

Poznań, dnia 28.05.2015

Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Pawła Szymkiewicza

pt. „Ocena wpływu mutacji genów CYP 2C19 i ABCB1 na wybrane parametry reaktywności płytek krwi u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym”.

Rozprawa doktorska lek med. Pawła Szymkiewicza pt. „Ocena wpływu mutacji genów CYP 2C19 i ABCB1 na wybrane parametry reaktywności płytek krwi u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym” wpisuje się w interesującą tematykę ogólnie rozumianej oporności na kłopidogrel. Zagadnienia niezwykle ważnego u pacjentów poddawanych angioplastyce tętnic wieńcowych, zwłaszcza w polskich realiach, w których zastosowanie kłopidogrelu (jako drugiego leku p/płytkowego) ciągle jest obowiązującym i preferowanym schematem leczenia przeciwplatekowego w ostrych zespołach wieńcowych (OZW/ ang. ACS) pomimo, że zalecenia Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego rekomendują już nowsze leki. Stąd praca jest aktualna i ważna dla polskiej populacji osób z OZW. Dodatkowo tematyka pracy jest aktualna w kontekście podwójnego leczenia p/płytkowego ale u osób ze stabilną chorobą wieńcową, poddawanych planowanej angioplastyce z implantacją stentu, ponieważ rekomendacje ESC w tej określonej sytuacji klinicznej nie definiują preferowanej strategii leczenia p/płytkowego.

Praca lek med. Pawła Szymkiewicza zawiera 9 rozdziałów, 109 stron, 19 tabel, 17 rycin i 231 pozycji cytowanego piśmiennictwa. Bardzo mocną stroną pracy jest jej zwięzłość i spójność. Na pochwałę zasługuje także bardzo logiczny tok narracji, który powoduje, że pracę czyta się z przyjemnością, ponieważ każdy kolejny podrozdział jest konsekwencją poprzedniego. We wstępie Autor dokładnie, ale co ważne w przystępny sposób opisuje

mechanizm hemostazy naczyniowej z uwzględnieniem niebagatelnej w tym procesie aktywacji i agregacji płytek krwi. Wskazuje również miejsce działania, mechanizm i efektywność poszczególnych leków p/płytkowych w hamowaniu aktywności płytek oraz powikłania takiej terapii. We wstępie Autor podejmuje także bardzo udaną próbę opisu zasad oceny aktywności płytek krwi w warunkach laboratoryjno-klinicznych oraz służących do tego celu narzędzi diagnostycznych. Naturalną i logiczną konsekwencją tego podrozdziału jest także wnikliwy opis zjawiska oporności na kwas acetylosalicylowy oraz kłopidogrel (HPR). Bardzo słusznie, że Autor dostrzega złożoność i mnogość przyczyn zjawiska HPR oraz oporności na kwas acetylosalicylowy. Autor w końcu zwraca ogólną uwagę na mechanizmy zależne od płytek krwi oraz ich rolę w procesie destabilizacji blaszki miażdżycowej, co może prowadzić do indukcji ostrego zespołu wieńcowego. Tej kwestii dotyczy również moja krytyczna uwaga. Autor bowiem nie zwrócił uwagi na możliwe różnice w aktywacji procesu hemostazy u pacjentów z ostrym zespołem z uniesieniem (STEMI), bez uniesienia odcinka ST(NSTEMI), podobnie jak w przypadku dusznicy niestabilnej (UA), których to grup dotyczy właśnie praca. Odrębność mechanizmów wyzwalających te schorzenia, będzie bowiem prawdopodobnie widoczna także we wpływie na sam proces aktywacji i agregacji płytek krwi. W końcowej części wstępu Autor również opisuje złożony metabolizm kłopidogrelu z uwzględnieniem swoistego układu enzymatycznego i jego zmienności genetycznej, istotnie wpływającej na ten proces. Tutaj zabrakło jednej bardzo istotnej informacji, mianowicie, że metabolizm nowych leków p/płytkowych (prasugrelu i tikagrelolu) jest zasadniczo wolny od wpływu zmienności mutacyjnej enzymów CYP 2C19 oraz genu ABCB1. Jest to ważne stwierdzenie, ponieważ w podrozdziale „założenia pracy” Autor wspomina, że „...zmienność polimorfizmów genów CYP 2C19 i ABCB1 istotnie wpływa na zwiększenie ryzyka niekorzystnych epizodów sercowo-naczyniowych w grupie pacjentów z ACS..” i ma rację, ale kwestia ta dotyczy tylko pacjentów otrzymujących kłopidogrel, a nie prasugrel ani tym

bardziej tikagrelol. Zatem zdanie „Analiza częstości występowania poszczególnych genotypów i ich wpływ na reaktywność płytek ocenianych w poszczególnych testach laboratoryjnych ma istotne znaczenie dla wyboru skutecznego leczenia przeciwplatekowego” nabiera w tej sytuacji odmiennego kontekstu, ponieważ obecność niektórych mutacji w CYP 2C19 i genie ABCB1, raczej powinna skłaniać do wyboru terapii opartej na prasugrelu lub tikagrelolu niż oczywiście klopidoogrelu. Niemniej wytyczne ESC dotyczące rewaskularyzacji mięśnia sercowego nie zalecają rutynowego określania sekwencji genów kodujących białka uczestniczących w metabolizmie klopidoogrelu, ponieważ a priori preferują zastosowanie tikagrelolu lub prasugrelu (przy znanej anatomii tętnic wieńcowych). Przy próbie opublikowania pracy w fachowym piśmiennictwie z listy filadelfijskiej podczas uzasadniania celu badania należy zwrócić uwagę na wspomnianą kwestię. Cel badania jest prawidłowo sformułowany i nie budzi żadnych wątpliwości.

Metodyka: W kwestii doboru grupy badanej mam kilka wątpliwości, co do jej jednorodności. O ile jednorodność grupy nie ma znaczenia w kwestii badań genotypu cytochromu P450, to ma ogromne znaczenie przy badaniu reaktywności płytek. Stąd jeśli do grupy badanej włączano osoby ze STEMI, NSTEMI lub UA (choroby o odmiennej etiologii), należy się spodziewać, że mechanizmy prowadzące do aktywacji płytek mogą być również różne, co zdają się potwierdzać dane literaturowe. Autor powinien zatem dokonać ewentualnej oceny różnic pomiędzy reaktywnością płytek krwi u pacjentów z STEMI, NSTEMI i UA.

Po drugie, krew do badań była pobierana pomiędzy 2, a 4 dobą od wystąpienia OZW, co również może wpływać na reaktywność płytek. Po trzecie, część z pacjentów otrzymywała dawkę nasycającą klopidoogrelu i kwasu acetylosalicylowego (ASA), a druga część pobierała tylko dawki podtrzymujące tych leków (przyjmowali je przed koronarografią). Po czwarte, nie znamy stosowanego przez pacjentów leczenia farmakologicznego przed OZW, np.

hipolipemizującego, a jak wiemy rodzaj statyny może również wpływać na reaktywność płytek krwi. Co prawda różnice w agregacji płytek u osób stosujących atorwastatynę i rozuwastatynę obserwuje się dopiero po około 6 miesiącach, niemniej w pracy brakuje informacji co do rodzaju, czasu trwania oraz liczby pacjentów objętych leczeniem farmakologicznym przed epizodem ostrego zespołu wieńcowego.

Zastosowane metody diagnostyczne oceny aktywności i agregacji płytek krwi są aktualne i zgodne z danymi literaturowymi. Metodyka molekularna również nie budzi zastrzeżeń. Zastosowane testy statystyczne są poprawne.

Wyniki: Autor twierdzi, że obecność genotypu *2 CYP 2C19 ma wpływ na agregację płytek ale tylko u heterozygot. Z kolei u homozygot jest zaznaczona różnica, niemniej bez znamienności statystycznej, co wynika z niezwykle małej grupy (tylko 3 pacjentów). Ze względu właśnie na niewielką liczbę osób z tym konkretnym genotypem, wnioskowanie statystyczne nie powinno mieć miejsca tym bardziej, że rozrzut wyników (odchylenie standardowe) jest dużo większy niż w pozostałych grupach. Dodatkowo obecność genotypu *2 CYP 2C19 koreluje z agregacją płytek po zastosowaniu 10 $\mu\text{mol/l}$ ADP. Nieco zaskakujące są otrzymane wyniki agregacji płytek krwi u pacjentów z różnymi genotypami warunkującymi szybkość metabolizmu klopidoogrelu. Autor nie stwierdził różnic w agregacji płytek pomiędzy pacjentami z szybkim i wolnym metabolizmem klopidoogrelu, a wykazał ją pomiędzy pacjentami z wolnym i pośrednim metabolizmem. Można jedynie spekulować, że taki wynik należy tłumaczyć niejednorodnością grupy badanej. Mam na myśli fakt, że pomiary agregacji płytek krwi u pacjentów z tymi samymi genotypami ale w różnych typach zespołów wieńcowych mogą się różnić.

Autor ponadto w swojej pracy wykazał, że na agregację płytek krwi spośród takich czynników jak cukrzyca nadciśnienie, nikotynizm i otyłość wpływała wysoka wartość BMI.

Dużym zaskoczeniem był brak wpływu cukrzycy i nadciśnienia, co Autor tłumaczy w dyskusji i ograniczeniach pracy małą liczebnością grupy badanej. Najprawdopodobniej i te wyniki należy tłumaczyć znaczną niejednorodnością grupy badanej. Swoją drogą jestem ciekaw czy gdyby przeprowadzić oddzielną analizę w podgrupach osób ze STEMI i NSTEMI, uwzględniając znane czynniki wpływające na reaktywność płytek, czy wyniki uległy by zmianie.

Bardzo mocną stroną pracy jest analiza genotypów dla cytochromu CYP 2C19 oraz białka ABCB1. Badanie było przeprowadzane w jednorodnej etnicznie grupie pacjentów i w tym przypadku rodzaj ostrego zespołu wieńcowego nie miał już żadnego znaczenia dla uzyskanego wyniku. Częstości występowania poszczególnych genotypów były zbliżone do wcześniej opisywanych w literaturze. Badanie te są niezwykle interesujące dla genetyków populacyjnych. Świadczą bowiem o mozaice genetycznej, dzięki której można w przybliżeniu określać pochodzenie różnych grup etnicznych,

Dyskusja w pracy jest niezwykle zwarta, logiczna, a dodatkowo jestem pod ogromnym wrażeniem dbałości lingwistycznej Autora, co z pewnością jest także zasługą nadzorującego „promotorskiego oka”. Autor powołuje się na wiele badań kluczowych dla zagadnienia, wykazując się ich znajomością, a także błyskotliwie i umiejętnie konfrontując z nimi własne wyniki. Niemniej w cytowanym piśmiennictwie znalazłem tylko jedną pozycję dotyczącą badań reaktywności płytek u osób z ostrym zespołem wieńcowym (bez różnicowania na NSTEMI, STEMI czy UA), czyli w podobnej populacji do opisywanej przez Autora. Obecnie doniesienia literaturowe dotyczą badań w grupach znacznie bardziej jednorodnych.

Wnioski wypływające z pracy są trafnie i rzeczowo sformułowane, stanowiąc zresztą bardzo eleganckie jej podsumowanie. Dobór zawartego w pracy piśmiennictwa jest prawidłowy.

Niemniej w pozycji 213 brakuje dokładnego źródła, z którego pochodzi cytowany artykuł. Poszczególne pozycje piśmiennictwa ułożone są w zależności od kolejności ich występowania w tekście.

Podsumowując: Praca lek med. Pawła Szymkiewicza dotyczy ciekawego i ciągle aktualnego w codziennej polskiej praktyce klinicznej zagadnienia oporności na kłopidogrel. Niewątpliwym atutem pracy jest jej duża czytelność, przejrzystość i niezwykła dbałość o szczegóły, nie tylko merytoryczne ale także lingwistyczne.

Interesujące są wyniki pracy, zwłaszcza dotyczące części genetycznej. Natomiast ocena reaktywności i agregacji płytek krwi w bardzo mało homogennej grupie klinicznej, w moim odczuciu, budzi pewne wątpliwości. Moja krytyczna uwaga, bynajmniej nie wpływa na ogólne bardzo pozytywne wrażenie przedstawionej do recenzji rozprawy i uważam, że praca pt. „Ocena wpływu mutacji genów CYP 2C19 i ABCB1 na wybrane parametry reaktywności płytek krwi u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym” spełnia wszystkie kryteria pracy doktorskiej zgodne z art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym oraz § 6.3 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim. Zwracam się zatem do Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek med. Pawła Szymkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Recenzent:

Dr hab. med Paweł Burchardt
Katedra Biologii i Ochrony Środowiska
Centrum Biologii Medycznej
ul. Rokietnicka 8
60-356 Poznań

dr hab. n. med. Paweł Burchardt
Specjalista chorób wewnętrznych
KARDIOLOG
1410402