

Wrocław dnia 16.10.2015 r.

Prof. dr hab. n. med. Adam Szelaż
Kierownik Katedry i Zakładu Farmakologii
Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Rada Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Przedstawiam Wysokiej Radzie ocenę rozprawy doktorskiej Pana

lek. med. Michała Żorniaka

pt.: *„Analiza działania kardioprotekcyjnego preparatu WS-1442
w modelu wczesnych arytmii reperfuzyjnych u szczurów”*

Leki pochodzenia roślinnego były, są i będą bardzo ważną składową farmakoterapii. Postęp w leczeniu farmakologicznym wielu chorób był możliwy dzięki nowym lekom - zarówno tym stworzonym od podstaw przez człowieka (syntetycznych) jak i tych powstałych na bazie istniejących w przyrodzie związków i często stosowanych od wieków w terapii.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy badań wpływu standaryzowanego ekstraktu głogu WS-1442 w modelu wczesnych arytmii reperfuzyjnych u szczurów.

Tematyka pracy związana jest z poszukiwaniem nowych sposobów farmakoterapii chorób układu krążenia. Wyzwaniem dla współczesnej nauki jest niewydolność serca, która jest końcowym wspólnym etapem wielu chorób układu krążenia (najczęściej choroby niedokrwiennej serca i nadciśnienia tętniczego). Mimo znacznych postępów w leczeniu niewydolności serca stanowi ona coraz większy problem zdrowotny, ponieważ częstość jej występowania (jako jedynej choroby układu krążenia) wciąż wzrasta. Niewydolność serca ma złe rokowanie, ponieważ w zaawansowanej chorobie (IV klasa wg NYHA) około 50% chorych umiera w ciągu jednego roku, a wskaźniki przeżyć 5-letnich są gorsze niż w przypadku większości chorób nowotworowych. Niewydolność serca stanowi także ważny problem zdrowotny i społeczny, między innymi dlatego, że jest najczęstszą i prawdopodobnie najbardziej kosztowną przyczyną

hospitalizacji pacjentów. Te dane wskazują, że podjęcie badań, których wyniki pośrednio lub bezpośrednio mogłyby poprawić te niekorzystne wskaźniki należy uznać za zasadne.

Owoce i kwiaty głogu w postaci różnych preparatów - nalewek lub gotowego inkraktu (alkoholatury) podobnego do nalewki, ale sporządzanego z surowców świeżych, a nie suszonych, lub kwiatostanu przygotowanego do zaparzenia, były stosowane od dawna w różnych schorzeniach, np. w niewydolności nerek lub serca na ogół jako leki wspomagające leczenie glikozydami nasercowymi. Dawniej nie było innych skutecznych leków, a częste kojarzenie preparatów z głogu z glikozydami nasercowymi, uzasadniane obserwacjami klinicznymi, staje się dzisiaj jasne i zrozumiałe w świetle - dobrze opisanego przez doktoranta mechanizmu działania preparatów głogu. Gdy przed laty pojawiły się leki o udowodnionym działaniu obniżającym ciśnienie krwi, poprawiające bilans tlenowy serca, czy wymuszające skutecznie diurezę, stosowanie preparatów głogu straciło na znaczeniu, ponieważ nie znajdowały one racjonalnego zastosowania. Produkty zawierające preparaty głogu można spotkać w wolnej sprzedaży w wielu krajach. Wyciągi z głogu stosowane w różnych schorzeniach jako leki uzupełniające są obecne w Polsce w różnych preparatach, takich jak Cardiol C, Kelicardina, Neocardina lub Neospasmina lub Passispasmina. Dostępne są także standaryzowane produkty głogu produkowane przez firmy związane z medycyną alternatywną, w tym także producentów leków homeopatycznych. Jednym z produktów firmy Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals, który badał doktorant jest standaryzowany wyciąg z głogu oznaczony symbolem WS 1442 zawarty w preparatach Crataegut lub CardioMax® produkowanych w tabletkach. Zgodnie z informacją producenta preparatu CardioMax® zawierającego wyciąg z głogu WS 1442 nie jest on substytutem dla medycyny. Tak więc pośrednio firma przyznaje, że nie ma dostatecznych wiarygodnych dowodów (takich jakich wymaga allopatia) na jego skuteczność terapeutyczną w określonych schorzeniach.

Doświadczenia dawnej medycyny tradycyjnej, a dzisiaj określanej jako medycyna ludowa wielokrotnie umożliwiały postęp i wprowadzenie nowych leków. Dobrym przykładem jest tegoroczna nagroda Nobla przyznana 5 października 2015 roku w dziedzinie medycyny i fizjologii. Jedną z laureatek tej nagrody Youyou Tu odkryła lek - Artemisinin, dzięki któremu zachorowanie na malarię rzadziej kończy się śmiercią pacjenta. Youyou Tu jest profesorem Akademii Chińskiej Medycyny Tradycyjnej a swoją karierę naukową poświęciła badaniom nad tradycyjną medycyną chińską. Wspominam o tym, aby podkreślić, że czasami medycyna tradycyjna w niektórych krajach rozumiana jest przez naukowców spoza tych krajów jako medycyna ludowa. Niezależnie od nazewnictwa mamy wiele do odkrycia a osiągnięcia dawnej medycyny określanej dzisiaj jako medycyny ludowej są wciąż wykorzystywane we współczesnej

medycynie - nauce opartej przecież na dowodach naukowych. W ten nurt badań - wyjaśniania mechanizmów działania i dostarczania dowodów naukowych na skuteczność i bezpieczeństwo działania preparatów roślinnych, dawniej powszechnie stosowanych a dzisiaj rzadziej - wpisuje się przedstawiona do recenzji praca doktorska lek. med. Michała Żorniaka.

Rozprawa doktorska liczy łącznie 59 stron w tym: 42 ponumerowane i 17 nieponumerowanych stron, na których autor umieścił: streszczenie w języku polskim i angielskim (2 strony), 12 rycin (12 stron), 2 tabele (2 strony), podziękowanie za pomoc w wykonaniu pracy (1 strona). Układ pracy jest typowy. Praca posiada wykaz używanych skrótów, wykaz rycin i tabel, wstęp; poza tym praca zawiera główne rozdziały - założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusję, wnioski, piśmiennictwo liczące 109 pozycji, w tym po jednej publikacji z roku 2012 i 2013, a pozostałe z lat wcześniejszych. Niektóre wymienione rozdziały mają także podrozdziały. Czytelne ryciny i wykresy przedstawiające wyniki badań, bardzo ułatwiają zapoznanie się z treścią pracy i analizę wyników oraz wniosków z przeprowadzonych badań, mimo braku w pracy spisu treści. Wstęp pracy liczący 7 stron (7-14 str.) jest napisany zwięźle, zawiera informacje merytorycznie związane z tematyką badań - dowodzi, że doktorant ma sporą wiedzę specjalistyczną, a także ogólną wiedzę z zakresu medycyny, która zgodnie z obowiązującymi przepisami wymagana jest od kandydatów na stopień doktora w dyscyplinie medycyna.

Celem pracy było zbadanie wpływu preparatu WS-1442 - przy różnych dawkach i drogach podania - na śmiertelność zwierząt, występowanie komorowych zaburzeń rytmu, oraz wybrane parametry hemodynamiczne i biochemiczne w modelu doświadczalnym wczesnych arytmii reperfuzyjnych u szczurów. Sformułowanie użyte przez doktoranta przy celu pracy jako (...) *określenia najskuteczniejszych dawek badanego preparatu i czasu jego podania na zmniejszenie śmiertelności zwierząt, występowanie komorowych zaburzeń rytmu, wybrane parametry hemodynamiczne i biochemiczne stosowane do oceny uszkodzenia mięśnia sercowego* (...) sugeruje - niesłusznie - , że działanie badanego preparatu zmniejszające śmiertelność (...) występowanie komorowych zaburzeń rytmu, i.t.d. zostało wykazane przed tym badaniem, a badacz podjął się jedynie określenia najskuteczniejszych dawek i czasu jego podania na zmniejszenie śmiertelności (...).

Wg informacji producenta preparatu CardioMax® firmy Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals każda tabletkę CardioMax® 450 mg zawiera standaryzowany wyciąg oznaczony symbolem WS 1442 w ilości 450 mg, która to ilość odpowiada 2,385 g suchych liści i kwiatów głogu.

Badania z użyciem preparatów roślinnych są trudne, przede wszystkim z powodu kłopotów z ustaleniem stałego składu produktu, wynikających ze zmiennej zawartości różnych substancji. To sprawia, że możemy mieć trudności z odpowiedzią na pytanie - czy na pewno składnik, który wystandaryzowaliśmy rzeczywiście jest odpowiedzialny za obserwowane, wykazane działanie? Standaryzacja ma na celu zagwarantowanie powtarzalności określonego składu. W przypadku preparatu WS-1442 standaryzacja dotyczy obecności grupy polifenoli - tzn. zawartości w wyciągu 18.75% oligomerycznych procyanidyn należących wg niektórych także do flawonoidów. Trzeba jednoznacznie podkreślić, że doktorant badał działanie całego ekstraktu, a nie poszukiwał składnika odpowiedzialnego za to działanie. Nie mniej jednak w każdym przypadku należy uwzględnić, że otrzymane wyniki dotyczą konkretnego wyciągu, o określonym składzie, a to oznacza, że kolejne badanie, nawet przy tej samej dawce, z użyciem wyciągu wystandaryzowanego do jednego składnika może dać inny wynik o ile za to działanie odpowiada inny, niewystandaryzowany składnik, ponieważ może on występować w innym stężeniu. Preparaty głogu zawierają (różne preparaty w różnej ilości): związki flawonoidowe: hyperozyd, kwercetynę, witeksynę, mieszaninę kwasów triterpenowych (kratogolowego, ursolowego, oleanowego), pochodne puryn (adenozynę, adeninę, guaninę), kwasy (cytrynowy, winowy), związki garbnikowe. Z tych związków wiele wykazuje aktywność biologiczną wykorzystywaną w terapii. Przykładowo wiadomo, że adenozyzna jest między innymi uznanym lekiem przeciwaritmicznym, a kwercetyna jest chyba najczęściej opisywanym i stosowanym przez farmaceutów flawonoidem działającym między innymi na naczynia.

Doktorant badania przeprowadził na 152 szczurach. Metoda i technika operacyjna została bardzo dokładnie opisana w sposób umożliwiający jej powtórzenie. Skuteczność zamknięcia tętnicy weryfikowana była w zapisie elektrokardiograficznym i przez pomiar – stwierdzenie gwałtownego spadku ciśnienia tętniczego. Reperfuzję kontrolowano również poprzez obserwację zapisu ekg tzn. zmiany zespołu ST-T. Każde doświadczenie obejmowało okresy: 10 minut - operacyjne przygotowanie narządów, 15 min. stabilizacja, 7 minut zamknięcie tętnicy, 15 minut reperfuzja. Mierzono ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe i zapisywano obraz ekg, po czym obliczano średnie ciśnienie tętnicze, częstość akcji serca - z krzywej ekg, pośredni wskaźnik zużycia tlenu, wskaźnik śmiertelności - odsetek zwierząt, które nie przeżyły do końca okresu reperfuzji w porównaniu do liczebności całej grupy (w %), częstość występowania (%) i czas trwania arytmii komorowych (migotania komór, częstoskurczu komorowego) podczas reperfuzji. W pobranej próbce krwi oznaczano aktywność kinazy kreatynowej oraz stężenie białka w surowicy.

Analizę statystyczną przeprowadzono nieparametrycznym odpowiednikiem ANOVA dla najprostszych analiz czyli testem Kruskal-Wallisa, który normalności nie wymaga oraz testem chi-kwadrat ($p < 0,05$).

Na podstawie analizy otrzymanych wyników, doktorant wysuwa właściwe wnioski dotyczące badanego ekstraktu z głogu oznaczonego symbolem WS-1442.

Działanie ekstraktu zależy od wielkości podanej dawki. Wskaźnik śmiertelności był mniejszy w każdej z badanych grup w porównaniu z grupą kontrolną, i zmniejszał się wraz ze zwiększaniem dawki preparatu. W grupie, w której podano ekstrakt WS-1442 dwukrotnie w dawce 100 mg/kg na 24 godziny i 100 mg *p.o.* na godzinę przed doświadczeniem nie padł żaden ze szczurów. Migotanie komór nie występowało w grupach, w których ekstrakt stosowany był dwukrotnie, a rzadziej występowało w grupach, w których WS-1442 podano w dawkach 50 mg/kg *p.o.* i 100 mg/kg *p.o.* Dodatkowy wniosek z tej obserwacji - przyczyną śmierci zwierząt jest migotanie komór. We wszystkich grupach badanych krótszy był także czas trwania częstoskurczu komorowego. W badaniach biochemicznych wykazano (z wyjątkiem grupy z najmniejszą dawką ekstraktu) obniżenie aktywności kinazy keratynowej. Badania dowodzą, że ekstrakt skutecznie zmniejsza śmiertelność szczególnie wtedy, gdy podany jest na 4 godziny przed doświadczeniem, ale czas podania nie wpływał na częstość występowania częstoskurczu komorowego i wielkość spadku aktywności kinazy kreatynowej. Wielkość dawki ekstraktu WS-1442 nie wpływała na mierzone parametry hemodynamiczne, ale miała wpływ na większe wartości wskaźnika pośredniego zużycia tlenu (w okresie stabilizacji), ale nie w okresie zamknięcia ani nie w okresie otwarcia tętnicy. Nie wykazano wpływu badanego ekstraktu na wielkość ciśnienia i częstość akcji serca. Ta obserwacja jest ciekawa, ponieważ sugeruje, że częstoskurcz komorowy powstaje w sposób nagły, a właściwości obniżania ciśnienia tętniczego przez związki zawarte w preparacie głogu związane są prawdopodobnie z ich wpływem na naczynia i/lub z działaniem diuretycznym.

Każdy naukowiec trochę inaczej planuje badania i potem je opisuje i dlatego przy ocenie należy to uwzględnić. Niektóre bardziej lub mniej ważne uwagi przedstawiam poniżej.

Dlaczego doktorant oznaczał niespecyficzną kinazę keratynową a nie bardziej specyficzne troponiny?

Opisując wyniki badania SPICE-trial (bardzo ważne badanie dla uzasadnienia badań) doktorant napisał (...) *Do badania włączono 2 681 chorych z przewlekłą niewydolnością serca w stopniu*

NYHA II/III, a grupa badana liczyła 1338 pacjentów, którzy otrzymywali standaryzowany ekstrakt WS-1442 w dawce 900 mg/dobę przez okres 24 miesięcy. Badacze potwierdzili znamienne, wynoszącą 39,7 % redukcję występowania nagłej śmierci sercowej w grupie badanej w porównaniu z grupą placebo (...)

Takie rewelacyjne wyniki powinny szokować każdego i gdyby były prawdziwe to badanie powinno zostać przerwane po to, aby umożliwić wszystkim pacjentom zażywanie tak „cudownie działającego leku”. Zmniejszenie przypadków śmierci nagłej o prawie 40 % u pacjentów zażywających wyciąg z głogu w porównaniu do niezażywających jest przecież niezwykle. Błąd interpretacyjny polega na tym, że doktorant - podobnie jak autorzy pracy - nie podaje wielkości bezwzględnych tzn. liczby pacjentów a tylko procenty, które w zestawieniu z ogólną liczbą pacjentów mogłyby sugerować, że u 39,7 % z 1338 pacjentów zażywających wyciąg nie wystąpiła śmierć nagła, czyli preparat z głogu uratował życie 531 pacjentom ! W rzeczywistości podane % dotyczą niewielkiej podgrupy, i stanowią, że śmierć nagła wystąpiła u 5 % zażywających WS-1442 i u 8,3 % leczonych bez preparatu głogu (*placebo*) i to tylko w grupie pacjentów z wyrzutem lewej komory między 25 a 35 %. Trzeba też podkreślić, że w omawianym badaniu nie ma prawdziwego *placebo*. *Placebo* w tym badaniu (o czym nie wspomniano) oznacza pacjentów zażywających różne standardowe leki i to w różnych indywidualnych połączeniach, tzn. leki moczopędne, glikozydy naparstnicy, β -blokery, inhibitory enzymu koncertującego a nawet leki przeciwaritmiczne. Zresztą żadna komisja bioetyczna nie wydałaby zgody na badanie z użyciem prawdziwego *placebo* u pacjentów z niewydolnością serca. Innymi słowy podając skuteczność leków w % zawsze warto, a nawet trzeba podać liczbę pacjentów, do której odnoszą się te procenty.

Jaki preparat był stosowany w badaniach? Doktorant w metodyce wspomina o standaryzowanym wyciągu, ale czy był to wyciąg w tabletkach, produkowany przez wspomnianą wyżej firmę czy czysty substrat używany do produkcji tego preparatu w tabletkach?

Szczury przed doświadczeniem były głodzone przez 12 godzin - czy otrzymywały wodę *ad libitum* czy też były pozbawione swobodnego dostępu do wody?

Badania zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach. Czy w numerze zgody nie ma błędu?

Z eksperymentu wykluczano zwierzęta z arytmia występującą w czasie okresu stabilizacji i ze średnim ciśnieniem tętniczym poniżej 70 mmHg. Pytanie ile zwierząt wykluczono? Przykładowo w grupie kontrolnej użyto 16 zwierząt. Śmiertelność wynosiła 50 %. tzn. przeżyło 8

zwierząt (tyle podano w tabelach), ale czy to oznacza, że nie wykluczono żadnego? W której grupie wykluczono zwierzęta i jak to wpłynęło na liczbę zwierząt ujętych na rycinach? Czy liczba 152 szczurów użytych w doświadczeniu jest precyzyjna?

W całej pracy używane jest niezbyt precyzyjne sformułowanie dotyczące statystyki, chociaż analiza statystyczna jest wykonana prawidłowo. Chodzi o pojęcie „istotność statystyczna”. Trzeba pamiętać, że różnica statystycznie istotna przy $p < \dots$ dotyczy porównania średnich wartości między grupami. Jeżeli stwierdzimy, że badany związek w dawce ... obniża stężenie parametru X... w porównaniu do grupy kontrolnej....., to zapis powinien brzmieć:

Różnica między średnią wartością stężeń X w grupie ze związkiem w dawce... w porównaniu do średniej wartości stężeń X w grupie kontrolnej jest istotna statystycznie przy $p < \dots$. Podsumowując istotna statycznie przy $p < \dots$ jest różnica między średnimi wartościami badanego parametru w badanych grupach. Oczywiście powyżej napisane zdanie w mowie potocznej często skracamy, ale w pracy naukowej zapis musi dowodzić, że rozumiemy, co napisaliśmy i właściwie stosujemy zasady statystyki. Z drugiej strony język polski jest językiem dynamicznym i szczególnie w nauce często określenia potoczne stają się oficjalne.

Bardzo często pojawia się nieścisłość polegająca na tym, że doktorant używa określeń ... działanie lub wpływ dawki ... sugerując przez to, że to dawka działa..., a przecież to substancja w określonej dawce działa. Jest to nieścisłość popełniana przez młodych naukowców.

Także wysoka dawka lub niska dawka nie jest właściwym określeniem - dawka może być mała lub duża, większa lub mniejsza, ale nie niska lub wysoka, bo nie mierzymy jej w jednostkach długości, np. w cm.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest dobrze zaplanowaną, przemyślaną i porządnie wykonaną pracą naukową z rzetelnym uzasadnieniem celu badań. Praca jest bardzo dobrze wykonana z użyciem właściwej aparatury i metod badawczych wymagających wprawy i doświadczenia, w tym także nabycia określonych umiejętności manualnych. Aby wykonać to doświadczenie doktorant musiał opanować stronę techniczną doświadczenia i solidnie wcześniej poćwiczyć.

Przedstawione wyniki badań sugerują, że badania aktywności biologicznej preparatów glogu są uzasadnione, a co więcej być może ich kontynuowanie, także przy innym planie

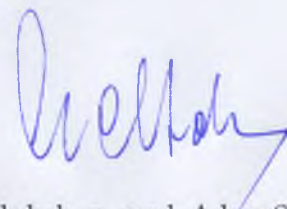
doświadczenia, ułatwi w przyszłości wyjaśnienie patomechanizmu niewydolności serca i umożliwi znalezienie nowych leków skutecznych w leczeniu różnych schorzeń z nią związanych.

W podsumowaniu stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane a wnioski znajdują potwierdzenie w przedstawionych wynikach badań.

Rozprawa doktorska lek. med. Michała Żorniaka spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrzu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie lek. med. Michała Żorniaka do dalszego etapu przewodu doktorskiego.

Wrocław dnia 16 października 2015 r.



Prof. dr hab. n. med. Adam Szelağ