



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 27.05.2021r.

dr hab. Halina Małgorzata Żbikowska
prof. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
Instytut Biochemii UŁ
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

OCENA
pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Wzorek
„Wpływ elementów morfotycznych krwi oraz wybranych białek osocza na hamowanie funkcji płytek krwi przez agonistów receptorów adenozynowych”

Promotor pracy: dr hab. Magdalena Boncler, prof. UM w Łodzi

Płytki krwi pełnią kluczową rolę w patofizjologii różnych zespołów chorobowych, w tym chorób układu krążenia, które są główną przyczyną zgonów w Europie i na świecie. Prawidłową funkcją płytek krwi jest utrzymanie fizjologicznej hemostazy, jednak ich wzmożona aktywacja/reaktywność może prowadzić do występowania powikłań zakrzepowozatorowych, natomiast zmniejszona reaktywność i/lub mała liczba płytek krwi do powikłań krwotocznych. Podstawą farmakoterapii stosowanej u chorych z zespołem niedokrwienym w obrębie naczyń wieńcowych i mózgowych są leki przeciwplatekcyjne, reprezentowane przez preparaty o zróżnicowanej budowie chemicznej i odmiennym mechanizmie działania. Obecnie standardem jest stosowanie podwójnej terapii przeciwplatekowej, m.in. antagonisty platekowego receptora P2Y₁₂ w połączeniu z aspiryną, mającej na celu hamowanie aktywności płytek krwi i zmniejszenie ryzyka powikłań zakrzepowozatorowych. Istotnym problemem klinicznym podczas stosowania leków przeciwplatekowych jest brak skuteczności leczenia u niektórych chorych, związany z opornością na te leki, a także ryzyko wystąpienia niepożądanych krwawień. Intensywne badania nad lekami oddziałującymi na płytki krwi dają nadzieję na poprawę skuteczności leczenia oraz ograniczenie ryzyka powikłań.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Wzorek dobrze wpisuje się w powyżej opisaną tematykę, a opublikowane wyniki badań wnoszą cenne dane

dotyczące poszukiwań nowych rozwiązań w leczeniu schorzeń układu krążenia. W mojej opinii podjęta tematyka jest w pełni uzasadniona, aktualna i zasługuje na uznanie.

Wyzwaniem, jakie postawiła sobie Doktorantka było sprawdzenie, czy elementy morfotyczne krwi i składniki osocza mają wpływ na aktywność przeciwplateletową wybranych agonistów receptorów adenozynowych, stosowanych samodzielnie lub w kombinacji z inhibitorami receptora P2Y₁₂, a także scharakteryzowanie oddziaływań agonistów receptorów adenozynowych z białkami osocza, które transportują leki.

Na rozprawę doktorską mgr inż. Joanny Wzorek składają się 3 publikacje, z których każda stanowi oryginalną pracę doświadczalną. Tworzą one zwarty cykl zagadnień związanych z realizacją założonych celów doktoratu.

1. Boncler M, Wzorek J, Wolska N, Polak D, Watala C, Rozalski M. Adenosine receptor agonists deepen the inhibition of platelet aggregation by P2Y₁₂ antagonists. *Vascul Pharmacol.* 2019; 113:47-56 (IF 3,33 MNiSW 100).

2. Wzorek J, Bednarek R, Watala C, Boncler M. Binding of adenosine derivatives to carrier proteins may reduce their antiplatelet activity. *Biochem Pharmacol.* 2020;174:113827 (IF 4,96 MNiSW 100).

3. Wzorek J, Bednarek R, Watala C, Boncler M. Efficacy of a combined antiplatelet therapy is not affected by a simultaneous binding of cangrelor and PSB 0777 to albumin. *Front Pharmacol.* 2021; 12:638257 (IF 4,225; MEiN = 100).

Oświadczenia współautorów, deklarujących swój udział intelektualny/wkład pracy w powstawaniu poszczególnych publikacji, nie budzą wątpliwości, że wkład pracy mgr inż. Joanny Wzorek był dominujący w każdej publikacji składającej się na oceniane dzieło. W skład ocenianej dysertacji wchodzi także streszczenie pracy, które stanowi zwięzłe podsumowanie zarówno części teoretycznej, nawiązującej do tematu dysertacji, jak i krótkie omówienie najważniejszych wyników, a zakończone jest przedstawieniem wniosków. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*impact factor*; IF) publikacji stanowiących rozprawę doktorską jest wysoki i wynosi **12,515**, czemu odpowiada **300** punktów MNiSW/MEiN.

W skład całego dorobku naukowego mgr inż. Joanny Wzorek wchodzi jeszcze 5 publikacji oraz 8 komunikatów zjazdowych prezentowanych przez Doktorantkę w kraju i za

granicą. Warto podkreślić, że sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) publikacji stanowiących dorobek naukowy Doktorantki wynosi 21,638, a liczba punktów według listy czasopism punktowanych MNiSW/MEiN - 660.

Cel rozprawy został precyzyjnie określony przez Autorkę, w formie pięciu pytań badawczych (przedstawionych na str. 15 streszczenia), a jego osiągnięcie udowodnione zostało w zebranych w dysertacji publikacjach.

W badaniach Doktorantka wykorzystowała pięć związków wykazujących powinowactwo do płytkowych receptorów adenozynowych: 2-chloroadenozynę (Cl-Ado), PSB 0777, MRE 0094, UK 432097 oraz BAY 60-6583, różniących się strukturą chemiczną, właściwościami fizykochemicznymi i selektywnością względem tychże receptorów. Poza tym do badań wykorzystowała także dwa inhibitory płytkowego receptora P2Y₁₂ - kangrelor i metabolit prasugrelu. Doktorantka zastosowała bardzo trafnie spektrum nowoczesnych technik i testów, które pozwoliły na pełną realizację celów pracy. Uwagę zwraca logiczny i konsekwentny zestaw metod: mikroskopia optyczna do oceny rozpuszczalności stosowanych agonistów receptorów adenozynowych, cytometria przepływowa do oceny żywotności i analizy aktywacji płytek krwi, agregometria optyczna i impedancyjna do pomiaru agregacji płytek krwi, odpowiednio w osoczu bogatopłytkowym i w krwi pełnej, test enzymatyczny do badania wpływu agonistów adenozynowych na właściwości adhezyjne płytek krwi, technika powierzchniowego rezonansu plazmonowego i spektroskopia fluorescencyjna do oceny oddziaływań białek osocza transportujących leki z badanymi ligandami (agonistami receptorów adenozynowych) oraz metoda *in silico* w celu analizy potencjalnych miejsc wiązania liganda do białka osocza.

Przechodząc do merytorycznej oceny pracy chciałabym jeszcze raz podkreślić, że wszystkie wyniki badań opisane w trzech eksperymentalnych pracach opublikowanych w czasopiśmie *Vascular Pharmacology*, *Biochemical Pharmacology* i *Frontiers in Pharmacology* oraz w syntetycznej formie w rozdziałach 5 i 6 dysertacji – „Dyskusja najważniejszych wyników” i „Wnioski”, są w pełni oryginalnymi osiągnięciami naukowymi. W pracy udowodniono, że pochodne adenozyny Cl-Ado, UK 432097, MRE 0094 i PSB 0777 hamują w różnym stopniu agregację płytek krwi indukowaną ADP, przy czym najsilniejszym inhibitorem agregacji płytek okazał się związek UK 432097. Ponadto, wszystkie cztery pochodne adenozyny istotnie zwiększały przeciwplatekcyjne działanie inhibitora receptora P2Y₁₂ (zarówno kangreloru, jak i w nieco mniejszym stopniu metabolitu prasugrelu), co wydaje się mieć wymiar praktyczny z uwagi na potencjalne korzyści wynikające ze stosowania agonistów receptorów adenozynowych w połączeniu z inhibitorami receptora P2Y₁₂ w podwójnej terapii

przeciwpłytkowej. Udowodniono, że skuteczność hamowania funkcji płytek krwi przez pochodne adenozyiny (CI-Ado, PSB 0777, MRE 0094 i UK 432097) jest mniejsza w obecności białek osocza. Analiza, metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego, oddziaływań pochodnych adenozyiny z wytypowanymi czterema białkami osocza, transportującymi endo- i egzogenne związki, albuminą (HSA), α_1 -kwaśną glikoproteiną (α_1 -AGP), apolipoproteiną A-1 (ApoA-1) i apolipoproteiną B-100 (ApoB-100) wykazała, że albumina i lipoproteiny mogą być ważnymi transporterami dla pochodnych adenozyiny, a także dla kangreloru. Dodatkowym aspektem o znaczeniu potencjalnie praktycznym prezentowanych badań jest wykazanie, że mimo iż w obecności osocza lub albuminy przeciwpłytkowe działanie kangreloru i PSB 0777 jest osłabione, związki te prawdopodobnie oddziałują z różnymi subdomenami albuminy, co budzi nadzieję, że dystrybucja i skuteczność PSB 0777 i kangreloru, stosowanych w połączeniu (w sytuacji podwójnej terapii przeciwpłytkowej), nie powinny być zakłócone.

Rozprawa prezentowana w formie cyklu publikacji nie daje dużych możliwości edytorskich. Chciałabym jednak podkreślić, że formalne części rozprawy zostały zredagowane jasno i bardzo starannie. Mam kilka uwag dotyczących tej części, które w żadnym stopniu nie umniejszają wartości pracy.

(1) W odniesieniu do informacji na stronie 4 (wiersze 29-32) o ograniczonej skuteczności leczenia pochodnymi tienopirydyny pewien niedosyt budzi brak choćby krótkiego omówienia przyczyn obserwowanej u pacjentów oporności na niektóre leki przeciwpłytkowe z tej grupy.

(2) W pracy udowodniono, że badane pochodne adenozyiny w stężeniach mikromolowych nie są toksyczne wobec płytek krwi, co jest istotne w kontekście oceny aktywności przeciwpłytkowej tych związków *in vitro*. Biorąc pod uwagę, zaproponowaną ideę nowego podejścia do podwójnej terapii przeciwpłytkowej, z potencjalnym zastosowaniem agonisty receptorów adenozynowych w kombinacji z inhibitorem receptora P2Y₁₂, nasuwa się pytanie o bezpieczeństwo tychże związków – czy Doktorantka mogłaby odnieść się do tej kwestii?

(3) Jakkolwiek w pełni rozumiem intencje Doktorantki, która chciała pokreślić nowatorskość, oryginalność i pozostałe zalety swoich badań, użyta w niektórych sformułowaniach w streszczeniu bezosobowa forma nieco razi i może być odczytana jako

swego rodzaju „autorecenzja”, np. str. 23 „Dużym walorem publikacji jest ciekawe podejście eksperymentalne, łączące metody biologiczne..... z badaniami *in silico*”, czy też str. 25 „Należy podkreślić nowatorskość i oryginalność prowadzonych badań”.

(4) Rozdział 6. „Wnioski” słuszniej byłoby zatytułować „Podsumowanie wyników i wnioski”

(5) Str. 4, wiersz 24. Słowo „target” w zdaniu „Receptor P2Y₁₂stanowi główny target w terapii przeciwplatekowej” jest „kalką” z języka angielskiego, powiedziałabym raczej ... „stanowi główny cel terapii przeciwplatekowej”.

(6) Str. 7, wiersz 17. Skrót związku „NECA” nie został wyjaśniony, ani w tekście, ani w wykazie skrótów.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Wzorek jest tematycznie spójna, nowatorska i stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego, wnosząc istotne wartości przede wszystkim poznawcze. Uzyskane wyniki mogą mieć też wymiar praktyczny. W trakcie realizacji pracy Doktorantka wykazała się znajomością szeregu technik badawczych, umiejętnością stawiania i weryfikacji hipotez badawczych oraz krytycznej analizy i interpretacji wyników. Wszystkie części rozprawy świadczą o dużej wiedzy Autorki i Jej dojrzałości naukowej.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska **spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm).** Wnoszę, zatem do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Joanny Wzorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

.....
dr hab. Halina M. Żbikowska, prof. UŁ

