



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

dr hab. Paweł Wiczling, prof. nadzw.
Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki
Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki
Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk
e-mail: wiczling@gumed.edu.pl, tel. 58-349-14-93

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Zofii Tylutki

pt.: *„Development and performance verification of the pharmacokinetic model towards determination of the active drug fraction surrogate in the heart tissue”*

wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Sebastiana Polaka, kierownika Zakładu Farmacji Społecznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Modelowanie farmakokinetyki i farmakodynamiki leków (PK/PD) jest często wykorzystywanym narzędziem do przewidywania stężeń leku w osoczu i w tkankach oraz efektów działania leku w funkcji dawki i czasu. Szczególne miejsce w tej dziedzinie nauki zajmują modele oparte o fizjologię i anatomię organizmu, ponieważ pozwalają w łatwy sposób uwzględnić informacje o właściwościach poszczególnymi tkanek czy organów i tym samym umożliwiają dokładniejsze, bardziej mechanistyczne, ujęcie wpływu złożoności organizmu ludzkiego na losy leku w ustroju. Modele oparte o fizjologię mają swoją ugruntowaną pozycję w farmakokinetyce, ale stosowane są względnie rzadko, ponieważ wymagają bogatej informacji eksperymentalnej lub poczynienia wielu założeń o zachowaniu się leku w poszczególnych tkankach i organach. Również pewnym ograniczeniem jest trudność wynikająca z matematycznej złożoności tych modeli, szczególnie w kontekście estymacji parametrów. Jednak, w mojej ocenie, rozwój technik obliczeniowych i dziedzin nauki takich jak farmakologia systemowa czy biologia systemowa będzie prowadził do częstszego wykorzystywania tego typu modeli w nauce i w przemyśle.

Głównym celem przedstawionej do recenzji pracy było opracowanie modelu farmakokinetycznego opartego o fizjologię organizmu ludzkiego dla amitryptyliny i jej

metabolitu, nortryptyliny, z uwzględnieniem wielu znanych z literatury procesów, które mogą wpływać na stężenia tych substancji w organizmie, a w szczególności w różnych anatomicznie rozróżnialnych częściach serca. Model ten został wykorzystany do predykcji stężeń leku i metabolitu w miejscu działania i powiązanie ich z efektem elektrofizjologicznym serca. Opracowanie modelu opartego o fizjologię u ludzi jest zadaniem trudnym, głównie przez konieczność pracy z dużym układem równań różniczkowych, z dużą liczbą parametrów, w warunkach niepewności co do struktury modelu i wartości parametrów. Duża niepewność prowadzi do konieczności podjęcia wielu decyzji o spodziewanej kinetyce leku dla poszczególnych tkanek i organów, dlatego budowa modelu musi być poprzedzona oszacowaniem wartości wszystkich parametrów modelu, w oparciu o badanie eksperymentalne lub syntezę informacji zawartej w literaturze naukowej. W pracy poruszono wiele zagadnień, które obejmowały parametryzację modelu, weryfikację modelu, oraz jego praktyczne wykorzystanie do rozwiązywania problemów związanych z przewidywaniem stężeń leku w osoczu i w sercu oraz odpowiedzi organizmu na lek.

Praca doktorska mgr Zofii Tylutki ma często spotykany układ dla tego typu opracowań, który stanowi skrótowy opis prowadzonych badań wraz z załączonymi publikacjami naukowymi. Monografia zawarta jest na 70 stronach i składa się z wykazu skrótów, wstępu, celu pracy, metodyki, wyników, dyskusji, wniosków i piśmiennictwa. Praca rozpoczyna się listą publikacji autorki, streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz podziękowaniem, a wieńczy ją dodatek składający ze 114 stron przedruku trzech prac naukowych oryginalnych i jednej przeglądowej autorstwa p. mgr Zofii Tylutki. Dysertacja została udokumentowana licznymi rycinami i równaniami. Przypisy literaturowe w ilości 137 są w zdecydowanej większości opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Pracę czyta się z dużą przyjemnością, napisana jest poprawnym językiem (angielskim) i zawiera niewiele potknięć redakcyjnych.

Wstęp pracy jest dobrze przedstawionym wprowadzeniem do zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej. Z dużym zainteresowaniem przeczytałem poszczególne jego części, gdzie przejrzysto i w możliwie zwięzły sposób została opisana idea modelowania opartego o fizjologię, anatomia i fizjologia serca, oraz różne aspekty związane z modelowaniem farmakokinetyki i farmakodynamiki leków ważne w kontekście zagadnień poruszanych w pracy.

Cel rozprawy doktorskiej został dobrze określony, natomiast jego osiągnięcie zostało szeroko opisane w metodologii, wynikach i dyskusji oraz w czterech załączonych publikacjach. Treści zawarte w pierwszej, przeglądowej, pracy, opublikowanej w *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, dotyczą systematycznego przeglądu literatury i wyszukania danych odnoszących się do dystrybucji leków w ludzkim sercu. W drugiej publikacji, opublikowanej w *Scientific Reports*, opracowano cztero-kompartmentalny model fizjologiczny serca dla amitryptyliny. W trzeciej pracy, opublikowanej w *Journal of Pharmaceutical Sciences*, udoskonalono wcześniej opracowany model uwzględniając farmakokinetykę nortryptyliny oraz modyfikując uprzednio zaproponowany model serca. W ostatniej czwartej pracy, opublikowanej w *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, zweryfikowano model pod kątem przewidywań stężeń leku w sercu w różnych populacjach ludzkich, dla różnych dawek i dróg podania leku. Lektura dysertacji uprawnia do stwierdzenia, że Autorka wykazała się dużą biegłością w opanowaniu zagadnień związanych z modelowaniem farmakokinetyki leków oraz ich praktycznym wykorzystaniem w rozwiązywaniu problemów spotykanych w badaniach nad oceną lekozależnej aktywności elektrofizjologicznej serca.

Podjęta przez p. mgr Zofię Tylutki tematyka wymagała opanowania różnych metod statystycznych, opanowania pisania kodu w środowisku R, rozumienia fizjologii organizmu i serca i jego relacji do farmakokinetyki leków, umiejętności planowania oraz konsekwentnej realizacji założonego planu badawczego. Zebrane prace dowodzą, że Doktorantka opanowała te wymagania w stopniu bardzo dobrym. Przedstawione w poszczególnych pracach wyniki oraz ich dyskusja potwierdzają dojrzałość Autorki poprzez prezentację właściwej i równocześnie krytycznej oceny otrzymanych wyników. Praca ta dowodzi również dociekliwości Doktorantki, zrozumienia przez niej badanej materii oraz umiejętności stawiania i rozwiązywania problemów badawczych. Czytelny opis metodyki, ogrom pracy włożony w budowę modelu, oraz jego umiejętne wykorzystanie budzą u mnie duży podziw.

Strona redakcyjna pracy jest wykonana bardzo starannie, z obowiązku znalazłem zaledwie kilka potknięć i sformułowań wartych w mojej ocenie drobnej korekty.

1. Strona 14. *“Each of the tissue compartment is defined by two parameters: physiological tissue volume and blood flow rate.”* Bez wątplenia są to dwa ważne parametry, ale nie można zapomnieć o innych jak np. współczynnik podziału czy klirens wewnętrzny.

2. Strona 14. Modele kompartmentalne są wersją minimalnych modeli fizjologicznych. Parametry modeli kompartmentalnych mają również odniesienie do fizjologii, które jest nieco ukryte ze względu na złożoność poszczególnych parametrów, np. objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym jest dana sumą iloczynów *mass* (objętości) i współczynników podziału dla poszczególnych tkanek. Podobnie klirens można powiązać z parametrami odnoszącymi się do fizjologii, jak klirens wewnętrzny, czy szybkość przesączania kłębuszkowego.
3. Strona 14. *"In a perfusion rate-limited model the tissue is treated as a single well-stirred compartment in which the compound distributes instantly as it does not come across the diffusion barriers."* Część zdania dotycząca przechodzenia przez błony jest zbędna. Kinetyka może być opisana modelem ograniczonym perfuzją dla leków przemieszczających się przez błony, kiedy procesy dystrybucji i redystrybucji są szybkie względem szybkości perfuzji.
4. Brakuje wyjaśnienia niektórych skrótów: np. SA czy AV
5. Strona 21. Zamiast *"The evaluate (...)"* powinno być *"The evaluated (...)"*
6. Strona 21. *"(...) and potentially intraindividally variable."* Słowo potencjalnie jest zbędne. Wszystkie parametry różnią się między ludźmi i u poszczególnych osób w różnych momentach życia (w czasie). Nas powinna interesować wielkość tych zmienności (np. standardowe odchylenie).
7. Strona 29. *"the equilibrium between the blood and tissue is reached immediately"*. Raczej powinno być, że poszczególne kompartmenty są dobrze mieszane (równowaga w obrębie kompartmentu ustala się szybko). Natomiast równowaga pomiędzy krwią i tkanką ustala się po pewnym czasie, który zależy od wartości stałych szybkości dla procesów dystrybucji i redystrybucji.
8. Strona 29. Wartości współczynników podziału dla amitryptyliny zostały przewidziane przy pomocy równań zaproponowanych przez Rodgersa-Rowlanda. Ponieważ wartość objętości dystrybucji w stanie stacjonarnym u ludzi dla amitryptyliny i nortryptyliny jest znana, dlaczego nie była ona wykorzystana jako źródło informacji w trakcie opracowywania modelu? W końcu wartość objętości dystrybucji w stanie stacjonarnym niesie informacje o współczynnikach podziału dla poszczególnych tkanek.
9. Strona 30: Równanie 3.1 i równania (1) i (3) w JPKPD są w mojej ocenie zapisane błędnie, tzn. wszystkie parametry po prawej stronie równania (k_a ,

$Dose_{PO}$ i F) są stałymi. Nie podano również warunków początkowych. Moim zdaniem równie 3.1 powinno być zapisane jako:

$$\frac{dDose_F(t)}{dt} = -k_a Dose_F(t), Dose_F(0) = F \cdot Dose_{PO}$$

10. Strona 30: Dlaczego do opisu farmakokinetyki nortryptyliny użyto minimalnego modelu, a nie modelu podobnego do amitryptyliny?
11. Strona 31: W jaki sposób nastąpiła digitalizacja danych, np. jakiego użyto oprogramowania?
12. Strona 32: Dlaczego w modelu E_{max} , C odnosi się do stężeń w osoczu a nie do stężeń przewidzianych w sercu?
13. Strona 32: „*Active drug fraction surrogate*” Do jakich stężeń odnosi się to sformułowanie. Nie jest dla mnie czytelne czy mowa jest o stężeniu całkowitym czy o stężeniu frakcji wolnej, oraz czy stężenie odnosi się do stężenia w całym sercu czy w jakiejś jego części, np. miokardium.
14. Strona 34: „*in the femoral vein*” – czy te współczynniki podziału odnoszą się do krwi pełnej czy osocza?
15. Strona 36. Dlaczego założono, że wartości współczynników podziału dla amitryptyliny dla poszczególnych części serca są podobne do wartości otrzymanych dla saxitoxyny?
16. Strona 37: Struktura modelu serca z pracy II została mocno zmieniona w pracy III. Rodzi to pewne komplikacje. Otóż przy tak zmiennej strukturze „pożyczenie” wartości parametru z poprzedniego modelu jest ryzykowne. Mam na myśli wartość szybkości przepływu krwi perfundującej osierdzie (0.011 L/h).

Jednym z nałożonych na recenzenta obowiązków jest zwrócenie uwagi na nieścisłości czy pewne niedociągnięcia, które dostrzeżone zostaną w przedstawionej do recenzji pracy. Wywiązując się z tego obowiązku chciałam prosić o odniesienie się do następujących uwag.

1. Pewne wątpliwości budzi we mnie część pracy dotycząca parametryzacji modelu. Otóż z mojego punktu widzenia, zbudowanie i zaproponowanie złożonego modelu (a nawet całej serii złożonych modeli o różnej strukturze) nie jest, przy pewnym doświadczeniu, zadaniem trudnym. Natomiast dużym wyzwaniem jest przypisanie odpowiednich wartości dla wszystkich parametrów tak złożonych modeli, czyli odpowiednia kalibracja modelu do

celów jakie sobie stawiamy. W tej pracy zatrzymano się na etapie, który nazwałbym oceną *a priori* typowych własności predykcyjnych modelu, tzn. wizualnie skonfrontowano czy przewidywania modelu są zbliżone do eksperymentalnie wyznaczonych średnich stężeń amitryptyliny i nortryptyliny dostępnych w literaturze. I jest to ważny etap, który powinien poprzedzać każdy proces budowania modelu. Niemniej, dalszym krokiem, powinno być wyliczenie wszystkich możliwych kombinacji parametrów, dla wszystkich potencjalnych modeli, które są zgodne z rozkładem *a priori* i dostępnymi danymi (np. wyznaczenie rozkładu *a posteriori*). Prawdopodobnie takie podejście byłoby trudne, ale zatrzymanie się tylko na symulacjach z typowymi wartościami parametrów, których część została ustalono dosyć arbitralnie lub bez uwzględnienia niepewności (np. wartości współczynników podziału dla poszczególnych tkanek mają z samej swojej natury dużą niepewność) prowadzi do zbyt dużej pewności w przewidywaniach, a tym samym ufności, że symulowane profile odzwierciedlają rzeczywistość. Kalibracja i wielkość niepewności wokół krzywej kalibracji są miarami na których oparłbym weryfikację modelu. Model który jest słabo skalibrowany z danymi lub prowadzi do przewidywań obarczonych dużą niepewnością, choćby idealnie odwzorowywał fizjologię, jest mało użyteczny. Chociażby sam fakt wspomnianego w pracy błędu systematycznego dla stężeń amitryptyliny i nortryptyliny świadczy o problemie z kalibracją zaproponowanego modelu. Dodatkowo brak jest informacji na temat niepewności dla przewidywań. A ma to niebagatelne znaczenie, w końcu jeżeli 90% przedział niepewności wokół typowych przewidywań jest bliski zakresu $(0, \infty)$ to te przewidywania mają niewielką użyteczność, natomiast jeżeli są one w zakresie $\pm 1\%$ wartości typowych i nie są obarczone dużym błędem systematycznym, mogą być przydatne w rozwiązywaniu konkretnych problemów.

2. Symulacje populacyjne prowadzą do uzyskania zakresu stężeń których spodziewalibyśmy się w populacji ludzi i związane są z dodatkowym modelowaniem zmienności międzyosobniczej. Czytając i analizując wyniki tej pracy nie wiem jaką mam ufność pokładać w przewidzianych przez model zakresach profili (szczególnie dla serca), których możemy się spodziewać w populacji ludzi. Np. zakresy stężeń przedstawione na rysunku 4 w pracy *Journal of Separation Sciences* (str. 1174) mogą sugerować, że takiego zakresu

stężeń możemy się spodziewać dla rasy kaukaskiej. I jest to prawda, ale przy założeniu, że wszystkie parametry modelu (i jego struktura) są prawdziwe. Natomiast, dla mnie dużo ciekawsze byłoby odpowiedzenie na pytanie jakiego zakresu stężeń możemy się spodziewać uwzględniając niepewności dla poszczególnych komponentów (parametrów) modelu. Mam wrażenie, że ewentualne decyzje oparte o takie przewidywania miałyby większą wartość.

3. W odniesieniu do aspektu pracy jakim jest wyznaczenie surogatu stężeń leku w miejscu jego działania, tak żeby móc lepiej zrozumieć odpowiedź organizmu po podaniu leku. Mam tutaj wątpliwości czy konieczne jest użycie aż tak skomplikowanego modelu. Moim zdaniem warto byłoby sprawdzić, czy dużo prostsze podejście, np. wyliczenie stężeń leku w biofazie z wykorzystaniem hipotetycznego kompartmentu efektorowego, nie jest równie dobre?

Wymienione wyżej uwagi i pytania nie obniżają wysokiej oceny rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Zofii Tylutki, która stanowi opracowanie wartościowe z poznawczego i praktycznego punktu widzenia. Moim zdaniem oceniana rozprawa doktorska świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu mgr Zofii Tylutki do prowadzenia badań naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja w pełni odpowiada warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim zawartym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. – *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dziennik Ustaw RP nr 65, poz. 595 z dnia 16 kwietnia 2003 r.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o dopuszczenie mgr Zofii Tylutki do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych. Ponadto, z uwagi na wysoką merytoryczną wartość oraz oryginalność przedłożonej do recenzji pracy oraz opublikowaniem wyników badań w recenzowanych czasopismach wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.



Gdańsk, 17 sierpnia 2018.

