



**Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska**  
**Zakład Biofarmacji**  
**ul. Mickiewicza 2C,**  
**15-222 Białystok**  
**Tel.85 7485607**  
**e-mail: [ewa.chabielska@umb.edu.pl](mailto:ewa.chabielska@umb.edu.pl)**

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
**mgr inż. Joanny Wzorek**

**„Wpływ elementów morfotycznych krwi oraz wybranych białek osocza na hamowanie funkcji płytek krwi przez agonistów receptorów adenozynowych”**

**Promotor: dr hab. Magdalena Boncler prof. UM w Łodzi**

**Praca wykonana w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Terapia przeciwplatek jest strategicznym postępowaniem w leczeniu i prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego. Skuteczne terapie przeciwplatekowe opierają się na podaniu 2 lub 3 leków, o różnych mechanizmach działania, co wskutek blokowania różnych ścieżek aktywacji płytek efektywniej hamuje ich funkcje. Mimo to skuteczności terapii przeciwplatekowych jest niezadawalająca z powodu braku pełnej odpowiedzi płytek na działanie inhibitorów.

W ramach rozprawy doktorskiej zaproponowano nowe podejście do leczenia przeciwplatekowego w oparciu o ideę dwutorowego hamowania funkcji płytek krwi. Dotyczy ona łącznego stosowania związków działających na płytkowe receptory purynergiczne i polega na stosowaniu leków należących do grupy antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub> oraz związków wykazujących potencjał do hamowania funkcji płytek krwi poprzez aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od obecnych na płytkach krwi receptorów adenozynowych (AR). Adenozyna powstająca na drodze zewnątrzkomórkowego katabolizmu nukleotydów adeninowych stymuluje receptory purynergiczne typu P1, obecne na powierzchni różnych komórek, między innymi komórek śródbłonna i mięśniówki gładkiej naczyń, fibroblastów, neutrofilii, a także płytek krwi. Wszystkie podtypy receptorów adenozynowych (A1, A2a, A2b i A3) należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G, a ich aktywacja (głównie podtypu A2b, stymulowanego przez wysokie stężenie adenozyny) znosi efekty pobudzenia receptorów P2, co kompensuje między innymi pro-miażdżycowe działanie zewnątrzkomórkowych nukleotydów, jednocześnie podkreślając ochronny wpływ adenozyny.

Już w 1964 roku doniesiono o silnym hamowaniu, przez 2-chloroadenozyne, agregacji płytek krwi indukowanej ADP. W latach 70-tych, kiedy wykryto błonowe receptory stymulowane przez adenozyne i sukcesywnie wprowadzano do badań szereg analogów adenozyne szukając możliwości ich farmakologicznego wykorzystania, rozpoczął się intensywny rozwój badań dotyczących roli adenozyne jako cząstek sygnałowych.

Obecność poszczególnych podtypów receptorów adenozynowych w łożysku naczyniowym i płytkach krwi, jak również efekty ich aktywacji, mogą mieć bezpośredni wpływ na rozwój schorzeń układu sercowo-naczyniowego. W tym świetle uważam prezentowane podejście badawcze, skupiające się na kolejnym protekcyjnym mechanizmie opartym na aktywacji płytkowych receptorów adenozynowych przy jednoczesnym hamowaniu receptorów P2Y<sub>12</sub>, za ważne i aktualne. Badania nad specyficznymi receptorami purynergicznymi i ich agonistami/antagonistami mogą prowadzić do wdrożenia nowoczesnych terapii schorzeń układu sercowo-naczyniowego.

#### Ocena formalna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Wzorek jest napisana w postaci 45-stronicowego komentarza do zbioru 3 oryginalnych prac, które ukazały się w druku w latach 2019, 2020 i 2021. W pierwszej z nich, opublikowanej w 2019 roku, Doktorantka jest drugim autorem, w kolejnych już autorem pierwszym. Parametry bibliometryczne prac są wysokie (IF = 12,515). Doktorantka definiuje swój wkład w powstanie prac, który rośnie wraz z kolejnymi publikacjami, jako: planowanie i wykonywanie eksperymentów, statystyczne opracowanie i wizualizacja wyników, a w pracy ostatniej także pisanie pracy współludział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Prace stanowiące treść rozprawy:

1. Boncler M, Wzorek J, Wolska N, Polak D, Watala C, Rozalski M. Adenosine receptor agonists deepen the inhibition of platelet aggregation by P2Y<sub>12</sub> antagonists. *Vascul Pharmacol*. 2019 Feb;113:47-56. doi: 10.1016/j.vph.2018.11.005. IF = 3,330; 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 Apr;174:113827. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113827. IF = 4,960; 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 Mar;12:638257. doi: 10.3389/fphar.2021.638257. IF = 4,225; MEiN = 100

Komentarz do prac został napisany w układzie równoważnym klasycznej rozprawie doktorskiej. Rozprawę podzielono na rozdziały, rozpoczynając od „Wstępu”, w którym Autorka skupiła się na kilku zagadnieniach dotyczących: korzyści i wad podwójnej terapii przeciwplateletowej, charakterystyki receptorów adenozynowych z wyróżnieniem płytek krwi i ich agonistów oraz

znaczenia białek osocza w procesie transportu leków we krwi. Interesujący i bardzo uzasadniony jest podrozdział dotyczący klasycznych i nowoczesnych metod stosowanych do analizy połączeń białek osocza z lekami. Kończąc „Wstęp” Doktorantka przedstawia skondensowany opis najważniejszych badań i metod stanowiących treść rozprawy. W tekście „Wstępu” dostrzegłam nieprecyzyjność w opisie znaczenia połączeń białek osocza z lekami. Na stronie 9 (wersy 28-30) Autorka pisze - „Kompleksy białko-lek tworzą swego rodzaju system transportowy do przenoszenia leków do ich docelowych miejsc działania (Vallner 1977)”. Sugeruje tym samym, że kompleksy lek-białko przechodzą przez błony biologiczne do tkanek receptorowych. Podczas gdy są magazynem leku i krążą w kompleksach we krwi, a ich transport do miejsc docelowych może dotyczyć tylko komórek krwi i ściany naczyń krwionośnych. W innych częściach rozprawy Autorka definiuje to zagadnienie prawidłowo. W rozdziale „Cele”, swoje plany badawcze Autorka przedstawia bardzo precyzyjnie w postaci 5 pytań badawczych i 10 szczegółowych celów badań. W rozdziale „Materiał i metody”, tytułowe zagadnienia zostały opisane skrótowo, co jest uzasadnione, bowiem szczegółowy opis znajduje się w pracach, wraz z ryciną przedstawiającą schemat badania w Pracy 2. Zwraca uwagę logiczna konstrukcja schematu badań, która ostatecznie daje odpowiedzi na wszystkie pytania, które Autorka stawia wcześniej. W kolejnym rozdziale, „Dyskusja najważniejszych wyników”, uwzględniono wszystkie ważne wątki prac, a ich analiza jest wnikliwa i bardzo merytoryczna. Tutaj też Autorka często odnosi się do zasadności wybranej do badań metodologii. Na wyrazy uznania zasługuje wskazanie kierunku dalszych badań.

Cześć dyskusyjną zamykają 3 „Wnioski”, które *de facto* są połączeniem krótkiego opisu wyników i w końcowej części również wnioskami ogólnymi. Uważam, że w świetle szerokiego zakresu badań i licznych wyników, korzystne byłoby wydzielenie krótkiego podsumowanie wyników od wniosków ogólnych. W rozdziale „Streszczenie w języku polskim”, na stronie 29, bardzo trafnie i syntetycznie takie wnioski ogólne zostały także przedstawione w formie kilkuzdaniowego podsumowania.

Po kolejnych rozdziałach „Streszczenie w języku polskim” i „Streszczenie w języku angielskim” jest „Bibliografia”, oparta w większości na najnowszych publikacjach, choć cytowane są również starsze prace, co dowodzi bardzo dokładnej analizy piśmiennictwa i dobrego teoretycznego przygotowania Autorki do badań.

Kolejny rozdział - „Publikacje stanowiące treść rozprawy doktorskiej”, zawiera spis i dane bibliometryczne publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej. Rozdział kolejny to „Wykaz pozostałego dorobku naukowego i innych osiągnięć”. Wynika z niego, że Autorka aktywnie uczestniczyła w kilku konferencjach międzynarodowych oraz jest współautorem pracy o wysokim współczynniku oddziaływania, które są ściśle związane z tematyką rozprawy doktorskiej.

Kolejny rozdział „Finansowanie badań”, informuje, że prezentowane w rozprawie badania zostały zrealizowane w ramach projektu TEAM (TEAM/2016-1/8) pt. „Strategia dwutorowej, zależnej od purynoreceptorów, modulacji aktywacji i reaktywności płytek krwi do ograniczania ryzyka zatorowości naczyń krwionośnych, zależnego od płytek krwi i śródbłonna naczyniowego - badania z wykorzystaniem modeli komórkowych i zwierzęcych”, sfinansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej i Unię Europejską z zakresu Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

W ostatnim rozdziale „Treść publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i oświadczenia autorów”, znajdują się publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej i oświadczenia współautorów wyrażających zgodę na ich wykorzystanie w przewodzie doktorskim.

### Ocena merytoryczna

W badaniach wykorzystano dostępne komercyjnie związki - agonistów AR, które z wyjątkiem BAY 60-6583, są analogami adenozyiny. Związki mają charakter zasadowy i polarny oraz charakteryzują się różnym profilem rozpuszczalności. Różni je też selektywność wobec receptorów adenozyinowych. UK 432097, MRE 0094 i PSB 0777 – są selektywne wobec receptora A<sub>2A</sub>, BAY 60-6582 – jest selektywny względem receptora A<sub>2B</sub>, a 2-chloroadenozyina jest nieselektywnym agonistą. W celu blokady receptora P2Y<sub>12</sub> wybrano dwa leki - kangrelor, który jest stosowany *i.v.* w trakcie przezskórnych interwencji wieńcowych oraz metabolit prasugrelu, który jako prolek jest stosowany *p.o.* chronicznie.

Dużym walorem rozprawy jest metodologia badań. Materiał biologiczny stanowiła krew zdrowych ochotników z prawidłowo zastosowanymi kryteriami wykluczenia. Protokół badawczy wyróżnia fakt, że powstał wyłącznie w oparciu o badania *in vitro*. Zastosowano metody biologiczne w tym agregometrię i cytometrię przepływową. Interakcje leków z białkami osocza scharakteryzowano po unieruchomieniu białka (metoda powierzchniowego rezonansu plazmonowego) oraz spektroskopię fluorescencyjną, gdy znajdowało się w roztworze. Wykorzystano również modelowanie molekularne (metoda *in silico*) w celu oceny miejsc wiązania związków do albuminy.

W pierwszym etapie badań Doktorantka wykazała, że agoniści receptorów adenozyiny: Cl-Ado, PSB 0777, MRE 0094 oraz UK 432097 w stężeniach mikromolarnych nie są toksyczne w stosunku do płytek krwi, a PSB 0777 jest bardzo dobrze rozpuszczalnym w wodzie związkiem. Wykazała, że badane związki z wyjątkiem BAY 60-6583, z różną efektywnością hamują indukowaną ADP agregację płytek krwi. Dowiodła, że erytrocyty i leukocyty nie zmieniają skuteczności przeciwpłytkowej agonistów AR. Następnie wykazała, że Cl-Ado, PSB 0777, MRE 0094 i UK 432097 istotnie nasilają proces hamowania agregacji płytek krwi przez inhibitory receptora P2Y<sub>12</sub> (kangrelor oraz metabolit prasugrelu) we krwi pełnej. Wyniki powyższych badań dowodzą udziału receptorów AR w hamowaniu funkcji płytek krwi i wskazują na potencjalne korzyści wynikające ze stosowania

agonistów AR w połączeniu z inhibitorami receptora P2Y<sub>12</sub> w podwójnej terapii przeciwplatekowej. Poszerzają też znacząco charakterystykę fizykochemiczną i farmakodynamiczną badanych analogów adenozyiny, która to wiedza jest kluczowa w wyborze związków do dalszych badań farmakologicznych.

Proszę o odpowiedź na pytania: Kiedy może dojść do zmian ekspresji lub powinowactwa receptorów płytowych receptorów A<sub>2A</sub>? Czy stosowane *in vitro* stężenia agonistów odpowiadają stężeniom, które *in vivo* mogą wywołać hipotensję pobudzając naczyniowe receptory A<sub>2A</sub>?

Wychodząc z założenia, że podwójna terapia przeciwplatekowa niesie ryzyko niekorzystnych interakcji farmakokinetycznych na poziomie wiązania/ wypierania leków z białek w kolejnych badaniach Autorka szukała odpowiedzi na pytanie - czy i jak białka osocza tj. HSA, α1-AGP, apolipoproteina A-1 i apolipoproteina B-100 zmieniają efektywność przeciwplatekową czterech hamujących agregację agonistów AR. Doktorantka wykazała, że ważne w transporcie leków we krwi białka osocza w stężeniu fizjologicznym osłabiają efektywność hamowania funkcji płytek krwi przez pochodne adenozyiny (Cl-Ado, PSB 0777, MRE 0094 i UK 432097). Analogi adenozyiny wiążą się przede wszystkim do albuminy osoczowej (PSB 0777) oraz do białkowych składników apolipoprotein: ApoA-1 (MRE 0094) i ApoB-100 (MRE 0094 i UK 432097). Wyniki te opisując jeden z ważnych parametrów farmakokinetycznych, którym jest wiązanie z białkami osocza, przyniosły informację o tym, że przeciwplatekowy efekt agonistów AR może być osłabiony w wyniku ich interakcji z białkami osocza.

W ostatnim etapie badań Doktorantka skupiła się na wytypowanym w oparciu o wcześniejsze wyniki łącznym stosowaniu kangreloru i PSB0777. Oceniała proces wiązania tych związków z albuminą osoczową. Wykazała, że kangrelor (wiązania hydrofobowe) i PSB 0777 (wiązania hydrofobowe i siły elektrostatyczne) wiążą się do albuminy osoczowej z umiarkowanym powinowactwem. Kangrelor i PSB 0777 nie konkurują o miejsce wiążące w albuminie, gdyż PSB 0777 wiąże się w miejscu Sudlowa 2, a kangrelor w miejscu Sudlowa 1. Wskazuje też na kierunek dalszych badań, obejmujących pomiary krystalograficzne, które pozwolą na precyzyjne wskazanie miejsce wiązania obu związków z cząsteczką albuminy.

Resumując efektywność badanych związków w hamowaniu funkcji płytek krwi jest zależna od obecności osocza lub albuminy w środowisku.

Podsumowując analizę uzyskanych wyników, Autorka stwierdza „wyselekcjonowana na podstawie wielu zmiennych para inhibitorów płytek krwi (kangrelor i PSB 0777) ma duży potencjał do wykorzystania w nowej podwójnej terapii przeciwplatekowej”. Tym samym dowodzi, że osiągnęła

nadrzędny cel swoich badań, którym było znalezienie korzystnego pod względem farmakodynamicznym i farmakokinetycznym połączenia dwóch związków o działaniu przeciwplatekcyjnym.

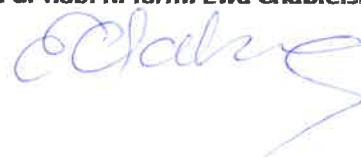
#### Ocena końcowa

Wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr inż. Joanny Wzorek. Zakres badań został logicznie i starannie zaprojektowany, a zamierzone cele badawcze osiągnięte. Część teoretyczna i doświadczalna rozprawy świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym i eksperymentalnym Doktorantki. Ilość uzyskanych wyników, w większości nowatorskich, jest imponująca. Zostały one opublikowane w prestiżowych czasopismach. Uzyskane wyniki mogą być przyczynkiem do rozpoczęcia badań przedklinicznych. Należy także mocno podkreślić znaczenie uzyskanych wyników jako obiecującej próby poszukiwania farmakologicznej, opartej na synergizmie hiperaddycyjnym ingerencji w funkcje zaktwowanych w chorobach układu sercowo-naczyniowego płytek krwi.

Przedstawiając powyższą recenzję kieruję do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Wzorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie - nauki medyczne i nauki o zdrowiu, dyscyplinie - nauki medyczne.

Wnioskuje także o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska



Białystok, 26 maja 2021 r.