinu v transplantologii, základní principy, AUC a predikce akutní rejekce.
2. Role P glykoproteinu v metabolismu CsA.
3. Mechanizmy vzniku hypertenze při terapii CsA, léčba.

Předloženou disertační práci doporučuji k obhajobě a udělení akademického titulu doktor(PhD) dle § 47 Zákova o vysokých školách č 111/98 Sb.

V Plzni dne 8.7.2015 MUDr.David Suchý, PhD

primář Oddělení klinické farmakologie FN Plzeň

Fakultní nemocnice Plzeň
Oddělení klinické farmakologie
Prim.: MUDr. SUCHÝ David, Ph.D.
301 00 Plzeň, Edvarda Beneše 1128/13