



*Akceptuję
H. B.*

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Dr hab. n. med. Edyta Paczkowska
Zakład Patologii Ogólnej
Katedra Fizjopatologii
Klinika Hematologii z Oddziałem Transplantacji Szpiku
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 1
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Al. Powstańców Wlkp. 72
70-111 Szczecin

Szczecin, 29.06.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk medycznych

mgr Kamili Bujko

pt. „Rola receptorów P2X w procesach zasiedlania szpiku kostnego oraz farmakologicznej mobilizacji komórek macierzystych” wykonanej w Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny Stem Cell Institute, James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Magdaleny Kuci.

Mobilizacja krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) jest w ośrodkach transplantacyjnych powszechnie stosowaną metodą zmierzającą do pobrania krwiotwórczych komórek macierzystych celem przeprowadzenia przeszczepienia. W przypadku przeszczepień autologicznych KKM pobierane są od pacjentów, nie od zdrowych dawców, w związku z tym u dość licznej grupy występują problemy ze skuteczną kolekcją komórek. Proces krwiotworzenia oraz patofizjologiczne mechanizmy regulujące funkcję niszy hematologicznych są niezwykle skomplikowane. Dane pochodzące z badań doświadczalnych wskazują również na udział ATP w regulacji procesu krwiotworzenia. Jednak pomimo znaczącego postępu w medycynie, wiele mechanizmów sygnałowania purynergicznego, które są w ten proces włączone, pozostaje nieodkrytych i ich zbadanie oraz ewentualne wykorzystanie stanowi stale wyzwanie dla badaczy. Tematyka przedstawionej mi rozprawy doktorskiej związana jest właśnie z mobilizacją, zasiedleniem szpiku oraz rekonstytucją hematopojezy przez KKM.

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie potencjalnego znaczenia wybranych receptorów P2X w wyżej wymienionych procesach, związanych ściśle z towarzyszącym terapii



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

klinicznym wykorzystaniem KKM. Doktorantka podjęła się wyjaśnienia tego zagadnienia w świetle wyników dotychczas przeprowadzonych badań, określających rolę ATP w procesie krwiotworzenia oraz udział sygnalowania purynergicznego, a przede wszystkim rolę receptora P2X w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM, zasiedlania szpiku oraz rekonstytucji hematologicznej.

Celem rozprawy doktorskiej była ocena poziomu ekspresji receptorów purynergicznych na ludzkich oraz mysich KKM. Następnie po wstępnej analizie profilu ekspresji receptorów P2X, na podstawie uzyskanych wyników, **analiza roli wybranych receptorów, P2X1 i P2X4, w procesie farmakologicznej mobilizacji w modelach zwierzęcych.** W końcu ocena **roli tych receptorów purynergicznych w procesie zasiedlania szpiku oraz rekonstytucji hematologicznej po przeszczepieniu KKM z wykorzystaniem modeli zwierzęcych.** Ponadto Doktorantka za cel obrała sobie określenie możliwych **mechanizmów efektorowych** zależnych od prawidłowego działania układu purynergicznego. **Uważam przedstawione cele pracy doktorskiej za prawidłowo skonstruowane oraz istotne z punktu widzenia poznawczego i prawdopodobnie również klinicznego.**

Praca doktorska została przygotowana w standardowym dla tego typu prac układzie, a mianowicie zawiera streszczenie, wstęp, część opisującą cele, materiał i metody oraz wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski. Cała praca liczy 131 stron, 31 rycin i 2 tabele oraz wykaz skrótów. Do jej przygotowania wykorzystano imponującą liczbę 276 pozycji literaturowych, zawierających dane dotyczące przedmiotu badań w tym wiele najbardziej aktualnych pozycji. Praca napisana jest poprawnie językowo, staranną polszczyzną oraz przygotowana z dużą starannością pod względem edytorskim. Niewiele jest błędów literowych czy interpunkcyjnych, trudno jest ich się całkowicie ustrzec w tak obszernym opracowaniu. Moja uwaga jako recenzenta dotyczy stosowania przez Doktorantkę określenia „przeszczep” w znaczeniu czynności, procedury. Określenie to powinno być zamienione na „przeszczepienie” lub „transplantację”. Słowo „przeszczep” odnosi się natomiast do materiału przeszczepianego, organu lub komórek. Podobna uwaga dotyczy określenia „układ kardiologiczny”, warto je zmienić na układ sercowo-naczyniowy, czy „leukoforeza”, gdy chodzi o leukaferozę. Ponadto daje się zauważyć trochę nieścisłości dotyczących zagadnień ściśle klinicznych, np. konsekwencją GVHD nie jest odrzucenie przeszczepu, ale zaznaczyć należy, że zagadnienia te



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

są bardzo specjalistyczne. Pragnę jednak podkreślić, że uwagi te nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną pracy.

Wstęp obejmuje całą poruszaną w trakcie analizy tematykę, został napisany bardzo przejrzysto ze znajomością tematu, wzbogacony schematami, świetnie ilustrującymi poruszane zagadnienia i ułatwiającymi zrozumienie tematu. Metodyka została dokładnie opisana w pracy, a analiza statystyczna została przeprowadzana za pomocą odpowiednich testów. Badania opisane w tej części przez Doktorantkę zostały zaplanowane chronologicznie, co świadczy o dobrym warsztacie badawczym. W ocenie recenzenta warty docenienia jest również fakt zaprojektowania doświadczeń z zastosowaniem specyficznych inhibitorów sygnałowania, co pozwoliło ocenić rzeczywisty udział analizowanych ścieżek sygnałowych w badanym procesie. Wyniki przedstawione są w postaci rycin i opisane w sposób przejrzysty. Dyskusja jest bogata i została napisana w sposób, który świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu. Doktorantka swobodnie omawia swoje wyniki w kontekście wcześniej publikowanych danych. Wyniki, które uzyskała to dane poszerzające naszą wiedzę i dające lepszy wgląd w skomplikowane mechanizmy fizjologiczne i patofizjologiczne. Jednocześnie Doktorantka jest świadoma obszarów i zagadnień, które wymagają wyjaśnienia oraz ograniczeń zastosowania modeli zwierzęcych i potrzeby potwierdzenia pewnych mechanizmów w warunkach klinicznych. Na uwagę zasługuje szeroki warsztat badawczy, którym wykazała się Doktorantka.

Na podstawie uzyskanych wyników badań sformułowała pięć wniosków, które są odpowiedzią na wyznaczone cele badawcze. Są one następujące:

1. Receptory P2X regulują ludzką hematopoezę. Potwierdza to wysoka ekspresja receptorów P2X1, P2X4 oraz P2X7 na KKM izolowanych z krwi pępowinowej.
2. Receptory purynergiczne P2X1 i P2X4 zwiększają migrację KKM do głównych czynników chemotaktycznych (SDF-1, ATP oraz S1P).
3. Inhibitory receptorów P2X1 oraz P2X4 mogą znaleźć zastosowanie w transplantologii hematologicznej poprawiając efektywność procesu farmakologicznej mobilizacji i wszczepienia komórek po przeszczepieniu.
4. Receptory P2X są receptorami sygnalizującymi w KKM, biorącymi udział w przekazywaniu informacji z pozakomórkowego ATP na aktywację kompleksu inflammasomu Nlrp3.



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

5. Rodzina receptorów P2X charakteryzuje się dużym stopniem wzajemnej kompensacji w przypadku blokady działania receptorów P2X1 i P2X4.

Stanowią one logiczne podsumowanie uzyskanych wyników i wyczerpującą odpowiedź dla postawionych przez doktorantkę celów pracy.

W podsumowaniu Doktorantka stwierdza, że uzyskane wyniki znacząco zwiększają poziom wiedzy o roli sygnałowania purynergicznego w regulacji migracji KKM oraz ich retencji w niszy szpikowej, a wykazanie znaczenia receptorów P2X1 oraz P2X4 może zostać wykorzystane do optymalizacji protokołów klinicznych, dla pacjentów poddawanych mobilizacji, gdzie wytypowanie mutacji w genach kodujących receptory purynergiczne będzie wskazówką do zastosowania niestandardowych procedur mobilizujących KKM. Oczywiście droga do takiego postępowania jest jeszcze daleka, ale badania stanowią pewne wskazówki mogące w przyszłości pomóc w rozwiązywaniu problemów klinicznych.

Podsumowując stwierdzam, że praca została napisana z bardzo dobrą znajomością omawianych tematów. Zagadnienia w niej zaprezentowane z całą pewnością wymagały żmudnej i skrupulatnej pracy badawczej, pozyskania doskonałego warsztatu z zakresu badań molekularnych, obrazowania i innych. Uzyskane wyniki mają aspekt teoretyczny, jednak niewykluczone jest, że będą miały również implikacje praktyczne w klinice. Jest to praca wykonana na modelach zwierzęcych i bardzo starannie zaplanowana.

Wyniki badań w ramach rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w czasopiśmie z Impact Factor, w dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem:

1. Bujko K, Adamiak M, Iłowska N, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. A novel evidence that the P2X1 purinergic receptor – Nlrp3 inflammasome axis orchestrates optimal trafficking of hematopoietic stem progenitors cells (HSPCs). *Folia Histochem Cytobiol.* 2022; 60(3):280-290
2. Adamiak M*, Bujko K*, Thapa A, Pensato V, Brzezniakiewicz-Janus K, Ratajczak J, Davies DL, Ulrich H, Kucia M, Ratajczak MZ. The P2X4 purinergic receptor has emerged as a potent regulator of hematopoietic stem/progenitor cell mobilization and homing-a novel view of P2X4 and P2X7 receptor interaction in orchestrating stem cell trafficking. *Leukemia.* 2022; 36(1):248-256. *contributed equally

W kolejnych dwóch jest współautorem:

1. Ratajczak MZ, Adamiak M, Bujko K, Thapa A, Pensato V, Kucia M, Ratajczak J, Ulrich H. Innate immunity orchestrates the mobilization and homing of hematopoietic



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

stem/progenitor cells by engaging purinergic signaling - an update. Purinergic Signal. 2020; 16(2):153-166.

2. Adamiak M, Bujko K, Cymer M, Plonka M, Glaser T, Kucia M, Ratajczak J, Ulrich H, Abdel-Latif A, Ratajczak MZ. Novel evidence that extracellular nucleotides and purinergic signaling induce innate immunity-mediated mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. Leukemia. 2019; 32(9):1920-1931.

Ten fakt przemawia za wysoką jakością prowadzonych badań i istotnym znaczeniem uzyskanych wyników oraz sformułowanych wniosków.

W podsumowaniu stwierdzam, że 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) i mam przyjemność przedłożyć Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Kamili Bujko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy. Wniosek o wyróżnienie uzasadniam faktem podjęcia się przez Doktorantkę wyjaśnienia stosunkowo mało poznanego zagadnienia, wnikliwym podejściem do problemu, zastosowaniem różnorodnych technik w tym nowoczesnych metod molekularnych oraz opublikowaniem wyników w recenzowanych czasopismach o wysokim wskaźniku oddziaływania.

Christa Paulonke

