

Kraków, 1.09.2014 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamila Karolczaka pt. Nowe czynniki przyczyniające się do oporności płytek krwi na działanie kwasu acetylosalicylowego.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Kamila Karolczaka dotyczy bardzo częstego problemu praktycznego związanego z powszechnym stosowaniem pierwotnej i wtórnej profilaktyki aspirynowej w chorobach układu sercowo-naczyniowego. W Stanach Zjednoczonych AP aktualnie 26 milionów osób przyjmuje aspirynę jako leczenie przeciwplatek. Redukcja zawałów serca przypisana profilaktycznej dawce aspiryny u chorych po przebytych zawałach wynosi co najmniej 20%. Termin oporność na aspirynę odnosi się do obserwacji klinicznej niepowodzenia profilaktyki przeciwplatekowej z zastosowaniem tego leku. W diagnostyce laboratoryjnej tą samą nazwą opisane jest zjawisko zachowania reaktywności płytek krwi wobec agonistów, których działanie powinno być zablokowane po podaniu aspiryny. W zależności od definicji i populacji, w której są prowadzone badania, oporność na przeciwplatekowe działanie aspiryny obserwowana jest u 5-40%.

Kliniczna i eksperymentalna praca doktorska mgr Kamila Karolczaka została wykonana w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Promotorem pracy jest Pan prof. dr hab. n. med. Cezary Watała, którego zainteresowanie zaburzeniami hemostazy, rolą płytek krwi i funkcją lipidowych błon krwinek liczą 30 lat a ich miarą jest 150 publikacji. Doktorant prowadził swoje badania pod okiem jednego z największych ekspertów w dziedzinie.

Rozprawa doktorska ma formę skomentowanego przez Doktoranta zbioru dwóch spójnych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, w języku angielskim. Układ edytorski rozprawy jest typowy. W krótkim, liczącym niespełna 8 stron Wstępie Doktorant wyjaśnia molekularny mechanizm działania aspiryny oraz wprowadza termin oporności na aspirynę; tej klinicznej oraz zjawiska obserwowanego w laboratorium, które nazywa opornością na aspirynę płytek krwi. Wśród wskazywanych przyczyn oporności zwraca uwagę na zwiększone stężenie homocysteiny, niebiałkowego aminokwasu o działaniu szkodliwym z powodu reaktywności chemicznej i pobudzającego wpływu na receptorowe kanały błonowe NMDA. Drugim parametrem, który został wybrany jako temat rozprawy, jest morfologia krwi, zbiór parametrów najczęściej oznaczanych laboratoryjnie, których związek z krzepnięciem jest oczywisty z powodu dostarczania fosfolipidów niezbędnych w składaniu kompleksu enzymatycznego

protrombinazy i udziału w formowaniu zakrzepu, a jednak nie był nigdy specjalnie rozpatrywany. Wstęp został napisany bardzo dobrym i zwięzłym językiem naukowym, zamieszczono w nim 39 odnośników piśmiennictwa do najistotniejszych publikacji. Z moich uwag krytycznych do tej części rozprawy, oczekiwałbym wzmianki o tiolaktonie homocysteiny, jako potencjalnie bardziej reaktywnej formie aminokwasu, a także o aktywności paraoksonazowej osocza, która przeciwdziała niektórym z efektów toksycznych homocysteiny. Oba te tematy zostały jednakże uwzględnione w pracach oryginalnych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Cele rozprawy przedstawiono krótko, czy homocysteina i erytrocyty uczestniczą w mechanizmie oporności płytek na aspirynę. Takie ich sformułowanie jest najkrótszym przedstawieniem problemu z możliwych do wyobrażenia. Doktorant weryfikację tych hipotez przeprowadził na podstawie randomizowanego badania klinicznego, w którym zarówno stężenie homocysteiny i liczba erytrocytów we krwi były zmiennymi niezależnymi, uzupełniając poczynione obserwację starannie zaplanowanymi eksperymentami *in vitro*.

Kolejnym rozdziałem recenzowanej rozprawy jest opis zastosowanych metod. Podstawowe znaczenie w interpretacji wyników badania klinicznego miał wskaźnik całościowy (*comprehensive score*), który był trójparametryczną interpretacją wyniku badania reaktywności płytek *in vitro*. Uwzględniał on stopień aktywacji mierzonej agregometrem impedancyjnym w krwi pełnej pod wpływem dwóch agonistów: kolagenu i kwasu arachidonowego, a także stężenie tromboksanu B<sub>2</sub> uwalnianego pod wpływem godzinnej inkubacji antykoagulowanej krwi w warunkach jej ciągłego mieszania. Na podstawie tego wskaźnika, grupa badana była stratyfikowana na chorych z dobrą odpowiedzią na przeciwplatekowe działanie aspiryny oraz na chorych, u których efekt leku był suboptymalny. Pozostałe analizy statystyczne, w których porównano efekt podwojenia dawki leku, były również interpretowane na podstawie tego wskaźnika. W dalszej części Metod przedstawiono założenia wykonanych eksperymentów laboratoryjnych, w których badano zdolność hamowania płytek we krwi pełnej przez aspirynę po jej wcześniejszej inkubacji z homocysteiną i jej tiolaktonem, a także mierzono stopień acetylacji metodą radioizotopową izolowanych płytek. Z uwag krytycznych, Recenzent oczekiwał pełniejszego opisu wykorzystanego w rozumowaniu statystycznym całościowego wskaźnika reaktywności płytek, ponieważ we wcześniejszych pracach Promotora test generacji TXB<sub>2</sub> był używany niezależnie od testu trójparametrycznego, w którym trzeci parametr stanowił czas okluzji mierzony aparatem PFA-100. W opisie eksperymentów laboratoryjnych zakradła się drobna nieścisłość, mianowicie metody radiometryczne nadal oceniały jedynie acetylację białek płytek, fakt ich homocysteinylacji pozostał oczekiwany, lecz niezwerifikowanym skutkiem inkubacji w obecności homocysteiny.

Podstawę rozprawy doktorskiej mgr Kamila Karolczaka stanowią dwie oryginalne prace naukowe, w których Doktorant jest pierwszym autorem.

W pracy pt. *Homocysteine is a novel risk factor for suboptimal response of blood platelets to acetylsalicylic acid in coronary artery disease: a randomized multicenter study*, opublikowanej w *Pharmacological Research* 2013;74:7-22 (IF=4,34) część kliniczna polegała na przeprowadzeniu randomizowanej próby z zastosowaniem dwóch dawek aspiryny (75 i 150 mg na dobę) podawanych raz dziennie 200 chorym, którzy kwalifikowali się do leczenia przeciwplateletowego z powodu przebytego zawału serca lub stabilnej choroby wieńcowej. Badanie było naprzemienne, a jego fazy trwały po 30 dni. Ponadto, w grupie zdrowych ochotników zbadano metodami laboratoryjnymi działanie aspiryny po 7 dniach podawania w dawce 75 mg, a także wykonano eksperymenty laboratoryjne w pobranej od nich krwi. Badanie ukończyło 138 osób, którym na podstawie całościowego wskaźnika reaktywności płytek przypisano prawidłowe lub suboptymalne przeciwplateletowe działanie leku. Wśród istotnych dla tej stratyfikacji różnic demograficznych stwierdzono podwyższony wskaźnik masy ciała, nadciśnienie tętnicze, zwiększoną częstość ostrych zespołów wieńcowych wymagających interwencji, a także częstsze występowanie cech zespołu metabolicznego. Nowym odkryciem Doktoranta jest wykazanie podniesionego stężenia homocysteiny w osoczu, które w analizie metodą regresji wieloczynnikowej okazało się niezależnym od wymienionych już różnic czynnikiem ryzyka osłabionego działania przeciwplateletowego aspiryny w dawce 75 mg na dobę. Kolejnym wnioskiem wynikającym z tego badania jest stwierdzenie, że podwojona dawka aspiryny poprawia jej efekty przeciwplatetowe, zwłaszcza w grupie chorych z podwyższonym stężeniem homocysteiny w osoczu. Jest praktyczne znaczenie obserwacji poczynionej na podgrupie chorych na cukrzycę typu 2. Ich korzyść terapeutyczna, przejawiająca się zmniejszeniem reaktywności płytek po zwiększeniu dawki aspiryny, wydaje się niezależna od stężenia homocysteiny w osoczu.

Istotną częścią pracy opublikowanej w *Pharmacological Research* są eksperymentalne oznaczenia działania aspiryny na płytki krwi. Przy czym nie miały one na celu weryfikacji stopnia zahamowania cyklooksygenazy-1, lecz sprawdzenie w jakim stopniu lek może stanowić donor grup acetylowych modyfikujący białka płytkowe. W toku eksperymentów okazało się, że zachodzi silna interakcja między homocysteiną obecną we krwi a aspiryną. Polega ona na acetylacji reszty aminowej aminokwasu, szczególnie szybko zachodzącej w przypadku jego wiązania do powierzchni stałej. Udowodnienie, czy to nowo odkryte zjawisko może powodować słabsze hamowanie aktywności COX-1, wymaga prowadzenia dalszych badań. Należy podkreślić, że zaproponowany przez Doktoranta i poparty wstępnymi wynikami mechanizm interakcji między aspiryną a homocysteiną jest bardzo interesujący.

W drugiej z prac składających się na rozprawę doktorską pt. *Aspirin dose increase from 75 to 150 mg suppress red blood cell contribution to suboptimal platelet response to aspirin in patients with CAD* (*Cardiovascular Drugs and Therapy* 2013;27:549-558 IF=2,67) mgr Kamil Karolczak weryfikował hipotezę o modulacji przeciwplateletowego działania aspiryny przez erytrocyty. Grupa badana, licząca 125 chorych na stabilną chorobę wieńcową

pochodziła z randomizowanego badania klinicznego z interwencją polegającą na naprzemiennym podawaniu aspiryny w dawce 75 i 150 mg przez 30 dni każda. Dodatkowo zrekrutowano grupę kontrolną 65 zdrowych osób, u których aspiryna była podawana w dawce 75 mg przez 7 dni. Działanie leku na płytki krwi oceniono takim samym wskaźnikiem całościowym, uwzględniającym ich stopień aktywacji pod wpływem kolagenu typu 2 i kwasu arachidonowego mierzonej agregometrią impedancyjną krwi pełnej, oraz przez oznaczenie stężenia tromboksanu B<sub>2</sub> w osoczu krwi po jej 1 godzinnej inkubacji. Podobne były do poprzedniej publikacji porównania i modelowania statystyczne, oparte na stratyfikacji osób badanych z wykorzystaniem mediany jako punktu odcięcia. Zmiennymi niezależnymi w tych analizach, poza klasycznymi czynnikami ryzyka choroby wieńcowej, były parametry morfologiczne krwi, poziom CRP, cholesterolu HDL i hemoglobiny glikowanej. Bardzo interesującym wynikiem tego badania było stwierdzenie, że zwiększona liczba erytrocytów koreluje dodatnio ze słabszą odpowiedzią na aspirynę u chorych, przy dawce leku 75 mg. Zwiększenie dawki leku do 150 mg spowodowało zamaskowanie tego efektu, jednakże nadal obserwowano wśród chorych słabsze hamowanie reaktywności płytek w przypadku nieznacznie podwyższonych poziomów CRP. Uwzględnienie klasycznych czynników ryzyka choroby wieńcowej w regresji logistycznej nie udokumentowało niezależnej roli podwyższonej liczby krwinek czerwonych lub hematokrytu w zjawisku aspirynooporności. Jest jednak zastanawiające, że efekt spowodowany liczbą erytrocytów pozostał istotny po uwzględnieniu różnic w poziomie CRP, stężenia cholesterolu LDL i leukocytozy przy dawce aspiryny 75 mg. Istnieje kilka możliwych wyjaśnień tego zjawiska. Doktorant sugeruje, że może być związane z opisaną w 2011 r. aktywnością enzymatyczną erytrocytów, które mają ekspresję acetylhdroazy czynnika aktywującego płytki (PAF) przyczyniając się do wewnątrzkomórkowego metabolizmu aspiryny jako substratu, przez co zmniejszają jej stężenie w osoczu. Biorąc pod uwagę znaną zależność między liczbą erytrocytów a lepkością i innymi reologicznymi właściwościami krwi, szczególnie w krążeniu tętniczym, zmiany morfologii krwi w kierunku policytemii mogą także nasilać aktywację płytek, np. spowodowana siłami ścinającymi. W porównaniu z grupą kontrolną, chorzy na chorobę wieńcową, mimo dość dobrego hamowania generacji TXB<sub>2</sub> *in vitro* zachowują reaktywność płytek na kolagen, na co Doktorant zwraca uwagę w omawianej publikacji. W podsumowaniu implikacją praktyczną tej publikacji jest wykazanie dawkozależności zjawiska laboratoryjnej oporności płytek krwi na aspirynę oraz identyfikacja po raz pierwszy podwyższonych parametrów morfologii jako czynnika sprzyjającego występowaniu zjawiska oporności na aspirynę.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Kamila Karolczaka zawiera również rozdział poświęcony syntetycznemu omówieniu wyników, w którym znalazła się ocena przydatności metod laboratoryjnych badania reaktywności płytek w identyfikacji oporności na aspirynę. Poza moją wcześniejszą uwagę dotyczącą całościowego wskaźnika aktywacji

płytek, oczekiwałem wzmianki o wykonanych w toku badań klinicznych oznaczeniach agregacji pod wpływem ADP jako agonisty. Czy te wyniki były jedynie kontrolą jakości materiału klinicznego, czy też stanowiły element rutynowego badania agregometrycznego, którego Doktorant nie wykorzystał w swoich badaniach nad aspiryną.

Najważniejsze obserwacje i wnioski Doktoranta poczynione w toku pracy zostały zebrane w 7 punktach. Są one sformułowane bardzo dobrze i nie mam uwag do tej części pracy.

Rozprawę uzupełniają oświadczenia współautorów publikacji, z których wynika, że wkład Doktoranta w ich powstanie, zarówno na etapie zaplanowania, rekrutacji grup, wykonania oznaczeń oraz analizy wyników i przygotowania manuskryptu był zdecydowanie przeważający i szacowany na około 70% dla każdej z prac.

Doktorant jest autorem lub współautorem 4 publikacji przyjętych do druku przed rozpoczęciem studiów doktoranckich oraz dwóch dalszych opublikowanych już podczas studiów doktoranckich. Spośród tych 7 publikacji nie składających się na rozprawę doktorską, 4 ukazały się w czasopismach indeksowanych o współczynniku oddziaływania ponad 1,43.

Prace stanowiące podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr Kamila Karolczaka zostały dotychczas zacytowane pięciokrotnie, a dobry współczynnik oddziaływania czasopism, w których je opublikowano gwarantuje dalsze zainteresowanie uzyskanymi wynikami

W podsumowaniu recenzji rozprawy doktorskiej Pana Kamila Karolczaka stwierdzam, że jest ona oryginalnym i wartościowym opracowaniem dotyczącym mechanizmów przyczyniających się do niepowodzenia terapeutycznego aspiryny w profilaktyce chorób układu sercowo-naczyniowego. Doktorant dowiódł dużych umiejętności w zakresie przeprowadzonego badania klinicznego oraz laboratoryjnej oceny reaktywności płytek krwi. Na szczególne uznanie zasługuje wzorowo przeprowadzona analiza statystyczna wyników badania klinicznego, która ujawniła istotny udział homocysteiny oraz erytrocytów w zjawisku oporności płytek na aspirynę. Pozwoliło to sformułować ważne dla klinicysty wnioski, o możliwości poprawy skuteczności profilaktyki aspirynowej w grupie z suboptymalnym działaniem leku, przez podwojenie dawki. Wskazanie zależności mechanizmów acetylacji białek płytkowych od stężenia homocysteiny, a także sugestia ochronnego działania N-acetylo-tiolaktonu homocysteiny, jest nowym odkryciem zaproponowanym przez Doktoranta, które powinno zostać dokładnie zbadane. Może się podobać w rozprawie umiejętność zaplanowania eksperymentów niezbędnych dla krytycznego opracowania wyników własnych oraz ostrożność w ich interpretacji. Uzyskane wyniki są oryginalne i nowatorskie, zostały opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu i o dobrym wskaźniku oddziaływania. Rozprawa doktorska mgr Kamila Karolczaka spełnia warunki określone w art

13 Ustawy z dn. 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Powołując się na powyższą pozytywną ocenę, wnoszę o dopuszczenie mgr Kamila Karolczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również do Pana Dziekana Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie tej rozprawy, a to ze względu na jej szeroki zakres badań, nowatorstwo oraz realne szanse praktycznego wykorzystania osiągnięć zawartych w pracy.

Prof. dr hab. n. med. Marek Sanak



Kierownik Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej

II Katedra Chorób Wewnętrznych UJ CM