

Dr hab. n. med. Marek Gierlotka  
III Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii ŚUM  
Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu  
ul. Marii Curie-Skłodowskiej 9  
41-800 Zabrze

Zabrze, 7 czerwiec 2015 r.

**Recenzja pracy doktorskiej lek. Pawła Szymkiewicza**  
***Ocena wpływu mutacji genów CYP2C19 i ABCB1 na wybrane parametry reaktywności***  
***płytek krwi u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym***

Choroby układu sercowo-naczyniowego, w tym ostre zespoły wieńcowe (OZW), są w dalszym ciągu główną przyczyną umieralności wśród mieszkańców Polski oraz większości krajów europejskich. W Polsce odpowiadają za jedną czwartą zgonów wśród osób w wieku produkcyjnym, stając się dominującą przyczyną utraty życia powyżej 64 roku życia. Co więcej, zachorowalność na zawał serca jest w Polsce istotnie wyższa niż w większości zachodnich krajów Europy. Na przestrzeni ostatnich lat obserwujemy dynamiczny rozwój nowoczesnej farmakoterapii oraz agresywnej, inwazyjnej strategii podejścia do leczenia chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w wytycznych Towarzystw Kardiologicznych, które wskazują na angioplastykę wieńcową z implantacją stentu jako najbardziej zalecaną metodę leczenia. Dzięki rejestrom PL-ACS i AMI-PL wiemy, iż obecnie w Polsce inwazyjnie leczonych jest prawie 80% chorych z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI), ponad 70% z zawałem bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI) i zdecydowana większość chorych z objawami niestabilnej choroby wieńcowej (UA). Na oddziałach kardiologii odsetki te przekraczają 90%. Prawie u wszystkich chorych implantowane są stenty wieńcowe, a w ostatnich latach odsetek stosowania stentów uwalniających leki antymitotyczne (DES) w przekracza 70-80% w zależności od typu OZW. W tym kontekście nie dziwi, iż niemal każdy chory z ostrym zespołem wieńcowym otrzymuje podwójną terapię przeciwplatekową, a z uwagi na brak refundacji nowszych leków przeciwplatekowych, nadal zdecydowanie dominuje kwas acetylosalicylowy w połączeniu z kłopidogrelem.

Jednym z istotnych, choć obecnie dość rzadkich powikłań, które dotyczą pacjentów po implantacji stentu wieńcowego jest zakrzepica w stencie, której konsekwencją jest najczęściej zawał serca, a jedną z jej przyczyn jest utrzymująca się zwiększona reaktywność płytek krwi pomimo podwójnego leczenia przeciwplatekowego. Jak zauważa Doktorant we wstępie, zjawisko to może być wynikiem upośledzonej odpowiedzi na aspirynę jednak głównie związane jest z nieskutecznym leczeniem kłopidogrelem. Dlatego też podjęcie przez

niego tego tematu jest bez wątpienia ważne i celowe, zarówno pod względem klinicznym, jak i naukowym.

Przedstawiona do recenzji praca ma układ typowy. Liczy 120 stron, zawiera 17 tabel i 16 rycin. Cytowana literatura liczy 231 pozycji. Uwagę zwraca bardzo rozbudowany, ciekawie i dobrze napisany wstęp. Autor omawia w nim zarówno klasyfikację i aktualne sposoby leczenia ostrych zespołów wieńcowych jak również szeroko i wnikliwie opisuje dostępne obecnie leki przeciwplatekcyjne i powikłania występujące podczas ich stosowania. Osobne podrozdziały wstępu szczegółowo przybliżają zagadnienie zwiększonej reaktywności płytek podczas stosowania leków przeciwplatekcyjnych wraz z opisem możliwych do zastosowanych metod laboratoryjnych dla jej oceny. W końcu zapoznajemy się genetycznymi aspektami odpowiedzi na leczenie kłopidogrelem. Sposób przedstawienia problemu wskazuje na dużą wiedzę Doktoranta w tym zakresie. Wykazał, iż potrafi wybierać informacje ważne, o istotnym znaczeniu dla analizowanego problemu.

W ostatniej części wstępu Doktorant przedstawia założenia pracy a następnie formułuje oryginalny cel badawczy, którym była ocena częstości występowania mutacji w zakresie genów CYP2C19 i ABCB1 oraz ich związku z zaburzeniami reaktywności płytek krwi u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym leczonych za pomocą angioplastyki tętnic wieńcowych z implantacją stentu. Założył również, iż określi wpływ wybranych, klinicznych czynników ryzyka niepełnej odpowiedzi na leczenie kłopidogrelem na funkcję płytek krwi w badanej przez siebie grupie pacjentów.

Do badania włączono 188 chorych, hospitalizowanych w Klinice Kardiologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu z powodu ostrego zespołu wieńcowego, u których wykonano PCI z implantacją stentu i byli leczeni kwasem acetylosalicylowym oraz kłopidogrelem. Na uwagę zasługują precyzyjnie sformułowane i zastosowane kryteria włączenia i wyłączenia do badanej grupy opisane w metodyce pracy, w tym wykluczenie pacjentów z opornością na kwas acetylosalicylowy, zidentyfikowanych przy pomocy dodatkowych laboratoryjnych testów agregacji płytek. Świadczy to o dobrym przygotowaniu metodologicznym Doktoranta i umiejętności właściwego doboru badanej grupy. U wszystkich wykonano testy genetyczne krwi określające mutacje i polimorfizmy genetyczne genu CYP2C19: CYP2C19\*2, CYP2C19\*3, CYP2C19\*17 oraz wybranego polimorfizmu genu ABCB1. Wykonano także pomiary reaktywności płytek za pomocą agregometru świetlnego przy użyciu różnych stężeń ADP. Metodyka oznaczeń została poprawnie opisana w pracy. Należy w tym miejscu podkreślić, iż prace analizujące łącznie, w

jednej grupie pacjentów, polimorfizmy genetyczne genów CYP2C19 i ABCB1 są nieliczne i według wiedzy recenzenta w odniesieniu do populacji polskiej dotychczas nieopublikowane.

W oparciu o przeprowadzone badania określono częstość występowania polimorfizmów w zakresie genu CYP2C19 i ABCB1 w badanej populacji. Wyniki pracy wskazały, że występowanie alleli \*2 i \*17 genu CYP2C19 jest zbliżone do danych europejskich i zgodne z nielicznymi doniesieniami opisującymi genotypy mieszkańców Polski. Nie zarejestrowano ani jednej mutacji CYP2C19\*3. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu genu ABCB1 w badanej w pracy nie odbiegała zasadniczo od dostępnych danych europejskich i polskich. Analizując wpływ badanych polimorfizmów na reaktywność płytek krwi podczas ich stymulacji za pomocą 10  $\mu\text{mol/l}$  roztworu ADP, wykazano istotne różnice w agregacji pomiędzy homozygotami dzikimi a heterozygotami CYP2C19\*2, nie wykazując przy tym istotnego wpływu polimorfizmów CYP2C19\*17 i ABCB1 na reaktywność płytek bez względu na stężenie zastosowanego ADP. W zakresie zdefiniowanych fenotypów metabolicznych wykazano znamienne różnice w średniej agregacji płytek krwi pomiędzy fenotypem nie w pełni metabolizującym a fenotypem w pośrednim stopniu metabolizującym klopidoogrel, dla obu stężeń ADP. Ponadto nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu większości analizowanych czynników ryzyka zwiększonej reaktywności płytek pomimo leczenia klopidoogrelem na parametry agregacji płytek poza wskaźnikiem masy ciała (BMI), którego większe wartości związane były ze słabszą inhibicją agregacji płytek krwi. Należy zaznaczyć, iż uzyskane wyniki należy rozpatrywać w aspekcie zidentyfikowanych, opisanych i uzasadnionych przez autora w pracy ograniczeń badania, w tym stosunkowo małej liczebności badanej grupy.

Czytając dyskusję należy podkreślić dojrzałość Doktoranta. Liczne fragmenty świadczą nie tylko o umiejętności prawidłowej interpretacji przedstawionych danych, ale i pewnym dystansie w spojrzeniu na własną pracę naukową. Przeprowadzona przez Doktoranta dyskusja i analiza własnych wyników w odniesieniu do innych badań świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym w zakresie prezentowanego tematu rozprawy. Sposób, w jaki przedstawia i interpretuje zagadnienie dotyczące podobieństw i różnic w uzyskanych wynikach jest logiczny i przejrzysty, oparty o szczegółowo dobraną literaturę, co dodatkowo podnosi wartość pracy. Na koniec autor przedstawia ograniczenia badania, implikacje kliniczne i podsumowuje kierunki przyszłych badań w tematyce terapii przeciwplatekowej.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano szczegółowe wnioski, które w części są powtórzeniem wyników i wyczerpująco odpowiadają na postawione cele pracy:

1. Występowanie allelu CYP2C19\*2 u chorych z ostrym zespołem wieńcowym leczonych PCI z implantacją stentu jest niezależnym czynnikiem predykcyjnym zwiększonej reaktywności płytek krwi pomimo leczenia kłopidogrelem (HPR).
2. U chorych z ostrym zespołem wieńcowym leczonym PCI z implantacją stentu nie stwierdzono zależności między reaktywnością płytek krwi a obecnością polimorfizmu genów CYP2C19\*17 i ABCB1.
3. Rozkład polimorfizmów genów CYP2C19 i ABCB1 u badanych chorych jest zbliżony do rozkładu opisywanego w innych populacjach Polski i Europy.
4. U badanych pacjentów zwiększone BMI było niezależnym czynnikiem predykcyjnym zwiększonej reaktywności płytek pomimo leczenia kłopidogrelem.
5. W badanej grupie chorych nie wykazano, aby cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, przewlekła choroba nerek, nikotynizm, wiek i płeć miały istotny statystycznie wpływ na reaktywność płytek krwi.
6. Nie stwierdzono zależności między agregacją płytek krwi a średnią objętością płytki (MPV) i liczbą płytek (PLT).
7. Uwzględniając wieloczynnikowe uwarunkowania zdolności do agregacji płytek krwi u pacjentów leczonych angioplastyką z implantacją stentu z powodu ostrego zespołu wieńcowego należy uznać, że występowanie allelu CYP2C19\*2 stanowi ważną przyczynę zwiększonej reaktywności płytek krwi, ale nie pozwala zidentyfikować wszystkich chorych z HPR.

Dla recenzenta głównym przesłaniem przedstawianej pracy i wynikających z niej wniosków jest spostrzeżenie, że reaktywność płytek krwi jest uwarunkowana wieloma czynnikami, wśród których badania genetyczne mogą znaleźć realne implikacje kliniczne, zarówno w aspekcie wyboru leku przeciwplatekowego jak i identyfikacji czynników ryzyka powikłań krwotocznych związanych z podwójną terapią przeciwplatekową.

Pomimo wysokiej oceny przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej lek. Pawła Szymkiewicza nasuwa się jeszcze kilka uwag i komentarzy, z których część byłaby istotnym uzupełnieniem w trakcie przygotowywania publikacji. Praca przygotowana jest starannie, aczkolwiek Doktorant nie ustrzegł się kilku błędów edytorskich.

- Pomocny byłby spis rycin i tabel.
- W pierwszym zdaniu w sekcji wyników omyłkowo użyto słowa „zrandomizowano” zamiast „włączono”.

- W części dotyczącej metodyki oznaczeń agregacji płytek krwi ciekawa byłaby informacja czy weryfikowano powtarzalność pomiarów oraz ewentualnego odsetka powtórnych oznaczeń przy wątpliwym/niepewnym wyniku oznaczenia.
- Na rycinach 4.3.a i 4.3.b oraz w konsekwencji również w innych miejscach w pracy wątpliwości budzi oznaczenie \*1/\*1, gdyż na każdym z tych wykresów związane jest z inną liczebnością. Z uwagi na fakt, iż nie potwierdzano obecności allelu \*1 bardziej prawidłowym byłoby oznaczenie braku obecności badanego allelu, odpowiednio \*2-go, \*3-go i \*17-go.
- Ryciny 4.4.a-f oraz 4.6.b-c omyłkowo oznaczono jako medianę, rozstęp międzykwartyłowy i zakres, tymczasem wykresy przedstawiają zdaniem recenzenta średnią, błąd standardowy i 95% przedział ufności, co jest zgodne z zastosowanymi metodami statystycznymi (analiza wariancji)
- Tabela 4.4.a - nie dziwi fakt, iż nie wykazano istotności dla homozygoty mutacyjnej \*2/\*2 z uwagi na małą liczebność (3 chorych). Zdaniem recenzenta do rozważenia jest połączenie w jedną grupę heterozygot i homozygot mutacyjnych.
- Z tabeli 4.5.a wynika, iż obecność allelu CYP2C19\*2 wykazano u 41% chorych z HPR a nie u 31% jak podano w tekście.
- Zrezygnowałbym z analizy korelacji przedstawionej w tabeli 4.13.
- W analizie wieloczynnikowej przedstawionej w tabeli 4.14 nie uwzględniłbym GFR, jako parametr bezpośrednio skorelowany z wiekiem, płcią i kreatyniną. Jednocześnie wskazane byłoby uzupełnienie w opisie metod statystycznych typu zastosowanej regresji (liniowa?) oraz dołączenie do tabeli 95% przedziałów ufności dla oszacowanych współczynników beta.

Przedstawione powyżej uwagi nie pomniejszają i nie podważają dużej wartości pracy. W mojej ocenie jest to badanie oryginalne spełniające wymogi rozprawy doktorskiej. To ciekawa i jedna z nielicznych prac w populacji polskich pacjentów, w której autor podjął się badań nad trudnym zagadnieniem genetycznych aspektów odpowiedzi na leczenie kłopidogrelem. Badanie to wnosi istotny wkład do ciągle trudnego i aktualnego problemu oporności na leki przeciwplatekcyjne.

Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lekarza Pawła Szymkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Marek Gierlotka  
 Specjalista chorób wewnętrznych  
 KARDIOLOG

