



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
KATEDRA NEUROLOGII

ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. 61 869 15 35 fax 61 869 16 97
e-mail: neurologia@spsk2.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Niny Wolskiej,

pt. *"Adenosine receptor agonists and P2Y12 receptor antagonists exhibit combined inhibitory effect on blood platelet function"*

wykonanej

w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została napisana na podstawie prac badawczych przeprowadzonych w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Biologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem promotora prof. UM dr. hab. Marcina Różalskiego oraz promotora pomocniczego, dr inż. Izabeli K. Piechockiej z Pracowni Modelowania w Biologii i Medycynie Instytutu Podstawowych Problemów Techniki PAN. Rozprawa doktorska została przedłożona w języku angielskim, w formie spójnego tematycznie cyklu trzech prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach zagranicznych z listy filadelfijskiej – jednej pracy przeglądowej oraz dwóch prac oryginalnych o charakterze eksperymentalnym, opatrzonych zwięzłym i wyczerpującym komentarzem o typowym dla publikacji układzie, a także streszczeniem w języku angielskim i polskim. Praca zawiera również indeks skrótów oraz bibliografię, jak również informacje na temat dotychczasowej pracy badawczej i osiągnięć doktorantki, w tym dane bibliometryczne. Wskazują one na ponadprzeciętną aktywność naukową doktorantki zarówno w zakresie prowadzenia prac badawczych, uczestnictwa w konferencjach jak i pozyskiwania funduszy – doktorantka jest kierownikiem grantu doktorskiego ETIUDA oraz beneficjentką uczelnianego grantu dla młodych naukowców.

Łączny wskaźnik oddziaływania (IF) dla przedstawionych do recenzji prac wynosi 12.109, suma punktów MNiSW = 340, a mgr Nina Wolska jest w nich pierwszym (choć nie korespondencyjnym) autorem, co świadczy o istotnym wkładzie w ich powstanie. Co prawda udział doktorantki w poszczególnych pracach nie został opisany w odrębnym oświadczeniu, tak jak to ma miejsce w przypadku pozostałych współautorów, jednak informacja ta jest zawarta w pracach oryginalnych i wskazuje na wiodącą rolę doktorantki w sformułowaniu koncepcji badawczej, realizacji zadań badawczych i omówieniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. Prace badawcze prowadzone przez doktorantkę zostały zaakceptowane przez lokalną Komisję Bioetyczną.

W dysertacji doktorantka podejmuje się opracowania zagadnienia, które do tej pory nie było eksplorowane, co już samo czyni temat bardzo interesującym. Mimo, że praca ma charakter eksperymentalny, to jednak na końcu drogi jawi się cel jak najbardziej kliniczny. Zadania jakie sobie doktorantka wyznaczyła obejmują wstępne prace nad nowatorskim podejściem do złożonego leczenia przeciwplatekowego chorób naczyniowych. I chociaż metoda podwójnej terapii przeciwplatekowej od dawna funkcjonuje w prewencji chorób naczyniowych – mam na myśli połączenie aspiryny (inhibitora cyklooksygenazy) z dipirydamolem (inhibitorem fosfodiesterazy, PDE-5) lub kłopidogrelem (inhibitorem receptora P_2Y_{12}), to innowacją jest połączenie agonisty receptora adenozynowego (AR) z inhibitorem receptora P_2Y_{12} . W założeniu połączenie takie ma umożliwić zmniejszenie dawki inhibitora i tym samym ograniczenie działań niepożądanych, przede wszystkim zagrażających życiu krwotoków, przy jednoczesnym utrzymaniu skuteczności antyagregacyjnej. Doktorantka podjęła się przeanalizowania pod tym kątem kilku agonistów AR w odniesieniu do dwóch, stosowanych w praktyce klinicznej leków: kangreloru i metabolitu prasugrelu.

Cykl prac otwiera bardzo przemyślany artykuł przeglądowy pt.: „Blood Platelet Adenosine Receptors as Potential Targets for Anti-Platelet Therapy”, opublikowany w International Journal of Molecular Sciences (IF=4.556), wprowadzający w tematykę zaangażowania receptorów adenozynowych w proces hamowania aktywacji płytek, jak również stanowiący obszerny przegląd dostępnych komercyjnie agonistów, których właściwości, zwłaszcza w odniesieniu do płytek krwi, zostały już poznane. Praca ta prezentuje szerokie ujęcie zagadnienia, a jednocześnie jest tematycznie bardzo spójna z pozostałymi pracami oryginalnymi i niewątpliwie stanowi cenne wprowadzenie w tematykę opisanych dalej eksperymentów.

Tezy dysertacji zostały zawarte zarówno w komentarzu do Rozprawy jak również są wyraźnie wyartykułowane w każdej z prac oryginalnych. Celem badań było 1) udokumentowanie, że połączenie inhibitora receptora P_2Y_{12} z agonistą receptora adenozynowego potęguje efekt antyagregacyjny oraz 2) określenie skuteczności takiego połączenia w odniesieniu do szeregu molekularnych aspektów procesu aktywacji płytek.

Osiągnięcie pierwszego celu opisuje artykuł oryginalny, opublikowany w czasopiśmie Molecule (IF=3.267) pt.: „Adenosine Receptor Agonists Exhibit Anti-Platelet Effects and

the Potential to Overcome Resistance to P₂Y₁₂ Receptor Antagonists". W pracy tej doktorantka wraz z zespołem wykazała, że po pierwsze - użyte w eksperymencie związki agonistyczne względem AR jak: NECA, regadenoson oraz LUF5835 nie wywierają efektu cytotoksycznego względem płytek. Dwa pierwsze samodzielnie wywołują efekt antyagregacyjny, natomiast wszystkie w połączeniu z kangrelorem lub metabolitem prasugrelu - potęgują go. Bardzo interesującym aspektem tej pracy było wyodrębnienie prób z dobrą i słabą odpowiedzią na antyagregacyjne działanie antagonisty P₂Y₁₂ i ocena agregacji płytek po dodaniu agonisty AR w tychże grupach. Spektakularne wyniki i konkluzja, że agoniści AR wzmacniają efekt antyagregacyjny zwłaszcza w grupie ze słabą odpowiedzią płytek na działanie antagonistów P₂Y₁₂ są obiecujące w kontekście nowych możliwości przełamania biochemicznej oporności na działanie leków antyagregacyjnych. Takiego synergizmu działania doktorantka nie wykazała w warunkach dynamicznych, w których co prawda zarówno agoniści AR (i to znacznie wyraźniej niż w warunkach statycznych) jak i inhibitory P₂Y₁₂ wykazują efekt przeciwpłytkowy, to jednak nie jest on wzmocniony w modelu skojarzonym, co przy wysokich wartościach współczynnika zmienności nakazuje jednak zachować ostrożność w formułowaniu jednoznacznych wniosków odnoszących się do zastosowań klinicznych.

Próba wyjaśnienia mechanizmów molekularnych stojących za tym zjawiskiem została zawarta w drugiej pracy eksperymentalnej opublikowanej w czasopiśmie *Pharmaceuticals* (IF=4.286) pt.: „Adenosine Receptor Agonists Increase the Inhibition of Platelet Function by P₂Y₁₂ Antagonists in a cAMP- and Calcium-Dependent Manner". W publikacji tej doktorantka przeanalizowała szeroki wachlarz aż 9 agonistów i określiła ich wpływ na różne aspekty aktywacji płytek (mobilizację jonów wapnia, tworzenie VASP, degranulację ziarnistości alfa czy aktywację receptora dla fibrynogenu i wreszcie wiązanie samego fibrynogenu), również w modelu skojarzonym, z udziałem inhibitora receptora P₂Y₁₂. Udokumentowała przy tym, że zwiększony efekt przeciwpłytkowy występuje na wszystkich badanych etapach aktywacji płytek, jednak nie przebiega według uniwersalnego dla wszystkich agonistów wzorca. Niemniej wyniki wskazują, że intensyfikacja działania przeciwpłytkowego zachodzi w mechanizmie zależnym od mobilizacji jonów wapnia i stężenia cAMP. Zatem problem pozostaje otwarty i aktualny stan badań wydaje się być dobrym punktem wyjścia do dalszych prac w tym zakresie.

Ponadto doktorantka wykazała, że agoniści AR również samodzielnie zmniejszają aktywację płytek, choć z różną intensywnością, a także potwierdziła wcześniejsze obserwacje, że oddziaływanie to nie zależy od selektywności agonistów i siły powinowactwa do receptora. W komentarzu doktorantka przedstawiła dziewięć kluczowych wniosków, które ściśle odzwierciedlają wyniki prac.

Wartą odrębnego komentarza jest też przemyślana i precyzyjnie opracowana metodologia. Doktorantka miała do dyspozycji rozbudowany warsztat badawczy - połączenie metod agregometrycznych z funkcjonalną analizą cytometryczną wraz z mikroskopią konfokalną i wizualizacją agregacji płytek w warunkach przepływu krwi oraz inne metody biochemiczne. Pozwalają one na wielopłaszczyznową analizę aktywacji płytek pod wpływem badanych związków, co doktorantka doskonale

wykorzystała. Należy też zauważyć, że prace były prowadzone na materiale pozyskanym od znacznej jak na badania eksperymentalne grupy zdrowych ochotników. Więcej, wykonywane były w krwi pełnej, co jest bardzo korzystne z punktu widzenia metodologii, gdyż pozwala uniknąć artetyficznej aktywacji płytek w trakcie analiz, ale jest zarazem trudne logistycznie, bowiem wymaga przeprowadzenia wszystkich eksperymentów bezpośrednio lub w krótkim czasie po pobraniu krwi.

Zastosowanymi przez doktorantkę w obydwu pracach antagonistami receptora P_2Y_{12} był kangrelor i metabolit prasugrelu. I tu rodzi się pytanie - jakie były przesłanki skłaniające do takiego wyboru? Obydwa leki są stosowane w praktyce klinicznej, zasadniczo w kardiologii interwencyjnej. Nie są jednak stosowane w przewlekłej profilaktyce chorób naczyniowych w tym udaru mózgu, w przeciwieństwie do kłopidogrelu, powszechnie ordynowanego w szeroko rozumianej prewencji chorób naczyniowych zarówno w monoterapii jak i w pewnych sytuacjach klinicznych w terapii łączonej z aspiryną. Zatem z jakiego powodu wybór padł na kangrelor i prasugrel?

Doskonałe przygotowanie eksperymentów pod względem metodologicznym powoduje, że prace doktorantki stanowią bardzo rzetelną bazę dla dalszych badań przedklinicznych nad farmakologicznym wykorzystaniem aktywacji receptorów adenylinowych. I choć do zastosowania praktycznego droga jest daleka, to właśnie takie badania są milowym krokiem naprzód w pragmatycznych z założenia naukach biomedycznych.

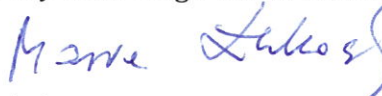
Reasumując, pracę doktorską mgr inż. Niny Wolskiej, ze względu na nowatorstwo, doskonale opanowany warsztat badawczy i dużą swobodę z jaką doktorantka prowadzi merytoryczną dyskusję, oceniam bardzo wysoko. Należy podkreślić, że publikacje doktorantki zostały docenione również przez recenzentów uznanych czasopism o zasięgu międzynarodowym. Przyłączając się do tych pozytywnych opinii stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Niny Wolskiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i tym samym przedkładam Wysokiej Radzie Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Niny Wolskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z względu na bardzo wysokie walory poznawcze i znaczenie kliniczne rezultatów pracy wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Niny Wolskiej.

Poznań; 14 października 2020 r.

ADIUNKT

Katedry Neurologii UM w Poznaniu



dr hab. n. med. Maria Łukasik