



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Farmakodynamiki

Prof. dr hab. n. med. i n. zdr. Magdalena Bujalska-Zadrożny
Zakład Farmakodynamiki
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ul. Banacha 1b
02-097 Warszawa

Warszawa, 13.04.2021r.

RECENZJA

Rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne Pani mgr Joanny Mikłosz pt. „Małopłytkowość indukowana protaminą oraz jej potencjalne powikłania zakrzepowo-zatorowe w eksperymentalnych modelach zwierzęcych” wykonanej w Zakładzie Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod kierunkiem Pana dr hab. n. farm. Andrzeja Mogielnickiego

Krew stanowi najważniejszą płynną tkankę łączną organizmu człowieka, drugą obok chłonki. Ogromne znaczenie układów fizjologicznych kontrolujących płynność krwi dla przeżycia ustroju znajdują - niestety - odzwierciedlenie w statystykach chorobowości i śmiertelności, przede wszystkim tej spowodowanej chorobami związanymi ze zmianami zakrzepowo-zatorowymi.

Jednym z częściej stosowanych w świecie leków przeciwzakrzepowych, jest występująca także natywnie u ludzi heparyna oraz jej syntetyczne analogi. Lek ten z jednej strony jest bardzo cennym środkiem zapobiegającym potencjalnie śmiertelności zmianom zakrzepowo-zatorowym, jednak z drugiej strony jego przedawkowanie może prowadzić do bardzo niebezpiecznych zmian o charakterze krwotocznym. Z tego powodu nie do przecenienia jest znaczenie środków mogących szybko i skutecznie odwrócić działanie wprowadzonej do ustroju heparyny i jej analogów. Koronnym środkiem stosowanym od dziesiętków lat w tym wskazaniu jest protamina.

Ponieważ z jednej strony protamina jest w chwili obecnej jedynym liczącym się antidotum na nadmierne działanie heparyny, a z drugiej strony jej działanie nie jest jednokierunkowe i podanie jej samo w sobie może być w niektórych sytuacjach niebezpieczne dla zdrowia, bardzo ważne jest dokładne przebadanie wszystkich aspektów działania protaminy, w tym rzeczywiste lub domniemane działania niepożądane ujawniające się w trakcie kolejnych lat stosowania protaminy w leczeniu. W ten obraz wpisuje się będące przedmiotem recenzowanej rozprawy doktorskiej zagadnienie małopłytkowości indukowanej przez protaminę (PIT) wraz z jej potencjalnymi powikłaniami zakrzepowo-zatorowymi.

Ponieważ opisywana interpretacja problemu została przedstawiona stosunkowo niedawno a w dodatku jego istnienia nie można być pewnym (część badaczy nadal je kwestionuje), jak w każdej wczesnej fazie badania zagadnienia farmakologicznego związanego z podawaniem leku u ludzi, szczególne znaczenie mają badania na zwierzętach i te właśnie w omawianym kontekście są przedmiotem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. W tym świetle uważam prezentowane podejście badawcze za ważne i aktualne.

Rozprawa doktorska pani Joanny Mikłosz obejmuje 58 stron maszynopisu, z czego trzy prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej (dwie poglądowe i jedna eksperymentalna) zajmują 42 strony.

Rozprawę podzielono na, kolejno idąc, rozdziały „Wprowadzenie” i „Cel pracy”, „Realizacja celów naukowych” a następnie „Wnioski” „Literatura” oraz „Streszczenie w języku polskim” i „Streszczenie w języku angielskim”. W dalszej części zamieszczono kolejno stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej dwie prace przeglądowe oraz jedną oryginalną. Są to:

(1) Mikłosz J, Kałaska B, Sokołowska E, Mogielnicki A.: Małopłytkowość indukowana protaminą - nowy problem czy inny typ małopłytkowości poheparynowej? *Folia Cardiologica* 2017; 12(4): 355-361. Artykuł poglądowy; punktacja wg skali MNiSW - 9 pkt;

(2) Mikłosz J, Kałaska B, Mogielnicki A.: Pharmacogenetic considerations of anticoagulant medication. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2018;69(4): 14 pp. Artykuł poglądowy; IF = 2,544; Punktacja wg skali MNiSW - 25 pkt;

(3) Mikłosz J, Kałaska B, Kamiński K, Rusak M, Szczubiałka K, Nowakowska M, Pawlak D, Mogielnicki A.: The inhibitory effect of protamine on platelets is attenuated by heparin without inducing thrombocytopenia in rodents. *Marine Drugs* 2019;17(9):539, 18pp. Praca doświadczalna; IF = 4,073; punktacja wg skali MNiSW - 100 pkt.

W końcowej części zamieszczono rozdziały zawierające informacje pomocnicze. W niektórych przypadkach zawartość spisu treści na str. 3 różni się od tytułów zamieszczonych w dalszym ciągu pracy. Jest tak w przypadku rozdziału 4 (podrozdział "Podsumowanie wyników badań i dyskusja" w spisie treści, podczas gdy na str. 9 czytamy "Podsumowanie wyników i dyskusja") oraz rozdziału 14 (podrozdział A "Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską" w spisie treści, podczas gdy na str. 77 "Lista publikacji stanowiących rozprawę doktorską")

Rozpoczynające właściwy tekst pracy niedługie "**Wprowadzenie**" Autorka poświęciła przede wszystkim tytułowemu zjawisku małopłytkowości indukowanej przez protaminę. Rozdział ten, poza krótkim zarysowaniem roli heparyny w lecnictwie a następnie charakterystyką protaminy skupia się na ukazaniu hipotetycznych patomechanizmów PIT, ze szczególnym wskazaniem na rozbieżne obserwacje badaczy, które wraz z lukami w wiedzy klinicznej dotyczącej PIT stanowią jeden z podstawowych powodów przeprowadzenia omówionych dalej badań podstawowych. Wprowadzenie uzasadnia tematykę badań opisanych we włączonej do doktoratu pracy oryginalnej oraz zastosowane w niej modele doświadczalne, a także tematykę włączonych do doktoratu prac przeglądowych. We wstępie Doktorantka wspomina, że badania dotyczące działań niepożądanych protaminy okazały się pomocne w opracowaniu jego skuteczniejszego bezpieczniejszego następcy. Proszę o przybliżenie w jaki sposób okazały się pomocne?

Uważna analiza rozdziału "Wprowadzenie" każe dopatrzeć się nim drobnych nieścisłości. Wg przynajmniej części obecnie dostępnych źródeł większość obecnej na rynku protaminy ma być pochodzenia biotechnologicznego a nie - jak stwierdzono w tekście pracy - być izolowanej z nasienia łososi.

Doktorantka stwierdza że "W 2013 roku dwa niezależne zespoły badawcze opublikowały **zaskakujące** doniesienia o **nowym** immuno-hematologicznym zaburzeniu określanym mianem trombocytopenii indukowanej protaminą (PIT). Tymczasem znacznie starsze źródła [np. Eika i Godal [1971, przeprowadzona na królikach], Rådegran et al. 1971 (na psach) oraz Jaques [1949, na psach] oraz cytowana przez Doktorantkę praca Al-Mondhiry i wsp. [1985]] wskazują na występowanie przemijającej trombocytopenii po protaminie.

Proszę o wyjaśnienie **dlaczego** mimo wszystko cytowane prace Bakchoul i wsp. [2013] oraz Lee i wsp. [2013] stanowiły aż taki przełom, że po latach zastoju badanie zjawiska PIT ruszyło z nową siłą.

Cel pracy, którym było wyjaśnienie wpływu protaminy i jej kompleksów z heparyną niefrakcjonowaną (UFH) na płytki krwi oraz proces megakariocytopoezy, a także zbadanie jej potencjalnych wczesnych i późnych powikłań zakrzepowo-zatorowych został sformułowany poprawnie.

W celu realizacji założeń pracy Autorka przeprowadziła złożone badania składające się na omówioną dalej pracę eksperymentalną. Duży ładunek wiedzy teoretycznej koniecznej do zrozumienia sensu celowości badań eksperymentalnych został z kolei zawarty w dwóch pracach poglądowych omówionych poniżej. Pomimo umieszczenia ich na końcu merytorycznej części doktoratu zostaną one omówione w tym miejscu.

We wstępie **pierwszej** przeglądowej publikacji Doktorantka omawia pokrótce okoliczności kliniczne i tło immunologiczne, na jakim dochodzi do występowania PIT, dalej szczegółowo omawia elementy składające się na patogenezę trombocytopenii indukowanej protaminą, obraz kliniczny PIT oraz czynniki ryzyka jego wystąpienia. W rozdziale "Postępowanie terapeutyczne" Doktorantka wskazuje obecnie zalecane postępowanie w przypadku wystąpienia HIT (należy to uznać za celowe w kontekście podobieństw między HIT i PIT) a następnie bardzo wnikliwie charakteryzuje obecnie znane potencjalne zamienniki protaminy podkreślając, że obecnie brak szeroko dostępnego w leczeniu zamiennika protaminy. Wszystkie takie zamienniki, także autorstwa zespołu badawczego do którego należy Doktorantka, znajdują się na etapie badań. W podsumowaniu pracy Autorka słusznie stwierdza, że choć w ostatnich badaniach wskazano wyraźnie na istnienie zjawiska PIT, to z różnych przyczyn brak dowodów na jego "objawową obecność".

Zjawisko PIT zostało w pracy nr 1 omówione dokładnie, co dobrze świadczy o teoretycznym przygotowaniu Autorki. Piśmiennictwo w tej pracy dotyczy wielu lat (1980 – 2016), co obok samej treści artykułu świadczy o dokładności ujęcia tematu publikacji i rzetelnym podejściu Autorki.

Rozległa pod względem zawartości merytorycznej jak i piśmiennictwa **druga** teoretyczna publikacja odnosi się do uwarunkowań stosowania leków przeciwzakrzepowych zależnych od działania i zróżnicowania w populacji genów odpowiedzialnych za działanie antykoagulantów w ustroju. Autorzy wychodzą z założenia, że przewidywanie klinicznych konsekwencji terapii przeciwzakrzepowej poprzez identyfikację indywidualnych wariantów genowych może być pomocne także w ocenie ryzyka zakrzepicy lub krwawienia przed i po zabiegach. Omawiana praca skupia się na przeglądzie danych farmakogenetycznych dotyczących powszechnie stosowanych leków przeciwzakrzepowych. Przegląd ten koncentruje się na polimorfizmach genetycznych wpływających na skuteczność i bezpieczeństwo pozajelitowych i doustnych leków przeciwzakrzepowych; omawiane jest także kliniczne znaczenie zróżnicowania genów w populacji oraz wytyczne "zarządzania farmakogenetyką". We wnioskach Doktorantka stwierdza, że konieczne są dalsze wieloetniczne badania, zwłaszcza łączące geny enzymów metabolizujących bezpośrednie doustne leki przeciwzakrzepowe z pierwszorzędowymi klinicznymi celami końcowymi.

W pracy numer 2 uderza fakt, że praktycznie nie ma w niej mowy o protaminie, zaś trombocytopenia jest omawiana w kontekście jej powstawania pod wpływem heparyny, czyli HIT. W tych okolicznościach włączenie omawianego artykułu do tekstu doktoratu może dziwić, choć z jednej strony brak prac na temat PIT w ogóle, z drugiej rozliczne podobieństwa pomiędzy PIT i HIT mogą taki wybór uzasadnić.

Trzecia z kolei publikacja stanowi jedyną choć obszerną pracę eksperymentalną stanowiącą podstawę doktoratu. Jak wiadomo, interakcje między protaminą, UFH oraz płytkami krwi pozostają niejasne, co utrudnia poznanie istoty zjawiska PIT. W celu lepszego zrozumienia istniejących pomiędzy tymi elementami współzależności przeprowadzono badania wpływu UFH, siarczanu protaminy (PS) oraz skojarzenia UFH+PS na (1) liczbę płytek krwi i ich czynność u myszy i szczurów; (2) rozwój zakrzepicy i parametry krzepnięcia (myszy, szczury); (3) megakariocytopoezę u myszy oraz (4) parametry morfologiczne krwi myszy i szczurów.

W pracy stosowano zarówno podania ostre jak i przewlekłe. Te ostatnie wprowadzono ze względu na trudny do określenia przedział czasu, w którym mogą ujawnić się symptomy PIT, a celem było zgromadzenie informacji na temat ewentualnych późnych powikłań PIT; horyzont czasowy wynosił tu 35 dni.

Analizując otrzymane wyniki wykazano, że ani jednorazowe ani wielokrotne skojarzone podawanie UFH i protaminy nie wywołało u szczurów i myszy znaczącej trombocytopenii, aktywacji płytek krwi ani rozwoju zakrzepicy tętniczej a więc symptomów charakterystycznych dla zjawiska PIT. Badane związki nie wpłynęły także na megakariocytopoezę i tworzenie płytek krwi. Mimo to sama protamina podczas eksperymentu z podaniem ostrym przejściowo zahamowała u myszy i szczurów agregację płytek krwi (efekt przeciwpłytkowy), jednak bez wywoływania małopłytkowości. Efekt ten był słabszy u myszy przy jednoczesnym podaniu UFH, także bez towarzyszącej indukcji małopłytkowości. Wielokrotne (pięć razy - raz w tygodniu przez 35 dni) wstrzyknięcie samej protaminy u szczurów wpływało hamująco na rozwój indukowanej prądem elektrycznym zakrzepicy tętniczej, co jednak nie wiązało się z wystąpieniem trombocytopenii i nie miało związku z działaniem przeciwpłytkowym; u obu użytych do badań gatunków nie zarejestrowano zmian aktywności i liczby płytek krwi, czasu krzepnięcia oraz stężeń D-dimerów.

Autorzy pracy wnioskują, że potencjalne przeciwpłytkowe i przeciwwakrzepowe działanie PS może przyczyniać się do ryzyka krwawienia (a nie zakrzepicy) w przypadku przedawkowania tego leku u ludzi. W jaki sposób protamina indukuje długotrwałe niezależne od płytek krwi działanie przeciwwakrzepowe? Czy doktorantka dokładnie zbadała mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska?

Jak zgodnie z aktualnym stanem wiedzy powinna wyglądać neutralizacja działania przeciwwakrzepowego heparyny niefrakcjonowanej przez siarczan protaminy, aby uniknąć powikłań krwotocznych?

W dziale czwartym pracy ("4. Materials and Methods") na pochwałę zasługuje dokładny opis schematu badań połączony z przedstawieniem graficznym, co jest szczególnie ważne ze względu na ich rozległość. Sama konstrukcja schematu badań uwzględniająca przemyślane wprowadzenie pewnych jego elementów w oparciu o publikacje innych autorów powoduje uzyskanie ostatecznych wniosków w możliwie najmniejszym stopniu obciążonych wątpliwościami.

Uwagę zwracają różne procedury pobierania krwi. Proszę przybliżyć procedurę pobierania ze splotu pozaoczdolowego (ze względów oczywistych nie jest ona dokładnie opisana w artykule). Czy pobranie krwi z serca myszy odbywało się przy zamkniętej czy otwartej klatce piersiowej? Czy sama procedura nie miała wpływu na krzepliwość krwi?

Przed trzema pracami stanowiącymi podstawę doktoratu w rozprawie zamieszczono czterostronicowy rozdział czwarty pt. **"Realizacja celów naukowych"** zawierający podrozdziały **"Materiały i metody badawcze"** oraz **"Podsumowanie wyników badań i dyskusja"**

Podrozdział **"Materiały i metody badawcze"** generalnie dobrze charakteryzuje plan badań składających się na pracę nr 3 i pozwala zrozumieć ich celowość. Pewne zastrzeżenia budzi miejscami

język ("Eksperymenty ostre" zamiast "z zakresu podawania ostrego" (str.8); analogicznie "eksperymentów chronicznych" zamiast "z zakresu podawania przewlekłego" (str. 8), dane niegaussowskie" zamiast "dane, których rozkład nie spełnia znamion krzywej Gaussa" (str. 8).

Dyskusja została przeprowadzona poprawnie i uwzględniono w niej wszystkie ważniejsze wątki pracy. W dziale tym zwraca uwagę zdolność Doktorantki do wnikliwej i krytycznej analizy wyników. Na wyrazy uznania zasługuje także kilkakrotne wskazanie w maszynopisie pracy kierunków przyszłych badań, postępowania terapeutycznego oraz rysujących się na horyzoncie możliwości postępowania farmakologicznego w zakresie związanym z zagadnieniami omawianymi w rozprawie, przy czym punktem wyjścia takiej opinii są badania własne Autorki lub/i ocena ogólnego stanu wiedzy w danej dziedzinie. Jednym z przykładów są badania nad HBC - potencjalnym następcą protaminy o ulepszonych właściwościach, w których bierze udział Autorka ocenianej rozprawy.

W II-IV wierszu str. 10 nie bardzo kontekstowo wiadomo jak rozumieć zdanie "Być może model zwierzęcy CPB byłby bardziej wartościowy w ekstrapolowaniu uzyskanych wyników bezpośrednio na pacjentów, nie mniej jednak jego wyeliminowanie pozwoliło ocenić wyłącznie wpływ leków." - jeśli "byłby bardziej wartościowy", to kiedy i dlaczego jednak został wyeliminowany?

Po zamknięciu dyskusji Doktorantka sformułowała cztery **wnioski** syntetycznie podsumowujące przeprowadzone badania. Wnioski te w kontekście materiału zawartego w przedstawionych pracach nie budzą zastrzeżeń, choć nadal nie dają odpowiedzi na jedno z podstawowych pytań, tzn. czy małopłytkowość indukowana przez protaminę stanowi samodzielną jednostkę chorobową czy też stanowi odmianę małopłytkowości wywoływanej przez heparynę.

Kolejny **rozdział** rozprawy stanowi **wykaz piśmiennictwa** (w tekście nazwany jako "Literatura").

W odniesieniu do **piśmiennictwa rozprawy ujmowanej jako całość** należy dodać, że oparte jest ono na najnowszych publikacjach, lecz nie tylko na nich. Doktorantka dokonała dokładnego przeglądu prawdopodobnie całego dostępnego piśmiennictwa z zakresu wymaganego przez tematykę. Świadczy to o dobrym teoretycznym przygotowaniu Autorki do rozwiązania podjętego zadania badawczego. Z przedstawionej w rozprawie analizy literatury wiadomo, że terapia oparta na heparynie niefrakcjonowanej i siarczanie protaminy może prowadzić do pojawienia się we krwi przeciwciał IgG, skierowanych przeciwko kompleksom heparyny i protaminy. Czy spadek liczby płytek krwi, który obserwuje się u części pacjentów, jest zawsze wynikiem swoistej odpowiedzi immunologicznej, czy mogą wchodzić w grę inne mechanizmy patofizjologiczne?

W rozdziale **13** w tytule Autorka użyła niefortunnego sformułowania "Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej" (w rzeczywistości są to współautorzy prac, na których opiera się rozprawa doktorska).

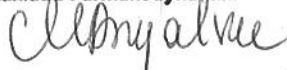
Ocena końcowa:

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani Joanny Mikłosz oceniam od strony merytorycznej wysoko. Włączona do niej obszerna praca doświadczalna nr 3 została starannie zaprojektowana i przemyślana a ilość aspektów omówionych w pracach poglądowych nr 1 i 2 jest imponująca. Część teoretyczna jak i doświadczalna rozprawy świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym i manualnym Doktorantki, umiejętności organizowania pracy badawczej, a także planowania i rozwiązywania zagadnień naukowych. Dwie z trzech prac zawartych w rozprawie (jedna o charakterze eksperymentalnym oraz jedna poglądowa) zostały opublikowane w dobrych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym o wysokim współczynniku wpływu (łącznie IF 6,617). Udział Doktorantki (jako pierwszego Autora) w pracy eksperymentalnej wynosił 76%, zaś w pracach przeglądowych po 80%. Całkowity IF dorobku naukowego Doktorantki jest również wysoki i wynosi 26,643 a łączna ilość uzyskanych przez nią punktów MNiSW to 489. Zwraca uwagę, że mimo stosunkowo niedługiego stażu naukowego była (bądź jest nadal) kierownikiem czterech projektów

badawczych na łącznie dziesięć, w których bierze albo brała udział. O kwalifikacjach naukowych Doktorantki pozytywnie świadczy także fakt przyznania jej aż sześciu różnego rodzaju nagród w ciągu sześciu lat kalendarzowych.

Przedstawiając powyższą ocenę kieruję do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pani mgr Joanny Mikłosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje także o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakodynamiki



prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Magdalena Buińska-Zadrożny