



**KATEDRA I ZAKŁAD FARMACJI FIZYCZNEJ
I FARMAKOKINETYKI**

MARTA KARAŻNIEWICZ-ŁADA

AUTOREFERAT

1. Posiadane dyplomy i wykształcenie

2002 r.: dyplom magistra farmacji

Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wydział Farmaceutyczny, specjalność Farmacja Kliniczna

Praca magisterska: „Metoda wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej oznaczania enancjomerów pochodnych kwasu 2-arylopropionowego w surowicy krwi”

Promotor: dr n.farm. Franciszek Główka

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej

2007 r.: dyplom doktora nauk farmaceutycznych

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wydział Farmaceutyczny, specjalność: farmakokinetyka

Praca doktorska: „Wpływ polimorfizmu genetycznego izoenzymów CYP2C8 i 2C9 na farmakokinetykę enancjomerów pochodnych kwasu 2-arylopropionowego”

Promotor: dr hab. Franciszek Główka

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

2008 r.: prawo wykonywania zawodu farmaceuty – Okręgowa Izba Aptekarska
w Poznaniu

2014 r.: specjalizacja z farmacji klinicznej

2. Przebieg pracy zawodowej

2002 – 2005 r.: słuchacz studium doktoranckiego UMP, praca badawcza realizowana w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

2005 – 2007 r.: asystent z tytułem magistra w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMP

2007 – 2008 r.: asystent z tytułem doktora w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMP

2008 r. – do chwili obecnej: adiunkt w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMP

3. 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.)

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Farmakokinetyczne i farmakogenetyczne aspekty analizy kłopidogrelu i jego metabolitów w płynach biologicznych pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego”

Podstawę ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego stanowi cykl 10 publikacji (7 publikacji oryginalnych i 3 pogładowe), opublikowanych w latach 2010 – 2015, o łącznym współczynniku oddziaływania IF równym 18.656 (pkt. MNiSW = 221). Omówiono w nich wyniki badań farmakokinetyki i farmakodynamiki kłopidogrelu z uwzględnieniem polimorfizmu genetycznego glikoproteiny P oraz enzymów biorących udział w przemianach metabolicznych tego leku do jego aktywnego metabolitu. Ponadto, przedstawiono opracowane metody analityczne przeznaczone do oznaczania kłopidogrelu i jego metabolitów w osoczu i moczu pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego.

3.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji

Prace oryginalne

I. Metody analizy kłopidogrelu i jego metabolitów w płynach biologicznych

1. **M. Karaźniewicz-Łada**, F. Główka, G. Oszkinis: Capillary Zone Electrophoresis method for determination of (+)-S clopidogrel carboxylic acid metabolite in human plasma and urine designed for biopharmaceutic studies. J. Chromatogr. B 2010; 878: 1013-1018.
IF = 2.971, MNiSW = 32.000
2. **M. Karaźniewicz-Łada**, D. Danielak, F. Główka: HPCE and HPLC methods for determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite in biological samples. A comparative analysis. J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech. 2014, 37: 620-633.
IF=0.606, MNiSW = 15.000
3. **M. Karaźniewicz-Łada**, D. Danielak, A. Teżyk, C. Żaba, G. Tuffal, F. Główka: HPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of clopidogrel, its

carboxylic acid metabolite and derivatized isomers of thiol metabolite in clinical samples. J. Chromatogr. B 2012; 911: 105-112.

IF=2.487, MNiSW = 35.000

II. Farmakokinetyka i farmakogenetyka kłopidogrelu i jego metabolitów u pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego

4. **M. Karaźniewicz-Łada**, D. Danielak, P. Burchardt, Ł. Kruszyna, A. Komosa, M. Lesiak, F. Głowska: Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases. Clin. Pharmacokinet. 2014; 53: 155-164.

IF = 5.053, MNiSW = 45.000

5. **M. Karaźniewicz-Łada**, D. Danielak, P. Burchardt, F. Głowska: The influence of diabetic status on the pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients suffered from cardiovascular diseases. J. Med. Sci. 2014; 3 (83): 215-221.

MNiSW = 5.000

6. **M. Karaźniewicz-Łada**, D. Danielak, B. Rubiś, P. Burchardt, G. Oszkinis, F. Głowska: The influence of genetic polymorphism of Cyp2c19 isoenzyme on the pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases. J. Clin. Pharmacol. 2014; 54(8): 874-880.

IF = 2.475, MNiSW = 30.000

7. **M. Karaźniewicz-Łada**, D. Danielak, B. Rubiś, P. Burchardt, A. Komosa, M. Lesiak, F. Głowska: Impact of common ABCB1 polymorphism on pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel and its metabolites. J. Clin. Pharm. Ther. 2014; 40: 226-231.

IF = 1.668, MNiSW = 20.000

Prace pogładowe

- P-1. **M. Karaźniewicz-Łada**, D. Danielak, F. Głowska: Czynniki genetyczne wpływające na terapię kłopidogrelem. Kard. Pol. 2012; 70: 1177-1181.

IF = 0.536, MNiSW = 15.000

- P-2. **M. Karaźniewicz-Łada**, D. Danielak, F. Głowska: Genetic and non-genetic factors affecting the response to clopidogrel therapy. Expert Opin. Pharmacother. 2012; 13: 663-683.

IF = 2.860, MNiSW = 20.000

P-3. **M. Karaźniewicz-Łada**, F. Główka: Zmienność odpowiedzi na leczenie kłopidogrelem u chorych na cukrzycę. Farm. Współcz. 2013; 6: 28-32.

MNiSW = 4.000

* Kopie prac i oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji wskazanych jako osiągnięcie naukowe zestawiono w załącznikach 5 i 6. Oświadczenia habilitanta dotyczące wykonywanych prac i procentowego w nich udziału znajdują się w załączniku 4.

3.3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników

Wprowadzenie

Kłopidogrel (CLP) jest chiralnym lekiem przeciwplatekowym z grupy pochodnych tienopirydyny II generacji. Stosowany jest w postaci izomeru o konfiguracji (+)-S w leczeniu pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi, w profilaktyce powikłań a także po zabiegach angioplastyki, zwłaszcza po implantacji stentów naczyniowych [1]. Stwierdzono, że CLP jest bardziej skuteczny niż kwas acetylosalicylowy (ASA) w zapobieganiu następstwom miażdżycy tętnic, takim jak udar niedokrwienny, zawał mięśnia sercowego czy zgon z przyczyn naczyniowych [2]. Połączenie obu leków znalazło zastosowanie w schemacie podwójnej terapii przeciwplatekowej (DAT – dual antiplatelet therapy) w leczeniu ostrych zespołów wieńcowych bez uniesienia odcinka ST oraz z uniesieniem odcinka ST, a także w zapobieganiu incydentom zakrzepowym u pacjentów poddanych przezskórnej interwencji wieńcowej [3–5]. Pomimo widocznych korzyści ze stosowania leku, potwierdzonych w wielu badaniach klinicznych, u 5 – 44% pacjentów leczonych standardowymi dawkami CLP (dawka inicjująca 300 mg oraz podtrzymująca - 75 mg), nie obserwuje się oczekiwanego efektu terapeutycznego [6–8]. Konsekwencją niedostatecznej inhibicji płytek jest zwiększone ryzyko występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych, takich jak zawał mięśnia sercowego, udar, zakrzepica w stencie, a nawet śmierć [6].

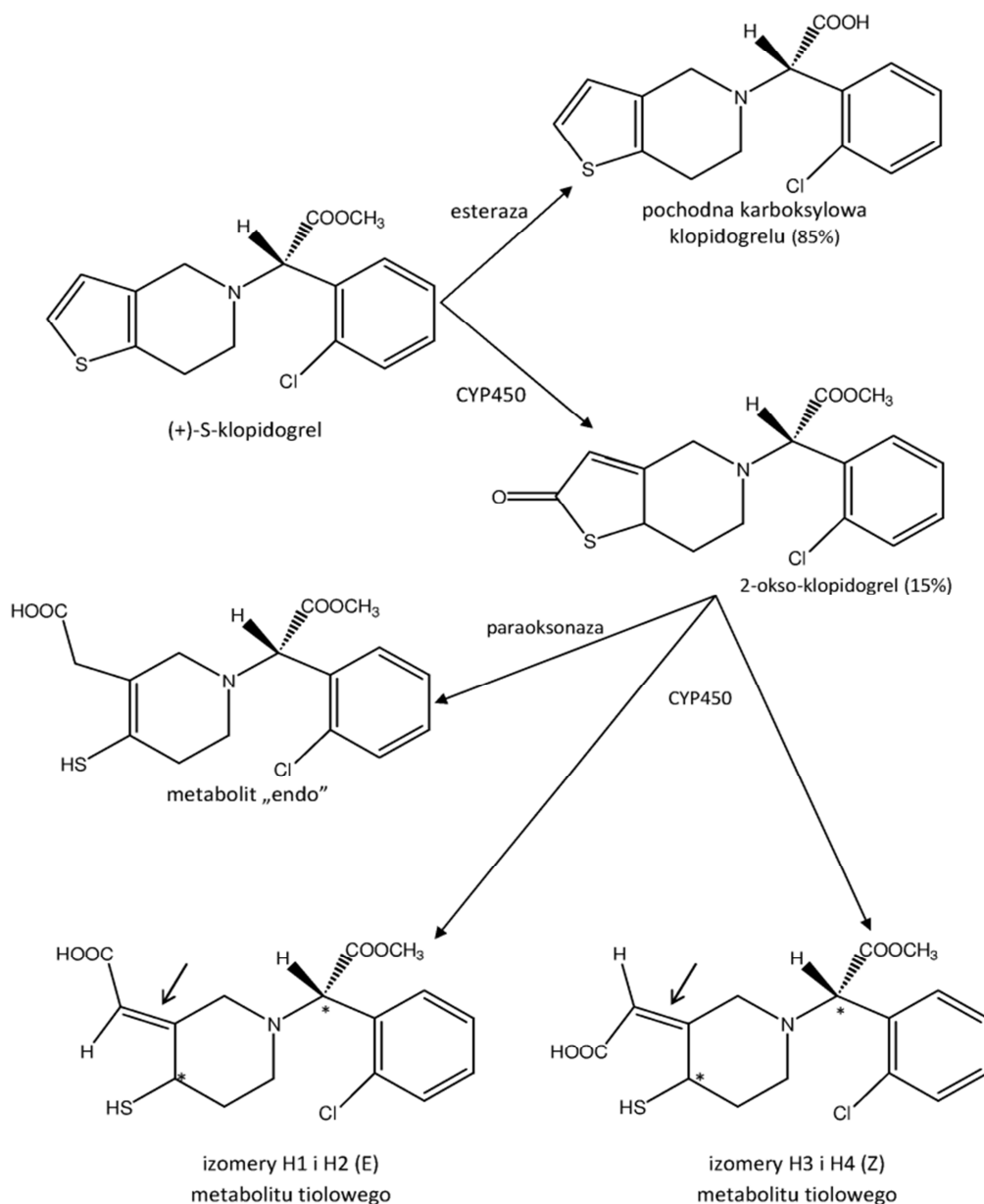
Przyczyny występowania oporności na CLP nie zostały do końca wyjaśnione. Przypuszcza się, że zmienność odpowiedzi wśród pacjentów stosujących ten lek może być związana z polimorfizmem genetycznym transporterów białkowych biorących udział we wchłanianiu leku oraz enzymów cytochromu P450 (CYP450) odpowiedzialnych za jego metabolizm. Wśród czynników pozagenetycznych wymienia się współistniejące choroby, wiek, masę ciała czy przyjmowane leki [9]. Oporność na CLP występuje szczególnie często u pacjentów

z cukrzycą, którzy przyjmują CLP w związku ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych [10]. Brak spodziewanego efektu terapeutycznego CLP może być związany z niedostatecznym wytwarzaniem metabolitów, co skutkuje niewielkim zahamowaniem agregacji płytek krwi. Metabolizm leku zachodzi w wątrobie i obejmuje przemianę CLP do nieaktywnej pochodnej karboksylowej przy udziale esterazy karboksylowej. Tą drogą metabolizowane jest ok. 85% wchłoniętej dawki leku [11]. Pomimo braku farmakologicznej aktywności metabolitu karboksylowego, do niedawna analizę stężeń tego związku wykorzystywano do oceny farmakokinetyki leku macierzystego. Było to spowodowane niskimi poziomami niezmienionego CLP w osoczu, rzędu pg/ml oraz trudnościami analitycznymi związanymi z oznaczaniem nietrwałego w warunkach *ex vivo* metabolitu aktywnego [12]. Pozostałe 15% wchłoniętej dawki CLP ulega dwustopniowej przemianie do aktywnej farmakologicznie pochodnej tiolowej. W przemianie tej uczestniczą enzymy CYP450, głównie CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A [13]. W pierwszym etapie powstaje nieaktywny farmakologicznie 2-okso-klopidogrel, który z kolei jest przekształcany do aktywnego metabolitu, posiadającego wolną grupę tiolową. Dodatkowym produktem metabolizmu CLP jest nieaktywny farmakologicznie izomer tiolowy „endo”, powstały przy udziale paraoksonazy-1 (PON-1), w którym wiązanie podwójne znajduje się wewnątrz pierścienia piperidynowego (Rys. 1). Powstający metabolit tiolowy występuje w postaci 4 diastereoizomerów, oznaczanych jako H1 – H4 (Rys. 1). Izomery H1 i H2 posiadają konfigurację *trans* (E), natomiast H3 i H4 są izomerami typu *cis* (Z) [14]. W próbkach klinicznych stwierdzono występowanie wyłącznie izomerów o konfiguracji Z. Natomiast w badaniach *in vitro* wykazano, że jedynie izomery H2 oraz H4 posiadają zdolność do hamowania agregacji płytek krwi, przy czym aktywność izomeru H4 jest dwukrotnie wyższa niż izomeru H2 [14].

Wśród polimorficznych wariantów izoenzymów biorących udział w tworzeniu metabolitu tiolowego, allel CYP2C19*2 wydaje się być w największym stopniu odpowiedzialny za obniżoną aktywność przeciwplatekową CLP i zwiększone ryzyko wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych w populacji kaukaskiej [15,16]. Natomiast u nosicieli allelu CYP2C19*17 skuteczność terapii z użyciem CLP jest największa, co związane jest ze zwiększoną aktywnością kodowanego przez ten allel enzymu biorącego udział w przemianie CLP do jego aktywnej pochodnej [17]. Efekt przeciwplatekowy może również być uzależniony od polimorfizmu genu ABCB1 kodującego transporter błonowy glikoproteinę P, która wpływa na dostępność biologiczną leku. Niektórzy badacze sugerują, że polimorficzny wariant 3435C>T wpływa na farmakokinetykę i farmakodynamikę CLP [18,19]. Nie

odnotowano jednak istotnej zależności pomiędzy genotypem ABCB1 a skutecznością terapii CLP i częstością występowania działań niepożądanych [18,20]. Wyniki te sugerują, że wpływ glikoproteiny P na odpowiedź na CLP nie jest jednoznaczny i wymaga dalszych badań.

Mechanizm działania aktywnej izoformy H4 metabolitu tiolowego polega na selektywnym i nieodwracalnym hamowaniu zależnej od ADP agregacji płytek krwi poprzez blokowanie wiązania ADP z płytkowymi receptorami P2Y₁₂ [21]. Receptory te również mogą wykazywać polimorfizm genetyczny, co wpływa na aktywność przeciwplatekową CLP [22].



Rys. 1. Metabolizm CLP.

Pomimo powszechnego stosowania CLP w terapii przeciwplatekowej u osób z chorobami układu sercowo-naczyniowego, w światowym piśmiennictwie istnieje niewiele informacji dotyczących farmakokinetyki CLP i jego metabolitów w tej grupie pacjentów oraz czynników wpływających na efektywność kliniczną leku. W związku z tym, przedmiotem moich badań była ocena parametrów farmakokinetycznych CLP w powiązaniu z efektem farmakodynamicznym leku oraz polimorfizmem genetycznym izoenzymów CYP2C19 oraz glikoproteiny P. Badania te miały na celu określenie czynników wpływających na skuteczność leczenia oraz ryzyko wystąpienia oporności na CLP, co ma szczególne znaczenie w optymalizacji terapii przeciwplatekowej i zmniejszeniu częstości incydentów zakrzepowych spowodowanych niedostatecznym zahamowaniem agregacji.

Omówienie wyników badań

W celu wyznaczenia kierunków badań eksperymentalnych w obszarze poszukiwania wskaźników pozwalających przewidzieć skuteczność leczenia kłopidogrelem u pacjentów przyjmujących lek, podsumowano dostępne wyniki badań dotyczących aspektów farmakokinetycznych, farmakodynamicznych i genetycznych terapii przeciwplatekowej.

Na podstawie dostępnego piśmiennictwa, w publikacji **P-1** dokonano próby identyfikacji czynników genetycznych o największym potencjalnym znaczeniu w występowaniu obniżonej aktywności przeciwplatekowej CLP w grupie pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego. Opisano w niej wpływ określonych mutacji genetycznych glikoproteiny P, która uczestniczy w procesie wchłaniania leku do krwiobiegu, a także enzymów CYP450 uczestniczących w przemianie leku do aktywnego metabolitu tiolowego. Szczególną uwagę zwrócono na polimorficzne odmiany izoformy CYP2C19, które wydają się mieć największy wpływ na obniżoną skuteczność działania przeciwplatekowego CLP. Opisano również czynniki genetyczne wpływające na mechanizm działania leku, polegający na wiązaniu się jego aktywnego metabolitu z receptorami płytkowymi P2Y₁₂. Przedstawiono konsekwencje kliniczne występowania ww. mutacji oraz zaproponowano alternatywne schematy terapeutyczne dla pacjentów genetycznie obciążonych zwiększonym ryzykiem wystąpienia oporności na lek.

W publikacji **P-2**, znaczenie polimorfizmu genetycznego w badaniach nad opornością na CLP uzupełniono o szczegółową analizę czynników pozagenetycznych wpływających na działanie przeciwplatekowe leku. Szczególną uwagę zwrócono na interakcje z innymi lekami, zwłaszcza tymi, które często są stosowane u osób z chorobami układu sercowo-

naczyniowego. Należą do nich statyny, antagoniści kanałów wapniowych czy leki β -adrenolityczne. Opisano także interakcję pomiędzy CLP a inhibitorami pompy protonowej, które często podawane są jednocześnie z CLP w celu zmniejszenia działań niepożądanych leku ze strony przewodu pokarmowego. Zwrócono uwagę na współistniejące choroby, takie jak cukrzyca, niewydolność nerek czy stany zapalne, które modyfikują skuteczność terapeutyczną leku. Opisano również metody wykorzystywane do oceny przeciwplatekowego działania CLP.

W publikacji **P-3** skupiono się na aspektach terapii przeciwplatekowej kłopidogrelem u pacjentów z cukrzycą. Dokonano analizy czynników wpływających na zwiększoną agregację płytek krwi w tej grupie chorych. Opisano przyczyny i konsekwencje kliniczne zmniejszonej skuteczności działania leku. Szczególną uwagę zwrócono na zmiany w farmakokinetyce CLP związane z niedostatecznym wytwarzaniem aktywnego metabolitu tiolowego. Przedstawiono również strategie terapii przeciwplatekowej u osób z cukrzycą pozwalające zmniejszyć ryzyko zdarzeń niedokrwiennych w tej grupie chorych.

Zestawienia zaprezentowane w publikacjach poglądowych (**P-1, P-2 i P-3**), stanowiły istotny punkt wyjścia do zaplanowania badań nad czynnikami predysponującymi do wystąpienia oporności na CLP. Stwierdzono, że powiązanie badań farmakokinetycznych leku macierzystego i jego metabolitów z efektem farmakodynamicznym, określonym poprzez poziom agregacji płytek krwi po podaniu leku, oraz z oznaczeniem genotypu, pozwoliłoby ocenić ryzyko zmniejszonej odpowiedzi przeciwplatekowej w grupach pacjentów ze schorzeniami wpływającymi na aktywność leku.

Badania eksperymentalne, prezentowane w ramach rozprawy habilitacyjnej, realizowane były w dwóch uzupełniających się obszarach badawczych:

- opracowania odpowiednio szybkich i selektywnych metod analitycznych przeznaczonych do oznaczania CLP i jego metabolitów w płynach biologicznych (**publikacje 1, 2 i 3**)
- badania wpływu czynników genetycznych i pozagenetycznych na parametry farmakokinetyczne i farmakodynamiczne CLP (**publikacje 4, 5, 6 i 7**).

Do badań farmakokinetyki CLP i jego metabolitów u pacjentów, konieczne było opracowanie odpowiednich metod bioanalitycznych. Ze względu na ograniczoną dostępność do HPLC z detekcją MS/MS, farmakokinetykę CLP określa się często w sposób pośredni, poprzez oznaczanie stężeń jego metabolitu karboksylowego (CLPM), gdyż po podaniu nawet małych dawek leku macierzystego, stężenia CLPM są rzędu $\mu\text{g/ml}$ i można je oznaczyć stosując detekcję UV. W związku z tym opracowano metodę wysokosprawnej elektroforezy

kapilarnej (HPCE) oznaczania CLP i CLPM w osoczu i moczu pacjentów (**publikacja 1**). Do izolacji CLP i CLPM z płynów biologicznych zastosowano metodę ekstrakcji do ciała stałego (SPE). Opracowano najbardziej optymalne warunki elektroforetyczne umożliwiające rozdział analitów w obecności wzorca wewnętrznego – piroksykanu oraz związków endogennych pochodzących z osocza i moczu. Całkowity rozdział elektroforetyczny CLP i CLPM uzyskano w kapilarze krzemionkowej wypełnionej buforem fosforanowym o pH 2,5. Przeprowadzono walidację opracowanej metody, która obejmowała określenie selektywności, wykrywalności i oznaczalności, precyzji, dokładności i odzysku analitów z płynów biologicznych. Stwierdzono, że metoda jest odpowiednio dokładna i precyzyjna i spełnia kryteria walidacyjne dla metod analitycznych przeznaczonych do oznaczania leków i ich metabolitów w płynach biologicznych. Metodę zastosowano do oznaczeń stężeń CLPM w osoczu i moczu pacjentów, którym podano dawkę inicjującą 300 mg CLP przed zabiegiem angioplastyki. Należy zaznaczyć, że opracowana metoda HPCE oznaczania CLPM w osoczu i moczu była pierwszą opisaną tego typu metodą w literaturze.

Opracowano również metodę HPLC-UV oznaczania CLP i CLPM w płynach biologicznych pacjentów, w celu porównania jej z opisaną powyżej metodą HPCE (**publikacja 2**). Rozdział analitów przeprowadzono w kolumnie C18 z użyciem fazy ruchomej złożonej z acetonitrylu i buforu fosforanowego o pH 3. Do izolacji CLP i CLPM z płynów biologicznych zastosowano metodę SPE. Metodę poddano walidacji, a następnie zastosowano do oznaczeń stężeń CLPM w osoczu pacjentów. Opracowaną metodę HPLC porównano do opracowanej wcześniej metody HPCE za pomocą testów statystycznych, metody Bland-Altmana oraz metody ATE/LER (Allowable Total Error and Limits for Erroneous Results). Nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic między wynikami oznaczeń CLPM w próbkach osocza pacjentów metodami HPCE i HPLC. Zastosowane testy Bland-Altmana oraz ATE/LER wykazały, że badane metody analityczne są porównywalne. W związku z tym obie metody mogą być stosowane alternatywnie do oznaczania CLPM w osoczu pacjentów leczonych kłopidogrelem. Jednakże, metoda HPCE charakteryzowała się większą selektywnością dla oznaczeń CLPM w moczu pacjentów w porównaniu do metody HPLC, w przypadku której nie udało się uzyskać całkowitego rozdziału analitów od związków endogennych pochodzących z moczu.

W związku z tym, że za efekt przeciwpłytkowy CLP odpowiedzialny jest jego metabolit tiolowy (CTM), konieczne było opracowanie metody bardziej selektywnej, umożliwiającej oznaczenie w osoczu pacjentów nie tylko CLP i CLPM, ale również CTM, który może występować w postaci czterech izomerów H1-H4. Ze względu na niskie stężenia leku

macierzystego oraz izomerów CTM w osoczu rzędu pg/ml - ng/ml, oraz nietrwałość CTM związaną z obecnością w jego cząsteczce ugrupowania tiolowego, opracowano jedynie kilka metod oznaczania CTM w próbkach biologicznych. Większość z nich dotyczyła jednak oznaczania tego związku w postaci mieszaniny racemicznej [23–25], co może prowadzić do błędnych wniosków co do ekspozycji pacjentów na aktywny metabolit CLP, zważywszy na fakt, że tylko jeden izomer - H4 obecny w osoczu pacjentów jest biologicznie aktywny. Dotychczas, jedynie Tuffal i wsp. [14] opisali metodę HPLC-MS/MS oznaczania izomerów CTM w osoczu zdrowych ochotników. Jednakże, ich badania nie obejmowały oznaczania tą metodą CLP oraz CLPM. Opracowana metoda jest, wg mojej wiedzy, pierwszą metodą HPLC-MS/MS oznaczania CLP, CLPM oraz izomerów H3 i H4 metabolitu tiolowego w osoczu w czasie jednego cyklu analitycznego (**publikacja 3**). Do stabilizacji izomerów CTM w próbkach krwi pacjentów stosowano 2-bromo-3-metoksyacetofenon (MPB), w związku z tym izomery H3 i H4 oznaczane były w postaci zderywatyzowanych pochodnych (MP-H3, MP-H4). Rozdział CLP, CLPM oraz MP-H3 i MP-H4 przeprowadzono na kolumnie Zorbax Eclipse Plus C18 z użyciem fazy ruchomej składającej się z acetonitrylu i wody z dodatkiem 0.1% kwasu mrówkowego. Izolację analitów z próbek osocza przeprowadzono przez strącenie białek acetonitrylem i przesączenie supernatantu za pomocą odpowiednich systemów filtracyjnych. Opracowaną metodę poddano walidacji. Liniowość metody potwierdzono w zakresach stężeń: 0,25 – 5 ng/ml dla CLP, 50 – 10000 ng/ml dla CLPM oraz 0,25 – 50 ng/ml dla MP-H3 i MP-H4. Metoda była odpowiednio precyzyjna i dokładna, o czym świadczą wartości współczynnika zmienności i błędu oznaczeń < 20%. Badane anality były trwałe w przygotowanych do oznaczeń próbkach stojących przez co najmniej 6h w autosamplerze oraz 24h w temperaturze pokojowej. Potwierdzono również ich trwałość w osoczu przechowywanym przez 3 miesiące w temperaturze -25°C oraz po trzykrotnym cyklu mrożenia i rozmrażania. Opracowane metody analityczne (**publikacje 1, 2 i 3**) zastosowano do oznaczenia poziomów CLP, CLPM i izomerów H3 i H4 metabolitu tiolowego w osoczu i moczu pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego.

Badania farmakokinetyki CLP i jego metabolitów przeprowadzono u pacjentów leczonych w Klinice Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych Szpitala Klinicznego im. H. Świącickiego w Poznaniu oraz w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń Szpitala Klinicznego im. Przemienienia Pańskiego w Poznaniu. W początkowym etapie badań wykorzystano metodę HPCE do oznaczenia CLPM w osoczu 14 pacjentów po dawce 300 mg CLP i 4 pacjentów przyjmujących 75 mg CLP. Natomiast, w dalszym etapie badań wykorzystano metodę HPLC-MS/MS do oznaczenia CLP, CLPM, H3 i H4 w próbkach od 41

pacjentów przyjmujących dawkę podtrzymującą 75 mg CLP oraz 3 pacjentów, którym podano dawkę 300 mg CLP. Na podstawie oznaczonych stężeń obliczono parametry farmakokinetyczne z użyciem programu WinNonlin. Uzyskane wyniki przedstawiono w **publikacji 4**. U pacjentów przyjmujących CLP w dawce 75 mg, maksymalne stężenie (C_{maks}) w osoczu wynosiło $2,0 \pm 2,0$ ng/ml, 2516 ± 1754 ng/ml, $5,3 \pm 5,5$ ng/ml i $7,1 \pm 6,3$ ng/ml, odpowiednio dla CLP, CLPM, H3 i H4. Natomiast u pacjentów, którym podano dawkę inicjującą 300 mg, C_{maks} było równe $4,5 \pm 3,4$ ng/ml, 8464 ± 3772 ng/ml, $8,5 \pm 1,7$ ng/ml i $17,9 \pm 20,4$ ng/ml, odpowiednio dla CLP, CLPM, H3 i H4. Parametry farmakokinetyczne wyznaczone dla CLP i CLPM były porównywalne z danymi literaturowymi [26,27]. Natomiast wartości C_{maks} i AUC izomerów H3 i H4 uzyskane w badanej grupie pacjentów były istotnie niższe niż wartości opisane w literaturze dla zdrowych ochotników. Może to wynikać z faktu, iż farmakokinetyka izomerów CTM u pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego i cukrzycą może różnić się od farmakokinetyki tego metabolitu u osób zdrowych. Potwierdzają to wyniki badań przeprowadzonych przez Sibbinga i wsp., którzy zaobserwowali niższy poziom CTM w postaci mieszaniny racemicznej u pacjentów, którym podano 600 mg CLP, w porównaniu do zdrowych ochotników [28]. Może to być związane ze zmniejszonym przepływem krwi do tkanek, co jest charakterystyczne w przypadku chorób układu sercowo-naczyniowego, i może wpływać zarówno na zmniejszone wchłanianie leku z przewodu pokarmowego, jak i upośledzony metabolizm leku w wątrobie.

W celu oceny farmakologicznego efektu działania leku, w próbkach krwi pacjentów oznaczono agregację płytek krwi w odpowiedzi na ADP, z wykorzystaniem aparatu Multiplate. Wyznacznikiem aktywności płytek u pacjentów leczonych CLP były pola pod krzywą agregacji (AUC_{agr}), których wartości mieściły się w zakresie 37 – 747 AU·min. Wg Bonello i wsp. [29], $AUC_{agr} > 468$ AU·min wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia powikłań zakrzepowych. W badanej grupie, u dwóch pacjentów oznaczono agregację płytek powyżej tej wartości, przy czym w przypadku jednego z pacjentów wysokiej wartości AUC_{agr} , równej 747 AU·min, towarzyszyła niska, w porównaniu do pozostałych pacjentów, wartość C_{max} aktywnego izomeru H4, równa 2,5 ng/ml. Wielkości te sugerują występowanie oporności na leczenie CLP u tego pacjenta, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia u niego powikłań zakrzepowych. Przeprowadzono analizę zależności między wyznaczonymi parametrami farmakokinetycznymi CLP i jego metabolitów a efektem farmakodynamicznym leku. Stwierdzono statystycznie istotną korelację pomiędzy C_{maks} aktywnego metabolitu H4 oraz agregacją płytek krwi ($p = 0,025$), a także tendencję do

korelacji pomiędzy $C_{\max}$ H3 a AUC_{agr} ($p=0,063$). Pozwala to przypuszczać, że zarówno $C_{\max}$ aktywnego farmakologicznie izomeru H4, jak i AUC_{agr} , mogą służyć jako markery odpowiedzi na terapię przeciwpłytkową z użyciem CLP.

W celu wyjaśnienia przyczyn dużej zmienności międzyosobniczej parametrów farmakokinetycznych zaobserwowanej w badanej grupie pacjentów, badano wpływ czynników genetycznych i pozagenetycznych na poziomy leku i jego metabolitów w osoczu. W **publikacji 5** porównano oznaczone stężenia CLP i jego metabolitów oraz obliczone na ich podstawie parametry farmakokinetyczne pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz pacjentów bez cukrzycy. U pacjentów z cukrzycą przyjmujących CLP w dawce 75 mg ($n = 16$), $C_{\max}$ w osoczu wynosiło $2,3 \pm 2,3$ ng/ml, 2339 ± 989 ng/ml, $4,6 \pm 4,8$ ng/ml i $6,4 \pm 4,8$ ng/ml, odpowiednio dla CLP, CLPM, H3 i H4. Natomiast u pacjentów bez cukrzycy ($n = 28$), $C_{\max}$ było równe $1,8 \pm 1,9$ ng/ml, 2662 ± 2090 ng/ml, $5,4 \pm 4,6$ ng/ml i $7,4 \pm 7,2$ ng/ml, odpowiednio dla CLP, CLPM, H3 i H4. Stwierdzono, że pacjenci z cukrzycą charakteryzowali się niższą ekspozycją na aktywny farmakologicznie izomer H4, o czym świadczyły niższe wartości stężeń i wynikające z nich niższe AUC_{0-t} ($8,7 \pm 7,0$ ng·h/ml w stosunku do $13,5 \pm 13,8$ ng·h/ml u pacjentów bez cukrzycy). Oba izomery, H3 i H4, były szybko eliminowane z krwi, w wyniku czego ich stężenia w osoczu u większości pacjentów znajdowały się poniżej granicy oznaczalności już po upływie 6h. Biologiczny okres półtrwania ($t_{0,5}$) izomerów CTM u pacjentów z cukrzycą był dłuższy (0,9 h i 1,2 h, odpowiednio dla izomeru H3 i H4) niż u pacjentów bez cukrzycy (0,7 h dla H3 i 0,8 h dla H4). Nieznaczące różnice w wartościach parametrów farmakokinetycznych, obserwowane między badanymi grupami chorych, mogą wynikać z obniżonej motoryki przewodu pokarmowego pacjentów z cukrzycą, co z kolei prowadzi do wolniejszego wchłaniania leku do krwiobiegu. Nie stwierdzono wpływu obecności cukrzycy na efekt farmakodynamiczny CLP, mierzony poprzez zahamowanie agregacji płytek krwi, stymulowanej przez ADP. Wyznaczona wartość AUC_{agr} była porównywalna w obu badanych grupach pacjentów. Przeprowadzone badania nie potwierdziły sugerowanego w literaturze związku pomiędzy cukrzycą a zwiększonym ryzykiem oporności na CLP. Jednak zauważalny na podstawie uzyskanych wyników trend w kierunku obniżonej ekspozycji na aktywny izomer H4 u pacjentów z cukrzycą wymaga dalszych badań na większej grupie chorych. Ponadto, określenie wpływu czynników genetycznych na farmakokinetykę i farmakodynamikę leku może być pomocne w identyfikacji przyczyn zmienności międzyosobniczej farmakokinetyki w obu grupach chorych.

Na dalszym etapie badań określono genotyp pacjentów w kierunku mutacji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za przemianę CLP do CTM (**publikacja 6**) oraz genów kodujących białka biorące udział w transporcie przez błonowy (**publikacja 7**). Biorąc pod uwagę częstość występowania poszczególnych polimorfizmów w populacji polskiej oraz ich możliwe znaczenie w rozwoju oporności na CLP, zdecydowano się na ocenę polimorfizmu genu kodującego CYP2C19 (allele *2 i *17) oraz glikoproteiny P (ABCB1) (3435C>T). Poszczególne genotypy określono na podstawie klasycznej metody PCR-RFLP (w przypadku polimorfizmu ABCB1 oraz CYP2C19*2) oraz allelo-specyficznego PCR (dla CYP2C19*17). Sekwencjonowanie losowo wybranych zamplifikowanych fragmentów DNA potwierdziło prawidłowość wyników uzyskanych metodami klasycznymi. Częstości występowania poszczególnych genotypów były zgodne z prawem Hardego-Weinberga i nie odbiegały od danych literaturowych obserwowanych w populacji polskiej przez innych autorów [18,30].

W **publikacji 6** dokonano analizy zależności farmakokinetyki i farmakodynamiki CLP od polimorfizmu genetycznego CYP2C19*2 i *17. W związku z tym, że allele *2 i *17 mają przeciwstawny wpływ na aktywność izoenzymu CYP2C19, sklasyfikowano pacjentów pod względem fenotypu w odniesieniu do statusu metabolicznego wg następującego schematu: ultraszybcy metabolizerzy (UM) – posiadający co najmniej jeden allel *17 i brak allelu *2, szybcy metabolizerzy (EM) – osoby z genotypem prawidłowym, pośredni metabolizerzy (IM) – posiadający jeden allel *2. Żaden z pacjentów nie posiadał dwóch zmutowanych alleli *2, świadczących o fenotypie wolnego metabolizera (PM). Natomiast allel *17 genu CYP2C19 był reprezentowany stosunkowo często w badanej populacji (*1 – 0,705, *17 – 0,295), przy czym częstość występowania homozygot *17/*17 (11,5%) była większa w porównaniu do danych pochodzących z innych populacji europejskich [31]. Zaobserwowano różnice w wartościach stężeń CLP oraz izomerów H3 i H4 pomiędzy pacjentami o różnym statusie metabolicznym. Wartość C_{maks} aktywnego farmakologicznie izomeru H4 u pośrednich metabolizerów była 3,1-krotnie niższa niż u ultraszybkich metabolizerów i 2,8-krotnie niższa niż u szybkich metabolizerów ($p=0.026$). Stwierdzono statystycznie istotne różnice w wartościach AUC_{0-24h} aktywnego izomeru H4 pomiędzy IM a EM i UM, przy czym AUC_{0-24h} było 3-krotnie niższe u IM w porównaniu do wartości uzyskanej dla UM i EM. Również C_{maks} leku macierzystego było znacząco niższe u IM w porównaniu do EM ($p=0.043$), podczas gdy stężenia nieaktywnego CLPM były podobne we wszystkich grupach pacjentów. Efekt farmakodynamiczny po podaniu CLP był mniejszy u pośrednich metabolizerów, o czym świadczyła znacznie wyższa wartość agregacji płytek krwi niż w pozostałych grupach. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że

obecność allelu *2 ma przeważający wpływ zarówno na odpowiedź farmakodynamiczną, jak i na farmakokinetykę aktywnego izomeru H4. Świadczą o tym statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą IM, a grupami EM i UM, przy braku takiej różnicy pomiędzy grupą szybkich i ultraszybkich metabolizerów. Potwierdzają to wyniki opublikowane przez Lewisa i wsp. [32], wg których to właśnie allel *2 a nie *17 jest czynnikiem determinującym zarówno niższe stężenia aktywnego metabolitu CLP, jak i agregację płytek krwi. Zbadano również wpływ czynników pozagenetycznych, takich jak cukrzyca, wiek > 65 lat, BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ czy stosowanie inhibitorów pompy protonowej, na farmakokinetykę i farmakodynamikę CLP i jego metabolitów. Analiza wieloczynnikowa wykazała znaczący wpływ allelu CYP2C19*2 ($p=0,029$) oraz BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ($p=0,034$) na agregację płytek krwi. Ponadto, efekt ten był bardziej zaznaczony w obecności pozostałych badanych czynników pozagenetycznych ($p=0,008$). Przeprowadzone badania wykazały, że CYP2C9*2 jest głównym czynnikiem determinującym odpowiedź przeciwplateletową na CLP.

W związku z tym, że polimorfizm genetyczny CYP2C9*2 nie wyjaśnia w pełni zmienności parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych obserwowanej w badanej grupie pacjentów, przeprowadzono również analizę zależności farmakokinetyki i farmakodynamiki CLP od polimorfizmu genetycznego ABCB1 (3435C>T), której wyniki przedstawiono w **publikacji 7**. Analizując wpływ genotypu pacjentów na wartości parametrów farmakokinetycznych CLP i jego metabolitów stwierdzono, że polimorfizm genetyczny glikoproteiny P miał znaczący wpływ na AUC_{0-t} leku macierzystego u pacjentów przyjmujących CLP w dawce 75 mg. Pacjenci posiadający genotyp T/T charakteryzowali się niemal czterokrotnie niższymi wartościami tego parametru niż osoby o genotypie C/C oraz dwukrotnie niższymi niż heterozygoty (C/T). Oznaczone wartości C_{max} CLP dla tej grupy pacjentów także były niższe niż w przypadku pozostałych wariantów genetycznych. Uzyskane zależności są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Tauberta i wsp. u pacjentów z chorobą wieńcową, którym podano CLP w dawkach 300 lub 600 mg przed wszczepieniem stentów [33]. Przypuszcza się, że u nosicieli dwóch zmutowanych alleli TT, wysoka ekspresja glikoproteiny P prowadzi do zwiększonego wchłaniania zwrotnego leku z krwi do światła jelit, co z kolei jest przyczyną mniejszej ekspozycji na lek. Jednak, pomimo znaczących różnic w stężeniach leku macierzystego w osoczu, zmienność obserwowanych stężeń jego metabolitów, zarówno CLPM, jak i izomerów H3 i H4, była niewielka. Nie stwierdzono również różnic pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi CLPM, H3 i H4 u osób z odmiennymi genotypami. Ponadto, efekt farmakodynamiczny CLP mierzony poprzez

zahamowanie agregacji płytek był porównywalny we wszystkich badanych grupach. Analiza piśmiennictwa dotyczącego zależności pomiędzy polimorfizmem genetycznym ABCB1 (3435C>T) a efektem farmakodynamicznym leku wykazała, że badana zależność może być związana z podaną dawką CLP. W badaniach przeprowadzonych przez Mega i wsp. [34], nie stwierdzono wpływu zmutowanych alleli na stopień zahamowania agregacji płytek po dawce 75 mg leku ale efekt ten był wyraźny po podaniu dawki 300 mg. Przeprowadzone przez mnie badania pozwoliły potwierdzić, że polimorfizm genetyczny ABCB1 (3435C>T) ma niewielki udział w rozwoju oporności na terapię przeciwplatekową CLP.

Podsumowanie

Określenie ryzyka wystąpienia oporności na CLP w grupie pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego stanowi niezwykle istotną kwestię w indywidualizacji leczenia przeciwplatekowego z użyciem CLP. Uzyskane w niniejszych badaniach wyniki wskazują na silną zależność pomiędzy efektem farmakologicznym CLP a farmakokinetyką jego aktywnego izomeru H4 oraz polimorfizmem genetycznym izoenzymu CYP2C19. W związku z tym kompleksowe badania obejmujące oznaczanie zarówno poziomów izomeru H4 w osoczu, AUC_{agr} będącego wyznacznikiem agregacji płytek krwi w odpowiedzi na ADP, jak i określenie genotypu w kierunku obecności allelu CYP2C19*2, może przyczynić się do racjonalizacji terapii przeciwplatekowej w tej grupie pacjentów i zwiększenia jej skuteczności.

Piśmiennictwo:

- [1]. Zambahari R, Kwok O-H, Javier S, Mak KH, Piyamitr S, Tri Ho HQ, i in. Clinical use of clopidogrel in acute coronary syndrome. *Int J Clin Pract.* 2007;61(3):473–81.
- [2]. Jarvis B, Simpson K. Clopidogrel: a review of its use in the prevention of atherothrombosis. *Drugs.* 2000;60(2):347–77.
- [3]. Hamm CW, Bassand J-P, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, i in. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2011;32(23):2999–3054.
- [4]. Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC), Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blömmström-Lundqvist C, i in. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2012;33(20):2569–619.
- [5]. Smith J Sidney C, Feldman TE, Hirshfeld J John W, Jacobs AK, Kern MJ, King I Spencer B, i in. ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary InterventionA Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(1):e1–121.
- [6]. De Miguel A, Ibanez B, Badimón JJ. Clinical implications of clopidogrel resistance. *Thromb Haemost.* 2008;100(2):196–203.
- [7]. Lev EI, Patel RT, Maresh KJ, Guthikonda S, Granada J, DeLao T, i in. Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the role of dual drug resistance. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(1):27–33.
- [8]. Müller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schönig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost.* 2003;89(5):783–7.
- [9]. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, i in. Genetic Determinants of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events. *N Engl J Med.* 2009;360(4):363–75.

- [10]. Ang L, Palakodeti V, Khalid A, Tsimikas S, Idrees Z, Tran P, i in. Elevated plasma fibrinogen and diabetes mellitus are associated with lower inhibition of platelet reactivity with clopidogrel. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(13):1052–9.
- [11]. Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA. Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. *J Clin Pharmacol*. 2010;50(2):126–42.
- [12]. Mani H, Toennes SW, Linnemann B, Urbanek DA, Schwonberg J, Kauert GF, i in. Determination of clopidogrel main metabolite in plasma: a useful tool for monitoring therapy? *Ther Drug Monit*. 2008;30(1):84–9.
- [13]. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, i in. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2010;38(1):92–9.
- [14]. Tuffal G, Roy S, Lavis M, Brasseur D, Schofield J, Delesque Touchard N, i in. An improved method for specific and quantitative determination of the clopidogrel active metabolite isomers in human plasma. *Thromb Haemost*. 2011;105(4):696–705.
- [15]. Shuldiner AR, O’Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, i in. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA*. 2009;302(8):849–57.
- [16]. Bouman HJ, Harmsze AM, van Werkum JW, Breet NJ, Bergmeijer TO, Ten Cate H, i in. Variability in on-treatment platelet reactivity explained by CYP2C19*2 genotype is modest in clopidogrel pretreated patients undergoing coronary stenting. *Heart Br Card Soc*. 2011;97(15):1239–44.
- [17]. Frère C, Cuisset T, Gaborit B, Alessi M-C, Hulot J-S. The CYP2C19*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost JTH*. 2009;7(8):1409–11.
- [18]. Spiewak M, Małek ŁA, Kostrzewa G, Kisiel B, Serafin A, Filipiak KJ, i in. Influence of C3435T multidrug resistance gene-1 (MDR-1) polymorphism on platelet reactivity and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Kardiol Pol*. 2009;67(8):827–34.
- [19]. Wang X, Shen C, Wang B, Huang X, Hu Z, Li J. Genetic polymorphisms of CYP2C19*2 and ABCB1 C3435T affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel in 401 patients with acute coronary syndrome. *Gene*. 2015;558(2):200–7.

- [20]. Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, i in. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet*. 2010;376(9749):1320–8.
- [21]. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, i in. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost*. 2000;84(5):891–6.
- [22]. Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny J-L, Aiach M, i in. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*. 2003;108(8):989–95.
- [23]. Takahashi M, Pang H, Kawabata K, Farid NA, Kurihara A. Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48(4):1219–24.
- [24]. Delavenne X, Basset T, Zufferey P, Malouk N, Laporte S, Mismetti P. Ultra-performance LC MS/MS method for quantification of clopidogrel active metabolite. *J Sep Sci*. 2010;33(13):1968–72.
- [25]. Peer CJ, Spencer SD, VanDenBerg DAH, Pacanowski MA, Horenstein RB, Figg WD. A sensitive and rapid ultra HPLC-MS/MS method for the simultaneous detection of clopidogrel and its derivatized active thiol metabolite in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012;880(1):132–9.
- [26]. Souri E, Jalalizadeh H, Kebriaee-Zadeh A, Shekarchi M, Dalvandi A. Validated HPLC method for determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr BMC*. 2006;20(12):1309–14.
- [27]. Hurbin F, Boulenc X, Daskalakis N, Farenc C, Taylor T, Bonneau D, i in. Clopidogrel pharmacodynamics and pharmacokinetics in the fed and fasted state: a randomized crossover study of healthy men. *J Clin Pharmacol*. 2012;52(10):1506–15.
- [28]. Sibbing D, Taubert D, Schömig A, Kastrati A, Von Beckerath N. Pharmacokinetics of clopidogrel in patients with stent thrombosis. *J Thromb Haemost JTH*. 2008;6(7):1230–2.
- [29]. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, i in. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(12):919–33.
- [30]. Gawrońska-Szklarz B, Siuda A, Kurzawski M, Bielicki D, Marlicz W, Drożdżik M. Effects of CYP2C19, MDR1, and interleukin 1-B gene variants on the eradication rate of

- Helicobacter pylori* infection by triple therapy with pantoprazole, amoxicillin, and metronidazole. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(7):681–7.
- [31]. Tiroch KA, Sibbing D, Koch W, Roosen-Runge T, Mehilli J, Schömig A, i in. Protective effect of the CYP2C19 *17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am Heart J*. 2010;160(3):506–12.
- [32]. Lewis JP, Stephens SH, Horenstein RB, O’Connell JR, Ryan K, Peer CJ, i in. The CYP2C19*17 variant is not independently associated with clopidogrel response. *J Thromb Haemost JTH*. 2013;11(9):1640–6.
- [33]. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, i in. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(5):486–501.
- [34]. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, i in. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON–TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *The Lancet*. 2010;376(9749):1312–9.

4. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Po wstąpieniu na studium doktoranckie w 2002 r. rozpoczęłam w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetiki UMP (wówczas Katedra i Zakład Chemii Fizycznej), badania dotyczące opracowania i walidacji metod HPLC i HPCE przeznaczonych do analizy farmakokinetycznej i farmakogenetycznej leków i ich metabolitów w płynach biologicznych u ludzi. Badania te kontynuowałam będąc od 2005 r. na etacie asystenta w powyższej Katedrze. Jednocześnie prowadziłam badania w ramach pracy doktorskiej, w których skupiałam się na opracowaniu metod HPCE przeznaczonych do analizy enancjomerów ketoprofenu oraz ibuprofenu i jego metabolitów w płynach biologicznych u ludzi, a także określeniu genotypu osób objętych badaniem w kierunku polimorfizmu enzymów cytochromu P450, biorących udział w metabolizmie powyższych leków. Uzyskane wyniki zawarłam w swojej rozprawie doktorskiej pt. „Wpływ polimorfizmu genetycznego izoenzymów CYP2C8 i CYP2C9 na farmakokinetykę enancjomerów pochodnych kwasu 2-arylopropionowego”, którą obroniłam w 2002 r., a jej promotorem był dr hab. Franciszek Główka. Praca doktorska była częściowo finansowana ze środków KBN w ramach grantu promotorskiego.

Wyniki badań prowadzonych przed uzyskaniem stopnia doktora opublikowałam w 6 artykułach z obszaru badań dotyczących bioanalizy enancjomerów leków przeciwwzapalnych pochodnych kwasu 2-arylopropionowego i 2-arylobutanowego (załącznik 4, pozycje II/A/1–6 wg spisu publikacji) oraz w 3 artykułach dotyczących bioanalizy innych substancji czynnych, takich jak endo- i egzogenne steroidy, leki przeciwnowotworowe oraz antybiotyki (załącznik 4, pozycje II/A/7-9 wg spisu publikacji). Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF publikacji z tego okresu wynosi 22.909 (punktacja MNiSW = 205). Powyższe wyniki były również prezentowane w postaci 32 plakatów na konferencjach naukowych (załącznik 4, pozycje III/A/1-32).

4.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora, równolegle do badań przedstawionych w ramach rozprawy habilitacyjnej, współuczestniczyłam/współuczestniczę w badaniach z zakresu:

- A. Analizy stężeń endogennych glikokortykosteroidów w płynach biologicznych u ludzi
- B. Farmakokinetyki treosulfanu u dzieci przechodzących leczenie mieloablacyjne przed przeszczepieniem komórek hematopoetycznych krwi

- C. Analizy stężeń mitotanu w osoczu krwi dzieci z nowotworem kory nadnerczy
- D. Kinetyki uwalniania chiralnych substancji czynnych z tabletek
- E. Analizy stężeń witamin w płynach biologicznych pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego
- F. Oceny wpływu interakcji CLP z innymi lekami i substancjami czynnymi wpływającymi na efekt terapeutyczny leku

A. Analiza stężeń endogennych glikokortykosteroidów w płynach biologicznych u ludzi

Ocena poziomów endogennych glikokortykosteroidów, takich jak kortyzol (E), kortyzon (F) i ich metabolity, może być przydatna do określenia aktywności enzymów biorących udział w regulacji gospodarki hormonalnej, odgrywającej dużą rolę w powstawaniu wielu chorób, takich jak nadciśnienie tętnicze, czy cukrzyca. W ramach powyższych badań, w których uczestniczyłam, opracowano metodę HPLC z detekcją fluorescencyjną przeznaczoną do oznaczania E, F oraz ich tetrahydro- i allo-tetrahydro- pochodnych w osoczu i moczu. Anality ekstrahowano z matrycy biologicznej za pomocą dichlorometanu, a następnie poddawano derywatyzacji w celu uzyskania pochodnych wykazujących zdolność fluorescencji. Rozdział chromatograficzny analitów przeprowadzono na kolumnie monolitycznej. Opracowaną metodę poddano walidacji. Wykazano, że metoda jest odpowiednio selektywna, precyzyjna i dokładna i spełnia kryteria walidacji dla metod bioanalitycznych. Użyteczność opracowanej metody potwierdzono w badaniach dotyczących analizy endogennych glikokortykosteroidów u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w celu oceny aktywności enzymu 11β -HSD2, biorącego udział w przemianie E do nieaktywnego F (załącznik 4, pozycja II/A/10 wg spisu publikacji).

Opracowaną metodę zastosowano również do oceny poziomów E i F w osoczu pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego i współistniejącą cukrzycą typu 2. Stwierdzono wyższe poziomy F w osoczu pacjentów z cukrzycą w porównaniu do pacjentów bez cukrzycy. Ponadto, pacjenci z cukrzycą posiadali niższe poziomy E i znacząco wyższe ilości wolnego F wyeliminowanego z moczem (UFF). Analiza statystyczna wykazała znacząco wyższe wartości F/E w osoczu pacjentów z cukrzycą w porównaniu do pacjentów bez cukrzycy. Stwierdzono również istnienie dodatniej korelacji między poziomem glikemii a UFF i UFE. Wyniki powyższych badań świadczą o zaburzonej równowadze endogennych glikokortykosteroidów na skutek zwiększonej aktywności enzymu 11β -HSD1 u osób z cukrzycą typu 2 (załącznik 4, pozycja III/A/43, wg spisu doniesień zjazdowych).

B. Badania farmakokinetyki treosulfanu u dzieci przechodzących leczenie mieloablacyjne przed przeszczepieniem komórek hematopoetycznych krwi

Treosulfan jest lekiem przeciwnowotworowym stosowanym u pacjentów dorosłych głównie w leczeniu nowotworów litych, takich jak rak jajnika. U dzieci wysokie dawki treosulfanu stosuje się w ramach terapii mieloablacyjnej przed przeszczepieniem komórek hematopoetycznych. W związku z ograniczoną dostępnością informacji na temat farmakokinetyki treosulfanu u dzieci, celem powyższych badań, w których współuczestniczyłam, była ocena parametrów farmakokinetycznych leku u pacjentów pediatrycznych poddawanych terapii treosulfanem. Badania przeprowadzono we współpracy z Kliniką Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej Szpitala Klinicznego UMP. Pacjentom w wieku 2 – 15 lat podawano wysokie dawki ($10\text{--}14\text{ g/m}^2$) treosulfanu w postaci 2h wlewu dożylnego. Do oznaczenia poziomów leku w osoczu i moczu wykorzystano opracowaną wcześniej metodę HPLC z detekcją refraktometryczną. Przeprowadzone badania wykazały, że zmiany stężenia treosulfanu w osoczu w czasie zachodzą zgodnie z modelem 2-kompartmentowym. Potwierdzono liniową zależność między wartościami C_{maks} i AUC leku a podaną dawką. Jednocześnie zaobserwowano dużą zmienność międzyosobniczą parametrów farmakokinetycznych, co sugeruje przydatność analizy profilu farmakokinetycznego indywidualnych pacjentów w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia wczesnych i późnych objawów toksyczności narządowej (załącznik 4, pozycja II/B/2 wg spisu publikacji).

C. Analiza stężeń mitotanu w osoczu krwi dzieci z nowotworem kory nadnerczy

Przedmiotem badań prowadzonych we współpracy z Kliniką Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej Szpitala Klinicznego UMP, była ocena stężeń mitotanu w ramach terapeutycznego monitorowania leku u pacjentów pediatrycznych z nowotworem kory nadnerczy. Wg danych literaturowych, ze względu na dużą zmienność międzyosobniczą parametrów farmakokinetycznych ($t_{0,5} = 18 - 159$ dni) oraz kumulację leku w tkance tłuszczowej, monitorowanie stężeń mitotanu w osoczu jest niezbędne do zapewnienia bezpiecznej i skutecznej terapii tym lekiem. W ramach przeprowadzonych badań opracowano metodę HPLC z detekcją UV przeznaczoną do oznaczenia stężeń mitotanu w osoczu krwi. Rozdział mitotanu oraz wzorca wewnętrznego – klopidoogrelu w próbkach osocza po uprzednim strąceniu białek z użyciem acetonitrylu, przeprowadzono w odwróconym układzie faz. Opracowaną metodę poddano walidacji obejmującej wyznaczenie wykrywalności,

oznaczalności, liniowości oraz precyzji i dokładności. Stwierdzono, że metoda ta spełnia kryteria walidacyjne dla metod analitycznych przeznaczonych do oznaczania leków w płynach biologicznych. W związku z tym może być stosowana do terapeutycznego monitorowania mitotanu w osoczu krwi pacjentów z rakiem kory nadnerczy (załącznik 4, pozycja II/B/6 wg spisu publikacji).

Opracowaną metodę z powodzeniem stosowano do oznaczeń stężeń leku w osoczu pacjenta pediatrycznego z rakiem kory nadnerczy poddawanego przez 12 miesięcy terapii mitotanem. Analiza stężeń umożliwiła lekarzom prowadzącym terapię modyfikację dawkowania w celu osiągnięcia skutecznego i bezpiecznego efektu leczenia.

D. Kinetyka uwalniania chiralnych substancji czynnych z tabletek

Przedmiotem tego badania była ocena parametrów kinetycznych uwalniania leków chiralnych z grupy NLPZ (ibuprofen), blokerów kanałów wapniowych (amlodypina) oraz leków przeciwplatek (klopidogrel) z tabletek. Badania uwalniania przeprowadzone zostały we współpracy z Katedrą i Zakładem Technologii Postaci Leku UMP. Do oznaczania enancjomerów badanych związków w odpowiednich płynach do uwalniania zastosowano opracowane wcześniej metody HPCE z detekcją UV, które umożliwiły, z zastosowaniem określonych selektorów chiralnych, szybki i efektywny rozdział enancjomerów.

W przypadku leków występujących w tabletkach w postaci mieszanin racemicznych, takich jak ibuprofen i amlodypina, celem badania była ocena różnic pomiędzy parametrami kinetycznymi uwalniania (stała szybkości uwalniania - k , czas połowicznego uwalniania – $t_{0,5}$) poszczególnych enancjomerów tych leków. Wiadomo bowiem, że zarówno w przypadku mieszaniny racemicznej ibuprofenu jak i amlodypiny, tylko jeden z enancjomerów jest farmakologicznie aktywny ((+)-S dla ibuprofenu i (-)-S dla amlodypiny). W związku z tym różnice w szybkości uwalniania enancjomerów mogłyby mieć wpływ na działanie leku. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono jednak, że uwalnianie enancjomerów dla każdego z leków podawanych w tabletkach w postaci mieszanin racemicznych zachodzi z porównywalną szybkością i spełnia farmakopealne kryteria akceptacji dla uwalniania (załącznik 4, pozycja III/A/37, wg spisu doniesień zjazdowych).

W przypadku CLP, celem badania była ocena parametrów kinetycznych uwalniania leku z 10 preparatów najczęściej stosowanych w terapii przeciwplatekowej w Polsce. W związku z występującą w przebiegu leczenia u wielu pacjentów opornością na CLP oraz wciąż rosnącą liczbą preparatów zawierających ten lek w postaci różnych połączeń chemicznych, porównanie preparatów CLP i ocena ich jakości jest przydatna do zapewnienia skutecznej

i bezpiecznej terapii. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wszystkie preparaty spełniły kryteria akceptacji dotyczące uwalniania. Przeprowadzone testy statystyczne wykazały jednak istotne różnice dotyczące parametrów kinetycznych uwalniania (k , $t_{0,5}$) leku między badanymi preparatami, które wynikały z obecności substancji czynnej w postaci odmiennych soli. Uwalnianie CLP zachodziło dwa razy szybciej z preparatu zawierającego bezyłan CLP, w porównaniu do preparatów zawierających lek w postaci wodorosiarczanu. Występujące różnice w szybkości uwalniania CLP z różnych preparatów mogą mieć wpływ na szybkość wystąpienia efektu leczniczego i w konsekwencji na skuteczność terapii przeciwpłytkowej (załącznik 4, pozycja II/A/13 wg spisu publikacji).

E. Analiza stężeń witamin w płynach biologicznych pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego

Przedmiotem prowadzonych obecnie badań jest ocena stężeń witamin A, D, E oraz β -karotenu u pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego. Wg danych literaturowych istnieje związek między stężeniem aktywnej formy witaminy D, 25-hydroksy-D₃, a ryzykiem rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, oraz między poziomami witamin antyoksydacyjnych (A, E) a powstawaniem blaszki miażdżycowej. Ocena stężeń wspomnianych wyżej witamin w płynach biologicznych badanej grupy pacjentów może być pomocna dla lekarzy prowadzących terapię w podjęciu decyzji o konieczności suplementacji witaminami pacjentów wykazujących ich niedobory, w celu zapewnienia skutecznego leczenia oraz zahamowania progresji chorób układu sercowo-naczyniowego. Przedmiotem badań, oprócz analizy stężeń witamin w osoczu badanej grupy pacjentów, jest również analiza wywiadów żywieniowych mająca na celu korelację oznaczonych stężeń witamin ze stopniem ich spożycia i stanem odżywienia. Badania te prowadzone są we współpracy z Katedrą i Zakładem Bromatologii UMP, w ramach pracy doktorskiej, w której pełnię rolę promotora pomocniczego.

Ze względu na ograniczoną trwałość badanych związków oraz ich silnie lipofilowy charakter, konieczne było opracowanie odpowiednich metod analitycznych, pozwalających na szybki i selektywny rozdział analitów w próbkach biologicznych. W celu określenia optymalnych warunków rozdziału i przygotowania próbek do analizy, podsumowano dostępne wyniki badań dotyczących metod chromatograficznych przeznaczonych do oznaczania witamin w płynach biologicznych (załącznik 4, pozycja II/A/14 wg spisu publikacji). Stwierdzono, że najbardziej optymalną metodą izolacji witamin rozpuszczalnych w tłuszczach z próbek jest

ekstrakcja ciecz-ciecz za pomocą heksanu. Natomiast, do rozdziału analitów najbardziej odpowiednie wydają się być metody HPLC w odwróconym układzie faz.

Następnym krokiem było opracowanie i walidacja metod HPLC z detekcją UV umożliwiających rozdział witamin A, E, β -karotenu oraz pochodnych witaminy D: 25-hydroksy-D₂ i 25-hydroksy-D₃ w osoczu. Ze względu na znaczne różnice w lipofilności badanych związków, a także 1000-krotne różnice między stężeniami pochodnych witaminy D a stężeniami pozostałych analitów w osoczu pacjentów, konieczne było opracowanie dwóch odrębnych metod HPLC-UV. Jedna z nich umożliwiała oznaczanie niskich stężeń (rzędu ng/ml) mniej lipofilnych pochodnych witaminy D: 25-hydroksy-D₂ i 25-hydroksy-D₃, natomiast druga – wysokich stężeń (rzędu μ g/ml) silnie lipofilnych witamin A i E oraz β -karotenu. Opracowane metody zastosowano do oznaczenia stężeń powyższych związków w próbkach uzyskanych od pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego. Dotychczas analizie poddano próbki uzyskane od 136 pacjentów. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono znaczne niedobory pochodnych witaminy D (u 60% pacjentów), witaminy E (u 50% pacjentów) oraz β -karotenu (u 60% pacjentów).

Obecnie zajmuję się opracowaniem i walidacją metody HPLC-MS/MS, umożliwiającej rozdział wszystkich analizowanych witamin w czasie jednego cyklu analitycznego.

F. Ocena wpływu interakcji CLP z innymi lekami i substancjami czynnymi wpływającymi na efekt terapeutyczny leku

Przedmiotem tych badań jest ocena wpływu interakcji między CLP i statynami o odmiennych właściwościach farmakokinetycznych (atorwastatyną ($t_{0,5}$ = 7 – 14 h) oraz rosuwastatyną ($t_{0,5}$ = 20 – 30 h)) na farmakokinetykę i farmakodynamikę CLP i jego aktywnego metabolitu u pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego poddawanych zabiegowi angiografii/angioplastyki tętnic wieńcowych. Założenia projektu związane są ze zjawiskiem występowania oporności na CLP, która dotyczy ok. 30% pacjentów, i może być wynikiem interakcji z lekami metabolizowanymi przez te same co CLP izoenzymy cytochromu P450. Proponowane badania pozwolą ocenić skuteczność terapii przeciwplatekowej CLP, stosowanym jednocześnie z lipofilową atorwastatyną, metabolizowaną przez izoenzym CYP3A4, który bierze również udział w aktywacji metabolicznej CLP, lub z hydrofilową rosuwastatyną, metabolizowaną jedynie w niewielkim stopniu przez izoenzym CYP2C9. Dodatkowo w ramach projektu przeprowadzona zostanie analiza obejmująca ocenę stężeń kreatyniny w surowicy pacjentów objętych badaniem. Jest to związane ze zwiększonym ryzykiem uszkodzenia nerek wywołanym kontrastem jodowym

stosowanym podczas zabiegu angiografii/angioplastyki, co z kolei może mieć wpływ na farmakokinetykę CLP i jego metabolitów, które w 50% eliminowane są drogą nerkową. Badania wykonywane są w ramach projektu OPUS finansowanego przez NCN we współpracy z Oddziałem Kardiologii Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia w Poznaniu. Efekty wzajemnego oddziaływania leków stosowanych jednocześnie w ramach terapii przeciwmiażdżycowej oceniane są na podstawie analizy poziomów CLP i jego aktywnego metabolitu tiolowego oraz statyn i ich pochodnych w osoczu oraz wyznaczonych na ich podstawie parametrów farmakokinetycznych przed rozpoczęciem terapii statynami i po 6 miesiącach jej trwania. Oceniany jest również efekt farmakodynamiczny CLP za pomocą pomiaru zahamowania agregacji płytek krwi po podaniu leku. Dodatkowo badanie obejmuje określenie polimorfizmu genetycznego enzymów cytochromu P450 (CYP3A4, CYP2C19), które biorą udział w metabolizmie CLP i statyn. Powyższe badania pozwolą odpowiedzieć na pytanie, czy stosowanie statyn, metabolizowanych przez te same co CLP enzymy, u pacjentów leczonych CLP, wpływa na efekt przeciwpłytkowy leku. Wyniki dotychczasowych badań przedstawiono w publikacji (załącznik 4, pozycja II/A/15 wg spisu publikacji).

W celu poszerzenia badań o interakcje CLP z innymi substancjami czynnymi mogącymi wpływać na efekt terapeutyczny leku, nawiązano współpracę z Kliniką Kardiologii CMKP w Szpitalu Grochowskim w Warszawie, w której realizowany jest projekt dotyczący wpływu zaprzestania palenia papierosów na zahamowanie agregacji płytek u chorych leczonych CLP. Założenia tego badania związane są z zaobserwowanym wyższym poziomem zahamowania agregacji płytek krwi i wynikającym z tego lepszym efektem klinicznym w grupie aktywnych palaczy w trakcie leczenia CLP w porównaniu z pacjentami niepalącymi. Może to być związane z indukcją przez substancje czynne obecne w dymie papierosowym enzymu CYP1A2, który uczestniczy w przemianie CLP do aktywnego metabolitu. Mój udział w powyższym projekcie polega na oznaczeniach stężeń CLP i jego metabolitów w próbkach krwi pobranych od palących i niepalących leczonych kłopidogrelem, wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych tych analitów oraz ich porównanie między dwoma badanymi grupami. Ma to na celu określenie różnic między farmakokinetyką CLP i jego metabolitów u osób palących i niepalących poddawanych terapii przeciwpłytkowej oraz jej korelację z efektem farmakodynamicznym leku, mierzonym przez zahamowanie agregacji płytek krwi.

Podsumowanie

W skład mojego łącznego dorobku naukowego wchodzi 23 publikacje oryginalne, 7 publikacji poglądowych oraz 2 rozdziały w monografii. Jestem także współautorem 4 rozdziałów w skryptach z chemii fizycznej dla studentów II roku farmacji i analityki medycznej oraz II r. farmacji programu anglojęzycznego Pharm.D. Sumaryczny wskaźnik oddziaływania IF tych prac wynosi **53,388** wg listy Journal Citation Reports (JCR), a łączna punktacja MNiSW = **587** pkt. Według bazy Web of Science liczba cytowań moich publikacji wynosi 219, a indeks Hirscha 11 (załącznik 7). Jestem współautorem 50 komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych (25) i międzynarodowych (25) (załącznik 4).

Wyniki badań stanowiących przedmiot postępowania habilitacyjnego opublikowałam w cyklu 10 prac (7 oryginalnych i 3 poglądowe), o łącznym wskaźniku IF = **18.656** (MNiSW = **221**) oraz prezentowałam w formie 7 plakatów na konferencjach naukowych.

W ramach prowadzonych badań nawiązałam współpracę z licznymi jednostkami klinicznymi UMP oraz z Kliniką Kardiologii CMKP w Szpitalu Grochowskim w Warszawie.

Brałam udział w realizacji 4 projektów badawczych finansowanych przez KBN/NCN (w dwóch jako kierownik projektu), oraz w 5 finansowanych w ramach badań własnych UMP jako kierownik.

Za osiągnięcia naukowe otrzymałam 1 indywidualną i 3 zespołowe Nagrody Rektora oraz 3 zespołowe Nagrody Ministra Zdrowia. Szczegółowe informacje obejmujące całokształt dorobku naukowego i dydaktycznego znajdują się w załączniku 4.

Marta Karasiewicz-Hudec