

## **Autoreferat**

### **1. Imię i nazwisko**

Wiktor Kuliczkowski

### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe / artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

- Lekarz medycyny - Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wydział Lekarski, Dyplom nr 15815 z dnia 15.09.98.
- Doktor Nauk Medycznych - Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wydział Lekarski, Dyplom nr 27/2004/WLKP z dnia 14.05.04. Tytuł rozprawy doktorskiej "Ocena oporności na kwas acetylosalicylowy u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca"
- Specjalista chorób wewnętrznych - Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi, Dyplom nr 0705/2005.1/568 z dnia 06.05.05.
- Specjalista w dziedzinie kardiologii - Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi, Dyplom nr 0748/2008.1/2 z dnia 14.05.08.

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych / artystycznych**

Od października 1999 do października 2006 roku - Katedra i Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna we Wrocławiu

- Studia Doktoranckie
- Asystent
- Adiunkt

Od stycznia 2007 do marca 2009 - Śląskie Centrum Chorób Serca, III Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

- Starszy Asystent

Od kwietnia 2009 do listopada 2009 - Kluczborskie Regionalne Centrum Chorób Serca i Naczyń, Polska Grupa Medyczna

- Ordynator Oddziału

Od grudnia 2009 do września 2010 - Katedra i Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna we Wrocławiu

- Adiunkt

Od października 2010 do marca 2011 - Raciborskie Regionalne Centrum Chorób Serca i Naczyń, Polska Grupa Medyczna

- Starszy Asystent

Od kwietnia 2011 do czerwiec 2013 - Śląskie Centrum Chorób Serca, III Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

- Starszy Asystent

Od lipca 2013 do nadal - Katedra i Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

- Kierownik Pracowni Hemodynamiki

Po uzyskaniu dyplomu lekarza na Akademii Medycznej we Wrocławiu (od 2012 roku Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu) odbyłem roczny staż (od 1998 do 1999 roku) w Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym nr 1 we Wrocławiu. Następnie od października 1999 roku rozpocząłem Studia Doktoranckie w Katedrze i Klinice Kardiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu. W tym czasie kierownikiem Katedry i Kliniki był prof. dr hab. n. med. Bogumił Halawa, który był również promotorem mojej pracy doktorskiej. W trakcie siedmioletniej pracy w Klinice moje zainteresowania skupiały się głównie na intensywnej terapii kardiologicznej oraz diagnostyce inwazyjnej choroby niedokrwiennej serca. Naukowe zainteresowania dotyczyły monitorowania leczenia przeciwplatekowego. Wspólnie z mgr Bożeną Karolko uruchomiłem i nadzorowałem wykonywanie badań agregometrycznych w Klinice Kardiologii, co skutkowało moją pracą doktorską i kolejnymi pracami nad monitorowaniem leczenia przeciwplatekowego prowadzonymi w Klinice Kardiologii do dnia dzisiejszego.

Z początkiem 2007 roku w celu dalszego szkolenia w zakresie kardiologii inwazyjnej oraz rozwijaniu warsztatu naukowego rozpocząłem pracę w Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrze, w III Katedrze i Oddziale Klinicznym Śląskiego Centrum Chorób Serca kierowanym przez prof. dr hab. n. med. Lecha Polońskiego. W czasie mojego ponad dwuletniego pobytu większość czasu pracowałem na Oddziale Intensywnej Terapii Kardiologicznej. W tym czasie otrzymałem certyfikat diagnosty i terapeuty Asocjacji Interwencji Sercowo-Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, uzyskałem

również samodzielność w implantacji stymulatorów serca i kardiowerterów-defibrylatorów. W ramach pracy naukowej uczestniczyłem w przygotowaniu, a następnie w realizacji dwóch grantów Komitetu Badań Naukowych;

- "Rola metaloproteinaz w patogenezie oporności na aspirynę u pacjentów z cukrzycą typu II i chorobą niedokrwinną serca" Numer projektu badawczego 2 P 05 B 143 30. Kierownik Prof. dr hab. n. med. Marian Zembala, lata realizacji 2006-2008.
- "Wpływ pobudzenia płytek krwi i pobudzenia układu zapalnego na zaburzenia przepływu w mikrokrażeniu u chorych z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST i cukrzycą leczonych przezskórną interwencją wieńcową. Obserwacja 12. miesięczna." Numer projektu badawczego N 4030555 33. Kierownik Prof. dr hab. n. med. Mariusz Gąsior, lata realizacji 2007-2011.

oraz badania statutowego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego;

- "Wpływ poziomu generacji trombiny na rokowanie odległe u pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi leczonymi inwazyjnie." Numer projektu badawczego ŚUM 1-149/08, Kierownik Prof. dr hab. n. med. Lech Poloński, lata realizacji 2008-2010

W ramach przygotowania i realizacji w/w badań we współpracy z dr Jackiem Kaczmarskim i jego zespołem z Pracowni Krzepnięcia Krwi Śląskiego Centrum Chorób Serca wdrożyłem wykonywanie badań agregacji płytek krwi. We współpracy z mgr Martą Szewczyk i jej zespołem z Pracowni Monitorowania Leków Śląskiego Centrum Chorób Serca wdrożyłem wykonywanie badań generacji trombiny. Z kolei współpraca z dr Sławomirem Żegleniem i jego zespołem z Pracowni Immunologii Śląskiego Centrum Chorób Serca skutkowałą rozpoczęciem badań reaktywności płytek krwi z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej. Wszystkie w/w działania umożliwiły realizację badań naukowych, a metoda agregacji płytek krwi służy obecnie również jako narzędzie w podejmowaniu decyzji klinicznych w codziennej praktyce lekarskiej w Śląskim Centrum Chorób Serca.

W kwietniu 2009 roku rozpocząłem pracę jako Ordynator nowotworzonego przez Polską Grupę Medyczną Regionalnego Centrum Chorób Serca i Naczyń w Kluczborku. W czasie mojej ośmiomiesięcznej pracy na tym stanowisku tworzyłem od podstaw oddział kardiologii z pracownią hemodynamiki; w Centrum od początku prowadzony był codziennie

całodobowy ostry dyżur zawałowy, wykonywano również implantacje stymulatorów i kardiowerterów-defibrylatorów.

W grudniu 2009 roku powróciłem do Wrocławia do Kliniki Kardiologii, której kierownikiem do dnia dzisiejszego jest prof. dr hab. n. med. Andrzej Mysiak. W Klinice pełniłem obowiązki Kierownika Pracowni Elektrofizjologii, w której wraz z zespołem wykonywałem zabiegi implantacji stymulatorów serca i kardiowerterów-defibrylatorów.

Od października 2010 roku przez pół roku pełniłem obowiązki Kierownika Pracowni Hemodynamiki w nowootwartym Regionalnym Centrum Chorób Serca i Naczyń w Raciborzu.

Od kwietnia 2011 roku do czerwca 2013 roku ponownie pracowałem w Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrze, w III Katedrze i Oddziale Klinicznym Kardiologii (Kierownik prof. dr hab. Lech Poloński) oraz Oddziale Chorób Serca i Naczyń (Koordynator Prof. dr hab. Mariusz Gąsior). W tym czasie kontynuowałem rozpoczęte uprzednio prace naukowe, prowadziłem Oddział Intensywnej Terapii Kardiologicznej, uzyskałem samodzielność w implantacji kardiowerterów-defibrylatorów resynchronizujących, biopsji mięśnia serca. Rozpocząłem również szkolenie w zakresie badań elektrofizjologicznych i ablacji.

Od lipca 2013 roku objąłem kierownictwo Pracowni Hemodynamiki w Katedrze i Klinice Kardiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, które pełnię do chwili obecnej. Kontynuuję również zabiegi z zakresu elektroterapii i elektrofizjologii. Moje obecne zainteresowania naukowe obejmują ocenę efektu przeciwpłytkowego u pacjentów leczonych nowymi doustnymi lekami przeciwpłytkowymi, ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów z cukrzycą.

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 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 ze zm.):**

**a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego**

Niepełna odpowiedź na leczenie przeciwpłytkowe u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca - ustalenie metody monitorowania, częstości występowania i przyczyny zjawiska wraz z jego wpływem na rokowanie u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca ze szczególnym uwzględnieniem cukrzycy.

**b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa**

1. **Kuliczkowski W**, Kobusiak-Prokopowicz M, Prajs I, Karolko B, Mazurek W. Aspirin failure course during exercise and its connection with soluble CD40L. *Thromb. Res.* 2007;119(6):679-686.
2. **Kuliczkowski W**, Greif M, Gąsior M, Kaczmarek J, Pres D, Poloński L. Effects of platelet and inflammatory system activation on outcomes in diabetic patients with ST segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Kardiologia Pol.* 2011;69(6):531-7.
3. **Kuliczkowski W**, Rychlik B, Chiziński K, Watała C, Golański J. Comparison of the VASP assay and platelet aggregometry in the evaluation of platelet P2Y12 receptor blockade. *Pol Arch Med Wewn.* 2011;121(4):115-21.
4. Aradi D, **Kuliczkowski W**, Atar D, Serebruany VL. Inter-patient variability and impact of proton pump inhibitors on platelet reactivity after prasugrel. *Thromb Haemost.* 2012;107(2):338-45
5. **Kuliczkowski W**, Gąsior M, Pres D, Kaczmarek J, Greif M, Łaszewska A, Szewczyk M, Hawranek M, Tajstra M, Żegleń S, Poloński L, Serebruany V. Effect of glycaemic control on response to antiplatelet therapy in patients with diabetes mellitus and ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2012;110(3):331-336
6. **Kuliczkowski W**, Szewczyk M, Kaczmarek J, Sztrohryn E, Greif M, Pres D, Fortmann SD, Poloński L, Serebruany V. Thrombin generation and platelet reactivity at hospital discharge and 6-months outcome after acute coronary syndrome in diabetic and non-diabetic patients. *Cardiology* 2014;128:25-33 (DOI: 10.1159/000356492)

**Łączna liczba punktów IF zgłoszonego cyklu 6 prac wynosi 14,74**

**c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

We współczesnej kardiologii monitorujemy skuteczność leczenia w przypadku wielu terapii. Efekty leczenia nadciśnienia tętniczego oceniamy za pomocą pomiarów

ambulatoryjnych i holterowskiego zapisu całodobowego, efekty leczenia hipolipemizującego oceniamy za pomocą lipidogramu, skuteczną dawkę antagonistów witaminy K ustalamy za pomocą wskaźnika INR. Jedną z najważniejszych terapii kardiologicznych, leczenie przeciwplatekcyjne, do niedawna jednak nie było w żaden sposób monitorowane, uważano bowiem, że aspiryna i klopidoogrel działa tak samo u wszystkich pacjentów. Wyniki badań pokazały jednak, że u części chorych stwierdza się niepełną odpowiedź na leczenie przeciwplatekcyjne, która ma swoje istotne znaczenie rokownicze.

Od początku badań nad reaktywnością płytek poszukiwano odpowiedzi na kilka zasadniczych pytań; jak oceniać zjawisko niepełnej odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne, jaka jest jego częstość występowania, jaka jest jego przyczyna oraz czy ma ono wpływ na rokowanie. W trakcie prowadzonych przeze mnie badań starałem się poszukiwać odpowiedzi na te pytania.

#### 1. Jak oceniać zjawisko niepełnej odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne?

Laboratoryjna ocena reaktywności płytek krwi podczas leczenia lekami przeciwplatekcyjnymi nawiązuje do chwili obecnej problemów dotyczących standaryzacji wszystkich procesów związanych z pobraniem krwi, wyborem metody i przeprowadzeniem pomiaru. W pierwszych badaniach oceniano ogólną reaktywność płytek krwi, bez uwzględnienia szlaku blokowanego przez dany lek przeciwplatekcyjny. Dopiero w toku kolejnych badań ustalono, że odpowiedź na kwas acetylosalicylowy powinna być mierzona agregacją indukowaną kwasem arachidonowym i poziomem metabolitów tromboksanu A<sub>2</sub> w surowicy lub moczu, a odpowiedź na blokery receptora płytkowego P2Y<sub>12</sub> - agregacją indukowaną adenosynodwufosforanem (ADP) i fosforylacją białka VASP, przy czym prowadzone przez nas badania pokazały, że ostatnie dwie wymienione metody nie powinny być stosowane zamiennie.

Kolejne prace pokazały również jaki poziom reaktywności płytek krwi oceniany w/w metodami należy uznać za niepełną odpowiedź na leczenie. W ustaleniu i przyjęciu tych zasad pomogły pierwsze europejskie zalecenia dotyczące oceny funkcji płytek krwi opublikowane w formie zaleceń w 2009 roku na łamach *European Heart Journal* (*Kulickowski W. i wsp.. Eur.Heart J.2009; Vol.30, No.4, p.426-435*).

#### 2. Jaka jest częstość niepełnej odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne?

W związku z nieustaloną do niedawna właściwą metodyką oceny reaktywności płytek krwi podczas leczenia częstość występowania tego zjawiska zależała od przyjętej metody pomiaru. Obecnie można przyjąć, że częstość niepełnej odpowiedzi na aspirynę wynosi kilka procent, a niepełnej odpowiedzi na klopidoogrel około 20%. Wartości te dotyczą pacjentów ze

stabilną chorobą niedokrwienną serca, w przypadku pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym, po udarze mózgu i z chorobą tętnic obwodowych opisywane odsetki są nieznacznie wyższe. Częstość występowania tego zjawiska była również przedmiotem moich badań omawianych w cyklu publikacji.

Nowe doustne leki przeciwplatekcyjne jak prasugrel i tikagrelor w rejestrowych badaniach klinicznych okazały się silniejsze od kłopidogrelu. Badania prowadzone przez naszą grupę pokazały jednak, że w trakcie przewlekłego stosowania prasugrelu poziom niepełnej odpowiedzi na ten lek zbliża się do częstości opisywanej dla kłopidogrelu, co może mieć swoje konsekwencje kliniczne.

### 3. Jaka jest przyczyna niepełnej odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne?

Do dnia dzisiejszego nie ma pełnej odpowiedzi na to pytanie. Prowadzone również przeze mnie badania pokazały, że zjawisko to może mieć związek z pobudzeniem układu zapalnego (podwyższony poziom sCD40L), podwyższoną glikemią (powyżej 8,5 mmol/l u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym), występowaniem cukrzycy, może je indukować wysiłek fizyczny, nasiloną miażdżycę (u pacjentów po operacjach pomostowania aortalno-wieńcowego). Może ono również wynikać z tak prostej przyczyny jak niestosowanie się pacjentów do zalecanej terapii i nieprzyjmowanie leków przeciwplatekcyjnych.

Inne grupy badaczy pokazały, że niepełna odpowiedź na kłopidogrel może mieć związek z genetycznymi różnicami w aktywności szlaków enzymatycznych metabolizujących kłopidogrel do aktywnej postaci lub z interakcją innych leków z tymi szlakami. Szczególnie dotyczy to interakcji kłopidogrelu z niektórymi blokerami pompy protonowej. Udowodniono większą częstość niepełnej odpowiedzi na kłopidogrel u pacjentów stosujących jednocześnie omeprazol. Prowadzone przez nas badania pokazały, że interakcja taka nie zachodzi w przypadku nowego leku przeciwplatekcyjnego o takim samym mechanizmie działania jak kłopidogrel - prasugrel.

### 4. Czy niepełna odpowiedź na leczenie przeciwplatekcyjne ma wpływ na rokowanie?

Liczne badania, również naszej grupy, pokazały, że niepełna odpowiedź na leczenie przeciwplatekcyjne ma wpływ na rokowanie, szczególnie w grupie pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym. Niepełna odpowiedź na kłopidogrel związana jest z 2-5 krotnie wyższym ryzykiem ponownego incydentu niedokrwiennego w dalszej obserwacji.

Cukrzyca jest czynnikiem gorszego rokowania u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca. W naszych badaniach pokazaliśmy, że szczególnie w tej grupie chorych niepełna odpowiedź na aspirynę przy wypisie ze szpitala (ok. 5-6 dni po angioplastyce wieńcowej) związana jest z gorszym rokowaniem. Wykazaliśmy również, że podwyższona agregacja

indukowana pobudzeniem receptora płytkowego dla trombiny związana jest z większą częstością incydentów niedokrwienych w obserwacji 6-cio miesięcznej, co jest nową, niepublikowaną dotychczas obserwacją. Może mieć ona wpływ na stosowanie terapii monitorowanej u pacjentów z cukrzycą z zastosowaniem nowych leków przeciwplatek z grupy blokerów receptora płytkowego dla trombiny.

Aktualne zagadnienia związane z monitorowaniem odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe i przyszłe kierunki badań.

Wyniki badań ostatnich lat pozwoliły ustalić metodykę oceny odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe, wyznaczyć progi odcięcia prawidłowej i niepełnej odpowiedzi na aspirynę i kłopidogrel, udowodnić wpływ omawianego zjawiska na rokowanie. Kolejnym etapem jest udowodnienie, że intensyfikacja leczenia przeciwplatekowego w oparciu o wyniki monitorowania poprawiają rokowanie. Jak dotąd niestety prowadzone prospektywne badania randomizowane nie potwierdziły takiej zależności. Można to tłumaczyć wieloma przyczynami, między innymi wyborem grupy badanej i zastosowaną metodyką badania reaktywności płytek. Tym niemniej najnowsze zalecenia Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego dotyczące postępowania w ostrych zespołach wieńcowych bez przetrwałego uniesienia odcinka ST z 2011 roku odnoszą się do tego zagadnienia rekomendacją w klasie IIb przy poziomie dowodów B nie zalecając zwiększania dawki podtrzymującej kłopidogrelu na podstawie oceny czynności płytek krwi jako postępowania rutynowego, pozwalając na modyfikacje dawki leku jedynie w wybranych przypadkach.

Jakkolwiek niedoskonałe są nadal narzędzia którymi dysponujemy w ocenie reaktywności płytek krwi i jakkolwiek brak jak dotąd twardych dowodów na przydatność monitorowania w codziennej praktyce lekarskiej - faktem jest istnienie niepełnej odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe i jego wpływ na rokowanie. Dlatego, w mojej opinii, tak ważne jest prowadzenie dalszych badań w tej dziedzinie. Ich wyniki pozwolą na ustalenie dokładnych mechanizmów braku odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe, miarodajne metody ich monitorowania i w dalszej kolejności ustalenie takiego postępowania terapeutycznego, które w oparciu o wyniki badań płytkowych pozwolą na skuteczne, ale również bezpieczne prowadzenie terapii przeciwplatekowej.

W omawianych poniżej pracach starałem się odnieść do wyżej wymienionych zagadnień; metody oceny odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe, częstości i przyczyn występowania tego zjawiska oraz jego wpływu na rokowanie u pacjentów z chorobą niedokrwieną serca ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów z cukrzycą. Omawiane poniżej badania naukowe prowadziłem na przestrzeni kilku lat, rozpoczynając je w



momencie, gdy zjawisko "oporności" na aspirynę było jeszcze słabo opisane, a metody badania odpowiedzi na leki przeciwplatekcyjne nie były jeszcze jednoznacznie ustalone.

Ad 1.

W poszukiwaniu przyczyn zjawiska niepełnej odpowiedzi na aspirynę w grupie pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca przeprowadziłem wraz z współpracownikami badanie oceniające zmienność reaktywności płytek krwi w trakcie wysiłku fizycznego oraz jej związek z poziomem rozpuszczalnego ligandu receptora CD40 (sCD40L). Ligand ten w postaci rozpuszczalnej pochodzi w większości od płytek krwi, ma związek z pobudzeniem układu krzepnięcia i zapalnego. Udowodniono również, że jego poziom jest podwyższony w ostrym zespole wieńcowym i ma wpływ na rokowanie u pacjentów po PCI. Co ważne dla omawianej pracy, sCD40L pobudza agregację płytek krwi wywołaną stresem przepływu, jak ma to miejsce w trakcie wzmożonego wysiłku fizycznego.

Do badania włączono 40 pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca oraz 10 osób grupy kontrolnej. Wszyscy przyjmowali aspirynę w dawce 75 mg co najmniej przez 7 dni przed włączeniem do badania. Oceniano agregację płytek krwi oraz poziom sCD40L w spoczynku i na szczycie wysiłku wykonywanego na bieżni ruchomej protokołem Bruce'a. Za niepełną odpowiedź na aspirynę przyjęto poziom agregacji optycznej z ADP i kolagenem powyżej 70%. Wyjściowo u 15 (37%) pacjentów stwierdzono niepełną odpowiedź na aspirynę. U osób z niepełną odpowiedzią na aspirynę w trakcie wysiłku stwierdzono również istotny dalszy wzrost agregacji płytek krwi (agregacja z ADP (%) od  $90,5 \pm 8,6$  wyjściowo do  $95,0 \pm 6,5$  na szczycie wysiłku  $p < 0,05$  oraz z kolagenem (%) od  $87,8 \pm 8,7$  wyjściowo do  $92,1 \pm 8,0$  na szczycie wysiłku  $p < 0,05$ ). Poziom sCD40L (ng/ml) był wyższy u pacjentów z niepełną odpowiedzią na aspirynę w porównaniu z resztą grupy zarówno w spoczynku ( $7,9 \pm 2,5$  w porównaniu z  $5,1 \pm 3,5$ ,  $p < 0,05$ ) jak i na szczycie wysiłku ( $8,1 \pm 2,9$  w porównaniu z  $4,5 \pm 3,9$ ,  $p < 0,05$ ). Wysiłek fizyczny spowodował, że u 3 (12%) kolejnych pacjentów agregacja płytek przekroczyła przyjęty punkt odcięcia dla "oporności" na aspirynę - u tych osób poziom sCD40L wykazał również istotny wzrost z  $7,6 \pm 1,9$  ng/ml w spoczynku do  $10,1 \pm 2,9$  ng/ml na szczycie wysiłku ( $p < 0,05$ ). W grupie niepełnej odpowiedzi na aspirynę poziom sCD40L korelował istotnie ze stopniem ocenianej agregacji płytek krwi przed i po wysiłku ( $r = 0,48$ ;  $p < 0,05$ ).

Wyniki omawianego badania pokazały, że osoby z niepełną odpowiedzią na aspirynę mają również wyższą agregację płytek w trakcie wysiłku, stopień agregacji płytek krwi koreluje z poziomem sCD40L oraz, że wysiłek fizyczny może pobudzić dodatkowo płytki u

osób odpowiadających wyjściowo na aspirynę, a pobudzeniu temu towarzyszy istotny wzrost poziomu w osoczu sCD40L.

Ad 2.

Kolejnym badaniem dotyczącym monitorowania efektów leczenia przeciwplatekowego była opublikowana w 2011 praca oceniająca wpływ odpowiedzi na aspirynę i kłopidogrel jak również pobudzenia układu zapalnego na rokowanie u pacjentów z cukrzycą leczonych inwazyjnie z powodu zawału z uniesieniem odcinka ST. Cukrzyca jest jedną z przyczyn niepełnej odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe, związana jest również z pobudzeniem układu zapalnego, co łącznie może mieć wpływ na gorsze rokowanie u pacjentów z cukrzycą leczonych z powodu ostrego zespołu wieńcowego.

Do badania włączono 120 pacjentów z cukrzycą i ostrym zespołem wieńcowym z uniesieniem odcinka ST leczonych pierwotną angioplastyką wieńcową z implantacją stentu. U pacjentów przy wypisie ze szpitala oceniano reaktywność płytek krwi oraz poziom wysokoczułego białka C-reaktywnego (hsCRP) w surowicy. W trakcie 6-cio miesięcznej obserwacji oceniano wystąpienie punktu końcowego badania, którym był ponowny ostry zespół wieńcowy lub restenoza w stentowanym naczyniu. W 2009 roku wraz z współpracownikami opublikowałem w European Heart Journal zalecenia dotyczące laboratoryjnego monitorowania odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe. Zrewidowano w nich dotychczas stosowane metody oceny reaktywności płytek krwi. W oparciu o te zalecenia przyjęto, że odpowiedź na aspirynę oceniana będzie za pomocą agregacji z kwasem arachidonowym, a odpowiedź na kłopidogrel za pomocą agregacji z adenylozynodwufosforanem (ADP). Dodatkowo wykonywano agregacje indukowane kolagenem i białkowym agonistą receptora trombinowego (TRAP).

Dotychczasowe badania nad odpowiedzią na leczenie przeciwplatekowe i jej wpływem na rokowanie obejmowały jedynie oznaczania w okresie okołozabiegowym; przed lub tuż po zabiegu angioplastyki, kiedy płytki są najbardziej pobudzone. Naszym zamiarem była ocena płytek krwi po kilku dniach od zabiegu (średnio po 6 dniach), kiedy ich reaktywność i odpowiedź na leczenie przeciwplatekowe stabilizuje się i odniesienie ich stopnia pobudzenia w tym okresie do rokowania 6-cio miesięcznego.

Końcowy punkt badania wystąpił u 28 pacjentów (23%). W tej grupie pacjentów w porównaniu z pozostałymi przy wypisie ze szpitala stwierdzano wyższą reaktywność płytek krwi na TRAP i kwas arachidonowy (pole pod krzywą agregacji w grupie z punktem końcowym badania  $1137,4 \pm 198,5$  w porównaniu z  $833,5 \pm 253,4$  u pozostałych pacjentów; p

= 0,013 dla agregacji wywołanej TRAP i odpowiednio  $333,0 \pm 263,8$  w porównaniu z  $186,9 \pm 105,4$ ;  $p = 0,019$  dla agregacji wywołanej kwasem arachidonowym). Nie stwierdzono związku pomiędzy wystąpieniem punktu końcowego badania, a agregacją płytek wywołaną ADP i kolagenem, jak również nie wykazano związku pomiędzy poziomem hsCRP przy wypisie ze szpitala, a rokowaniem 6-cio miesięcznym.

Biorąc pod uwagę w/w zalecenia niepełną odpowiedź na aspirynę (pole pod krzywą agregacji wywołanej kwasem arachidonowym ponad 300) wykazano u 10 pacjentów (8,3%), a niepełną odpowiedź na kłopidogrel (pole pod krzywą agregacji wywołanej ADP ponad 500) u 20 pacjentów (16,6%).

Nowością w porównaniu do wyników dotychczasowych badań było to, że u pacjentów z cukrzycą i ostrym zespołem wieńcowym odpowiedź na aspirynę, ale nie na kłopidogrel w kilka dni po zabiegu ma wpływ na rokowanie. Dotychczas w tej i innych grupach pacjentów to odpowiedź na kłopidogrel, a nie na aspirynę miała związek z rokowaniem po ostrym zespole wieńcowym, jednak, co ważne, jedynie w przypadku okołozabiegowej oceny reaktywności płytek. Co więcej, zwiększona odpowiedź na agonistę receptora trombinowego na płytkach (TRAP) istotnie wiązała się też z wystąpieniem punktu końcowego badania. Możliwe, że w tym przypadku zastosowanie leku przeciwplatekowego o mechanizmie blokowania receptora trombinowego poprawiło by rokowanie w tej grupie pacjentów. Leki takie, jak worapaksar, były oceniane w badaniach klinicznych i zmniejszały częstość występowania zdarzeń niedokrwienych u pacjentów po zawale, zwiększając jednak istotnie ryzyko krwawień. Wynik naszego badania może wskazywać na przydatność monitorowania reaktywności płytek w celu decyzji, który z chorych szczególnie skorzysta z dołączenia leku blokującego receptor trombinowy na płytkach.

### Ad 3.

Po okresie zainteresowania monitorowaniem odpowiedzi na aspirynę, przeprowadziłem laboratoryjną ocenę odpowiedzi na blokery receptora płytkowego P2Y<sub>12</sub>. W zaleceniach opublikowanych przez naszą grupę w 2009 roku omawialiśmy przydatność zastosowania agregacji indukowanej ADP i/lub oceny fosforylacji białka VASP w monitorowaniu odpowiedzi na kłopidogrel. Problemem pozostawało to, że oba testy oceniały nieznacznie odmienne aspekty blokady receptora P2Y<sub>12</sub> i otwarte było pytanie na ile są one wymienne, tj. czy wyniki uzyskane oboma testami korelują ze sobą. Dodatkowo w omawianym badaniu mieliśmy możliwość oceny obu testów zarówno dla kłopidogrelu jak i nowego dożylnego blokera receptora P2Y<sub>12</sub> - kangreloru.

Do badania włączono 17 zdrowych ochotników bez leków przeciwplatek oraz 12 pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca poddawanych zabiegowi angioplastyki wieńcowej z implantacją stentu. U wszystkich wykonywano agregację indukowaną ADP oraz cytofluorymetryczny test oceny fosforylacji białka VASP; w grupie osób zdrowych przed i po inkubacji krwi *in vitro* z kangrelorem, a w grupie pacjentów przed i po zastosowaniu kłopidogrelu. W obu grupach obserwowano istotne zablokowanie reaktywności płytek; przy czym agregacja wywołana ADP wykazała większą zmianę w porównaniu z testem VASP; ponad 17-krotne obniżenie agregacji po zastosowaniu kangreloru w porównaniu z 1,5-krotnym obniżeniem indeksu reaktywności płytek w teście VASP oraz ponad 14-krotne obniżenie agregacji po zastosowaniu kłopidogrelu w porównaniu z 1,7-krotnym obniżeniem indeksu reaktywności płytek w teście VASP. Jedyna, jakkolwiek słaba, korelacja pomiędzy testem VASP i agregacją została stwierdzona w grupie zdrowych ochotników po zastosowaniu kangreloru ( $r=0,68$ ;  $p<0,05$ ).

W grupie pacjentów niepełną odpowiedź na kłopidogrel wykryto za pomocą agregacji u 3 osób, a za pomocą testu VASP również u 3, ale innych osób. W grupie zdrowych wykryto niepełną odpowiedź na kangrelor u 3 osób za pomocą agregacji i 5 innych osób za pomocą testu VASP.

W podsumowaniu, zastosowanie antagonisty receptora P2Y<sub>12</sub> powoduje większą zmianę w stopniu agregacji indukowanej ADP niż w wartości indeksu reaktywności płytek ocenianego testem VASP. Dotyczy to zarówno stosowanego powszechnie kłopidogrelu jak i nowego dożylnego leku przeciwplatekowego - kangreloru. Oba testy wykrywają też osoby z niepełną odpowiedzią na badane leki, ale wyniki te nie korelują ze sobą. Jakkolwiek oba testy oceniają blokadę receptora P2Y<sub>12</sub> to jednak zasada ich działania jest różna i nie powinny być stosowane zamiennie.

#### Ad 4.

Niepełna odpowiedź na kłopidogrel ma różne przyczyny. Kłopidogrel jest prolekiem i do jego pełnej aktywacji, potrzebne jest przejście szeregu przemian katalizowanych w wątrobie przez cytochrom P-450, w szczególności przez jego izoenzymy CYP2C19 i CYP2C9. U części pacjentów podczas podwójnej terapii przeciwplatekowej stosowane są inhibitory pompy protonowej; omeprazol, pantoprazol i inne. Część z nich ma zdolność blokowania aktywności izoenzymów cytochromu P-450, hamując w ten sposób powstawanie aktywnej formy kłopidogrelu. Jest to jedna z opisywanych przyczyn niepełnej odpowiedzi na kłopidogrel.

Poszukiwanie silniejszych, mniej podatnych na interakcje leków przeciwplatek doprowadziło do wprowadzenia na rynek prasugrelu; bloker receptora P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>, który do pełnej aktywacji wymaga mniejszej liczby przemian w wątrobie w porównaniu z kłopidogrelem. Pomimo stwierdzanej *in vitro* silniejszej blokady płytek po dawkach nasycających nie znany był efekt przeciwplatekowy prasugrelu w obserwacji dalszej, jak również jego interakcja z blokerami pompy protonowej.

Celem badania była ocena zmienności odpowiedzi na prasugrel w obserwacji odległej oraz ewentualny wpływ na tą zmienność stosowanych jednocześnie blokerów pompy protonowej. Do badania włączono 104 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym leczonych inwazyjnie. U wszystkich stosowano dawkę nasycającą 60 mg prasugrelu, a następnie dawkę podtrzymującą; 10 mg u osób w wieku poniżej 75 lat i/lub wadze powyżej 60 kg oraz 5 mg u osób w wieku powyżej 75 lat i/lub wadze poniżej 60 kg. Agregację płytek oznaczano za pomocą agregacji impedancyjnej z zastosowaniem agregometru Multiplate i agregacji optycznej - w 24 godziny po zastosowaniu dawki nasycającej i po miesiącu terapii podtrzymującej. Przyjęto za niepełną odpowiedź na prasugrel przyjmować agregację wywołaną ADP powyżej 468 jednostek arbitralnych (AU) w przypadku agregacji impedancyjnej i powyżej 46% w przypadku agregacji optycznej. Z całej grupy dodatkowo 61 pacjentów (58%) stosowało pantoprazol lub esomeprazol.

Niepełną odpowiedź na dawkę nasycającą prasugrelu stwierdzono u 1% pacjentów za pomocą agregacji optycznej i u 7% pacjentów za pomocą agregacji impedancyjnej. Po miesiącu stosowania dawki podtrzymującej (5mg i 10mg) odsetek niepełnej odpowiedzi na prasugrel wzrastał i był istotnie wyższy w porównaniu z wartościami po dawce nasycającej; przy dawce 10 mg niepełna odpowiedź na prasugrel była obserwowana (w zależności od zastosowanej metody agregacji) u od 9% do 21%, a przy dawce 5 mg u od 23% do 31% pacjentów.

W celu oceny wpływu różnych czynników na zmienność odpowiedzi na prasugrel przeprowadzono analizę wieloczynnikową, która wykazała, że na zmienność odpowiedzi na dawkę nasycającą leku ma wpływ wiek, stosowanie blokerów pompy protonowej oraz przewlekła niewydolność nerek. Żaden z tych czynników nie miał wpływu na zmienność odpowiedzi na prasugrel w dawkach podtrzymujących.

Wyniki badania pokazały, że pomimo silnego działania przeciwplatekowego dawki nasycającej prasugrelu, podczas terapii dawką podtrzymującą obserwowane jest znaczne zróżnicowanie odpowiedzi na lek z istotnym zwiększeniem odsetka osób z niepełną odpowiedzią na prasugrel. Jednocześnie nie wykazano, aby niepełna odpowiedź na dawkę

podtrzymującą leku miała związek z jednoczesnym stosowaniem blokerów pompy protonowej.

Stwierdzona zmienność odpowiedzi na prasugrel w grupie pacjentów po ostrym zespole wieńcowym jest porównywalna, szczególnie przy dawce 5 mg, z częstością niepełnej odpowiedzi na dawkę podtrzymującą 75 mg kłopidogrelu, co jest wynikiem nieoczekiwanym, biorąc pod uwagę, przynajmniej w założeniu, silniejsze działanie przeciwplatekcyjne prasugrelu. Pod tym względem wynik badania jest ważny, a w czasie jego publikacji był pierwszym takim doniesieniem w literaturze.

#### Ad 5.

Cukrzyca jest czynnikiem ryzyka gorszego rokowania po ostrym zespole wieńcowym. Cukrzyca w niektórych badaniach jest też związana z niepełną odpowiedzią na kłopidogrel, jednak nie znany jest mechanizm tego zjawiska. Liczne hipotezy tłumaczące tę zależność wskazują na towarzyszący cukrzycy podwyższony poziom wolnych rodników, nasilone w tej chorobie pobudzenie układu zapalnego i krzepnięcia. Sprzeczne informacje dotyczą natomiast stopnia wyrównania cukrzycy lub samego poziomu glikemii na odpowiedź na leczenie przeciwplatekcyjne.

W kolejnym badaniu dotyczącym monitorowania leczenia przeciwplatekcyjnego zajęliśmy się tym zagadnieniem oceniając wpływ stopnia wyrównania cukrzycy na odpowiedź na podwójną terapię przeciwplatekową u pacjentów z ostrym zespolem wieńcowym.

Do badania włączono 60 pacjentów z rozpoznaną uprzednio cukrzycą, hospitalizowanych z powodu ostrego zespołu wieńcowego z przetrwałym uniesieniem docinka ST leczonego pierwotną angioplastyką wieńcową. W ocenie odpowiedzi na kłopidogrel oceniano agregację metodą impedancyjną indukowaną ADP oraz fosforylację białka VASP metodą cytometrii przepływową. Odpowiedź na aspirynę oceniano agregacją indukowaną kwasem arachidonowym. Dodatkowo, w celu oceny innych szlaków pobudzenia płytek krwi wykonywano agregację indukowaną kolagenem i agonistą receptora trombinowego na płytkach (TRAP). Reaktywność płytek mierzono przed zabiegiem, 24 godziny po zabiegu, następnie 7 i 30 dni po zabiegu angioplastyki wieńcowej.

Poziom glikemii powyżej 8,5 mmol/l (160mg%) przy przyjęciu był związany z niepełną odpowiedzią na kłopidogrel ocenianą za pomocą testu fosforylacji białka VASP (indeks reaktywności płytek, PRI powyżej 50%), ale nie agregacji wywołanej ADP. Efekt ten był obserwowany przed zabiegiem, 24 godziny i 7 dni po zabiegu, zanikał po 30 dniach od

zabiegu. W analizie wieloczynnikowej podwyższona glikemia przy przyjęciu była niezależnym czynnikiem wystąpienia niepełnej odpowiedzi na klopidogrel w teście VASP przed zabiegiem i w 24 godziny po nim (odpowiednio OR przed zabiegiem 7,8; 95% CI 1,4-17,7;  $p < 0,02$  oraz OR w 24 godziny po zabiegu 13,1; 95% CI 3,4-28,1;  $p < 0,01$ ). Poziom wyrównania cukrzycy przy przyjęciu mierzony wartością hemoglobiny glikowanej nie miał związku z odpowiedzią na klopidogrel i aspirynę w żadnym punkcie czasowym badania. Podobnie poziom glikemii przy przyjęciu nie miał związku z odpowiedzią na aspirynę oraz agregacje wywołane kolagenem i TRAP w żadnym z punktów czasowych badania.

Wcześniejsze badania wskazywały na wpływ poziomu glikemii u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym na rokowanie. Aktualnie zaleca się, aby w trakcie hospitalizacji utrzymywać poziom glikemii poniżej 11 mmol/l, nie obniżając go poniżej 5 mmol/l. Wynik naszego badania wskazuje na poziom 8,5 mmol/l, powyżej którego obserwowaliśmy częściej niepełną odpowiedź na klopidogrel. Jest to nowa wartość, wcześniej nie opublikowana, która może być brana pod uwagę w leczeniu pacjentów z cukrzycą i zawałem z uniesieniem odcinka ST. Utrzymywanie wartości glikemii poniżej 8,5 mmol/l w okresie okołozabiegowym może zapewnić odpowiedni poziom zablokowania płytek przez klopidogrel, przyczyniając się tym samym do poprawy rokowania w tej grupie pacjentów.

Ad 6.

W jednym z opublikowanych przez naszą grupę badań (nr 2 w niniejszym podsumowaniu) wykazaliśmy, że u pacjentów z cukrzycą i ostrym zespołem wieńcowym leczonymi inwazyjnie, poziom reaktywności płytek krwi przy wypisie ze szpitala (średnio 6 dni po zabiegu angioplastyki) ma związek z rokowaniem 6-cio miesięcznym. Niewielka liczba publikacji wskazuje również na związek pobudzenia osocznego układu krzepnięcia na rokowanie u pacjentów po ostrym zespole wieńcowym. W kolejnej pracy oceniliśmy przydatność ocenianej łącznie płytkowej i osoczowej składowej układu krzepnięcia na rokowanie u pacjentów z cukrzycą po ostrym zespole wieńcowym.

Reaktywność płytek ocenialiśmy za pomocą agregacji impedancyjnej indukowanej kwasem arachidonowym, ADP, kolagenem i agonistą receptora trombinowego na płytkach (TRAP). Stopień reaktywności osocznego układu krzepnięcia ocenialiśmy za pomocą testu generacji trombiny metodą fluorescencyjną z użyciem oprogramowania i odczynników firmy Thrombinoscope oraz aparatury firmy Thermo. W teście tym ocenianych jest pięć wskaźników wyliczanych z krzywej generacji trombiny (trombogramu); czas opóźnienia (min), czas do szczytu trombogramu (min), endogenny potencjał trombogenezy (nmol

trombiny na minutę), maksymalna wysokość trombogramu (nmol trombiny), czas do zakończenia generacji trombiny (min). Krew do oceny w/w wskaźników pobierano przy wypisie ze szpitala (mediana 5 dni). Łączony pierwotny punkt końcowy badania oceniany po 6-ciu miesiącach obejmował zgon, udar mózgu, ponowny zawał mięśnia serca i ponowną rewaskularyzację naczyń dozwolowego.

Do badania włączono 161 pacjentów. W trakcie 6-cio miesięcznej obserwacji punkt końcowy badania wystąpił u 30 pacjentów (18,6%). U tych pacjentów w porównaniu z pozostałymi obserwowano wydłużone: czas opóźnienia ( $5,3 \pm 2,8$  w porównaniu z  $4,3 \pm 1,3$ ;  $p < 0,05$ ; minuty), czas do szczytu trombogramu ( $7,9 \pm 3,2$  w porównaniu z  $6,7 \pm 1,7$ ;  $p < 0,05$ ; minuty) i czas do zakończenia generacji trombiny ( $25,3 \pm 8,8$  w porównaniu z  $21,8 \pm 4,3$ ;  $p < 0,01$ ; minuty). Nie wykazano związku pomiędzy stopniem agregacji płytek krwi przy wypisie ze szpitala, a ryzykiem wystąpienia punktu końcowego badania w całej grupie badanej. Biorąc pod uwagę wyniki wcześniejszych badań oceniliśmy pobudzenie układu osocznego i płytek w podgrupach pacjentów z i bez cukrzycy. W grupie osób bez cukrzycy ( $n=77$ ) nie wykazano istotnego związku w/w parametrów z wystąpieniem punktu końcowego badania. W grupie osób z cukrzycą ( $n=84$ ) wykazano istotne różnice pomiędzy pacjentami u których wystąpił punkt końcowy badania ( $n=17$ ), a pozostałymi. Pacjenci z cukrzycą, u których wystąpił punkt końcowy badania w porównaniu z pacjentami z cukrzycą bez punktu końcowego mieli wydłużony czas opóźnienia ( $5,6 \pm 3,3$  w porównaniu z  $4,3 \pm 1,4$ ;  $p < 0,05$ ; minuty), czas do szczytu trombogramu ( $8,2 \pm 3,8$  w porównaniu z  $6,5 \pm 1,6$ ;  $p < 0,05$ ; minuty) i czas do zakończenia generacji trombiny ( $26,0 \pm 11,1$  w porównaniu z  $21,2 \pm 2,8$ ;  $p < 0,01$ ; minuty). Można przyjąć, że obserwowane wcześniej istotne zmiany w całej grupie w wartościach trombogramu wynikały z tych obserwowanych w podgrupie pacjentów z cukrzycą. Podobnie w podgrupie pacjentów z cukrzycą i punktem końcowym badania obserwowano istotnie wyższą agregację wywołaną kwasem arachidonowym i TRAP przy wypisie w porównaniu z osobami z cukrzycą bez punktu końcowego badania (odpowiednio dla agregacji z kwasem arachidonowym  $33 \pm 26$  w porównaniu z  $18 \pm 10$ ;  $p < 0,05$  i dla agregacji z TRAP  $113 \pm 19$  w porównaniu z  $82 \pm 24$ ;  $p < 0,01$ ; AUC - pole pod krzywą agregacji).

W analizie krzywej ROC agregacja z TRAP przy wypisie ze szpitala powyżej 101 (AUC) z 82% specyficznością i 80% czułością (pole pod krzywą ROC 0,83; 95% CI 0,71-0,92;  $p < 0,0001$ ) przewidywała wystąpienie punktu końcowego badania w grupie pacjentów z cukrzycą. Podobnie w analizie wieloczynnikowej poziom agregacji z TRAP powyżej 101 (AUC) przy wypisie u pacjentów z cukrzycą był niezależnym predyktorem wystąpienia punktu końcowego badania (OR 2,1, 95% CI 1,5-7,8;  $p < 0,05$ ).



W dalszej analizie oceniano przydatność łącznej oceny pobudzenia układu krzepnięcia osoczkowego i płytek krwi w przewidywaniu wystąpienia punktu końcowego badania. W tym celu skategoryzowano wartości ciągle pomiarów trombogenezy i agregacji według kwartyli, nadając 1 punkt najniższemu kwartylowi i 4 najwyższemu kwartylowi. Następnie zsumowano punkty uzyskane u kolejnych pacjentów i odniesiono do wystąpienia punktu końcowego badania w całej grupie i podgrupach z i bez cukrzycy. Nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy tak uzyskanymi wartościami a wystąpieniem punktu końcowego badania.

Wynik omawianego badania wskazuje na przydatność oznaczania agregacji płytek krwi przy wypisie ze szpitala u pacjentów z cukrzycą w celu wyznaczenia grupy ryzyka nawrotu niedokrwienia w czasie półrocznej obserwacji. Szczególnie agregacja z TRAP miała istotny i niezależny związek z wystąpieniem punktu końcowego badania. Nie wykazano takiej zależności dla agregacji z ADP, czyli dla stopnia odpowiedzi płytek na kłopidogrel, co już raz zostało opisane przez naszą grupę (praca nr 3 w niniejszym opracowaniu). Wskaźniki endogennej zdolności zakrzepowej ocenianej za pomocą generacji trombiny są istotnie różne i związane z wystąpieniem punktu końcowego, ale tylko w grupie z cukrzycą. W analizie wieloczynnikowej nie okazały się one jednak niezależnymi czynnikami ryzyka.

Omawiane badanie wskazuje na to, że szlak pobudzenia płytek przez trombinę (TRAP) ma związek z rokowaniem u pacjentów z cukrzycą i ostrym zespołem wieńcowym. Obecnie dysponujemy lekiem blokującym ten receptor; worapaksarem, jednak nie jest on ujęty w aktualnych zaleceniach leczenia. Wynik naszego badania wskazywać może na jego szczególną przydatność w tej grupie pacjentów. Z kolei pobudzenie osoczkowego układu krzepnięcia, pomimo różnic w podgrupie pacjentów z cukrzycą, nie ma istotnego znaczenia w rokowaniu u pacjentów po ostrym zespole wieńcowym.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)**

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie **56** publikacji, z których **26** opublikowanych zostało w czasopismach posiadających „impact factor” (łączna punktacja **IF = 61,737**). Łączna punktacja **KBN/MNiSW wynosi 694**. Wśród tych publikacji w **32** jestem pierwszym lub drugim autorem.

W szczególności na mój dorobek składają się:

- **35** prac oryginalnych (łączna punktacja MNiSW = **526**), w tym **22** prac oryginalnych w czasopismach posiadających „impact factor” o łącznej punktacji IF = **49,61**
- **2** opisy przypadków (łączna punktacja MNiSW = **14**),

- **11** prac poglądowych (łączna punktacja MNiSW = **113**),
- **6** rozdziałów w podręcznikach (łączna punktacja MNiSW = **23**),
- **1** współautorstwo książki (łączna punktacja MNiSW = **12**)
- **1** pełnotekstowej pracy w suplementach czasopism (łączna punktacja MNiSW = **6**).

Jestem współautorem **51** streszczeń, w tym **23** ze zjazdów międzynarodowych oraz **28** ze zjazdów krajowych.

Łączna liczba cytowań wg ISI Web of Science z dnia 1. marca 2014 r. wynosi: **319**

Łączny indeks Hirscha wg ISI Web of Science z dnia 1. marca 2014 r. wynosi: **8**

### **Osiągnięcia w pracy organizacyjnej i dydaktycznej**

W trakcie mojej pracy naukowej zorganizowałem we współpracy z personelem laboratoriów naukowych badania agregacji płytek krwi (Klinika Kardiologii we Wrocławiu, Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu) oraz oznaczanie generacji trombiny i markerów płytkowych metodą cytometrii przepływowej (Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu).

W trakcie Studiów Doktoranckich oraz jako Asystent i Adiunkt Katedry i Kliniki Kardiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu prowadziłem zajęcia ze studentami V roku Wydziału Lekarskiego oraz zajęcia ze Studenckim Kołem Naukowym w w/w Klinice.

Byłem wykonawcą dwóch grantów Komitetu Badań Naukowych.

Wygłosiłem 22 prezentacje o tematyce głównie dotyczącej zjawiska niepełnej odpowiedzi na leczenie przeciwplatek - na zjazdach i konferencjach krajowych i międzynarodowych (odbywających się w Polsce).

Organizowałem sesje tematyczne podczas sześciu Międzynarodowych Konferencji Kardiologicznych w Zabrzu.

Recenzowałem łącznie 35 manuskryptów dla 6 czasopism medycznych, uzyskując status Złotego Recenzenta "Kardiologii Polskiej" za 2012 rok.

Jestem kierownikiem specjalizacji 3 lekarzy z zakresu kardiologii.

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Grupy do spraw Zakrzepic Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego.

Od sierpnia 2013 roku jestem konsultantem klinicznym w Biobanku przy Wrocławskim Centrum Badań EIT+

W trakcie mojej pracy naukowej nawiązałem współpracę z innymi badaczami funkcji płytek; dr Wiktoorem Serebruanym z Uniwersytetu Johnsa Hopkinsa z Baltimore, USA i jego zespołem, dr Danielem Aradi z Uniwersytetu Pecs, Węgry oraz profesorem Cezarym Watałą

z Uniwersytetu Łódzkiego i jego zespołem. Kontakty te skutkowały wspólnymi pracami na temat funkcji płytek i odpowiedzi na leczenie przeciwplatetkowe.

### **Wybrana tematyka podejmowana w opublikowanych pracach oryginalnych jest następująca**

#### **1. Publikacja wytycznych dotyczących zmienności odpowiedzi na leczenie przeciwplatetkowe**

W mojej ocenie jednym z istotnych osiągnięć jest opublikowanie w 2009 roku w czasopiśmie *European Heart Journal* wytycznych w formie "position paper" dotyczących oceny różnic w odpowiedzi na leczenie przeciwplatetkowe, w szczególności zaleceń co do stosowania odpowiedniej metodyki laboratoryjnej w ocenie reaktywności płytek. Publikacja była przyjęta jako wspólny dokument Sekcji Kardiologii Inwazyjnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego i Grupy Roboczej do spraw Zakrzepic Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego.

W publikacji zaproponowano aby odpowiedź na aspirynę oceniać za pomocą poziomu tromboksanu B2 w surowicy lub moczu oraz stopnia zablokowania agregacji indukowanej kwasem arachidonowym. Odpowiedź na klopidoogrel powinna być oceniana stopniem zablokowania agregacji indukowanej ADP lub fosforylacją białka VASP. Zaproponowano wartości punktów odcięcia dla pełnej i niepełnej odpowiedzi na oba leki z zastosowaniem wymienionych testów. Zaproponowano również, u kogo wskazane jest monitorowanie leczenia przeciwplatetkowego.

Omawiana publikacja przyczyniła się do uporządkowania metodyki badań efektów leczenia przeciwplatetkowego, o czym świadczy liczba jej cytowań, w większości w pracach oryginalnych (kwiecień 2014 - 145 cytowania według Google Scholar)

*Kuliczkowski W. i wsp. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. Eur.Heart J.2009; Vol.30, No.4, p.426-435.*

#### **2. Zmienność odpowiedzi na leczenie przeciwplatetkowe w różnych grupach pacjentów i jej przyczyny**

Na początku lat 2000-nych nie było wiadomo, jak prawidłowo oceniać efekt przeciwplatetkowy aspiryny w warunkach klinicznych, opublikowanych było zaledwie kilka

prac oceniających częstość występowania niepełnej odpowiedzi na aspirynę. Nie był również znany wpływ tego zjawiska na rokowanie.

W 2005 roku na łamach Kardiologii Polskiej opublikowałem wyniki badań przeprowadzonych w latach 2001-2003 dotyczących częstości występowania niepełnej odpowiedzi na aspirynę u pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca. Była to pierwsza w kraju publikacja na ten temat. Kryteriami włączenia była stabilna choroba niedokrwienna serca, potwierdzona w badaniu koronarograficznym i dodatnim nieinwazyjnym badaniu obciążeniowym oraz stosowanie przez co najmniej 7 dni przed włączeniem do badania aspiryny w dawce 75 mg dziennie. Kryteriami wyłączenia z badania było stosowanie innych leków przeciwplatek w okresie co najmniej dwóch tygodni przed włączeniem do badania i nieprawidłowy poziom płytek we krwi. Wykonywano badanie agregacji płytek w osoczu bogatopłytkowym z zastosowaniem metody agregacji optycznej wywoływanej kolagenem, kwasem arachidonowym i adenozyndifosforanem (ADP). Do badania włączono 205 pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca oraz 30 osób grupy kontrolnej niestosujących żadnych leków. Przyjęto, że niepełną odpowiedź na aspirynę ("oporność") będzie rozpoznawana, gdy poziom agregacji z kolagenem i ADP wynosił będzie ponad 70%, czyli wartość jaka była obserwowana w grupie kontrolnej bez leków. Obniżoną agregację z kwasem arachidonowym traktowano jako dowód na stosowanie aspiryny. Odsetek osób z "opornością" na aspirynę wyniósł 20% (41 pacjentów). Pacjenci "oporni" na aspirynę charakteryzowali się przede wszystkim większym zaawansowaniem choroby niedokrwiennej serca; częściej niż pacjenci bez "oporności" mieli stwierdzoną trójnaczyniową chorobę wieńcową w koronarografii (49% "opornych" w porównaniu z 28% bez "oporności";  $p < 0,05$ ) oraz częściej mieli w wywiadzie przebyty zabieg CABG (44% "opornych" w porównaniu z 19% bez "oporności";  $p < 0,05$ ). W analizie wieloczynnikowej wywiad przebytego zabiegu CABG był niezależnym czynnikiem związanym z ponad 5-cio krotnie częstszym występowaniem "oporności" na aspirynę (OR 5,6; 95% CI 2,0-15,4;  $p = 0,006$ ).

Wyniki badania przetestowały metodę oznaczania niepełnej odpowiedzi na aspirynę, częstość zjawiska w populacji pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca oraz jej związek z zaawansowaniem tej choroby.

*Kulickowski W, Halawa B, Karolko B, Mazurek W. Aspirin resistance in ischemic heart disease. Kardiol Pol 2005; 62(1): 14-25*

Prowadzone badania naukowe pokazały, że nie wszyscy pacjenci odpowiadają w ten sam sposób na stosowane leczenie przeciwplatek. W grupie 822 pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca stosujących przewlekłe aspirynę wyróżniono podgrupę 257 pacjentów z cukrzycą. Oceniano reaktywność płytek u pacjentów przed i po zastosowaniu kłopidogrelu. W ocenie reaktywności zastosowano agregację optyczną indukowaną ADP, kolagenem i kwasem arachidonowym, agregację we krwi pełnej ocenianą z pomocą urządzenia Ultegra i PFA-100 oraz ekspresję receptorów płytkowych z zastosowaniem cytometrii przepływowej. W większości z zastosowanych testów pacjenci z cukrzycą mieli istotnie bardziej reaktywne płytki krwi zarówno przed jak i po zastosowaniu kłopidogrelu. Wyniki badania wskazują na to, że cukrzyca powoduje znaczne nasilenie reaktywności płytek i to w szeregu różnych ocenianych szlaków pobudzenia oraz, że zastosowanie leków przeciwplatekowych nie powoduje obniżenia tej reaktywności do poziomu obserwowanego u pacjentów bez cukrzycy. Wynik ten skłania do zastanowienia się nad indywidualizacją leczenia przeciwplatekowego u pacjentów z cukrzycą.

*Serebruany V i wsp. Baseline platelet activity and response after clopidogrel in 257 diabetics among 822 patients with coronary artery disease. Thrombosis and Haemostasis 2008; Vol.100, No.1, p. 76- 82*

Zmienna odpowiedź na leczenie przeciwplatekowe może być związana z przyczyną oczywistą, lecz często nie brana pod uwagę - z brakiem stosowania się pacjenta do zaleceń i niestosowania leków przeciwplatekowych. W celu ustalenia optymalnej laboratoryjnej metody oceny faktu przyjmowania kłopidogrelu przebadano 422 pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i 209 po udarze niedokrwiennym mózgu. Wszyscy pacjenci mieli przepisane stosowanie kłopidogrelu. Oceniano reaktywność płytek z zastosowaniem agregacji optycznej indukowanej ADP oraz poziom metabolitów kłopidogrelu we krwi przed zastosowaniem leku i w różnych punktach czasowych w trakcie terapii. Niestosowanie kłopidogrelu rozpoznawano w przypadku stwierdzenia we krwi poziomu nieaktywnego metabolitu kłopidogrelu w stężeniu poniżej 5000 ng/ml. Odsetek pacjentów niestosujących leku wyniósł 22% w całej grupie, przy czym był istotnie wyższy w podgrupie pacjentów po udarze mózgu (38%) w porównaniu z pacjentami z chorobą niedokrwienną serca (14%,  $p=0,001$ ). Poziom aktywnego metabolitu kłopidogrelu, kłopidogrelu przed przemianą biochemiczną i nieaktywnego metabolitu kłopidogrelu istotnie korelowały ze stopniem zablokowania agregacji płytek krwi. Poziom nieaktywnego metabolitu kłopidogrelu we krwi okazał się najbardziej przydatny w ocenie stosowania przez pacjentów leku.

Wyniki badania wskazują na dość częste niestosowanie przez pacjentów kłopidogrelu, szczególnie u osób po udarze. Zjawisko to może być oceniane za pomocą pomiaru stężenia nieaktywnego metabolitu kłopidogrelu we krwi.

*Serebruany V i wsp. Association of platelet responsiveness with clopidogrel metabolism: Role of compliance in the assessment of "resistance" American Heart Journal 2009; Vol.158, No. 6, p. 925-932*

Niepełna odpowiedź na aspirynę występuje u zmiennego odsetka pacjentów. Nie znany jest w pełni mechanizm tego zjawiska. Oceniano odpowiedź na aspirynę u 96 pacjentów po udarze mózgu. Reaktywność płytek krwi mierzono za pomocą aparatu PFA-100; brak adekwatnej odpowiedzi na aspirynę przyjmowano przy czasie okluzji wkładu kolagenowo-epinefrynowego poniżej 170 sekund lub/i przy czasie okluzji wkładu kolagenowo-ADP poniżej 70 sekund. W oparciu o przyjęte kryteria 38% pacjentów zakwalifikowano jako "opornych" na aspirynę. Jedynym wskaźnikiem, który miał związek z występowaniem niepełnej odpowiedzi na aspirynę był poziom trójglicerydów we krwi (mg/dl); istotnie wyższy u pacjentów z "opornością" na aspirynę w porównaniu z pacjentami z prawidłową odpowiedzią na lek ( $237,1 \pm 11,0$  w porównaniu z  $174,2 \pm 13,3$ ;  $p < 0,01$ ). Trudno na podstawie omawianego badania ocenić przyczynę tego związku, jednak wynik badania pokrywa się z innymi doniesieniami, gdzie podwyższony poziom cholesterolu korelował z częstszą niepełną odpowiedzią na aspirynę.

*Karepov V i wsp. Plasma triglycerides as predictors of platelet responsiveness to aspirin in patients after first ischemic stroke. Cerebrovascular Diseases 2008; Vol. 26, No.3, p. 272-276*

Brak skutecznego przeciwplateletowego działania aspiryny u chorych po wykonaniu pomostów aortalno-wieńcowych w krążeniu pozaustrojowym (CABG) może być jedną z przyczyn występowania pooperacyjnego niedokrwienia mięśnia sercowego jako konsekwencji wczesnej niedrożności zespoleń. Oceniono reaktywność płytek krwi u 46 pacjentów po zabiegu CABG stosujących aspirynę w dawce 325 mg od pierwszej doby po operacji. Zastosowano agregację we krwi pełnej indukowaną kwasem arachidonowym, pomiar czasu okluzji w analizatorze PFA-100 oraz oznaczenie poziomu tromboksanu B2 w osoczu. Pooperacyjne niedokrwienie mięśnia serca oceniano na podstawie analizy EKG oraz badań enzymatycznych. U 12 pacjentów rozpoznano niedokrwienie, w tym u 3 zawał mięśnia sercowego. Niedokrwienie pooperacyjne było częściej stwierdzane u pacjentów z niepełną

odpowiedzią na aspirynę, przy czym wskaźnikiem najlepiej korelującym z niedokrwieniem był osoczowy poziom tromboksanu B2.

Wyniki badania wskazują na związek pomiędzy niepełną odpowiedzią na aspirynę a częstością niedokrwienia mięśnia serca w okresie pooperacyjnym u pacjentów po zabiegu CABG. Przełamanie "oporności" większą dawką leku lub dołączenie kłopidogrelu może zmniejszyć częstość niedokrwienia i potencjalnie poprawić rokowanie w tej grupie pacjentów.

*Golański R i wsp. Związek oporności na aspirynę z występowaniem incydentów niedokrwienych u pacjentów po chirurgicznym leczeniu choroby niedokrwiennej serca. Kardiochir.Torakochir.Pol. 2006 T.3 nr 3; s.299-303*

### 3. Ocena przydatności preparatów pochodzenia roślinnego jako nowych leków przeciwplatek

Niepełna odpowiedź na leki przeciwplatekowe skłania do poszukiwania nowych substancji o działaniu blokującym szlaki pobudzające reaktywność płytek krwi. Wśród tych substancji istotne miejsce zajmują preparaty pochodzenia roślinnego, podobnie jak pierwotnie miało to miejsce z kwasem arachidonowym.

Oceniano przydatność łącznego stosowania preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego z aspiryną w blokowaniu płytek krwi u pacjentów po zabiegu pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG). Do badania włączono 55 chorych przyjmujących aspirynę w dawce 75mg lub 150mg na dobę. Do krwi pobranej od pacjentów dodawano preparaty roślinne (Corvitan® i Aronox®) i oceniano skuteczność działania aspiryny i preparatów polifenolowych za pomocą agregacji optycznej, impedancyjnej, generacji tromboksanu B2 w osoczu oraz pomiar stężenia tromboksanu B2 w surowicy.

W pracy wykazano istotnie większe stężenie TXB2 w surowicy pacjentów przyjmujących dawkę 75 mg ASA niż w grupie leczonej dawką 150 mg ASA na dobę. Wyniki pracy wskazują, że wspomagający przeciwplatekowy efekt działania preparatu polifenolowego Aronox® występuje jedynie u chorych przyjmujących dawkę 75 mg ASA na dobę. Wyniki uzyskane w omawianym badaniu in vitro sugerują, że nie ma potrzeby uzupełniania preparatami polifenolowymi leczenia pacjentów przyjmujących ASA w dawce 150 mg na dobę, a wskazane jest rozpatrzenie zwiększenia dawki 75 mg ASA na dobę lub zastosowania terapii łączonej (ASA + preparat polifenolowy) u chorych po rewaskularyzacji mięśnia sercowego.

Obserwacja ta może mieć znaczenie u pacjentów, u których zwiększanie dawki aspiryny w celu poprawy efektu przeciwplateletowego skutkować będzie dolegliwościami ze strony układu pokarmowego. Potencjalnie dołączenie wówczas do małej dawki aspiryny (75mg) polifenolowego preparatu roślinnego pozwoli uzyskać odpowiedni efekt przeciwplateletowy bez zwiększania ryzyka działań niepożądanych wyższej dawki aspiryny.

*Golański J i wsp. The laboratory testing of different acetylsalicylic acid doses and the usefulness of plant polyphenol substances as antiplatelet supplementing therapy in patients after coronary artery bypass grafting surgery. Kardiologia i Torakochirurgia Polska 2011; T. 8, nr: 2, s.175-180*

Niacyna (witamina B3) współdziała w syntezie i rozkładzie węglowodanów, kwasów tłuszczowych i aminokwasów, w przemianach metabolicznych mających na celu uwalnianie energii, uczestniczy w tworzeniu czerwonych ciałek krwi, hamuje toksyczne działanie związków chemicznych i leków, reguluje poziom cholesterolu we krwi. Ze względu na jej udział w metabolizmie lipidów, w tym cholesterolu HDL, który w znacznym stopniu buduje błonę płytkową, wykonano badanie oceniające jej wpływ na reaktywność płytek krwi.

Krew pobrana od 30 zdrowych ochotników niestosujących żadnych leków przeciwplateletowych była inkubowana ze wzrastającymi stężeniami niacyny. Oceniano wpływ niacyny na agregację (metoda optyczna oraz impedancyjna), ekspresję receptorów płytkowych oraz poziom prostaglandyn we krwi. Inkubacja z niacyną spowodowała istotne obniżenie stopnia agregacji płytek krwi indukowanej ADP i kolagenem, zwiększenie ekspresji błonowej receptora PAR-1 oraz receptora dla witronektyny oraz zwiększenie poziomu tromboksanu B2, prostaglandyn D2 i E2 we krwi.

Wyniki badania wskazują na przeciwplatetowe działanie niacyny, przy czym jej mechanizm działania wydaje się inny od dotychczas znanych leków przeciwplatetowych jak aspiryna i kłopidogrel. Uzyskana obserwacja jest wstępna i wymaga dalszych badań.

*Serebruany V i wsp. The in vitro effects of niacin on platelet biomarkers in human volunteers. Thrombosis and Haemostasis 2010; Vol. 104, No.2, p. 311-317*

Do roślin z rodziny Asteraceae oraz Rosaceae należy wiele ziół uważanych za lecznicze przez medycynę ludową w Polsce. Właśnie ta grupa roślin stała się punktem naszych zainteresowań badawczych i poszukiwań w ich tkankach substancji o charakterze kwasowych polisacharydów. W toku prowadzonych przez nas badań opracowana została



metoda izolowania z surowca roślinnego substancji o charakterze kwasowych polisacharydów, tworzących koniugaty z polifenolami. Ostatecznie ocenie in vitro poddano preparat roślinny izolowany z przymiotna kanadyjskiego, o udowodnionym działaniu przeciwutleniającym. Okazało się, że środek ten nawet w stężeniu  $\mu\text{g/ml}$  w osoczu bogatopłytkowym, pobranym od zdrowych dawców, hamował agregację płytek. Aby wstępnie ocenić, jaki jest mechanizm inhibicji agregacji, przeprowadzone zostały badania w obecności czynników proagregacyjnych: kolagenu, ADP, trombiny oraz kwasu arachidonowego. Okazało się, że substancje roślinne wyizolowane z przymiotna kanadyjskiego hamują agregację płytek zachodzącą szlakiem kwasu arachidonowego. Po dodaniu do osocza bogatopłytkowego roślinnego środka w stężeniu  $100\mu\text{g/ml}$  agregacja płytek została zahamowana w 47%. Zaobserwowano istotny statystycznie spadek maksymalnej agregacji i nachylenia krzywej agregacji wywołanej kwasem arachidonowym przy stężeniu badanej substancji 100 i ~~200~~ $200\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$  dla obu porównań). Podobnych zależności nie obserwowano przy agregacji wywołanej ADP i kolagenem

Zaproponowane przez nas środki pochodzenia roślinnego hamując aktywację płytek, mogłyby w konsekwencji zapobiegać ich agregacji, a także sekrecji z ich wnętrza do osocza czynników krzepnięcia, zapobiegając również wydzielaniu czynników wzrostu, odpowiedzialnych w dużej mierze za formowanie się płytki miażdżycowej. Taki środek dawałby też nadzieję na leczenie pacjentów, którzy nie mogą zażywać takich środków jak kwas acetylosalicylowy i jego pochodne. Wykonanie badań podstawowych oraz przedklinicznych pozwoli na krok w kierunku stworzenia produktu, bądź produktów, które mogą stać się przedmiotem badań klinicznych, a może w przyszłości wprowadzenia na rynek nowego polskiego środka leczniczego, być może konkurencyjnego w stosunku do już obecnych pod względem właściwości biologicznych, źródła pochodzenia substancji aktywnej oraz pod względem stosunkowo niskich kosztów wytworzenia.

*Pawlaczyk I i wsp. Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant Erigeron canadensis L. Thromb.Res. 2011 Vol.127 no.4; s.328-340*

30.09.19. Kuliakowski