



Łódź, dn. 21.10.2020 r.

Dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach, prof. uczelni  
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka  
ul Stefanowskiego 4/10  
90-924 Łódź

### Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Niny Wolskiej

#### „Adenosine receptor agonists and P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists exhibit combined inhibitory effect on blood platelet function”

wykonanej w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem dr hab. Marcina Różalskiego, profesora uczelni oraz dr Izabeli Piechockiej (Instytut Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk).

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Prodziekana ds. Nauki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z dnia 30 września 2020 r.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl trzech monotematycznych publikacji naukowych, w tym dwóch prac oryginalnych, opublikowanych w 2019 i 2020 roku w zagranicznych czasopismach naukowych ujętych w zbiorach *Journal Citation Report* (JCR). W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. **Wolska N.**, Rozalski, M. (2019). Blood Platelet Adenosine Receptors as Potential Targets for Anti-Platelet Therapy. *Int J Mol Sci*, 20(21):5474. DOI: 10.3390/ijms20215475. MNiSW - 140, IF<sub>2019</sub> = 4.556
2. **Wolska N.**, Boncler M., Polak D., Wzorek J., Przygodzki T., Gapinska M., Watala C., Rozalski M. (2019). Adenosine Receptor Agonists Exhibit Anti-Platelet Effects and the Potential to Overcome Resistance to P2Y<sub>12</sub> Receptor Antagonists. *Molecules*, 25(1):130. DOI: 10.3390/molecules25010130 MNiSW - 100, IF<sub>2019</sub> = 3.267
3. **Wolska N.**, Kassassir H., Luzak B., Watala C., Rozalski M. (2020). Adenosine Receptor Agonists Increase the Inhibition of Platelet Function by P2Y<sub>12</sub>

Antagonists in a cAMP- and Calcium-Dependent Manner. *Pharmaceuticals*,  
13(8):E177. DOI: 10.3390/ph13080177  
MNiSW - 100, IF<sub>2019</sub> = 4.286

Całkowity współczynnik wpływu *Impact Factor* dla cyklu publikacji będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora wynosi 12.109 i odpowiada 340 punktom według kryteriów MNiSW. W wyżej wymienionych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a jej udział w powstaniu tych prac wynosi od 40% do 80%, co wskazuje, że pełniła Ona w tych badaniach kluczową rolę. Doktorantka złożyła oświadczenia i w każdym z nich przedstawiła, że Jej wkład w powstaniu artykułów polegał na udziale w planowaniu eksperymentów oraz ich prowadzeniu, analizie danych, przygotowaniu i edycji manuskryptu, a także przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Współautorzy poszczególnych prac złożyli także oświadczenia, w których przedstawili swój wkład w ich powstanie oraz wyrazili zgodę na wykorzystanie publikacji przez Panią Ninę Wolską w jej pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska, której podstawą są wyżej wymienione artykuły naukowe została zatytułowana „Adenosine receptor agonists and P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists exhibit combined inhibitory effect on blood platelet function”. Anglojęzyczny komentarz do rozprawy obejmuje łącznie 16 stron maszynopisu, w którym Doktorantka wyjaśnia problem badawczy opisany w publikacjach oraz podsumowuje najważniejsze wnioski. Komentarz zawiera indeks stosowanych skrótów, wstęp, wyraźnie zaznaczony cel pracy, materiały i metody, wyniki, podsumowanie w postaci konkluzji oraz wykaz stosowanej bibliografii. Na końcu zostały dołączone trzy publikacje, będące podstawą o ubieganie się o stopień doktora wraz z oświadczeniami współautorów. Na moją prośbę Pani Wolska dołączyła również Figure S1, której brak w artykule „Adenosine Receptor Agonists Exhibit Anti-Platelet Effects and the Potential to Overcome Resistance to P2Y<sub>12</sub> Receptor Antagonists” opublikowanym w czasopiśmie *Molecules*.

Rozprawa doktorska Pani Niny Wolskiej stanowi samodzielną i wyodrębnioną część pracy zbiorowej i wykazuje indywidualny wkład kandydata, odpowiadający warunkom określonym w art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wobec powyższego wszystkie kryteria niezbędne do przedstawienia rozprawy doktorskiej zostały spełnione pod względem formalnym.

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jej autorka, mgr inż. Nina Wolska podejmuje zadanie ewaluacji połączonego działania agonistów receptorów adenozynowych i antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub> w kierunku ich zastosowania jako czynników hamujących funkcję płytek krwi. Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego pacjenci ze zdiagnozowaną chorobą wieńcową powinni otrzymać między innymi podwójną terapię przeciwplateletową w postaci antagonisty płytkowego receptora P2Y<sub>12</sub> dla difosforanu adenozyny (ADP) w połączeniu z kwasem

acetylosalicylowym. U podstaw stosowania podwójnej terapii przeciwplatekowej w terapii powikłań miażdżycowo-zakrzepowych leży kluczowa rola płytek krwi. Jednym z mechanizmów prowadzących do ich aktywacji jest pobudzenie purynergicznych receptorów P2Y<sub>1</sub> i P2Y<sub>12</sub>. Naturalnym ligandem obydwu receptorów jest ADP. Aktywacja receptora P2Y<sub>1</sub> prowadzi do szybkiej zmiany kształtu płytek i odwracalnej agregacji. Jednocześnie aktywacja P2Y<sub>12</sub> prowadzi do powolnej agregacji płytek krwi. Ze względu na fakt, że receptor P2Y<sub>12</sub> reguluje wzrost zakrzepu i jego stabilność, a także ulega bardziej selektywnej ekspresji w tkankach organizmu, to on jest celem terapii przeciwzakrzepowej.

Do grupy antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub> należą pochodne tienopirydyny (dawniej stosowana tiklopidyna, obecnie klopidoogrel i prasugrel) oraz tikagrelor, który jest analogiem nukleozydowym. Podawanie jednego z leków należących do tienopirydyn prowadzi do nieodwracalnej inhibicji płytek krwi na skutek kowalencyjnego wiązania substancji czynnej leku z miejscem aktywnym receptora P2Y<sub>12</sub> i tworzenia mostka disiarczkowego z jedną lub dwiema resztami cysteinowymi. Czas ich działania jest ściśle związany z długością życia płytek krwi. Tikagrelor z kolei jest odwracalnym antagonistą tego receptora i wiąże się w innym miejscu struktury receptora i blokuje go w sposób niekompetycyjny.

Podwójna terapia przeciwplatekowa w postaci antagonisty receptora P2Y<sub>12</sub> w połączeniu z kwasem acetylosalicylowym należy do jednej z najlepiej przebadanych metod leczenia w obszarze medycyny sercowo-naczyniowej. Na podstawie oszacowania populacyjnego z 2015 roku odpowiednio u ok. 1 400 000 i 2 200 000 pacjentów rocznie mogą istnieć wskazania do jej stosowania po przebyciu interwencji wieńcowej lub zawału serca. Ciągła terapia przeciwplatekowa wiąże się jednak ze zwiększonym ryzykiem krwawienia, przy czym ryzyko krwawienia wykazuje proporcjonalny związek z czasem jej trwania. Poza tym istnieje duża zmienność osobnicza odpowiedzi na leczenie, a w skrajnych przypadkach brak odpowiedzi na zastosowaną terapię - oporność na leki przeciwplatekowe.

Nową strategią obejścia oporności na leki przeciwplatekowe może być zastosowanie ligandów dwóch różnych grup receptorów purynergicznych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Niny Wolskiej doskonale wpisuje się w ten niezwykle interesujący nurt badań. Nowatorskie podejście testowane w ramach rozprawy doktorskiej polegało na jednoczesnym zastosowaniu antagonisty receptora P2Y<sub>12</sub> oraz agonisty receptorów adenozyliny (A<sub>2A</sub> i A<sub>2B</sub>). Zadania badawcze zaplanowane przez Doktorantkę zostały w pełni zrealizowane. Do osiągnięcia założonych celów Pani Nina Wolska zastosowała podejście oparte na wykorzystaniu pełnej krwi ludzkiej pobranej od zdrowych ochotników, jak również izolowanych płytek krwi. W pracy wykorzystano klasyczne techniki biologii molekularnej oraz testy funkcjonalne, takie jak analizy agregometryczne, cytometria przepływowa, badanie tworzenia skrzepów w warunkach przepływu, pomiar przeżywalności płytek krwi, analiza mobilizacji jonów wapnia i

poziomu cAMP, a także identyfikacja populacji płytek aktywowanych (z użyciem specyficznych przeciwciał dla powierzchniowych receptorów zlokalizowanych na płytkach krwi, takich jak P-selektyna, czy receptor GP IIb/IIIa), wiązanie fibrynogenu, lub użycie testu VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*). Dobór w/w modeli i testów jest niezwykle trafny.

Doskonałym wstępem teoretycznym dysertacji jest praca przeglądowa opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* dotycząca roli ligandów płytkowych receptorów adenozyliny. Z kolei w oryginalnych pracach eksperymentalnych Pani Nina Wolska oceniała potencjał przeciwpłytkowy trzech (regadenozon, LUF 5835 and NECA) oraz dziewięciu (PSB0777, CGS21680, MRE0094, 2-chloroadenozylna, CV1808, HE-NECA, NECA, regadenozon i UK423,097) agonistów receptorów adenozyliny w połączeniu ze stosowanymi w klinice antagonistami receptora P2Y<sub>12</sub> (kangrelor i metabolit R-138727 prasugrelu). Dwie prace doświadczalne ukazały się odpowiednio w czasopismach *Molecules* i *Pharmaceuticals*. Z niezwykle cennych, z mojego punktu widzenia, obserwacji wynikających z prowadzonych prac należy wymienić m.in. wykazanie, że agoniści receptorów adenozyliny wykazują znaczną aktywność przeciwpłytkową w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (w warunkach przepływu) mimo braku takiej aktywności w warunkach statycznych. Co więcej, badani agoniści, pomimo posiadania różnych profili selektywności, znacząco wzmacnili działanie przeciwpłytkowe antagonistów P2Y<sub>12</sub>. Co ważne, ich działanie hamujące w połączeniu z antagonistami P2Y<sub>12</sub> było podobne u pacjentów z wysoką i niską odpowiedzią na antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub>. Również analizy aktywowanych szlaków sygnałowych wskazują, że zastosowanie podwójnego nacelowania na receptory purynergiczne wykazuje silniejsze efekty niż terapia pojedyncza. Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę jasno wskazują, że połączenie leków przeciwpłytkowych działających poprzez receptory adenozynowe i receptor P2Y<sub>12</sub> stanowi obiecującą alternatywę dla istniejącej terapii przeciwzakrzepowej i może być zastosowane nawet u pacjentów wykazujących słabą odpowiedź na obecność antagonistów P2Y<sub>12</sub>.

Podsumowując, nakreślone na początku cele pracy, które stanowią złożone problemy badawcze zostały zrealizowane w sposób skrupulatny i przemyślany. Nie oznacza to jednak, że tematyka badawcza została w tym obszarze wyczerpana. Wręcz przeciwnie - otwiera nowe pola do dyskusji, a otrzymane wyniki stanowią punkt wyjścia do dalszych badań. Dlatego prosiłabym Doktorantkę o kilka zdań na temat możliwości podjęcia kolejnych kroków badawczych w oparciu o uzyskane dotychczas wyniki.

Ponadto, podczas lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się pytania, a niektóre z nich wymieniam poniżej:

1. Na stronie 6 znajdujemy informację: "Adenosine receptors (AR) constitute a subfamily of highly-conserved G-protein coupled receptors expressed intracellularly and

on the membranes of most types of human cells and performing various physiological functions.”

Czy Autorka może skomentować fakt wewnątrzkomórkowej ekspresji receptorów adenozytowych?

2. Na stronie 7 widnieje zdanie “The half-life of adenosine in circulation is extremely short (approximately 1 s, no longer than 10 s), as in the bloodstream it is rapidly converted to inosine by adenosine deaminases, and subsequently phosphorylated to 5'-AMP, or alternatively eliminated due to the activity of nucleoside transporters”.

Na jakiej drodze inozyna może być fosforylowana do AMP?

3. Sugerowałabym również stosowanie ujednoczonej nomenklatury receptorów adenozytowych (w tekście komentarza można spotkać nazwy A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> lub A<sub>2a</sub> i A<sub>2b</sub>).

4. Czy kiedykolwiek Doktorantka oceniała przeżywalność płytek krwi po jednoczesnej inkubacji z ligandami receptorów P1 i P2Y<sub>12</sub>?

Podsumowując, przedstawioną do recenzji dysertację oceniam bardzo wysoko. Recenzja opublikowanych prac jest zresztą z założenia zadaniem znacznie łatwiejszym dla recenzenta. Praca Pani Wolskiej została bowiem już wcześniej wysoko oceniona i zweryfikowana przez co najmniej dwóch recenzentów czasopism *International Journal of Molecular Sciences*, *Molecules* i *Pharmaceuticals*. Stwierdzam też, że rozprawa mgr inż. Niny Wolskiej spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Z pełnym przekonaniem wnioskuję więc do Rady Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Niny Wolskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie chciałabym podkreślić, iż dorobek naukowy Pani mgr inż. Niny Wolskiej jest bardzo wysoki, zwłaszcza jak na ten etap rozwoju kariery naukowej. Oprócz trzech prac stanowiących cykl publikacji będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora, Doktorantka jest współautorką siedmiu artykułów w czasopismach ujętych w zbiorach *Journal Citation Report (Biochemical and Biophysical Research Communication, Vascular Pharmacology, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Clinical and Experimental Rheumatology*, dwie prace w *Arthritis & Rheumatology, The Annals of the Rheumatic Diseases*). Elementem wyróżniającym dorobek naukowy Pani Wolskiej jest bardzo dobra ranga czasopism, w których ukazały się artykuły Jej współautorstwa, co znajduje odzwierciedlenie w sumarycznej wartości współczynnika Impact Factor (48.635) oraz punktacji według kryteriów MNIŚW (1310 punktów). Prace Pani Wolskiej były cytowane 75 razy, a indeks Hirsch wynosi 5 (dane na dzień 21 października 2020 r.). Na uwagę zasługuje także odbyty staż zagraniczny, co należy podkreślić jako niezwykle ważny czynnik dla rozwoju młodej kadry naukowej. Staż zaowocował ukazaniem się kilku publikacji oraz udział w kilku projektach badawczych. Pani Wolska była kierownikiem projektu w konkursie ETIUDA finansowanym przez

Narodowe Centrum Nauki oraz wykonawcą w projekcie “Dual purinoreceptor – dependent approach to prevent thromboembolic events dependent on blood platelets and endothelium – approaches based on animal and cellular models” w Programie TEAM, będącym Projektem grantowym Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, jak również stypendystką projektów finansowanych przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

Z tego względu oraz z uwagi na znaczący wkład w poszerzenie i weryfikację dotychczasowej wiedzy naukowej, wnioskuję by wyróżnić recenzowaną pracę doktorską, jeżeli oczywiście zostaną spełnione wszystkie kryteria wymagane przez Radę Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

*Edyta Gembasiewicz-Dammach*