



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Kierownik Zakładu Badań Ultrastrukturalnych
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolów

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Komorowskiego pt. „*Ekspresja i potencjalne znaczenie receptorów purynergiczných P2X7 w liniach komórek endometrialnych*”

Endometrioza jest estrogenozależną, przewlekłą chorobą zapalną, a jej istotą jest występowanie tkanki o budowie zbliżonej do endometrium w lokalizacji innej niż jama macicy. Ogniska ektopowego endometrium najczęściej umiejscawiają się w jajnikach, otrzewnej, przestrzeni pochwowo-odbytniczej, ale także poza miednicą małą, np. w bliznach po cięciu cesarskim, jelitach, płucach czy mózgu. Choroba ta dotyka ok. 10% światowej populacji kobiet w wieku rozrodczym, a wśród kobiet cierpiących z powodu niepłodności wzrasta do 50%. W Polsce na endometriozę choruje ok. 3 mln kobiet. Endometrioza jest wynikiem złożonego oddziaływania wielu czynników genetycznych, epigenetycznych i środowiskowych, które wspólnie przyczyniają się do rozwoju tej choroby. Do najistotniejszych z nich należą uwarunkowania genetyczne oraz obecność chorób o podłożu immunologicznym.

Rak endometrium (trzonu macicy) jest najczęstszym nowotworem narządów płciowych kobiet. W Polsce rak endometrium jest obecnie trzecim pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym kobiet. Wg danych z Krajowego Rejestru Nowotworów szczyt zachorowań przypada w wieku okołomenopauzalnym między 55. a 70. rokiem życia, z czego 93% zachorowań stwierdza się u kobiet w wieku powyżej 50. roku życia, a ponad 70% dotyczy kobiet w wieku 60 lat i starszych. Liczba zachorowań powoli, ale systematycznie się zwiększa i obecnie tak trzonu macicy zajmuje 5. miejsce pod względem zachorowalności i 7. miejsce pod względem umieralności w klasyfikacji nowotworowych przyczyn zgonów u kobiet.

Receptory purynergiczne P2X₇, są jednym z siedmiu poznanych podtypów receptorów P2X, a ich naturalnymi agonistami są zewnątrzkomórkowa adenozyina i jej pochodne, w tym ATP. Obecność receptorów purynergicznych stwierdzono na powierzchni wielu komórek ludzkiego organizmu, a liczne badania pozwoliły na poznanie zasad sygnalizacji purynergicznej. Unikalne właściwości receptora P2X₇ powodują, że pełni on rolę swoistego czujnika stresu tkankowego, aktywowanego w warunkach podwyższonego stężenia ATP, typowego dla procesów martwicy, zapalenia i nowotworzenia. Zakres biologicznych efektów receptora P2X₇ zależy od stopnia i czasu ich aktywacji. Umiarkowane pobudzenie sprzyja procesom proliferacyjnym i proangiogennym, wspierając przeżycie komórek oraz ich adaptację do środowiska o podwyższonym stężeniu ATP. Z kolei silna i przedłużona stymulacja prowadzi do formowania tzw. dużego poru w błonie komórkowej, utraty homeostazy jonowej i aktywacji szlaków śmierci komórkowej. Ta dwoistość działania sprawia, że P2X₇R jest białkiem o efektach silnie zależnych od warunków biologicznych, łączących funkcje wspierające proliferację i przeżycie z mechanizmami cytotoksycznymi.

W licznych badaniach wykazano, że zmiany ekspresji tych receptorów odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu schorzeń, w tym m. in. neurodegeneracyjnych, układu krwionośnego, pokarmowego, immunologicznego, moczowo-płciowego oraz skóry i kości. Ponadto, poznanie mechanizmów sygnalizacji purynergicznej umożliwiło stworzenie i wprowadzenie na rynek nowych leków, modulujących aktywność receptorów, jak dotąd w leczeniu chorób ośrodkowego układu nerwowego.

Mimo rosnącego zainteresowania rolą sygnalizacji purynergicznej w patogenezie chorób zapalnych i nowotworowych, udział receptora P2X₇ w endometriozie pozostaje stosunkowo słabo poznany. Z kolei dotychczasowe badania wskazują, że w raku endometrium dochodzi do istotnej redukcji poziomu funkcjonalnego receptora P2X₇.

Celem ocenianej rozprawy doktorskiej była ocena ekspresji, lokalizacji i funkcjonalnej aktywności receptora P2X₇ w dwóch liniach komórkowych: endometriozy oraz gruczolakoraka endometrium. Dodatkowo, w ocenianej pracy był badany wpływ aktywacji P2X₇R na proliferację oraz ekspresję cytokin.

Dysertacja posiada układ typowy dla prac doktorskich w formie monografii i obejmuje 105 stron. Jest podzielona na 11 klasycznych rozdziałów, zawierających: spis rycin i tabel, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody badawcze, wyniki, dyskusję, podsumowanie wyników i wnioski oraz 221 pozycji aktualnego, dobrze dobranego

piśmiennictwa. Dodatkowym atutem jest umieszczenie na wstępie pracy rozdziału wykazu stosowanych skrótów, co niewątpliwie ułatwia czytanie i zrozumienie pracy doktorskiej.

We wstępie Autor wprowadza czytelnika w zagadnienia będące podstawą założeń ocenianej pracy. W tym rozdziale szczegółowo opisano budowę macicy, ze szczególnym podkreśleniem budowy, fizjologii oraz najczęstszych chorób endometrium. W kolejnej części tego rozdziału Doktorant przedstawił aktualną wiedzę na temat receptorów purynergicznych, ich fizjologicznej roli oraz udziału w patomechanizmie wielu chorób, w tym w schorzeniach endometrium. Jestem pod wrażeniem wiedzy Doktoranta i szczegółowej analizy piśmiennictwa na ten temat. Należy podkreślić bardzo przystępny i zwięzły sposób opisu zagadnień we „Wstępie”, co czyni go rozdziałem nie tylko wprowadzającym ale również swoistym kompendium wiedzy na temat badanych zagadnień.

Zasadnicze eksperymenty przeprowadzono na dwóch ludzkich liniach komórkowych, linii 12Z, unieśmiertelnionej linii komórkowej wyprowadzonej z otrzewnowego ogniska endometriozy oraz linii Ishikawa, linii wywodzącej się z dobrze zróżnicowanego gruczolakoraka endometrium. Do realizacji zamierzonych celów Doktorant stosował odpowiednie, nowoczesne techniki badawcze, gwarantujące rzetelność i powtarzalność otrzymanych wyników. Za pomocą metody ilościowego RT-PCR wykazał wyższą ekspresję genu receptora P2X7 w komórkach linii endometriozy w porównaniu do komórek linii gruczolakoraka endometrium. Obecność receptora P2X7 na poziomie białka została potwierdzona w obu liniach z zastosowaniem metody Western blot. To badanie mogłoby zostać poszerzone o analizę densytometryczną dla porównania półilościowego poziomu białka P2X7 w komórkach badanych linii. Dodatkowo, mgr Michał Komorowski stwierdził przy użyciu metody immunofluorescencyjnej, że badane białko jest zlokalizowane głównie w błonach komórkowych komórek obu linii. Mam w tym miejscu uwagę dotyczącą braku opisu metody immunofluorescencyjnej w rozdziale „Materiały i Metody”. Kolejne etapy badań obejmowały analizę funkcjonalną receptora P2X7 za pomocą pomiaru wewnątrzkomórkowego napływu jonów Ca^{2+} oraz formowania tzw. „dużego poru” (wychwytu barwnika fluorescencyjnego YO-PRO-1). Stymulacja receptora P2X7 jego specyficznym agonistą – BzATP wykazała gwałtowny wzrost poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+} , a jego hamowanie selektywnym antagonistą P2X7 – A438079 wyraźnie blokowało tę odpowiedź, co pozwoliło wykazać udział tego receptora w intensyfikacji metabolizmu komórkowego. Dodatkowo, aktywacja receptora P2X7 agonistą BzATP wpływała hamująco na proliferację badanych komórek zależnie od dawki i czasu inkubacji. Ważną obserwacją było wykazanie przez Autora, że mechanizm regulacyjny receptora P2X7 jest zależny od stężenia ligandu oraz czasu trwania stymulacji. Doktorant wykazał również, że aktywacja receptora P2X7 miała wpływ na profil

ekspresji genów cytokin prozapalnych *IL1A*, *TNF* i *TGFB1* w sposób zależny od typu komórek, dawki i czasu. Natomiast badania nad wpływem cytokin na ekspresję genu *P2RX7* wykazały, że *IL-1α* zwiększała a *TGF-β1* obniżał poziom *P2RX7* jedynie w komórkach linii endometrium, natomiast w komórkach raka endometrium nie wywołał tego efektu. Z kolei stymulacja komórek agonistą BzATP prowadziła do niewielkich zmian w profilu cytokinowym – obserwowano wzrost ekspresji genów *IL1A* i *TNF* jedynie w komórkach linii 12Z, a ekspresja *TGFB1* pozostawała niezmienną. Wskazuje to na obustronną regulację: z jednej strony cytokiny modulują ekspresję receptora, a z drugiej receptor *P2X7* wpływa na profil cytokinowy komórek endometrium.

Wyniki badań Doktoranta wskazują, że receptor *P2X7* jest obecny i funkcjonalny w badanych liniach endometrialnych, jednak jego poziom i aktywność różnią się pomiędzy komórkami linii endometriozy a komórkami raka endometrium.

„Dyskusja” jest podsumowaniem otrzymanych rezultatów i ich porównaniem z wynikami innych autorów. Z reguły ta część rozprawy jest zawsze najtrudniejsza do napisania. W przypadku ocenianej rozprawy doktorskiej ten rozdział jest napisany poprawnie mimo, że Autor nie uniknął błędów powtórzeń i ponownego opisywania w nim otrzymanych wyników. Chciałabym również podkreślić niezwykle w tego typu pracach, krytyczne podejście do prowadzonych przez siebie badań. Mgr Michała Komorowski w swoich badaniach wykazał, że receptor *P2X7* pełni odmienne role, w zależności od rodzaju linii, w komórkach linii endometriozy sprzyja odpowiedzi zapalnej i ogranicza proliferację przy silnej aktywacji, natomiast w komórkach raka endometrium jego cytotoksyczny potencjał jest ograniczony. Wyniki podkreślają dualny charakter *P2X7* i jego znaczenie w chorobach endometrium.

Podsumowując, Doktorant przedstawił siedem wniosków, spośród których część jest poprawnie sformułowanych, stanowiących pełną odpowiedź na wcześniej postawione cele i krytycznie interpretujących otrzymane wyniki badań. Jedynie zastrzeżenie mam do wniosku nr 1, 2, 3 i 4 oraz 6, które są raczej powtórzeniem osiągniętych wyników. Pozostałe wnioski oraz wnioski ogólne są sformułowane prawidłowo.

Przedstawione przeze mnie nieliczne uwagi krytyczne nie obniżają merytorycznej wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Mając na uwadze powyżej zawarty tekst recenzji oraz będąc przekonaną, że mgr Michał Komorowski na podstawie ocenianej rozprawy doktorskiej oraz pozostałych wymaganych ustawowo kryteriów, spełnia wymogi do nadania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauki medyczne. 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 wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o nadanie Jego Osobie stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Wrocław, 12.01.2026 r.

