

## Streszczenie w języku polskim

Terapia przeciwplatekowa odgrywa kluczową rolę w leczeniu i prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego. Klinicyści zmagają się z problemem osłabionej wrażliwości pacjentów na obecnie dostępne leki przeciwplatekowe, dlatego wciąż istnieje duże zapotrzebowanie na projektowanie skuteczniejszych terapii obniżających pobudliwość płytek krwi. W niniejszej pracy badano właściwości przeciwplatekowe wybranych agonistów receptorów adenozynowych (głównie pochodnych adenozyny) i zaproponowano nowe, dwutorowe podejście terapeutyczne (podwójna terapia przeciwplatekowa), prowadzące do zahamowania funkcji płytek krwi poprzez aktywację platekowych receptorów adenozynowych, przy jednoczesnym hamowaniu receptora P2Y<sub>12</sub>.

Białka osocza należą do ważnych regulatorów funkcji płytek krwi i mogą wpływać na aktywność przeciwplatekową leków lub związków o działaniu terapeutycznym. Niewiele wiadomo na temat oddziaływań agonistów receptorów adenozynowych z białkami osocza. Ponadto w piśmiennictwie brakuje informacji dotyczących współzawodnictwa inhibitorów płytek krwi o miejsce wiązania w białkach pełniących funkcję ich osoczowych transporterów, co może zaburzać farmakodynamikę związków podczas podwójnej terapii przeciwplatekowej. Dlatego też, kolejnym celem pracy była analiza interakcji między wybranymi pochodnymi adenozyny a białkami osocza oraz ocena wpływu tych oddziaływań na efekt przeciwplatekowy badanych związków.

Badania agregacji płytek krwi *in vitro* wykazały, iż stosunkowo nowe pochodne adenozyny: PSB 0777, MRE 0094 i UK 432097 oraz wcześniej opisana 2-chloroadenozyna (Cl-Ado), nie są toksyczne w stosunku do komórek i są, w mniejszym lub większym stopniu, zdolne do hamowania indukowanej ADP agregacji płytek krwi oraz do zwiększania przeciwplatekowego efektu wywołanego działaniem antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub>: kangreloru i metabolitu prasugrelu. Porównanie odpowiedzi płytek krwi na Cl-Ado, PSB 0777, MRE 0094 i UK 432097, we krwi pełnej i w PRP, pośrednio wskazało na znikomy wpływ elementów morfotycznych krwi (leukocyty, erytrocyty) na efektywność pochodnych adenozyny w hamowaniu agregacji płytek krwi. Wpływ osocza oraz wybranych białek osoczowych transportujących leki na aktywność przeciwplatekową pochodnych adenozyny oceniano w badaniach aktywacji

płytek krwi z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz adhezji płytek do fibrynogenu w odpowiedzi na ADP (metoda kolorymetryczna). Zaobserwowano, że białka osocza w sposób istotny statystycznie osłabiają efektywność Cl-Ado, PSB 0777, MRE 0094 i UK 432097 w hamowaniu aktywacji płytek krwi indukowanej ADP. Ponadto adhezja płytek krwi była silniej hamowana przez MRE 0094, UK 432097 oraz PSB 0777 w środowisku o obniżonej zawartości białek osocza, w porównaniu do osocza natywnego (istotne statystycznie różnice występowały w przypadku MRE 0094). Analiza oddziaływań pochodnych adenozyiny z czterema znanymi białkowymi transporterami leków (albumina (HSA),  $\alpha_1$ -AGP, ApoA-1/HDL, ApoB-100/LDL) z zastosowaniem powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) wykazała, że pochodne adenozyiny wiążą się przede wszystkim do HSA (PSB 0777) oraz do białkowych składników lipoprotein – apolipoprotein: ApoA-1 (MRE 0094) oraz ApoB-100 (MRE 0094 i UK 432097). Co więcej, albumina w sposób istotny osłabia przeciwplatekcyjne działanie PSB 777, a także, co okazało się w późniejszych analizach, kangreloru. W celu określenia występowania współzawodnictwa między PSB 0777 i kangrelorem o miejsce wiązania do albuminy określono siłę i specyfikę tych interakcji. Za pomocą trzech metod: spektroskopii fluorescencyjnej, SPR oraz modelowania molekularnego oceniono, iż oba związki wiążą się do HSA z umiarkowanym powinowactwem ( $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), przy czym za wiązanie kangreloru do HSA odpowiadają głównie oddziaływania hydrofobowe, podczas gdy w wiązaniu PSB 0777 do HSA, oprócz oddziaływań hydrofobowych, rolę odgrywają siły elektrostatyczne. Co szczególnie istotne, dowiedziono, iż PSB 0777 i kangrelor nie dzielą miejsca wiązania w cząsteczce albuminy.

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że receptory adenozyinowe obecne na powierzchni płytek krwi mają istotne znaczenie w regulacji funkcji tych komórek i stanowią potencjalny cel w terapii przeciwplatekowej. HSA i lipoproteiny są ważnymi transporterami dla pochodnych adenozyiny, a także dla kangreloru. Przeciwplatekcyjne działanie kangreloru i PSB 0777 jest osłabione w obecności osocza lub albuminy, niemniej jednak, dystrybucja i efektywność PSB 0777 i kangreloru, stosowanych w połączeniu (w sytuacji podwójnej terapii przeciwplatekowej), nie powinny być zakłócone, gdyż związki te oddziałują z różnymi subdomenami albuminy.

## Streszczenie w języku angielskim

Antiplatelet therapy plays a crucial role in the prevention and treatment of cardiovascular diseases. Clinicians still face the problem of drug resistance towards many currently available antiplatelet agents, therefore there is a need to develop novel therapies with better efficacy and safety in suppressing blood platelet activity. In this study we examined the antiplatelet properties of selected adenosine receptor (AR) agonists (mainly adenosine derivatives) and propose a new dual antiplatelet strategy, leading to the inhibition of platelet functions by activation of adenosine receptors with simultaneous inhibition of the P2Y<sub>12</sub> receptor. Plasma proteins play an important role in the regulation of platelet function and may influence the effectiveness of antiplatelet drugs or compounds of potential therapeutic action. Little is known about the interactions of AR agonists with plasma proteins. To our knowledge there are no reports on the competitive binding of two antiplatelet drugs administered together to the carrier plasma proteins, which may influence their pharmacodynamics. The subsequent purpose of this study was to investigate the interplay interaction between studied compounds and plasma proteins and the consequences of those interactions.

*In vitro* aggregation-based study revealed that relatively new adenosine receptor agonists: PSB 0777, MRE 0094, UK 432097 and previously described 2-chloroadenosine (Cl-Ado) remained non-cytotoxic to the cells. They were also found to be more or less potent inhibitors of ADP-induced platelet aggregation when acting alone, and to strengthen the effects exerted by P2Y<sub>12</sub> antagonists: cangrelor or prasugrel metabolite. The comparative analysis of the inhibition of platelet aggregation caused by Cl-Ado, PSB 0777, MRE 0094, and UK 432097, in plasma and whole blood, indirectly suggests that the impact of blood cells (leukocytes, erythrocytes) on their effectiveness is negligible. The influence of whole plasma and of some plasma carrier proteins, on the adenosine derivative-dependent inhibition of ADP-induced platelet activation was assessed by flow cytometry, and on platelet adhesion to fibrinogen in response to ADP by a colorimetric method. The results revealed that plasma proteins remarkably diminished the effectiveness of Cl-Ado, PSB 0777, MRE 0094, UK 432097 inhibition of ADP-induced platelet activation. Moreover, platelet adhesion to fibrinogen was diminished more by MRE 0094, PSB 0777, and UK 432097 in the environment with a reduced concentration of plasma proteins compared to native plasma (statistically significant difference was observed for MRE 0094). To discover the nature of

these observations, the binding kinetics of the four studied AR agonists (PSB 0777, Cl-Ado, MRE 0094, UK 432097) to four well-known carrier proteins (albumin (HSA),  $\alpha_1$ -AGP, ApoA-1/HDL, ApoB-100/LDL) was employed using surface plasmon resonance (SPR). AR agonists were found to strongly bind to HSA (PSB 0777) and to the protein components of lipoproteins – apolipoproteins: ApoA-1 (MRE 0094) and ApoB-100 (MRE 0094 and UK 432097). In addition, HSA was shown to significantly reduce the effectiveness of PSB 0777 inhibition of platelet activation. Interestingly, a similar observation was obtained for cangrelor during further experiments. To determine whether PSB 0777 and cangrelor compete with one another for the binding to albumin, the strength and specificity of their interactions with HSA was characterized. Fluorescence spectroscopy, SPR and molecular modeling indicated that PSB 0777 and cangrelor interacted with HSA with moderate affinity ( $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). The binding of cangrelor to HSA involved primarily hydrophobic interactions, while the interaction of PSB 0777 with HSA was driven by hydrophobic and electrostatic forces. It was found that PSB 0777 and cangrelor do not share the same binding site on the protein.

In conclusion, we indicated that adenosine receptors expressed on the platelet surface are essential for the regulation of platelet functions and pointed out their importance as a potential target for antiplatelet therapy. We identified HSA and lipoproteins as relevant carriers for both adenosine derivatives and cangrelor. Our findings suggest that although the antiplatelet effect of PSB 0777 and cangrelor is weakened by the presence of plasma or HSA, the distribution and effectiveness of PSB 0777 and cangrelor, used in combination (in the case of dual-antiplatelet therapy), should not be altered, as these compounds interact with different subdomains within the structure of HSA.