



ZAKŁAD MEDYCyny REGENERACYJNEJ I IMMUNOREGULACJI  
UNIwersYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU  
Wydział Lekarski  
z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

Białystok, 01 sierpnia 2023

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych  
pt. „Rola receptorów P2X w procesach zasiedlania szpiku kostnego oraz farmakologicznej  
mobilizacji komórek macierzystych”  
autorstwa mgr Kamili Bujko  
realizowanej pod kierunkiem  
prof. dr hab. Magdaleny Kuci

Sygnalizacja purynergiczna to jedna z najstarszych ewolucyjnie ścieżek komunikacji komórkowej, w której pośredniczą nukleotydy i nukleozydy znajdujące się poza macierzą komórkową włączając w to m.in. adenosynotryfosforan (ATP), adenozyndifosforan (ADP) oraz urydynotryfosforan (UTP). Sygnalizacja purynergiczna odgrywa istotną rolę w przekazywaniu impulsów nerwowych i innych procesach fizjologicznych, ponadto pełni istotną rolę w warunkach patologicznych działając immunomobilizująco i prozapalnie. W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się roli sygnalizacji purynergicznej w regulacji procesów dojrzewania i różnicowania komórek macierzystych i progenitorowych, włączając w to procesy krwiotwórcze, dlatego tematyka badawcza podjęta przez Panią magister Kamilę Bujko jest niezwykle aktualna i interesująca.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została napisana w języku polskim i ma układ charakterystyczny dla dysertacji na stopień naukowy doktora, przygotowywanych w formie monografii. Na 137 stronach Doktorantka zawarła 11 rozdziałów obejmujących: wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, wnioski oraz piśmiennictwo. Dodatkowo Doktorantka załączyła kopie uzyskanych zgód komisji etycznych

oraz bioetycznych. Całość rozprawy poprzedza spis słów kluczowych (w języku polskim i angielskim), informacja o źródle finansowania badań (funduszy NCN projektu OPUS), lista publikacji naukowych i doniesień konferencyjnych, w których wykorzystano wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej. Należy zwrócić uwagę, że w dwóch pracach doktorantka jest odpowiednio pierwszym i równorzędnym pierwszym autorem, a w kolejnej jest współautorem wiodącym. Wszystkie prace zostały opublikowane w prestiżowych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, włączając w to czasopismo *Leukemia* (IF>11 pkt; 200 pkt MEIN), które jest jednym z najwyższej punktowanych czasopism w tematyce hematologicznej (pozycja 7/78 czasopism według bazy JCR).

Nawigację po dokumencie ułatwia czytelny spis treści, poszerzony o spis rycin i tabel. Część graficzna rozprawy to 31 starannie przygotowanych rycin oraz 2 tabele. Rozprawę czyta się bardzo dobrze, gdyż napisana jest poprawnie językowo i zrozumiale, co świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktorantki w podejmowanej tematyce.

Wstęp rozprawy obejmuje 28 stron maszynopisu i wprowadza czytelnika w najbardziej istotne zagadnienia związane z tematem badawczym. Doktorantka nakreśla w nim problematykę podejmowanej pracy, odnosząc się bezpośrednio do zagadnień poruszanych w części eksperymentalnej, co pozwala czytelnikowi lepiej zrozumieć cel podejmowanych badań. Świadczy to o dużej świadomości i dojrzałości naukowej mgr Kamili Bujko. Rozdział ten podzielony jest na 3 podrozdziały, a podrozdziały na dodatkowe sekcje. W podrozdziale 1 Doktorantka charakteryzuje krwiotwórcze komórki macierzyste oraz opisuje ich zastosowanie w terapii. Odnosi się bezpośrednio do ich fenotypu, jednocześnie tłumacząc w jaki sposób będzie charakteryzowała opisywane komórki w pracach doświadczalnych. W kolejnych sekcjach skupia się na scharakteryzowaniu nisz szpikowych oraz interakcji krwiotwórczych komórek macierzystych z poszczególnymi elementami niszy. W dalszej części opisuje naturalne mechanizmy kontrolujące migrację komórek ze szpiku kostnego, a także sposoby farmakologicznej mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych oraz proces zasiedlania szpiku kostnego przez krwiotwórcze komórki macierzyste po przeszczepie. W podrozdziale 2 mgr Bujko charakteryzuje sygnalizację purynergiczną. W sekcji poświęconej zewnątrzkomórkowym nukleotydom i nukleozydom purynowym opisuje szczegółowo rolę ATP w sygnalizacji komórkowej, ale również w aktywacji niezwykle istotnych mechanizmów odpornościowych, włączając w to aktywację inflammasomu NLRP3 odpowiedzialnego za dojrzewanie IL-1 $\beta$  oraz IL-18. W kolejnej sekcji Doktorantka charakteryzuje receptory

odpowiedzialne za sygnalizację purynergiczną. Podrozdział 3 wstępu stanowi podsumowanie aktualnego stanu wiedzy w zakresie roli sygnalizacji purynergicznej w układzie krwionośnym i w procesie krwiotworzenia. W pięciu podsekcjach mgr Bujko charakteryzuje rolę sygnalizacji purynergicznej w różnicowaniu krwiotwórczych komórek macierzystych, ich proliferacji, migracji, farmakologicznej mobilizacji, a także w procesie wszczepiania po przeszczepie oraz odnowie hematologicznej.

Cele pracy zostały jasno sprecyzowane w czterech punktach i obejmują: 1) Ocenę poziomu ekspresji receptorów purynergicznych na ludzkich oraz mysich krwiotwórczych komórkach macierzystych; 2) Ocenę roli receptorów purynergicznych P2X1 oraz P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych z wykorzystaniem dostępnych modeli zwierzęcych; 3) ocenę roli receptorów purynergicznych P2X1 oraz P2X4 w procesie zasiedlania szpiku oraz rekonstytucji hematologicznej po przeszczepie z wykorzystaniem dostępnych modeli zwierzęcych. 4) Określenie możliwych mechanizmów efektorowych zależnych od prawidłowego działania układu purynergicznego.

Rozdział „Materiały i Metody” stanowi opis materiału badawczego oraz metod analitycznych wykorzystywanych podczas realizacji projektu doktorskiego. Rozdział podobnie jak wstęp podzielony został na podrozdziały.

W podrozdziale 1 mgr Bujko opisuje zwierzęta laboratoryjne wykorzystane podczas realizacji projektu. Na przeprowadzenie eksperymentów Doktorantka uzyskała zgody właściwych dla miejsca realizacji badań komisji etycznych. W eksperymentach wykorzystano dzięki szczepy C57BL/6, szczepy myszy z rekombinacją homologiczną receptora P2X7 (B6.129P2-P2rx7<sup>tm1Gab</sup>) zakupione w The Jackson Laboratory. Dodatkowo w swoich badaniach mgr Bujko wykorzystywała myszy z rekombinacją homologiczną receptora P2X4, które otrzymała z laboratorium prof. Daryla L. Davisa (University of Southern California). Nieznane jest jednak tło genetyczne myszy z rekombinacją homologiczną receptora P2X4. Doktorantka nie podaje również, czy w eksperymentach wykorzystywane były zwierzęta obu płci, czy tylko jednej. W podrozdziale 2 scharakteryzowano wykorzystywane związki chemiczne oraz inhibitory. Następnie Doktorantka opisała metody farmakologicznej mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych z wykorzystaniem G-CSF oraz AMD 3100. W kolejnym podrozdziale opisano ocenę efektywności procesu mobilizacji. W swoich badaniach Doktorantka wykorzystywała metodę cytometrii przepływowej w celu analizy komórek o fenotypie Sca1+c-Kit+Lin-. Nie jest jednak jasne w jaki sposób prowadzono analizę danych,

dlatego proszę o uzupełnienie informacji na temat wykorzystanego oprogramowania oraz sposobu bramkowania (m.in. czy prowadzona była dyskryminacja dubletów, dyskryminacja martwych komórek, jaki rodzaj kontroli barwienia zastosowano w celu odróżniania sygnału pozytywnego od negatywnego/tła/autofluorescencji). Dobrym zwyczajem jest również prezentacja przykładowych cytogramów przeprowadzonych analiz obrazujących sposób bramkowania z uwzględnieniem zastosowanych kontroli barwienia. Uwagi te dotyczą wszystkich przeprowadzonych analiz cytometrycznych oraz cytometrycznego sortowania komórek.

W kolejnych podrozdziałach mgr Bujko opisała metody oceny potencjału klonalnego, oceny wydajności procesu wszczepiania się krwiotwórczych komórek macierzystych, oceny wydajności procesu zasiedlania niszy szpikowej, oceny skuteczności procesu odnowy układu krwiotwórczego, a także wykonanych testów chemotaktycznych. W podrozdziale 12 znalazł się opis metody wykorzystywanej do analizy procesu migracji krwiotwórczych komórek macierzystych. Doktorantka wykorzystała mikroskop konfokalny oraz oprogramowanie ImageJ w celu analizy migracji komórek. Opis ten w ojej ocenie wymaga doprecyzowania, dlatego proszę o informację: 1) Czy komórki barwiono fluorescencyjnie przed analizą konfokalną? Jeśli tak, to w jaki sposób.;2) Zgodnie z opisem komórki inkubowano przez 30 minut ze stymulatorami (SDF-1, ATP oraz ATP + PSB 12054) w warunkach normalnych, a zdjęcia były wykonywane w odstępach 45-sekundowych. Łącznie wykonano 80 zdjęć. Z prostych obliczeń wynika, że analiza trwała 60 min, a nie 30min. Czy komórki ekspozowane były w trakcie całej analizy czy „prestymulowane”?; 3) Nie jest jasne w jaki sposób wykonano analizę zebranych danych w oprogramowaniu ImageJ (MTrack). W jaki sposób normalizowano dane pod względem liczby komórek, gęstości, rejonu szalki, etc.?; 4) Jaka była żywotność komórek po stymulacji ATP i jaki mogło mieć to wpływ na uzyskiwane wyniki? Czy ulegały one pyroptozie?

W kolejnych rozdziałach Doktorantka opisała metody wykorzystywane do oceny adhezji komórek, ilościowego PCR, izolacji ludzkich i mysich krwiotwórczych komórek macierzystych, analizy aktywacji inflammasomu, oraz wykorzystanych metod statystycznych.

Przedstawione opisy wykorzystanych materiałów i użytych metod nie budzą wątpliwości, są w przeważającej większości są szczegółowe i umożliwiają ich odtworzenie w razie potrzeby. Chciałbym jednak zaznaczyć, że pojawiające się w tej części recenzji pytania nie stanowią zarzutów merytorycznych, są jedynie prośbą o uzupełnienie opisów. Niezwykle

szeroki wachlarz zaawansowanych metod badawczych oraz odpowiedni ich dobór świadczą o doskonałym przygotowaniu Doktorantki do pracy laboratoryjnej oraz jej samodzielności w prowadzeniu badań eksperymentalnych.

Rozdział „Wyniki” składa się z 3 podrozdziałów podzielonych na sekcje, w których Doktorantka przedstawia rezultaty przeprowadzonych analiz laboratoryjnych.

Podrozdział pierwszy stanowi opis wyników oceny ekspresji receptorów P2X w analizowanych komórkach. Doktorantka zauważa, że ludzkie krwiotwórcze komórki macierzyste posiadają wyższą ekspresję receptorów P2X1, P2X4 oraz P2X7 w porównaniu do ludzkich komórek jednojądrzastych (MKC). Podobne wyniki można zaobserwować na rycinie 8 w komórkach mysich. Obserwacje te nie zostały jednak poparte analizą statystyczną. Interesujące byłoby również potwierdzenie zaobserwowanych różnic na poziomie białka.

Na podstawie przeprowadzonych analiz i w oparciu o dane literaturowe w dalszej części badań do oceny funkcjonalnej mgr Bujko wybrała receptory P2X4 (wyniki analiz opisano w podrozdziale 2) oraz P2X1 (wyniki analiz opisano w podrozdziale 3).

Doktorantka wykazała, że P2X4 wpływa w sposób istotny na potencjał migracyjny mysich komórek jednojądrzastych szpiku kostnego. Komórki z rekombinacją homologiczną receptora P2X4 wykazywały obniżoną zdolność migracji w kierunku czynników chemotaktycznych w porównaniu do komórek izolowanych z dzikich szczepów. Co ciekawe, również zastosowanie selektywnego inhibitora receptora P2X4 (PSB 12054) powodowało obniżenie migracji komórek stymulowanych ATP. Podobne wyniki zaobserwowano po zastosowaniu selektywnego inhibitora P2X1 (NF449). Dodatkowo badania z wykorzystaniem NF449 zostały poszerzone o test adhezji. Doktorantka wykazała, że zahamowanie aktywności P2X1 powoduje wzrost adhezji krwiotwórczych komórek macierzystych do fibronektyny. W mojej ocenie ciekawe byłoby również określenie roli P2X4 w tym procesie oraz bezpośrednie porównanie efektywności obu strategii blokujących.

W kolejnym etapie przeprowadzonych badań Doktorantka oceniała znaczenie sygnalizacji P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych z wykorzystaniem (G-CSF oraz antagonisty receptora CXCR4 – AMD3100). W tych doświadczeniach nie wykorzystano jednak myszy z rekombinacją homologiczną receptora P2X4, a blokowanie aktywności tego receptora uzyskiwano poprzez zastosowanie selektywnego inhibitora PSB 12054. Podobnie w badaniach nad rolą P2X1 wykorzystano jego

inhibitor NF449. Zastanawiające jest co było przyczyną zmiany podejścia do modelu eksperymentalnego w zakresie analiz aktywności P2X4? Proszę również o informacje czy sprawdzano skuteczność stosowanych inhibitorów. Czy ich podanie całkowicie znosiło aktywności receptorów, czy jedynie ograniczało przekąźnictwo purynergiczne indukowane przy ich udziale? Jak trwały był ten efekt? Z uwagi na obowiązek recenzenta muszę również zwrócić uwagę, że Doktorantka podczas opisu wyników używa sformułowania, które może sugerować, że zastosowanie Inhibitora wybranych receptorów PTX hamuje ich ekspresję. W mojej ocenie jest to zbyt duży skrót myślowy, jako że opisywane związki działają jako antagoniści receptorów, do których mają powinowactwo blokując ich aktywność, a nie ekspresję.

Uzyskane wyniki wskazują, że zahamowanie przekąźnictwa purynergicznego poprzez zastosowanie selektywnego Inhibitora receptora P2X4 lub P2X1 w sposób istotny obniża wydajność farmakologicznej mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych indukowaną G-CSF oraz AMD3100. Ciekawe byłoby bezpośrednie porównanie efektywności blokowania obu receptorów w badanym procesie.

Doktorantka potwierdziła wcześniej opublikowane obserwacje, że zahamowanie sygnalizacji purynergicznej zachodzącej przez P2X7 istotnie upośledzało proces mobilizacji indukowany przez G-CSF, ale nie AMD 3100. Zauważyła również, że dodanie inhibitora P2X4 do zwierząt z rekombinacją homologiczną receptora P2X7 powoduje obniżenie efektywności mobilizacji indukowanej obu czynnikami, wykazując kluczowe znaczenie P2X4 w procesie mobilizacji farmakologicznej wywołanej AMD3100. Eksperymenty te nie zostały jednak przeprowadzone w odniesieniu do roli P2X1.

W kolejnym etapie przeprowadzonych prac doświadczalnych doktorantka wykazała, że zahamowanie aktywności receptora P2X4 lub P2X1 w sposób istotny ogranicza wszczepianie i zasiedlania niszy szpikowej oraz odnowę hematologiczną po przeszczepie krwiotwórczych komórek macierzystych. W ostatnim etapie prowadzonych badań mgr Bujko wykazała, że zablokowanie sygnalizacji purynergicznej zachodzącej przez receptor P2X1 w sposób istotny ogranicza aktywację inflamasomu aktywowanego ATP. Ponownie niezwykle ciekawe byłoby bezpośrednie porównanie efektu blokowania sygnalizacji zachodzącej przez P2X4 oraz P2X1 na analizowane procesy.

Wyniki zostały omówione w szerokiej i krytycznej dyskusji opartej o współczesne, dobrze dobrane piśmiennictwo. Rozdział ten został podzielony na 7 sekcji, które odnoszą się

bezpośrednio do wyników wykonanych analiz laboratoryjnych. Przeprowadzona dyskusja świadczy o dużej wiedzy Pani mgr Kamili Bujko, jej dojrzałości naukowej oraz krytycznym podejściu do uzyskanych wyników.

Pracę podsumowuje 5 wniosków. Niestety w tym miejscu muszę zwrócić uwagę na wniosek 3, w którym doktorantka sugeruje, że: „Inhibitory receptorów P2X1 oraz P2X4 mogą znaleźć zastosowanie w transplantologii hematologicznej poprawiając efektywność procesu farmakologicznej mobilizacji i wszczepiania komórek po przeszczepianiu”. W pracy jednoznacznie wykazano, że zniesienie aktywności obu w/w receptorów poprzez zastosowanie specyficznych inhibitorów zmniejszało efektywność farmakologicznej mobilizacji komórek, a także wszczepiania komórek. Doktorantka zwraca na to uwagę również w rozdziale „Podsumowanie” poprzedzającym „Wnioski”. Proszę o wyjaśnienie. Ponadto wniosek 5 w którym doktorantka stwierdza, że „Rodzina receptorów P2X charakteryzuje się dużym stopniem wzajemnej kompensacji w przypadku blokady działania receptorów P2X1 i P2X4” wydaje się nie być bezpośrednio potwierdzona przez zaprezentowane dane. W rozdziale podsumowanie, mgr Bujko stwierdza, że „Wyniki farmakologicznej mobilizacji z wykorzystaniem czynników G-CSF oraz AMD3100 wykazały, że zablokowanie prawidłowej funkcji receptorów P2X1 oraz P2X4 z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów powodowało znaczące upośledzenie tego procesu co wskazuje, iż brak aktywnego receptora P2X1 lub P2X4 nie jest w pełni kompensowany poprzez inne receptory.” Proszę o komentarz do mojej uwagi.

Pozostałe wnioski są trafnie sformułowane i poparte uzyskanymi wynikami przeprowadzonych przez Doktorantkę badań.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem niezwykle ciekawym, aktualnym, oryginalnym i inspirującym do dalszych badań. Wskazane w recenzji nieliczne uwagi, które wymagają jedynie doprecyzowania, nie wpływają na jakość merytoryczną uzyskanych wyników, które oceniam bardzo wysoko.

Niniejszym stwierdzam, iż przygotowana przez Panią mgr Kamilę Bujko rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wnoszę więc do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Kamili Bujko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z uwagi na oryginalność przeprowadzonych badań, ich szeroki zakres metodyczny oraz wkład doktorantki

w opublikowane prace naukowe wykorzystujące uzyskane przez doktorantkę wyniki składam  
wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Białystok, 01.08.2023

dr hab. Andrzej Eljaszewicz

