

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Klinika Nefrologii i
Transplantologii z Ośrodkiem Dializ

15-540 Białystok ul. Żurawia 14, tel.: (085) 7409458, fax: (085) 7434586, e-mail: bnaumnik@poczta.onet.pl

Białystok, 05.07.2021

Opinia
o dysertacji doktorskiej pt.
**Wpływ stężenia takrolimusu oznaczanego przed kolejną dawką na odległą
czynność przeszczepu nerki u dzieci mierzoną szacowanym wskaźnikiem
filtracji kłębuszkowej (eGFR)**

autorstwa lek. med. Jacka Rubika
praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. med. Ryszarda Grendy

Problematyka terapii immunosupresyjnej, jej jak najlepszego doboru, powikłań i wpływu na przeżycie zarówno graftu jak i pacjenta po zabiegu przeszczepienia narządu jest tematem istotnym oraz nieustannie aktualnym. Transplantacja nerki jest jedną z metod leczenia nerkozastępczego pacjentów ze schyłkową niewydolnością tego narządu i może być wykonana w trybie *pre emptive*, czyli przed rozpoczęciem dializoterapii lub w jej trakcie. Narząd może być pozyskany od osób żywych (najczęściej rodziny) lub zmarłych, którzy stanowią główną pulę narządów w Polsce. Na przestrzeni lat doszło do istotnej poprawy wyników leczenia tą metodą, do czego w dużej mierze przyczyniły się coraz lepsze leki i protokoły immunosupresyjne. Ogromne znaczenie ma również coraz doskonalszy algorytm doboru dawcy i oznaczanie przeciwciał skierowanych przeciwko jego antygenom. Niemniej jednak w ostatnich latach szybkość zmian w kierunku dalszej poprawy rokowania stała się wolniejsza.

W transplantologii narządów unaczynionych podstawowym lekiem stosowanym w protokołach trójlekowych zarówno u dzieci jak i u dorosłych jest inhibitor kalcyneuryny – takrolimus. Leczenie tym lekiem prowadzi się w oparciu o monitorowanie jego stężenia we krwi pełnej pobieranej przed podaniem kolejnej dawki (tzw. C_0). Zgodnie z zaleceniami

dawkę leku dostosowuje się do zakresów stężeń od lat uznanych za terapeutyczne. Przedziały te są różne w zależności od czasu po zabiegu transplantacji i dla stabilnych pacjentów o niskim ryzyku immunologicznym dawki dostosowuje się do stężeń z dolnego zakresu. Nieadekwatność immunosupresji w przypadku zbyt niskich stężeń grozi rozwojem humoralnego odrzucania i przyspieszoną utratą przeszczepu. Sytuacja taka ma miejsce w przypadku stosowania dawek subterapeutycznych leku bądź nieprzestrzeganiem przez pacjentów zaleceń (tzw. zjawisko *non-adherence*).

Koncepcja próby weryfikacji zakresu terapeutycznego stężenia takrolimusu uznawanego dotąd za optymalny, zwłaszcza w stosunku do jego wartości minimalnej, jest z jednej strony pomysłem nowatorskim, a z drugiej logiczną konsekwencją klinicznych dylematów.

Przedmiot podjętych przez Doktoranta badań jest ciekawy i uzasadniony - zarówno z uwagi na aspekty poznawcze, jak i codzienną praktykę kliniczną.

Monografia wraz z piśmiennictwem liczy 139 stron druku. Posiada typowy dla dysertacji doktorskich układ. Zwarty merytorycznie wstęp poprzedzony jest spisem treści, wykazem użytych w tekście skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Streszczenia są rzeczowe i merytoryczne, stanowią doskonały przewodnik po całości wykonanej pracy. Z obowiązku recenzenta nadmienię jedynie, że w streszczeniu, wynikach i wnioskach końcowych pojawia się stwierdzenie „niedoboru HLA” co nie jest określeniem precyzyjnym ponieważ odnosi się do gorszego czy nieidealnego doboru antygenowego i tak powinno być nazywane.

We *Wstępie* Autor najpierw przybliży zagadnienia związane z transplantacją nerki. Przedstawia kształtowanie się wskaźników przeżycia przeszczepu nerkowego u dzieci i opisuje wpływ różnych czynników na rokowanie odległe. Dyskutuje częstość i przyczyny zgonów dzieci po przeszczepieniu nerki, bardzo słusznie poświęcając dużo uwagi powszechnemu zjawisku *non-adherence* u młodocianych. Przedstawia zasady monitorowania funkcji graftu obszernie omawiając wskaźniki laboratoryjne, w tym szacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej (eGFR) oraz histopatologiczne, ze szczególnym zwróceniem uwagi na zalety i niejasności diagnostyczno-terapeutyczne biopsji protokolarnych. Bardzo istotnym fragmentem *Wstępu* jest omówienie znaczenia przeciwciał DSA w diagnostyce odrzucania

zależnego od przeciwciał (AMR) i stratyfikacji jego ryzyka. Obszerna część *Wstępu* została poświęcona lekom i protokołom immunosupresyjnym, których mechanizm działania i powikłania zostały rzetelnie omówione i przedstawione na rycinach. Kontynuacją tematyczną jest szczegółowy opis leczenia takrolimusem, jego mechanizmu działania, form farmakologicznych, zasad stosowania i monitorowania z uwzględnieniem zasadności oznaczania tzw. pola pod krzywą (AUC). Bardzo ciekawe jest przedstawienie czynników wpływających na zmienność wewnątrzsobniczą stężeń takrolimusu, które istotnie modyfikują dawkowanie preparatu również u dzieci. Ostatni ustęp tej części dysertacji został poświęcony historii, zasadom i stosowanym algorytmom terapeutycznym dotyczącym transplantacji nerek w Instytucie Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie, który jako jedyny ośrodek w Polsce prowadzi program przeszczepiania nerek u dzieci.

Opis jest wyczerpujący, informatywny i stanowi dobrą podbudowę merytoryczną do przeprowadzonego badania. Na szczególną uwagę zasługuje wielka staranność, syntetyczność, logika i ciągłość merytoryczna przytaczanych faktów co bardzo ułatwia wprowadzenie czytelnika w założenia przeprowadzonego badania. *Wstęp* kończy uzasadnienie hipotezy badawczej. Doktorant rzeczowo argumentuje potrzebę sprawdzenia czy optymalizacja leczenia przez zawężenie zakresu docelowych stężeń takrolimusu w indywidualnych przypadkach i wprowadzenie tzw. dawkowania restrykcyjnego miałyby korzystny wpływ na utrzymanie odległych wartości eGFR na jak najwyższym poziomie. Czy wręcz przeciwnie, dawkowanie liberalne, czyli dowolne ale pozostające w granicy szerokiego przedziału stężeń terapeutycznych leku, tak samo kontroluje wpływ wszystkich innych zmiennych na eGFR.

Z rozważań zawartych we wstępie Autor formułuje jeden cel podstawowy i trzy dodatkowe przeprowadzonego badania. *Cele* pracy, są zwięzłe, syntetyczne i logiczne. Za cel podstawowy Autor wytycza weryfikację odpowiedzi na pytanie: Czy stężenie takrolimusu C_0 ma niezależny od innych czynników wpływ na odległą czynność przeszczepu nerki u dzieci, mierzoną eGFR. Cele dodatkowe to weryfikacja odpowiedzi na trzy kolejno zadane pytania:

1. Czy zawężenie szerokiego „tradycyjnego” zakresu stężeń w okresie dawkowania podtrzymującego, to jest 5-10 ng/ml, może zapewnić korzyści w odniesieniu do odległej czynności przeszczepu?

2. Czy można wskazać grupę (lub grupy) pacjentów, dla których korzystne byłoby trwałe ograniczenie zakresu stężenia takrolimusu C_0 ?
3. Czy inne znane cechy kliniczne pacjentów modyfikują wpływ stężenia leku C_0 na czynność przeszczepu nerki?

Należy zwrócić uwagę, że Autor opracowania pokusił się o weryfikację istniejącego od wielu lat standardu prowadzenia pacjentów po transplantacji nerki, co dowodzi Jego dużej biegłości i świadomości klinicznej.

Populację do badań stanowiła grupa 94 dzieci ze schyłkową niewydolnością nerek, które w czasie od 01.01. 2014. do 01.07.2018 roku zostały poddane zabiegowi transplantacji nerki (od dawcy żywego lub ze zwłok) w Instytucie Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka, i które w protokole immunosupresyjnym otrzymały takrolimus. Kryterium kwalifikacji do badania, jak i kryteria dyskwalifikacji, zostały bardzo jasno określone, opisane i przedstawione w 2 tabelach oraz na 2 rycinach. Podobnie, w bardzo klarowny i szczegółowy sposób zdefiniowano i przedstawiono zakres zebranych danych klinicznych i laboratoryjnych badanej populacji. Doktorant w tym miejscu wykazał się wyjątkową starannością ponieważ wyjściowa charakterystyka biorców i towarzysząca immunosupresja dotycząca każdego zakwalifikowanego chorego została przedstawiona w tabelach i dodatkowych materiałach informacyjnych zamieszczonych na załączonym do pracy nośniku. Taka dbałość o szczegółowe pokazanie poprawności metodologicznej przeprowadzonego badania jest doprawdy rzadko obecnie spotykana i zasługuje na podkreślenie.

Metody oznaczeń laboratoryjnych i założenia przyjęte na poczet analizy zostały precyzyjnie i wyczerpująco opisane i nie budzą zastrzeżeń.

Metody analizy statystycznej zastosowane w pracy są wyjątkowo starannie dobrane i adekwatne zarówno do założeń jak i obranych technik. Zwraca uwagę wzbogacony o testowanie warunkowych krzywych przeżycia warsztat statystyczny.

Wyniki badań Autor przedstawił na 38 stronach, co zajmuje około 28% tekstu całej dysertacji. Zostały one przedstawione w postaci opisowej oraz zilustrowane 19 tabelami i 18 rycinami. Zwraca uwagę niezwykle staranność opracowania i ładna forma graficzna. Wyniki badań są bardzo ciekawe i doskonale korespondują z przedstawionymi wcześniej hipotezami

badawczymi. Każdy punkt założeń badawczych został opisany w osobnym akapicie, a następnie w oparciu o uzyskane wyniki zbudowano metodą symulacji statystycznej różne scenariusze. Celem tego działania było zbadanie hipotetycznego procesu w zależności od rozkładu stężeń C_0 badanego leku w 5-letnim okresie obserwacji oraz początkowego średniego eGFR w pierwszym półroczu po transplantacji, który ustalono na 110 i 80 ml/min/1.73m². Analizowano przebieg trajektorii eGFR oraz ich zmienność w zależności od dwóch powyższych parametrów na podstawie czego prześledzono konsekwencje kliniczne zaobserwowanych uprzednio zależności. Stwierdzono, że dynamika zmian czynności graftu u dzieci mierzona wskaźnikiem eGFR zależy od jego wyjściowej wartości. U pacjentów z wyjściową bardzo dobrą czynnością przeszczepu (eGFR > 95 ml/min/1.73m²) obserwowano postępujący spadek wartości eGFR, podczas gdy u pacjentów z gorszym początkowo eGFR (< 95 ml/min/1.73m²) czynność nerki w okresie obserwacji nie pogarszała się. Dawkowanie takrolimusu prowadzone w oparciu o monitorowanie stężenia leku oznaczanego przed jego kolejną dawką skutecznie zapewniało osiągnięcie i utrzymywanie zalecanych wartości stężenia w granicach 5-10 ng/ml. U pacjentów z wysoką wyjściową wartością eGFR tempo pogarszania się czynności nerki przeszczepionej zależało od stężenia C_0 takrolimusu i o ile przekraczało ono 6 ng/ml – szybkość ubytku eGFR ulegała zwolnieniu a nawet zahamowaniu. Podwyższenie stężenia leku u tych chorych do 8 ng/ml powodowało dodatkowy efekt zwolnienia spadku wartości eGFR w czasie. Co ciekawe, u pacjentów, u których wyjściowa wartość eGFR była < 95 ml/min/1.73m² stężenie leku nie wpływało na tempo pogarszania się czynności nerki przeszczepionej. Z analizowanych cech klinicznych, statystycznie znamiennej wpływ na zależność między stężeniem takrolimusu C_0 i wartością eGFR w czasie miał jedynie zakres doboru HLA. Zahamowanie spadku wartości eGFR (zależne od stężenia leku > 6 ng/ml) było tym większe im lepiej była dobrana antygenowo nerka. Niemniej jednak wykazano, że efekt doboru antygenowego miał niewielkie znaczenie dla całości tej zależności, za którą w ok. 90% odpowiada stężenie leku.

Dyskusja, to bardzo istotny rozdział monografii. Autor, konsekwentnie do założeń i sformułowanych hipotez badawczych dyskutuje kolejno znaczenie zawężenia szerokiego zakresu norm stężeń takrolimusu mierzonych we krwi przed podaniem jego kolejnej dawki w odniesieniu do odległej czynności nerki przeszczepionej zwracając jednocześnie uwagę na złożoność innych czynników modyfikujących czynność graftu. Dzieli je, bardzo poprawnie na

immunologiczne i nieimmunologiczne. Mocną stroną dysertacji jest zamieszczona w tym miejscu analiza ograniczeń wykonanego badania. Świadczy ona niezbitnie o dojrzałości naukowej i dystansie Badacza do wysnutych wniosków. Rzeczywiście, retrospektywny charakter badania, różny stopień subordynacji pacjentów w zakresie przyjmowanych leków i innych zaleceń, wiarygodność czasu pobrania krwi na oznaczenie C_0 , różnorodność chorób współtowarzyszących i ich terapii powoduje duże zróżnicowanie badanej grupy oraz ma niezaprzeczalny wpływ na tzw. szum tła przeprowadzanych analiz. Stąd wielką wartością pracy jest zastosowanie specjalnie opracowanego i zwalidowanego statystycznie modelu zależności oraz ograniczenie analizy regresji zmiennych do tych etapów badania, w których dysponowano pewnymi i niezmiennymi w czasie danymi klinicznymi. Kolejnym atutem pracy jest kwalifikacja do badania reprezentatywnej próby losowej dzieci przeszczepionych w jednym ośrodku w ściśle określonym czasie. Z założenia, ten sposób oceny przypomina analizę *intent-to-treat*, stosowaną powszechnie w badaniach obserwacyjnych i niektórych badaniach klinicznych. Nieobecność przypadków zgonu i utraty przeszczepu w okresie obserwacji świadczy pozytywnie o jakości leczenia oraz skutecznym rozpoznawaniu i leczeniu ewentualnych powikłań. Podkreślić należy, że taka analiza, bez utraty informacji z jakiegokolwiek przedziału czasowego, umożliwia przeprowadzenie symulacji matematycznej polegającej na wykorzystaniu zależności stwierdzonych na podstawie danych retrospektywnych do prognozowania przyszłych konsekwencji klinicznych, czego właśnie dokonał Doktorant i co jest zasadniczym walorem przeprowadzonego badania. Niestety, retrospektywny charakter analizy uniemożliwiał podobną ocenę wpływu na odległą funkcję przeszczepu nerki innych zmiennych w czasie i niemożliwych do zidentyfikowania czynników. Wiarygodności danych dodaje fakt, że obserwowane w opisanym grupie przeżycie pacjentów i nerek przeszczepionych nie odbiega od wskaźników raportowanych przez inne renomowane ośrodki transplantacyjne. Podobnie, cechy charakteryzujące ryzyko immunologiczne, jak udział pierwszych przeszczepień nerki, aktualny wynik PRA = 0%, liczba niezgodności w układzie HLA czy czas zimnego niedokrwienia nie odbiegał istotnie od raportowanych przez inne ośrodki. Należy podkreślić, że założenia analizy były bardzo klarowne i zostały przeprowadzone niezmiernie konsekwentnie. Były one prowadzone sekwencyjnie i warunkowo. Przeprowadzenie kolejnej zależało od wyniku poprzedniej i uwzględniało stwierdzone w niej zależności. Wykazanie braku jakiegokolwiek zależności między wartością eGFR i stężeniem takrolimusu C_0 oznaczałoby zakończenie analizy. Doktorant bardzo

precyzyjnie wyjaśnił w *Dyskusji* zasadność i cel tak zaprogramowanego badania dowodząc tym samym poprawności i wielkiej staranności przeprowadzonych analiz. Omawia On krok po kroku wpływ badanych zmiennych na przeżywalność i funkcję przeszczepu nerkowego, porównując swoje obserwacje i wnioski z danymi ekstrahowanymi z aktualnego piśmiennictwa, którego przegląd został przeprowadzony bardzo systematycznie. Wnioskiem całkowicie autorskim jest stwierdzenie, że niewielka zmiana dotychczasowej praktyki przez podniesienie dolnego zakresu terapeutycznej normy stężenia takrolimusu C_0 z wartości 5 ng/ml na 6 ng/ml może ograniczyć spadek wartości eGFR szczególnie w grupie pacjentów z bardzo dobrą wyjściową funkcją graftu, a zapewnienie proporcjonalnie wyższych stężeń (do 8 ng/ml) może dodatkowo zwalniać tempo dalszego spadku funkcji graftu. Spostrzeżenie to zostało poparte szczegółową analizą dwóch symulowanych scenariuszy klinicznych skonstruowanych celem zbadania konsekwencji klinicznych w odniesieniu do zachowania się wskaźnika eGFR. Wyniki tych analiz potwierdzają znaczenie nie tylko utrzymania stężeń leku w określonym przedziale, ale także ich stabilności. To kolejne bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia spostrzeżenie.

Podsumowując tą część pracy – dyskusja jest zwarta, merytoryczna i poparta aktualną literaturą. Jest bardzo istotną częścią dysertacji i jej ogromnym walorem. Wielopłaszczyznowość przytaczanych faktów świadczy o dużej biegłości tematycznej Doktoranta i dużej umiejętności syntetycznego myślenia.

Wnioski końcowe wynikające z przeprowadzonych badań i całości analizy Doktorant zawarł w 4 esencjonalnych punktach (str. 120) będących dokładnymi odpowiedziami na założenia pracy. Wniosek pierwszy jest odpowiedzią na podstawowy cel pracy i potwierdza, że stężenie C_0 takrolimusu wykazuje niezależny od innych czynników wpływ na odległą czynność nerki przeszczepionej, ocenianą wartością eGFR u chorych z wysokimi wyjściowymi jego wartościami. Trzy kolejne wnioski to odpowiedzi na cele dodatkowe:

1. Zawężenie zakresu docelowego stężenia C_0 takrolimusu wynoszącego w leczeniu podtrzymującym 5 – 10 ng/ml, przez podwyższenie jego dolnego progu może zapewnić korzyści w odniesieniu do odległej czynności przeszczepu nerki polegające na zmniejszeniu tempa ubytku eGFR.
2. Utrzymanie stężeń C_0 takrolimusu > 6 ng/ml zmniejsza tempo pogarszania się

czynności przeszczepu nerkowego u pacjentów z jego bardzo dobrą czynnością wyjściową, co oznacza, że unikanie nadmiernej „minimalizacji” leczenia takrolimusem może chronić przed postępującym w czasie ubytkiem eGFR.

3. Zahamowanie spadku wielkości eGFR (zależne od stężenia takrolimusu > 6 ng/ml) było tym większe, im lepiej antygenowo była dobrana nerka. Niemniej efekt niedopasowania HLA miał niewielkie znaczenie dla całości tej zależności, za którą w ok. 90% odpowiada stężenie leku.

Wnioski są bardzo istotne z punktu widzenia algorytmów postępowania terapeutycznego u chorych po przeszczepieniu nerki ponieważ kładą nacisk na wiodące znaczenie terapii immunosupresyjnej, w tym stężenia takrolimusu $C_0 > 6$ ng/ml, na odległe funkcjonowanie nerki przeszczepionej oraz przestrzegają przed minimalizacją i nadmierną liberalizacją tej terapii. Tym samym podkreślają znaczenie zjawiska *non-adherence* w tym aspekcie.

Dla porządku dodam, że piśmiennictwo liczy 149 pozycje, jest aktualne, tematycznie spójne i prawidłowo cytowane.

Moje podsumowanie dysertacji, którą miałam wielką przyjemność recenzować jest jednoznaczne. Temat pracy, niezwykle aktualny i pożyteczny z naukowego punktu widzenia oraz praktyki lekarskiej, jest bardzo dobrze wybrany. Jego realizację przeprowadzono bardzo starannie, z wykorzystaniem prawidłowego warsztatu badawczego. Doktorant wykazał się dużą wiedzą, którą poparł adekwatnym warsztatem badawczym a także aktualnym piśmiennictwem, trafnie wykorzystanym we wstępie, metodyce i dyskusji. Praca doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a w związku z tym w mojej opinii zasługuje na wyróżnienie.

Równie jednoznaczny jest mój wniosek końcowy: praca pt. **Wpływ stężenia takrolimusu oznaczanego przed kolejną dawką na odległą czynność przeszczepu nerki u dzieci mierzoną szacowanym wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej (eGFR)** autorstwa lek. med. Jacka Rubika wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. med. Ryszarda Grendy spełnia wszystkie kryteria przewidziane odpowiednią ustawą (z dnia 20 lipca 2018r., Dz. U. z 2018 r. poz.1668 ze zm.) określone w art. 187 wymagane na stopień doktora nauk medycznych.

W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Instytutu „Pomnik – Centrum

Zdrowia Dziecka” wniosek o dopuszczenie lek. med. Jacka Rubika do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również o wyróżnienie pracy.

prof. dr hab. med. Beata Naumnik

Handwritten signature of Beata Naumnik in black ink, consisting of the letters 'B. Naumnik' with a stylized flourish at the end.

kierownik I Kliniki Nefrologii i Transplantologii z Ośrodkiem Dializ

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku