



**Uczelnia Medyczna
im. Marii Skłodowskiej Curie w Warszawie
Pl. Żelaznej Bramy 10, 00-136 Warszawa**

Prof. dr hab. n. med. inż. Patrycja Kleczkowska

Współczesne badania biologii komórki i biologii molekularnej coraz częściej koncentrują się na poznawaniu nowych aktywności biologicznych receptorów już znanych, a nie na odkrywaniu zupełnie nowych cząsteczek. Utrwalone przekonanie, że funkcje receptorów są jednoznacznie określone, ustępuje miejsca pogładowi, że ich aktywność jest silnie zależna od kontekstu komórkowego, warunków środowiskowych oraz współdziałania z różnymi partnerami sygnałowymi. W rezultacie wiele z receptorów zyskuje – niejako – swoje „drugie życie”: ujawnia nieznane dotąd role w odmiennych tkankach, układach czy procesach patologicznych. Zrozumienie tych niuansów funkcjonalnych pozwala nie tylko lepiej poznać biologię komórki, ale także wskazać nowe kierunki terapeutycznego wykorzystania receptorów, których klasyczne znaczenie wydawało się już dobrze opisane.

Szczególnym przykładem takiego receptorowego „renesansu” są receptory purynergiczne – wyspecjalizowane białka błonowe reagujące na obecność pozakomórkowych nukleotydów, głównie ATP, które pełnią rolę istotnych sygnałów międzykomórkowych. ATP, tradycyjnie kojarzony z wewnątrzkomórkowym nośnikiem energii, poza komórką staje się cząsteczką informacyjną – mediatorem

stresu, uszkodzenia tkanek czy aktywacji immunologicznej. Receptory purynergiczne uczestniczą w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych, obejmujących regulację proliferacji, różnicowania, migracji komórek, a także modulację reakcji zapalnych.

Interesujący w tej rodzinie jest receptor P2X7 – jonotropowy kanał aktywowany przez ATP, którego aktywność wiąże się zarówno z regulacją przeżycia, jak i śmierci komórek. W zależności od intensywności i czasu trwania stymulacji, P2X7 może inicjować odmienne szlaki sygnałowe – od wspierających proliferację po prowadzące do apoptozy czy nekrozy. Ta funkcjonalna wieloznaczność sprawia, że receptor P2X7 budzi duże zainteresowanie w kontekście fizjologii komórek skóry, jak również procesów nowotworowych, w których równowaga między proliferacją a śmiercią komórek zostaje zachwiana.

Skóra, będąca złożonym układem wielu typów komórek – keratynocytów, melanocytów i fibroblastów – stanowi doskonały model do badań nad zróżnicowaną ekspresją receptorów i ich potencjalnymi funkcjami. W szczególności melanocyty, odpowiedzialne za produkcję melaniny i ochronę przed promieniowaniem UV, są komórkami silnie reagującymi na sygnały środowiskowe i stres oksydacyjny, co czyni je podatnymi na zaburzenia w regulacji szlaków sygnalizacyjnych. Porównanie ich z komórkami czerniaka, nowotworu wywodzącego się z tej samej linii komórkowej, pozwala uchwycić subtelne różnice w ekspresji receptorów i sposobach reakcji na bodźce zewnętrzne.

W tym kontekście niezwykle istotne stają się badania nad ekspresją i funkcjonalnością receptora P2X7 w melanocytach prawidłowych i komórkach czerniaka. Analiza jego lokalizacji, poziomu ekspresji na poziomie mRNA i białka, a także wpływu aktywacji receptora na procesy proliferacji i ekspresję cytokin prozapalnych, dostarcza cennych informacji o różnicach w sygnalizacji purynergicznej między komórkami zdrowymi a nowotworowymi.

Właśnie tej tematyce poświęcona jest praca doktorska Pani mgr Marty Soszyńskiej, zatytułowana *„Ekspresja receptora P2X7 w pierwotnych*

liniach ludzkich melanocytów i komórkach czerniaka". Autorka przeprowadziła analizę ekspresji genu i białka P2X7 w pierwotnych melanocytach oraz komórkach czerniaka, a także oceniła funkcjonalną aktywność tego receptora w tych dwóch modelach komórkowych. Praca wpisuje się w aktualny kierunek badań nad zróżnicowaniem aktywności receptorów purynergicznym i ich znaczeniem w fizjologii oraz patologii komórek barwnikowych skóry, dostarczając danych, które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych analiz dotyczących roli P2X7 w homeostazie i procesach transformacji nowotworowej.

Wstęp pracy został opracowany w sposób szczegółowy i staranny, obejmując zarówno charakterystykę budowy skóry, jak i kompleksowe omówienie sygnalizacji purynergicznej oraz receptorów purynergicznym, ze szczególnym uwzględnieniem receptora P2X7. Poszczególne podrozdziały stopniowo wprowadzają czytelnika w tematykę pracy, przedstawiając zarówno aspekty molekularne, jak i znaczenie funkcjonalne receptora P2X7 w różnych typach komórek skóry, w tym melanocytach, keratynocytach, fibroblastach oraz komórkach układu odpornościowego. Dzięki temu czytelnik ma solidne podstawy do zrozumienia późniejszych analiz eksperymentalnych.

Należy zwrócić uwagę, że fragment dotyczący celu pracy został umieszczony dopiero po części metodologicznej. Taki układ może utrudniać czytelnikowi płynne śledzenie struktury wywodu, ponieważ opis technik eksperymentalnych pojawia się przed jasnym wskazaniem, w jakim kontekście będą one interpretowane. W typowej strukturze prac naukowych zaleca się przedstawienie celu badania bezpośrednio po części merytorycznej, a przed opisem zastosowanych metod, co umożliwia bardziej spójne powiązanie treści.

Pomimo tego drobnego mankamentu, część metodologiczna jest szczegółowa i dokładna, obejmując hodowlę komórkową, izolację i analizę pierwotnych komórek skóry oraz komórek czerniaka, a także szereg technik analitycznych, takich jak immunofluorescencja, analiza ekspresji genów czy Western blot.

Takie ujęcie pozwala na pełne odtworzenie badań i stanowi solidną podstawę do prezentacji wyników, które zostały przedstawione w kolejnych rozdziałach.

W tym miejscu należy podkreślić, że Pani mgr Marta Soszyńska wykazała się bardzo dobrą znajomością wspomnianych nowoczesnych technik biologii molekularnej oraz umiejętnością łączenia danych ekspresyjnych z analizami funkcjonalnymi. Zastosowanie wielu komplementarnych metod oraz praca z pierwotnymi melanocytami, które są materiałem trudnym i wymagającym, świadczy o dużej sprawności laboratoryjnej autorki.

Na uznanie zasługuje również konsekwentne prowadzenie narracji badawczej. Pomimo drobnych niedoskonałości redakcyjnych, doktorantka stworzyła spójny i logiczny opis wyników, na które składa się 15 rycin, a także trafnie powiązała je z aktualnym stanem wiedzy. Widać wyraźne zrozumienie złożoności sygnalizacji purynergicznej oraz świadomość ograniczeń własnych badań, co jest szczególnie ważne w rozprawie doktorskiej

Niestety, obok wielu mocnych stron pracy pojawiają się też elementy, które wymagają uwagi i poprawy. Już od początku tekstu zauważalny jest brak podziału na akapity, co znacząco utrudnia czytanie i śledzenie argumentacji. Pojawiają się literówki, np. „błękit brylatnowy” zamiast „brylantowy”, i niejednokrotnie brakuje odniesień do zamieszczonych rycin i tabel (dotyczy to np. ryciny 2, 7, 8, itp.). W pracy brakuje rozwinięcia niektórych skrótów przy pierwszym ich użyciu w tekście. Przykładem jest ATP – mimo że znajduje się w wykazie skrótów, przy pierwszym wystąpieniu w treści nie został rozwinięty jako adenozynotrójfosforan. Podobnie sytuacja przedstawia się w przypadku ADP, AMP, itp. Taka praktyka nie ułatwia czytelnikowi śledzenia tekstu, zwłaszcza osobom mniej zaznajomionym z tematem.

Niektóre zdania mają niewłaściwą formułę, co miejscami utrudnia precyzyjne zrozumienie treści. Doskonałym przykładem są tu:

1. Zdanie *„Pozakomórkowe ATP, enzymy odpowiedzialne za jego hydrolizę (CD39 oraz CD73) i powstająca w jej skutek adenozyna wraz ze specyficznymi*

dla nich receptorami tworzą wspólnie purynergiczną sieć sygnalizacyjną" (str. 20 pracy) w obecnej formie sugeruje, że enzymy CD39 i CD73 posiadają własne receptory, co jest błędne biologicznie. Rola enzymów ogranicza się do przekształcenia ATP w adenozyne, która następnie działa na receptory. Zdanie powinno wyraźnie rozdzielać funkcje enzymów i receptorów adenozyne, aby uniknąć wprowadzenie czytelnika w błąd. Takie uproszczenie, w innym razie, zniekształca podstawową wiedzę o sygnalizacji purynergiczej i obniża rzetelność naukową tekstu.

2. W tekście na stronie 24 pracy stwierdzenie, że adenozyne jest agonistą receptorów P1 jest nieprecyzyjne i daje wrażenie, że aktywacja tych receptorów jest automatyczna i jednakowa dla wszystkich podtypów. W literaturze wskazano, co również zauważyła doktorantka, że adenozyne ma różne powinowactwo do poszczególnych podtypów receptorów, to jednak może istotnie wpłynąć na stopień aktywacji receptora, indukując np. tzw. agonizm częściowy. Dodatkowo, autorka nie wprowadziła wcześniej pojęć agonista czy antagonisty. Stąd, w tym aspekcie, zalecam użycie terminu niejako bardziej neutralnego, tj. „ligand”.
3. W zdaniu na str. 24 dotyczącym receptora P2X7, Pani Mgr Marta Soszyńska miesza pojęcia powinowactwa i aktywacji. Niskie powinowactwo oznacza słabsze wiązanie liganda z receptorem, natomiast stężenie potrzebne do aktywacji jest odrębną właściwością. Zdanie w obecnej formie może sugerować błędnie, że niskie powinowactwo automatycznie równa się wysokiemu stężeniu potrzebnemu do aktywacji receptora, co stanowi błędną interpretację mechanizmów funkcjonalnych receptora P2X7 i może obniżać precyzję naukową tekstu. Warto również zaznaczyć, że w farmakologii liczne przykłady antagonistów pokazują wyraźnie, iż wysokie powinowactwo nie wiąże się z aktywacją receptora, ponieważ związki te często wiążą się znacznie silniej niż agoniści, mimo że nie wywołują odpowiedzi czynnościowej.

4. Zdanie „wyższe stężenie glukozy zwiększało wrażliwość receptora na jego agonistę”, zamieszczone na stronie 33, jest nieprecyzyjne i może wprowadzać czytelnika w błąd. W rzeczywistości wyższe stężenie glukozy zwiększało czułość receptora, co powodowało, że mniejsza dawka agonisty wystarczała do uzyskania porównywalnej lub większej odpowiedzi biologicznej. Obecna forma wypowiedzi może natomiast sugerować, że redukcja dawki agonisty sama w sobie nasila efekt, co jest biologicznie nieprawidłowe.

Inna uwaga dotyczy używanej terminologii – w kilku miejscach w pracy zastosowano określenia nieprecyzyjne lub niezgodne z przyjętym nazewnictwem w literaturze przedmiotu, co może prowadzić do niejasności. Przykładowo, jeśli mowa o receptorach w kontekście farmakologicznym, poprawnym terminem jest „blokowanie” lub „antagonizm”, a nie „hamowanie”, które zwykle odnosi się do enzymów lub procesów wewnątrzkomórkowych (str. 30). Podobnie w opisie antagonistów drugiej generacji P2X7, zarówno w tekście, jak i w tabelach (Tabela 1 i 2), autorka używa określenia „inhibitory”, mimo że receptor P2X7 nie jest enzymem. Takie nieprecyzyjne sformułowania, niestety w całym tekście, mogą utrudniać czytelnikowi właściwe zrozumienie opisywanych mechanizmów.

Kolejną uwagę, właściwą dla części merytorycznej pracy, jest brak cytowań potwierdzających obecność receptora P2X7 w skórze (str. 33). Wskazanie odpowiednich źródeł pozwoliłoby czytelnikowi zweryfikować przedstawione informacje i zwiększyłoby wiarygodność opisu oraz argumentację wstępu teoretycznego.

Przechodząc dalej, w treści merytorycznej pracy nie zostało jasno przedstawione powiązanie między czerniakiem a układem odpornościowym lub funkcjami receptora P2X7. Opisywane są jedynie komórki skóry i elementy układu odpornościowego, bez odniesienia do samego czerniaka jako modelu porównawczego względem melanocytów, co utrudnia zrozumienie zasadności wyboru komórek w badaniach.

W części wyników pojawiają się natomiast nieścisłości w oznaczeniach i prezentacji danych, np.:

1. Ryc. 12 wymaga podziału na A i B oraz doprecyzowania osi x dla ryciny prawej, podobnie ryc. 19.
2. W tabeli 4 w metodologii wskazany jest typ czerniaka WM115, podczas gdy na rycinie 18, w sekcji Wyniki, widnieje oznaczenie WM115.
3. Na ryc. 23 wartości żywotności (%) w czasie $t = 24$ h wykazują znaczne odchylenia, zaś w dyskusji nie ma żadnego komentarza ani wyjaśnienia, skąd mogą wynikać te rozbieżności.
4. W pracy doktorantki w kilku miejscach na rycinach pojawia się stężenie BzATP jako „ μm ”, co jest błędem jednostki – prawidłowo powinno być „ μM ” (mikromol na litr). W obecnej formie „ μm ” oznaczałoby mikrometry, co w kontekście eksperymentów z komórkami *in vitro* jest niepoprawne i może wprowadzać w błąd.
5. Dodatkowo, mając na uwadze zaprezentowaną analizę ekspresji genu *P2X7*, doktorantka nie podejmuje się wskazania czytelnikowi powodu, dla którego do dalszych badań wybrano linie MM9, MeWo czy MM16, skoro ekspresja genu *P2X7* była wyższa w liniach WM2664 i WM115; co istotne, rycina 18 jasno wskazuje brak ekspresji dla linii MM9.
6. W swoich badaniach doktorantka badała wpływ aktywacji receptora *P2X7* w liniach komórkowych czerniaka, stosując agonistę BzATP w różnych stężeniach (10–300 μM) oraz antagonistę A438079. Zaobserwowano tendencję do hamowania proliferacji przy wyższych stężeniach BzATP, choć różnice nie osiągnęły istotności statystycznej, natomiast żywotność komórek nie uległa znaczącej zmianie. Należy jednak podkreślić, że BzATP w wysokich stężeniach może wywoływać efekty pozareceptorowe w komórkach czerniaka, niezależnie od *P2X7*, takie jak: zmiany w homeostazie jonowej poprzez tworzenie niestandardowych porów w błonie, częściowa aktywacja innych receptorów purynowych (*P2X1–P2X4*, *P2Y*), a także potencjalny stres

oksydacyjny. W związku z tym wnioski dotyczące roli P2X7 w tych komórkach wymagają dodatkowych eksperymentów w celu zwiększenia wiarygodności: zastosowania komórek kontrolnych z dobrze udokumentowaną ekspresją i funkcjonalnością P2X7, oceny długoterminowego wpływu ligandów na ekspresję i funkcjonalność receptora, a także wykorzystania dodatkowych metod potwierdzających specyficzność działania BzATP i antagonisty. Takie podejście pozwoliłoby wyraźniej odróżnić efekty specyficzne od pozareceptorowych i jednoznacznie interpretować rolę P2X7 w liniach komórkowych czerniaka.

Z kolei w dyskusji Pani mgr Marta Soszyńska odnosi się do literatury, sugerując pozytywną korelację między ekspresją genu a poziomem białka receptorowego, wskazując, że niski poziom białka receptorowego koreluje z mniejszą ekspresją jego genu. Jednak obserwacja linii MM9 pokazuje, że taka korelacja nie jest uniwersalna, jako że linia ta charakteryzowała się znikomą ekspresją genu *P2X7*, podczas gdy poziom białka zbliżony był do pozostałych linii pierwotnych czerniaka. Co ważne, dalsze rozważenia dot. powyższej obserwacji zostały w pracy pominięte. Natomiast w ocenie Recenzenta, Doktorantka winna odnieść się do ewentualnych mechanizmów czy precyzji analizy, by tym samym uniknąć uogólnienia literaturowego.

Inne uwagi Recenzenta to:

1. niejednolite formatowanie nazw genów – w całej pracy niektóre geny są pisane kursywą, a inne nie, co wprowadza niepotrzebny chaos i utrudnia czytelnikowi śledzenie tekstu. W literaturze naukowej przyjętym standardem jest stosowanie kursywy dla nazw genów, co warto ujednolicić w całej pracy.
2. rycina 3 nie w pełni oddaje informacje przedstawione w opisie tekstowym. Widzimy rozbieżność między tym, co jest napisane w treści, a tym, co pokazuje rycina. Istotnie, na rycinie 3 kanał receptora jest pokazany jako por, jednak na rycinie próżno jest szukać informacji, że taki stan pojawia się dopiero przy wysokim stężeniu ATP.

3. niejednolite zapisywanie podtypów receptorów – w pracy raz użyto formy „A1”, a innym razem „A1” z dużą literą i małą cyfrą („A₁”).
4. w metodyce brakuje szczegółowych informacji dotyczących analizy statystycznej, co utrudnia ocenę rzetelności prezentowanych danych.

W toku analizy przedstawionej pracy nasunęły się pewne pytania, na które poprosiłabym o udzielenie odpowiedzi:

1. Biorąc pod uwagę, że w pracy wykorzystano różne linie komórek czerniaka (MeWo, SK-MEL-1, MM1, MM7, MM9, MM16, MM28, WM266-4, WM35, WM115), które wykazują znaczne różnice w ekspresji genu *P2X7* – w tym MM9, w której ekspresja genu była praktycznie nieobecna – pojawia się pytanie, czy te różnice mają jakiekolwiek powiązanie z charakterystyką nowotworu, jego agresywnością lub pochodzeniem linii (skóra vs węzeł chłonny, wiek pacjenta). Czy autorka rozważa, że poziom ekspresji genu *P2X7* mógłby być markerem różnicującym linie czerniaka lub prognostycznym wskaźnikiem ich właściwości biologicznych?
2. Jakie mechanizmy mogą odpowiadać za obniżoną ekspresję białka receptorowego *P2X7* w komórkach czerniaka? – w pracy pojawia się to stwierdzenie, ale bez rozwinięcia.
3. Wprawdzie w pracy zaznaczono, że dalsze badania są niezbędne do stwierdzenia czy obserwowane efekty stymulacji *P2X7* (np. spadek proliferacji melanocytów przy wysokim BzATP) są specyficzne dla *P2X7*, czy mogą mieć charakter ogólny dla ATP/pozakomórkowych nukleotydów, jednak mimo to proszę o opinię Pani magister?
4. Czy brano pod uwagę wpływ zmienności osobniczej dawców melanocytów na poziom ekspresji?

Pomimo zgłoszonych uwag natury merytorycznej, metodologicznej i redakcyjnej, praca Pani mgr Marty Soszyńskiej stanowi wartościowy wkład w poznanie ekspresji i funkcjonalności receptora P2X7 w komórkach skóry i czerniaka. Badania zostały przeprowadzone starannie, a prezentacja wyników jest ogólnie rzecz biorąc rzetelna. Uwagi mają charakter konstruktywny i służą poprawie przejrzystości, spójności i czytelności tekstu, tak aby w pełni oddać znaczenie i potencjał naukowy pracy.

WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marty Soszyńskiej pt. „Ekspresja receptora P2X7 w pierwotnych liniach ludzkich melanocytów i komórkach czerniaka” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668).

W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Marty Soszyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. inż. Patrycja Kleczkowska
UCZELNIA MEDYCZNA
Im. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE
w WARSZAWIE