

mgr Michał Komorowski

**Ekspresja i potencjalne znaczenie receptorów purynergicznych
P2X7 w liniach komórek endometrialnych**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Jacek Malejczyk

Promotor pomocniczy: dr hab. Aneta Ścieżyńska

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2025 r.

SŁOWA KLUCZOWE: P2X7R, Sygnalizacja purynergiczna, Endometrium, Endometrioza, Rak endometrium, Choroby endometrium, Cytokiny, Linia komórkowa 12Z, Linia komórkowa Ishikawa, Proliferacja, Apoptoza

KEYWORDS: P2X7R, Purinergic signaling, Endometrium, Endometriosis, Endometrial cancer, Endometrial diseases, Cytokines, 12Z cell line, Ishikawa cell line, Proliferation, Apoptosis

Spis treści

I. SPIS RYCIN I TABEL	6
II. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	8
III. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	12
IV. ABSTRACT	13
V. WSTĘP.....	14
1. Budowa i fizjologia macicy	14
1.1. Budowa anatomiczna macicy	14
1.2. Budowa histologiczna macicy.....	15
1.3. Funkcje macicy.....	18
1.4. Fizjologia cyklu miesięczkowego.....	18
2. Choroby endometrium – przegląd kliniczno-patologiczny	19
2.1. Endometrioza.....	19
2.2. Adenomioza	24
2.3. Rak endometrium	27
2.4. Zapalenie endometrium (<i>Endometritis</i>)	29
3. Sygnalizacja purynergiczna	31
3.1. Wprowadzenie	31
3.2. Klasyfikacja i charakterystyka receptorów purynergicznych	32
4. Receptor P2X7.....	35
4.1. Budowa receptora P2X7.....	35
4.2. Mechanizm działania receptora P2X7	39
4.3. Rola sygnalizacji purynergicznej i receptora P2X7 w żeńskim układzie rozrodczym ze szczególnym uwzględnieniem endometrium	42
4.4. Rola receptora P2X7 w patologiach endometrium	44
VI. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY.....	49
VII. MATERIAŁY I METODY	51
1. Hodowle komórkowe	51

2.	Stymulacja komórek oraz ocena proliferacji	51
3.	Stymulacja komórek cytokinami prozapalnymi	52
4.	Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja	52
5.	Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)	53
6.	Western Blot.....	53
7.	Pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia.....	54
8.	Pomiar aktywności „dużego poru”.....	55
9.	Analiza statystyczna.....	55
VIII.	WYNIKI.....	56
1.	Morfologia komórek linii 12Z i Ishikawa w hodowli <i>in vitro</i>	56
2.	Ekspresja P2X7 na poziomie mRNA.....	56
3.	Ekspresja P2X7 na poziomie białka	57
4.	Ekspresja powierzchniowa P2X7 – analiza immunofluorescencyjna	58
5.	Ocena aktywności biologicznej receptora P2X7	59
6.	Ocena wpływu aktywacji receptora P2X7 na proliferację komórek	65
7.	Porównanie ekspresji mRNA cytokin prozapalnych w komórkach linii 12Z i Ishikawa.....	67
8.	Analiza wpływu stymulacji receptora P2X7 na ekspresję mRNA wybranych cytokin	68
9.	Wpływ stymulacji BzATP na ekspresję <i>P2RX7</i>	70
10.	Wpływ stymulacji wybranymi cytokinami na ekspresję genu <i>P2RX7</i>	72
IX.	DYSKUSJA.....	75
X.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI.....	80
XI.	BIBLIOGRAFIA.....	81

Chciałbym serdecznie podziękować
Panu Profesorowi Jackowi Malejczykowi oraz
Pani Doktor Habilitowanej Anecie Ścieżyńskiej
za nieocenioną pomoc oraz jeszcze większą cierpliwość.

I. SPIS RYCIN I TABEL

Rycina 1. Położenie fizjologiczne macicy w miednicy mniejszej kobiety

Rycina 2. Mikroskopowy obraz przekroju ściany macicy (barwienie hematoksylina i eozyna).

Rycina 3. Schematyczna ilustracja endometriozy – obecność ognisk gruczołów endometrium poza jamą macicy: w obrębie jajników, otrzewnej, jajowodów.

Rycina 4. Schematyczna ilustracja adenomiozy – obecność ektopowych ognisk endometrium w obrębie błony mięśniowej.

Rycina 5. Szlak sygnalizacji purynowej: degradacja ATP do adenozyyny i aktywacja receptorów P2X, P2Y oraz P1.

Rycina 6. Architektura ludzkiego receptora P2X7R zbudowana metodą modelowania homologicznego na podstawie struktury krystalicznej ludzkiego P2X3R.

Rycina 7. Mechanizm aktywacji receptora P2X7 i jego rola w aktywacji inflamasomu NLRP3.

Rycina 8. Morfologia komórek linii 12Z (A) i Ishikawa (B) hodowanych *in vitro*.

Rycina 9. Względna ekspresja *P2RX7* mRNA w liniach komórkowych 12Z (n=21) i Ishikawa (n=19) oceniana metodą qRT-PCR.

Rycina 10. Analiza ekspresji białka P2X7 w frakcjach błonowej i cytoplazmatycznej komórek 12Z i Ishikawa metodą Western blot.

Rycina 11. Immunofluorescencyjna analiza ekspresji receptora P2X7 w komórkach linii 12Z (A) i Ishikawa (B) hodowanych *in vitro*.

Rycina 12. Ocena aktywności kanału wapniowego receptora P2X7 w komórkach linii 12Z.

Rycina 13. Ocena aktywności receptora P2X7 w komórkach linii Ishikawa.

Rycina 14. Ocena zdolności receptora P2X7 do tworzenia „dużego poru” w komórkach linii 12Z.

Rycina 15. Ocena zdolności receptora P2X7 do tworzenia „dużego poru” w komórkach linii Ishikawa.

Rycina 16. Wpływ stymulacji BzATP (50 μ M lub 300 μ M) na proliferację komórek linii 12Z (A) i Ishikawa (B).

Rycina 17. Względna ekspresja mRNA dla *IL1A* (A), *TNF* (B) oraz *TGFB1* (C) w komórkach linii 12Z i Ishikawa w warunkach standardowej hodowli.

Rycina 18. Względna ekspresja mRNA dla *IL1A* w komórkach linii 12Z oraz Ishikawa po stymulacji BzATP.

Rycina 19. Względna ekspresja mRNA dla *TNF* w komórkach linii 12Z oraz Ishikawa po stymulacji BzATP.

Rycina 20. Względna ekspresja mRNA dla *TGFB1* w komórkach linii 12Z oraz Ishikawa po stymulacji BzATP.

Rycina 21. Względna ekspresja mRNA dla *P2RX7* w komórkach linii 12Z oraz Ishikawa po stymulacji BzATP.

Rycina 22. Względna ekspresja mRNA genu *P2RX7* w komórkach linii 12Z i Ishikawa po stymulacji IL1 α (10 ng/ml).

Rycina 23. Względna ekspresja mRNA genu *P2RX7* w komórkach linii 12Z i Ishikawa po stymulacji TNF (10 ng/ml).

Rycina 24. Względna ekspresja mRNA genu *P2RX7* w komórkach linii 12Z i Ishikawa po stymulacji TGF- β (10 ng/ml).

Tabela 1. Klasyfikacja i charakterystyka receptorów purynergiczych

Tabela 2. Warianty splicingowe genu *P2RX7*

Tabela 3. Lista sond TaqMan wykorzystanych w badaniu qRT-PCR

Tabela 4. Przeciwciała zastosowane w analizie Western blot

II. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADP – adenozynodifosforan

ARID1A – AT-rich interaction domain 1A (gen supresorowy nowotworów)

ASRM – American Society for Reproductive Medicine (Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu)

ATP – adenozynotrifosforan

BAX – białko proapoptotyczne z rodziny BCL-2

BCL-2 – białko antyapoptotyczne z rodziny BCL-2

BMI – wskaźnik masy ciała (Body Mass Index)

BRCA1/BRCA2 – geny supresorowe nowotworów piersi i jajnika

BzATP – 2'(3')-O-(4-benzoylobenzoylo)adenozynotrifosforan, agonista receptora P2X7

CaSki – linia komórkowa raka szyjki macicy

CD10 – antygen różnicowania komórkowego 10 (endopeptydaza obojętna)

CD146 – antygen różnicowania komórkowego 146 (MCAM)

CD39 – ecto-ATP-difosfohydrolaza (NTPDase1)

CD73 – 5'-nukleotydaza związana z błoną komórkową

CE – przewlekłe zapalenie endometrium (chronic endometritis)

CK⁺/E-cad⁻; CK⁻/E-cad⁻ – fenotypy komórek: cytokeratyna dodatnia/ujemna, E-kadheryna ujemna

CLP – cecal ligation and puncture (model sepsy u gryzoni)

COMT – katecholo-O-metylotransferaza

Ct – wartość cyklu progowego (cycle threshold) w qPCR

CXCL12/CXCR4 – chemokina CXCL12 i jej receptor CXCR4

CYP1A1, CYP1A2 – cytochromy P450

CYP19A1 (CYP19) – aromataza

dNTP – trifosforany deoksynukleozydów (substraty do syntezy DNA)

DLK1 – Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1

DMEM/F-12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (pożywka hodowlana)

EIN – wewnątrz nabłonkowa neoplazja endometrium (endometrial intraepithelial neoplasia)

EMT – metaplasja nabłonkowo-mezenchymalne (epithelial–mesenchymal transition)

ENZIAN – klasyfikacja endometriozy wg systemu Enzian

ER – receptor estrogenowy (estrogen receptor)

ER- β (ESR2) – receptor estrogenowy β

ESR1/ESR2 – geny kodujące receptory estrogenowe α i β

FBS – surowica płodowa bydlęca (fetal bovine serum)

FIGO – Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa (International Federation of Gynecology and Obstetrics)

GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (gen referencyjny)

GATA – rodzina czynników transkrypcyjnych GATA

GWAS – badania asocjacyjne całego genomu (genome-wide association studies)

HEK293 – ludzka linia komórkowa embrionalnych komórek nerki

HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor)

HIF-1 α – czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją 1 α

HOX – rodzina genów regulatorowych HOX

IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IGFBP – białka wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu

IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11 – interleukiny (cytokiny prozapalne)

Ki67 – marker proliferacji komórkowej

KRAS – protoonkogen KRAS

MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami (mitogen-activated protein kinases)

MCP-1/CCL2 – białko chemotaktyczne monocytów 1 / chemokina CCL2

MMP-2, MMP-9 – metaloproteinazy macierzy 2 i 9

MMR – system naprawy niedopasowań DNA (mismatch repair)

MyD88 – adaptor białkowy MyD88 (myeloid differentiation primary response 88)

NF- κ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B

NGF – czynnik wzrostu nerwów (nerve growth factor)

NLRP3 – składnik inflamasomu NLRP3

NK cells (komórki NK) – natural killers (komórki układu odpornościowego)

NSMP – nowotwory bez specyficznego profilu molekularnego (no specific molecular profile)

nTPM – znormalizowane transkrypty na milion (miara ekspresji RNA)

PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu

PDGFR α – receptor α dla płytkopochodnego czynnika wzrostu

PI3K-Akt – szlak sygnałowy PI3K/Akt

PIK3CA – gen kodujący podjednostkę katalityczną PI3K

PGR (PR) – gen receptora progesteronowego / receptor progesteronowy

PR-B – izoforma receptora progesteronowego B

pro-IL-1 β , pro-IL-18 – prekursory nieaktywne interleukin 1 β i 18

PTEN – fosfataza i tensyna homolog (gen supresorowy)

qRT-PCR – ilościowy PCR w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją

rASRM – revised American Society for Reproductive Medicine (zmodyfikowana klasyfikacja ASRM)

SDS-PAGE – elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (single nucleotide polymorphism)

SOX-9 – czynnik transkrypcyjny SRY-related HMG-box 9

SP1 – czynnik transkrypcyjny Specificity Protein 1

SSEA-1 – antygen specyficzny dla stadiów rozwojowych 1 (Stage-Specific Embryonic Antigen-1)

SUSD2 – Sushi Domain Containing 2 (białko powierzchniowe komórek macierzystych)

TBST – bufor Tris–sól–fosforan z dodatkiem Tween 20

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β

TIAR – tissue injury and repair (uszkodzenie i naprawa tkanki)

TLR2 – receptor Toll-like 2

TNF – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor)

TP53 (p53) – gen supresorowy TP53 / białko p53

TRP – rodzina receptorów potencjału przejściowego (transient receptor potential)

TRPV1 – receptor waniloidowy 1 (transient receptor potential vanilloid 1)

UTP, UDP – urydynotrifosforan, urydynodifosforan

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej (vascular endothelial growth factor)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization)

III. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Receptor purynowy P2X7 (P2X7R) jest kanałem jonowym aktywowanym przez ATP, który uczestniczy zarówno w regulacji proliferacji i różnicowania komórek, jak i w indukcji śmierci komórkowej. Choć jego rola została szeroko opisana w procesach zapalnych i nowotworowych, udział w patogenezie chorób endometrium, takich jak endometrioza i rak endometrium, pozostaje niejasny. Celem pracy była ocena ekspresji, lokalizacji i aktywności funkcjonalnej receptora P2X7 w dwóch modelach komórkowych: 12Z (pochodzącej z ogniska endometriozy) i Ishikawa (rak endometrium) oraz analiza jego interakcji z cytokinami prozapalnymi. Ekspresję genu *P2RX7* badano metodą qRT-PCR, a poziom białka metodą Western blot, natomiast lokalizację receptora oceniano za pomocą immunofluorescencji. Aktywność funkcjonalną analizowano w testach napływu Ca^{2+} (Fluo-8) i wychwytu barwnika YO-PRO-1, w których stosowano agonistę BzATP i antagonistę A438079. Proliferację badano po stymulacji BzATP, a regulację ekspresji *P2RX7* przez cytokiny ($\text{IL-1}\alpha$, TNF, $\text{TGF-}\beta 1$) oceniano na poziomie transkryptu. Stwierdzono obecność P2X7R w obu liniach, z wyższą ekspresją w 12Z. Receptor lokalizował się w błonie komórkowej i cytoplazmie, a jego stymulacja BzATP indukowała napływ Ca^{2+} i powstawanie dużego poru, czemu zapobiegał A438079. Silna aktywacja receptora ograniczała proliferację w linii 12Z, przy słabszym efekcie w Ishikawa. Cytokiny modulowały ekspresję *P2RX7* w sposób zależny od linii – $\text{IL-1}\alpha$ działała stymulująco, a $\text{TGF-}\beta 1$ hamująco w 12Z. Wyniki wskazują, że P2X7R pełni odmienne role w modelach endometriozy i raka endometrium – w komórkach 12Z sprzyja odpowiedzi zapalnej i ogranicza proliferację przy silnej aktywacji, natomiast w linii Ishikawa jego potencjał cytotoksyczny jest słabszy. Uzyskane dane podkreślają dualny charakter P2X7R i jego znaczenie w patofizjologii chorób endometrium.

Expression and potential significance of purinergic P2X7 receptors in endometrial cell lines

IV. ABSTRACT

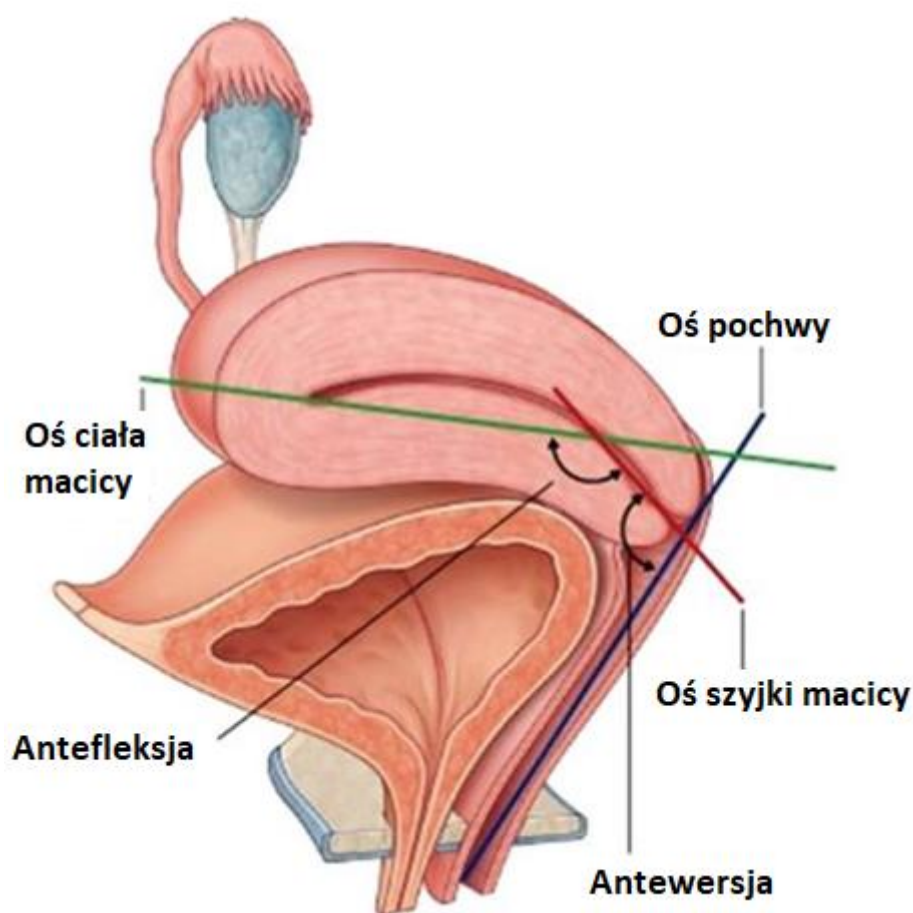
The purinergic receptor P2X7 (P2X7R) is an ATP-gated ion channel involved in the regulation of cell proliferation and differentiation, as well as in the induction of cell death. While its function has been widely described in inflammatory and neoplastic processes, its contribution to the pathogenesis of endometrial diseases, such as endometriosis and endometrial cancer, remains unclear. The aim of this study was to evaluate the expression, localization, and functional activity of the P2X7 receptor in two cellular models: 12Z (derived from an endometriotic lesion) and Ishikawa (endometrial adenocarcinoma), and to analyze its interactions with pro-inflammatory cytokines. *P2RX7* expression was determined by qRT-PCR, protein levels were assessed by Western blot, and receptor localization was examined using immunofluorescence. Functional activity was analyzed through Ca^{2+} influx (Fluo-8) and YO-PRO-1 uptake assays, applying the agonist BzATP and the antagonist A438079. Proliferation was examined following BzATP stimulation, and the regulation of *P2RX7* expression by cytokines (IL-1 α , TNF, TGF- β 1) was evaluated at the transcript level. P2X7R was detected in both cell lines, with higher expression in 12Z. The receptor localized to the plasma membrane and cytoplasm, and its stimulation with BzATP induced Ca^{2+} influx and pore formation, which were inhibited by A438079. Strong receptor activation suppressed proliferation in 12Z cells, whereas the effect in Ishikawa cells was weaker. Cytokines modulated *P2RX7* expression in a cell line-dependent manner, with IL-1 α upregulating and TGF- β 1 downregulating its expression in 12Z. The results indicate that P2X7R plays distinct roles in endometriotic and cancer-derived endometrial cells – in 12Z, it promotes inflammatory responses and limits proliferation under strong activation, whereas in Ishikawa its cytotoxic potential is less pronounced. These findings highlight the dual nature of P2X7R and its relevance in the pathophysiology of endometrial diseases.

V. WSTĘP

1. Budowa i fizjologia macicy

1.1. Budowa anatomiczna macicy

Macica (*uterus*) to nieparzysty narząd o kształcie gruszkowatym, położony w miednicy mniejszej kobiety, pomiędzy pęcherzem moczowym a odbytnicą. W warunkach fizjologicznych znajduje się w pozycji antewersji i antefleksji (*anteversio et anteflexio uteri*), co oznacza pochylenie całego narządu oraz zgięcie trzonu ku przodowi względem szyjki macicy. Średnie wymiary macicy wynoszą około 8 cm długości, 5 cm szerokości i 4 cm grubości, a objętość może wynosić od około 80 do 200 cm³.



Rycina 1. Położenie fizjologiczne macicy w miednicy mniejszej kobiety. Przedstawiono osie trzonu, szyjki i pochwy oraz kąty charakterystyczne dla pozycji *anteflexio–anteversio*. Opracowano na podstawie TeachMeAnatomy (<https://teachmeanatomy.info>); tłumaczenie i adaptacja własna.

W macicy wyróżnić można, idąc od dołu, 3 segmenty: szyjkę (*cervix uteri*), trzon (*corpus*) oraz dno (*fundus*) [1].

Położenie macicy jest stabilizowane przez układ więzadłowy i mięśniowy. Do głównych struktur podporowych należą: więzadło szerokie (*ligamentum latum uteri*), więzadło obłe (*ligamentum teres uteri*), więzadło właściwe jajnika (*ligamentum ovarii proprium*), więzadło podstawowe (*ligamentum cardinale uteri*) i więzadło krzyżowo-maciczne (*ligamentum sacrouterinum*). Dodatkowe wsparcie zapewniają mięśnie przepony miednicy, w tym m. dźwigacz odbytu i m. guziczny [1].

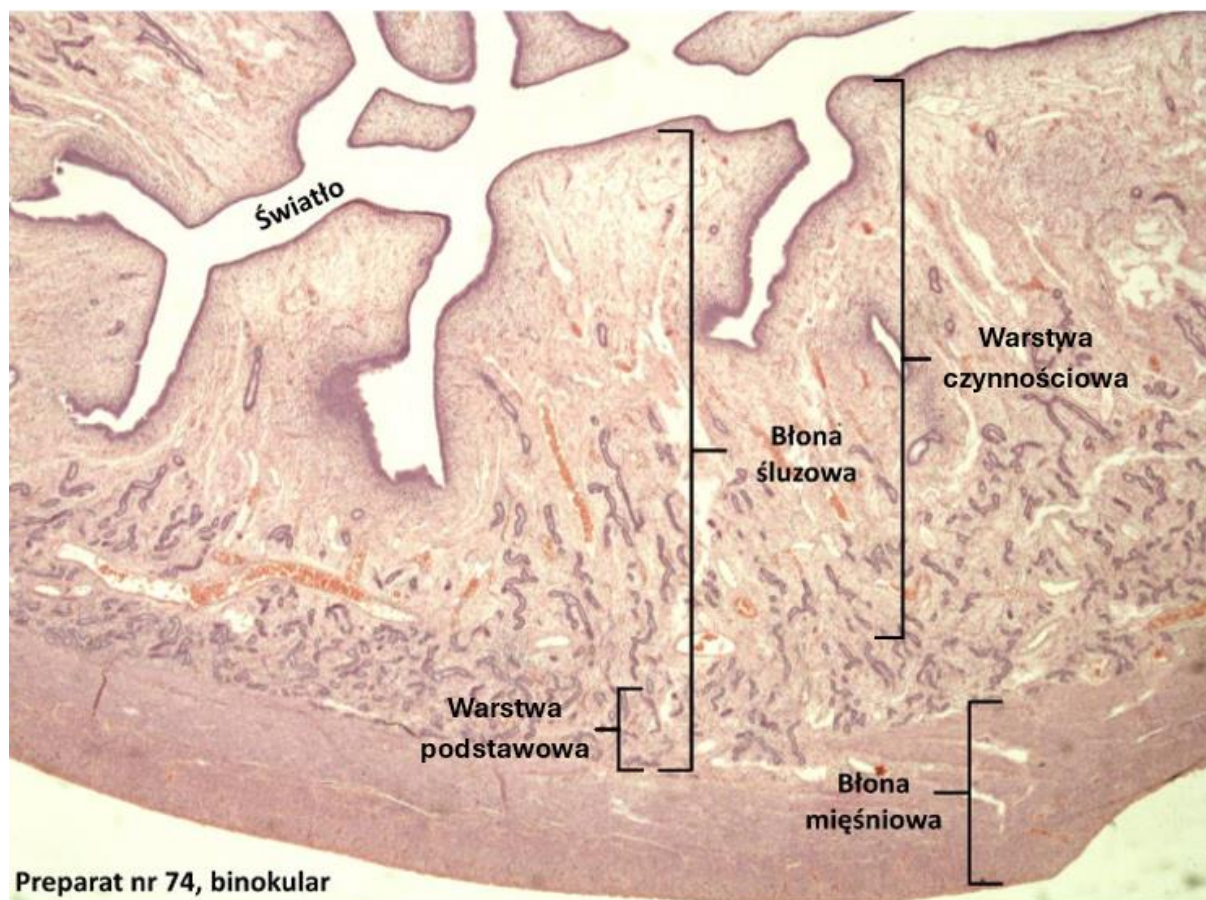
Unaczynienie tętnicze zapewnia tętnica maciczna – gałąź tętnicy biodrowej wewnętrznej – która rozdziela się między innymi na gałęzie wstępujące i zstępujące. Odpływ żylny odbywa się poprzez splot żylny maciczny do żyły biodrowej wewnętrznej. Unerwienie pochodzi z włókien współczulnych splotu podbrzusznego dolnego oraz przywspółczulnych nerwów trzewnych miednicznych (S2–S4). Drenaż limfatyczny obejmuje węzły chłonne biodrowe wewnętrzne, zewnętrzne i lędźwiowe [1].

1.2. Budowa histologiczna macicy

Ściana macicy zbudowana jest z trzech warstw: warstwy śluzowej (*endometrium*), warstwy mięśniowej (*myometrium*) oraz błony surowiczej (*perimetrium*). Zewnętrzna warstwa – *perimetrium* – stanowi pokrycie surowicze, będące częścią otrzewnej jamy brzusznej. Otrzewna nie pokrywa całej powierzchni macicy, lecz obejmuje jedynie jej dno oraz fragmenty przedniej i tylnej ściany. Po bokach macicy otrzewna tworzy podwójną warstwę nazywaną szerokim więzadłem macicy (*ligamentum latum uteri*), które zawiera jajowody, naczynia, nerwy oraz inne struktury towarzyszące. Mięśniówkę tworzy gruba warstwa miocytów gładkich, zorganizowanych w warstwy wewnętrzną podłużną, środkową okrężną i zewnętrzną podłużną, zapewniające skoordynowane skurcze podczas menstruacji i porodu [2].

Endometrium składa się z warstwy podstawowej (*stratum basale*) i czynnościowej (*stratum functionale*). Warstwa podstawowa zawiera dolne odcinki gruczołów oraz komórki progenitorowe, natomiast warstwa czynnościowa ulega cyklicznym przemianom proliferacyjnym, sekrecyjnym oraz złuszczeniu [1]. Nowoczesne techniki trójwymiarowej rekonstrukcji histologicznej ujawniły, że gruczoły endometrium nie są prostymi, prostoliniowymi strukturami, lecz tworzą w warstwie podstawowej rozgałęzioną, horyzontalną sieć o układzie przypominającym grzybnię (*mycelium-like*), z której wyrastają pionowe,

nierozgałęzione struktury gruczołowe sięgające warstwy czynnościowej [3, 4]. Takie ułożenie sprzyja regeneracji i adaptacji błony śluzowej w trakcie cyklu miesięczkowego.



Rycina 2. Mikroskopowy obraz przekroju ściany macicy (barwienie hematoksylina i eozyna). Widoczne warstwy: błona mięśniowa, błona śluzowa (z podziałem na warstwę podstawową i czynnościową) oraz światło jamy macicy. Liczne gruczoły endometrialne w warstwie czynnościowej wykazują cechy fazy sekrecyjnej. Zdjęcie wykonane w Zakładzie Histologii i Embriologii WUM. Adaptacja własna, powiększenie 4-krotne.

Zróżnicowanie komórkowe endometrium obejmuje jasne komórki z rzęskami oraz ciemne komórki nieurzęsione o charakterze wydzielniczym. W fazie sekrecyjnej gruczoły wykazują aktywność merokrynową, produkując glikogen, glikoproteiny i inne składniki odżywcze. W komórkach obecne są także liczne pęcherzyki wydzielnicze, co odzwierciedla ich intensywną aktywność metaboliczną [2].

W obrębie warstwy podstawnej gruczołów znajdują się komórki progenitorowe o cechach komórek macierzystych, wykazujące ekspresję markerów takich jak SSEA-1 (antygen embrionalny specyficzny dla stadium rozwojowego – typ 1), SOX9 (czynn timeranskrypcyjny

SOX9) i N-kadheryny. Komórki te tworzą fizjologiczną niszę regeneracyjną i odpowiadają za odnowę całej warstwy czynnościowej w każdym cyklu. Ich obecność wykazano zarówno w prawidłowym endometrium, jak i w ogniskach ektopowych (tj. endometrium przebywające poza jamą macicy) w przebiegu endometriozy [5, 6].

Na poziomie komórkowym endometrium charakteryzuje się wyjątkową złożonością i dynamiką. Oprócz komórek nabłonkowych, jego istotnymi komponentami są komórki zrębu – głównie fibroblasty – oraz znaczna populacja komórek układu odpornościowego. Fibroblasty uczestniczą w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej i odgrywają kluczową rolę w procesach regeneracji, angiogenezy i implantacji zarodka. Pod wpływem progesteronu mogą ulegać transformacji w komórki doczesnej, wspierając rozwój zarodka we wczesnych etapach ciąży [7].

Populacja fibroblastów endometrialnych jest heterogenna. W obrębie podścieliska zidentyfikowano subpopulacje różniące się ekspresją markerów powierzchniowych, takich jak: CD10 (neprylizyna, marker fibroblastów związanych z rakiem), SUSD2 (marker komórek macierzystych i fibroblastów związanych z rakiem), CD146 (białko adhezji komórkowej oraz angiogenezy), DLK1 (homolog Delta-like 1, niekanoniczny ligand receptora Notch), PDGFR α (receptor czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego alfa), ale także potencjałem regeneracyjnym i funkcją biologiczną. Szczególne znaczenie przypisuje się komórkom z fenotypem SUSD2⁺/CD146⁺ o cechach progenitorowych, zlokalizowanych w niszach okołonaczyniowych, które mogą uczestniczyć zarówno w regeneracji, jak i w patogenezie endometriozy i adenomiozy [7].

Komórki układu odpornościowego stanowią istotny element endometrium, a dominującą populacją limfocytarną w jego prawidłowej strukturze są komórki NK (naturalni zabójcy, *ang. Natural Killers*) o fenotypie CD56^{bright}/CD16⁻ (fenotyp subpopulacji tkankowej), wykazujące niską cytotoksyczność i pełniące funkcje regulacyjne, m.in. poprzez produkcję cytokin i udział w modelowaniu naczyń spiralnych — silnie skręconych tętniczek warstwy czynnościowej endometrium, które dynamicznie zmieniają długość i strukturę w cyklu miesięczkowym. Liczba i aktywność komórek odpornościowych w endometrium, w tym komórek NK, podlega zmianom w cyklu miesięczkowym pod wpływem lokalnych czynników hormonalnych, takich jak progesteron, czy transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), które modulują ich dojrzewanie i funkcje [8].

Złożone i precyzyjnie regulowane interakcje pomiędzy komórkami nabłonkowymi, fibroblastami i komórkami układu odpornościowego zapewniają endometrium jego unikalną zdolność do cyklicznej odbudowy, przygotowania do implantacji zarodka, tworzenia łożyska i kreowania stanu miejscowej tolerancji odpornościowej. Zakłócenia w tych procesach mogą leżeć u podłoża takich patologii jak zaburzenia receptywności (zaburzenia implantacji zarodka) nawracające poronienia, preeklampsja (stan przedrzucawkowy), jak również endometrioza, adenomioza czy przewlekłe zapalenie endometrium [9].

1.3. Funkcje macicy

Macica pełni kluczową rolę w cyklu rozrodczym kobiety. Zapewnia środowisko dla implantacji zapłodnionej komórki jajowej, rozwój łożyska i płodu. W trakcie menstruacji skurcze błony mięśniowej wspomagają usuwanie złuszczonej warstwy czynnościowej endometrium. Funkcje te są ściśle regulowane hormonalnie i zależne od integralności strukturalnej gruczołów i naczyń spiralnych [1,3].

1.4. Fizjologia cyklu miesięczkowego

Cykl miesięczkowy u kobiet trwa średnio 28 dni i dzieli się na trzy fazy: miesięczkową (1–4 dzień), proliferacyjną (5–13 dzień) i sekrecyjną (14–28 dzień). W praktyce długość cyklu jest zmienna i, zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa (FIGO), za prawidłowe uznaje się cykle trwające od 24 do 38 dni, przy czym krwawienie miesięczne nie powinno przekraczać 8 dni. Regulacja cyklu odbywa się za pośrednictwem osi podwzgórze–przysadka–jajniki [10]

W fazie miesięczkowej spadek stężenia progesteronu i estrogenów powoduje skurcz naczyń spiralnych i martwicę warstwy czynnościowej, prowadząc do jej złuszczenia. Następnie w fazie proliferacyjnej, pod wpływem estrogenów, dochodzi do odbudowy endometrium – gruczoły stają się proste, wąskie, z dużą aktywnością mitotyczną i wysoką ekspresją Ki67 (marker proliferacji komórek obecny w komórce podczas wszystkich faz czynnych cyklu komórkowego i niewykrywalny w fazie G0) [4].

W fazie sekrecyjnej, po owulacji, progesteron stymuluje różnicowanie komórek gruczołowych i zrębu. Gruczoły ulegają skręceniu, rozgałęzianiu, ich światło poszerza się, a wydzielina

wzbogaca się o glikogen i lipidy. Endometrium osiąga pełną dojrzałość receptywną, zwaną także oknem implantacyjnym, przypadającym około 6–10 dnia po owulacji. W tym czasie dochodzi do ekspresji specyficznych markerów adhezyjnych, które umożliwiają zakotwiczenie zarodka. W przypadku braku implantacji dochodzi do regresji ciała żółtego i rozpoczyna się nowy cykl [4, 11, 12].

2. Choroby endometrium – przegląd kliniczno-patologiczny

Zmiany chorobowe endometrium mogą przyjmować postać zaburzeń czynnościowych (związanych z gospodarką hormonalną), ogniskowych (polipy, przerosty) lub zapalnych czy nowotworowych. Ich różnorodność kliniczna, cykliczność objawów oraz zmienność molekularna i histologiczna sprawiają, że precyzyjna klasyfikacja chorób endometrium jest trudna, a skuteczna diagnostyka często opóźniona [13-15].

Szczególne znaczenie przypisuje się przewlekłym chorobom, takim jak endometrioza, adenomioza, rak endometrium czy przewlekłe zapalenie błony śluzowej macicy (endometritis), które łączy wspólne podłoże zapalne, hormonalne i odpornościowe. W patogenezie tych schorzeń odgrywają rolę m.in. zaburzenia receptywności endometrium [12], zmiany epigenetyczne [16], aktywacja inflamasyonu [17, 18] oraz przemieszczenie progenitorowych komórek gruczołowych do warstwy czynnościowej [5]. Postępujące badania nad strukturą i funkcją endometrium przyczyniają się do lepszego zrozumienia tych złożonych mechanizmów [3, 4].

2.1. Endometrioza

2.1.1. Epidemiologia

Endometrioza jest jedną z najczęstszych chorób ginekologicznych, występującą zarówno w Polsce, jak i na świecie [19]. Szacuje się, że dotyczy 10–15% kobiet w wieku rozrodczym oraz 35–50% pacjentek zgłaszających się z powodu bólu miednicy i/lub niepłodności [19, 20]. Zmiany endometrialne obserwuje się najczęściej między menarche (pierwszą miesiączką) a menopauzą, ze szczytem zachorowań przypadającym na 25–45 rok życia [21]. Opisywano jednak przypadki występowania endometriozy u nastolatków, kobiet po menopauzie [19], a także sporadycznie u płodów [22] i mężczyzn poddawanych terapii hormonalnej z powodu raka prostaty [23].

Dane z badań operacyjnych wskazują, że ogniska endometriozy stwierdzano u 0,1–53% kobiet poddanych laparoskopii lub laparotomii, w tym u 12–32% pacjentek diagnozowanych z powodu bólu miednicy oraz u 10–60% operowanych z powodu niepłodności [24-26].

Czynniki genetyczne również odgrywają istotną rolę – choroba ma charakter rodzinny u około 7% pacjentek. Stwierdzano ją także u 2% kobiet po podwiązaniu jajowodów oraz u 17% po usunięciu jajników [27, 28].

Występowanie endometriozy różni się między grupami etnicznymi – najniższe ryzyko obserwuje się u kobiet czarnoskórych, wyższe u kobiet rasy kaukaskiej, a najwyższe u kobiet azjatyckich [29].

Z epidemiologicznego punktu widzenia choroba stanowi również poważne obciążenie ekonomiczne. Roczne koszty leczenia w Europie szacuje się na 0,8–12,5 mld euro, co jest porównywalne z kosztami leczenia innych przewlekłych chorób, takich jak cukrzyca [30].

Mechanizmy powstawania endometriozy nie są w pełni wyjaśnione. Najczęściej przywołuje się teorię Sampsona o wstecznej menstruacji, czyli cofaniu się krwi miesięczkowej do jamy otrzewnej i implantacji komórek endometrium [31-34]. Jej ograniczenia wskazują na rolę czynników związanych z układem odpornościowym – m.in. przewagi cytokin prozapalnych i współwystępowania chorób autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów [35-37]. Uzupełnieniem jest teoria metaplazji otrzewnej w komórki typu Müllera, tłumacząca obecność ognisk w nietypowych lokalizacjach [38-40]. Istotne znaczenie mają także procesy neowaskularyzacji i zwiększone stężenia czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) [41, 42]. Obecnie uznaje się, że rozwój choroby jest wieloczynnikowy i zależy od interakcji czynników genetycznych, odpornościowych i środowiskowych [43].

2.1.2. Obraz kliniczny

Endometrioza znacząco obniża jakość życia, wpływając zarówno na zdrowie fizyczne, jak i psychiczne kobiet [44, 45]. U około 66% pacjentek pierwsze objawy występują przed 20. rokiem życia [46]. Do najczęściej zgłaszanych należą: bolesne miesiączki o narastającym nasileniu, przewlekły ból miednicy, ból w odcinku krzyżowym kręgosłupa, dyspareunia (ból podczas stosunku płciowego), bolesna owulacja, dolegliwości przy oddawaniu moczu i stolca, obfite i nieregularne miesiączki, krew w stolcu, zaparcia lub biegunki, niepłodność oraz przewlekłe zmęczenie [21, 47].

Mogą również pojawiać się mniej swoiste symptomy, takie jak stany podgorączkowe, nudności, bóle i zawroty głowy, obniżenie nastroju, lęk czy większa podatność na infekcje i alergię. Najczęściej jednak dominującym objawem pozostaje bolesne miesiączkowanie, rozpoczynające się przed krwawieniem, nasilające się z czasem i obejmujące podbrzusze oraz głębsze struktury miednicy. Ból może promieniować do kości krzyżowej i w części przypadków utrzymywać się przez cały cykl. Wskazuje się, że nasilenie dolegliwości może wiązać się z zajęciem zachyłka Douglasa i obecnością zrostów [48].

U części pacjentek, paradoksalnie, nawet zaawansowana endometrioza przebiega bezobjawowo, podczas gdy niewielkie ogniska mogą generować duże dolegliwości bólowe. Zrosty wewnątrztrzewnowe i zwężenia jajowodów stanowią częste przyczyny problemów terapeutycznych, a dodatkowo ogniska endometrialne mogą produkować przeciwciała skierowane przeciwko endometrium eutopowemu, prowadząc do upośledzonej implantacji zarodka lub poronień [48].

Szczególną postać stanowi endometrioza głęboko naciekająca, w której zmiany penetrują podotrzewnowo i obejmują struktury miednicy oraz ściany narządów, m.in. więzadła krzyżowo-maciczne, esiczo-odbytniczy fragment jelita, pochwę, pęcherz czy moczowody. Ten rodzaj endometriozy wiąże się z przewlekłym bólem i dysfunkcjami narządów, a badania wykazują, że pacjentki częściej mają zaburzenia mięśni dna miednicy i kończyn dolnych, wynikające z hipertoniczności i utrudnionej relaksacji [49]. Cięższy przebieg obserwuje się w przypadku endometriozy bocznego parametrium – tkanki łącznej położonej po bokach szyjki macicy i pochwy, zawierającej naczynia i nerwy. Jej zajęcie może powodować zwężenia moczowodów, poszerzenia układu moczowego, czy objawy przeszkody podpęcherzowej w następstwie naciekania spłotu podbrzusznego dolnego [50].

Inną szczególną manifestacją choroby jest endometrioma, czyli tzw. „torbiel czekoladowa”, najczęściej zlokalizowana w jajniku. Występuje u 17–44% pacjentek z endometriozą, a w części przypadków obustronnie. Obecność endometriomy wskazuje na bardziej zaawansowany etap choroby i wiąże się z przewlekłym bólem miednicy, niepłodnością oraz obniżeniem rezerwy jajnikowej. Leczenie zwykle wymaga chirurgicznego usunięcia zmiany [51].

W celu oceny lokalizacji i zaawansowania choroby opracowano różne systemy klasyfikacyjne. Najczęściej stosowana jest skala ASRM (American Society of Reproductive Medicine), która dzieli endometriozę na cztery stopnie – od łagodnych (I–II) po ciężkie (III–IV) [52–54]. W przypadku głęboko naciekających postaci używa się systemu ENZIAN, opisującego

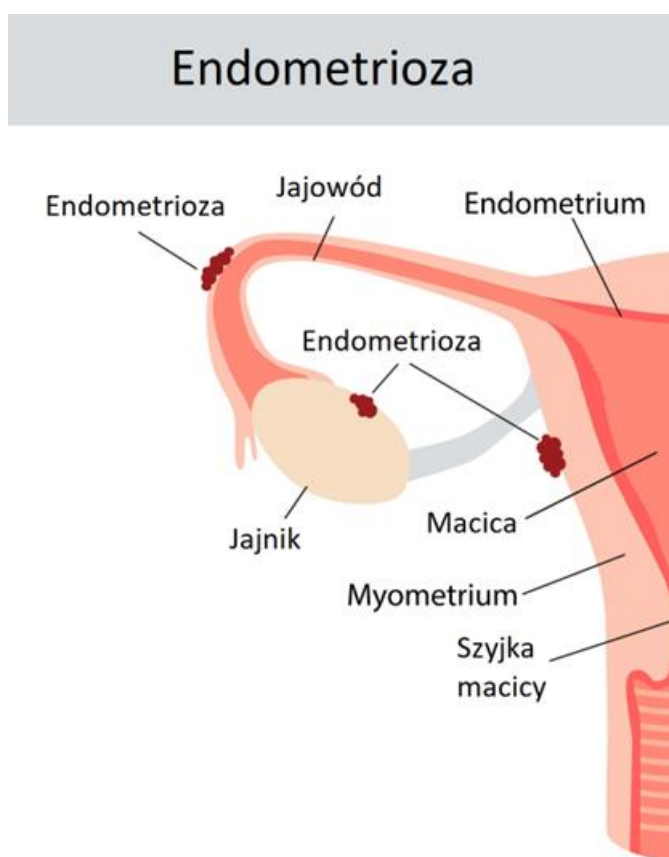
lokalizację i głębokość nacieku w przedziałach anatomicznych oraz uwzględniającego ogniska pozamiedniczne [55]. W piśmiennictwie opisano także rzadkie przypadki endometriozy w lokalizacjach nietypowych, takich jak układ oddechowy, osierdzie czy blizny pooperacyjne [56, 57].

2.1.3. Patogeneza

Endometrioza jest schorzeniem o wieloczynnikowej etiologii, w której istotne znaczenie mają współdziałające mechanizmy genetyczne, epigenetyczne, hormonalne i odpornościowe [58-62]. Badania bliźniąt wskazują na dziedziczność choroby na poziomie 47–51%, z czego ok. 26% można przypisać znanym wariantom genetycznym [61]. Analizy GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) obejmujące ponad 17 tys. pacjentek pozwoliły zidentyfikować 19 polimorfizmów SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), silniej związanych z ciężkimi postaciami choroby (III/IV wg rASRM – *revised American Society for Reproductive Medicine classification*) niż z łagodnymi (I/II), choć tłumaczą one jedynie ok. 1,75% ryzyka [61]. W ektopowych ogniskach wykazano także somatyczne mutacje charakterystyczne dla nowotworów, m.in. *KRAS*, *PIK3CA* i *ARID1A*, które nie prowadzą do transformacji złośliwej, ale mogą zwiększać proliferację i przeżywalność komórek [62]. Duże znaczenie mają również zmiany epigenetyczne – obejmujące metylację genów *ESR1/ESR2*, *PGR* i *CYP19A1* oraz czynniki transkrypcyjne HOX i GATA – a także deregulację mikroRNA (np. miR-20a, miR-200b), co zaburza proliferację, inwazję i odpowiedź na progesteron [62, 63]. Ektopowe tkanki charakteryzują się nadmierną aktywnością aromatazy i lokalnym hiperestrogenizmem oraz opornością na progesteron wynikającą z obniżonej ekspresji izoformy B receptora dla progesteronu (PR-B) [58, 59, 62, 63], nasilanej dodatkowo przez nadmierną aktywację receptora estrogenowego beta (ER-β) [62]. W procesie patogenezy uczestniczą także komórki macierzyste endometrium oraz pochodzenia szpikowego, których migrację wspiera oś chemokinowa CXCL12/CXCR4, co sprzyja tworzeniu ognisk głęboko naciekających i pozamiednicznych [62].

Ektopowe zmiany endometrialne charakteryzuje przewlekły stan zapalny z udziałem makrofagów, limfocytów B, komórek NK i komórek dendrytycznych, produkujących cytokiny (TNF – *Tumor Necrosis Factor*, IL-1β – *Interleukin 1 beta*, IL-6 – *Interleukin 6*, IL-8 – *Interleukin 8*), czynniki wzrostu i prostaglandyny. Mechanizm ten tworzy dodatnie sprzężenie zwrotne w osi estradiol–PGE2–COX-2, co prowadzi do utrwalania zapalenia, angiogenezy

i włóknienia [61, 62]. W płynie otrzewnowym pacjentek wykazano ponadto nadmiar żelaza i reaktywnych form tlenu, pochodzących z rozpadu erytrocytów, które nasilają proliferację i sprzyjają przeżywalności komórek [62, 63]. Dodatkowym elementem patofizjologii jest neuroangiogeneza – jednocześnie powstawanie nowych naczyń krwionośnych i włókien nerwowych w obrębie ognisk. W zmianach stwierdza się obecność włókien czuciowych (C i A δ) oraz cholinergiczných i adrenergicznych, a cytokiny i czynniki wzrostowe (NGF – *Nerve Growth Factor*, TNF, IL-1 β) zwiększają ekspresję kanałów bólowych, takich jak TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*), nasilając przewodnictwo nocyceptywne [61]. Estrogeny dodatkowo wzmacniają interakcje między układem odpornościowym a nerwowym, co sprzyja przewlekłemu bólowi i centralnej sensytyzacji [61]. Różnorodność tych mechanizmów wyjaśnia heterogenność objawów i zmienną odpowiedź pacjentek na leczenie.



Rycina 3. Schematyczna ilustracja endometriozy – obecność ognisk gruczołów endometrium poza jamą macicy: w obrębie jajników, otrzewnej, jajowodów. Opracowano na podstawie materiałów Pantai Hospital Kuala Lumpur [<https://www.pantai.com.my/medical-specialties/maternity-services/endometriosis-vs-adenomyosis>]; tłumaczenie i adaptacja własna.

2.2. Adenomioza

2.2.1. Epidemiologia

Epidemiologia adenomiozy jest trudna do oszacowania, gdyż przez wiele lat rozpoznawanie stawiano wyłącznie na podstawie badania histopatologicznego po histerektomii. W literaturze podawane wartości częstości występowania wahają się od 5% do 70%, najczęściej około 20–35% wśród pacjentek poddanych histerektomii [64-66]. Różnice wynikają z niejednorodnych kryteriów diagnostycznych i metod badawczych. Wprowadzenie ultrasonografii przezpochwowej i rezonansu magnetycznego umożliwiło mniej inwazyjne rozpoznanie choroby, również u młodszych kobiet [65, 66].

Tradycyjnie adenomiozę opisywano u kobiet w wieku 40–50 lat, zwykle wieloródek [64-66]. Obecnie coraz częściej diagnozuje się ją także u młodszych pacjentek, w tym nastolatek, gdzie może przyjmować postać młodzieńczej torbielowatej adenomiozy [65]. W populacyjnych analizach mediana wieku w chwili rozpoznania chirurgicznego wynosi 40–50 lat, co koreluje ze szczytem częstości histerektomii [66].

Choroba istotnie obniża jakość życia, powodując obfite krwawienia miesięczne, ból miednicy i przewlekłe zmęczenie. Wiąże się także ze zwiększonym ryzykiem powikłań położniczych (poród przedwczesny, stan przedrzucawkowy, niska masa urodzeniowa) oraz obniżoną skutecznością metod wspomaganego rozrodu [66]. Szacunki zapadalności w badaniach populacyjnych są niskie (0,027%–0,8%), co wskazuje na istotne niedodiagnozowanie choroby [66].

2.2.2. Obraz kliniczny

Adenomioza to obecność tkanki endometrium w mięśniu macicy, prowadząca głównie do bolesnych miesiączek, obfitych krwawień i niepłodności [67-69]. Objawy wynikają z lokalnego hiperestrogenizmu, oporności na progesteron, przewlekłego zapalenia, włóknienia i neuroangiogenezy.

Ból wiąże się z nadmierną aktywnością skurczową macicy, obecnością włókien nerwowych w ogniskach ektopowych oraz działaniem mediatorów zapalnych (np. TNF, IL-1 β , NGF), które sprzyjają nadwrażliwości nerwowej i centralnej sensytyzacji [68, 69]. Obfite miesiączki wynikają z krwawienia w ogniskach adenomiozy, zaburzeń angiogenezy (nadekspresja VEGF) i lokalnych nieprawidłowości hemostazy [68, 69].

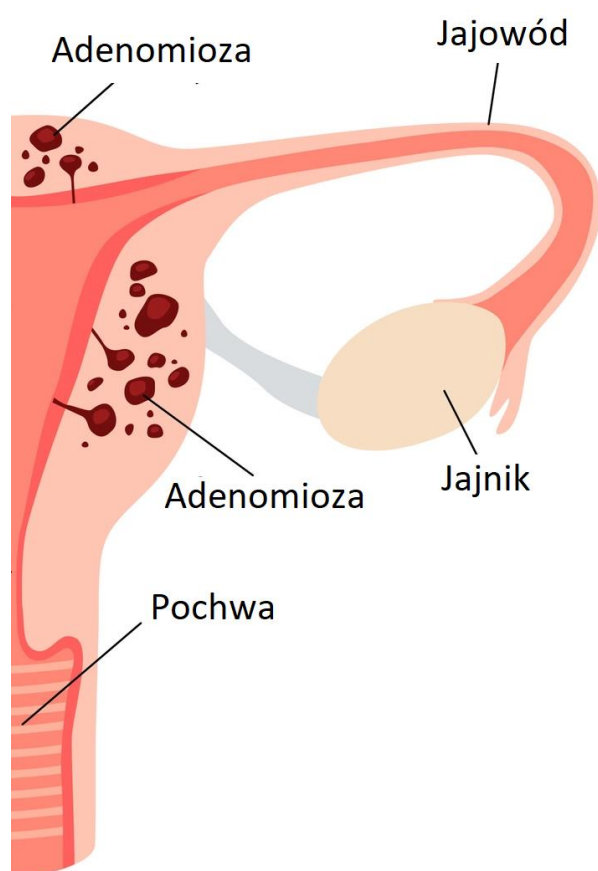
Niepłodność związana jest z deformacją mięśnia macicy, zaburzeniami perystaltyki oraz spadkiem receptywności endometrium. Szczególną rolę odgrywa obniżenie ekspresji genu *HOXA10* – czynnika transkrypcyjnego z grupy homeotycznych, kluczowego dla prawidłowej implantacji zarodka [68, 69].

2.2.3. Patogeneza

Patogeneza adenomiozy jest wieloczynnikowa i obejmuje kilka głównych mechanizmów. Kluczową rolę przypisuje się wrastaniu warstwy podstawnej endometrium w głąb mięśnia macicy na granicy endometrium–miometrium, której zaburzenia, spowodowane m.in. hiperperystaltyką, ciążami lub zabiegami ginekologicznymi, sprzyjają migracji komórek [68, 70]. Powtarzające się urazy inicjują proces TIAR (*tissue injury and repair* – uraz i naprawa tkanek), nasilany przez lokalny hiperestrogenizm i oporność na progesteron, a dodatkowo podtrzymywany przez hipoksję, stan zapalny i czynniki proangiogenne [68, 70-72]. W ektopowym endometrium wykazano zwiększoną aktywność aromatazy i obniżoną ekspresję 17 β -HSD2 (17 β -hydroksysteroidowa dehydrogenaza typu 2), co prowadzi do kumulacji estradiolu, oraz obniżoną ekspresję izoformy B receptora progesteronowego, wynikającą z zaburzeń epigenetycznych (hipermetylacja promotora, nadekspresja metylotransferaz DNA, deregulacja deacetylaz histonowych) [70-72]. Równolegle rozwija się EMT (*epithelial–mesenchymal transition* – metaplazja nabłonkowo-mezenchymalna), w której pod wpływem estradiolu, czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) i TGF- β komórki endometrium tracą ekspresję markerów nabłonkowych (np. E-kadheryny) i nabywają fenotyp mezenchymalny (N-kadheryna, wimentyna), co umożliwia ich migrację do miometrium [68, 70, 71]. Alternatywnie ogniska adenomiozy mogą rozwijać się z metaplazji pozostałości przewodów Müllera lub z progenitorowych komórek macierzystych endometrium (*endometrial mesenchymal stem cells*, eMSCs), których migrację ułatwia zwiększona aktywność metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9) [68, 70, 71]. Patogeneza obejmuje także zmiany genetyczne, m.in. polimorfizmy genów metabolizmu estrogenów (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP19*, *COMT*), prowadzące do deregulacji proliferacji i odpowiedzi hormonalnej [70-72]. Szczególne znaczenie mają mutacje somatyczne, zwłaszcza genu *KRAS* w gruczołach warstwy podstawnej, które inicjują powstawanie ognisk w mięśniu macicy, podczas gdy mutacje *PIK3CA* są mniej charakterystyczne [70, 73]. Udział mają również zaburzenia ekspresji mikroRNA (miR-17, miR-21, miR-200), które regulują proliferację, EMT, apoptozę i procesy zapalne [70]. Chorobie towarzyszy przewlekły stan zapalny z nadprodukcją cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF), aktywacją

czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i cyklooksygenazy-2, nasilonymi procesami angiogenezy (VEGF, PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu, HGF) oraz włóknienia, które prowadzą do powiększenia macicy i bólu o charakterze zapalno-neuropatycznym [69-71].

Adenomioza



Rycina 4. Schematyczna ilustracja adenomiozy – obecność ektopowych ognisk endometrium w obrębie błony mięśniowej. Opracowano na podstawie materiałów Pantai Hospital Kuala Lumpur [<https://www.pantai.com.my/medical-specialties/maternity-services/endometriosis-vs-adenomyosis>]; tłumaczenie i adaptacja własna.

2.3. Rak endometrium

2.3.1. Epidemiologia

Rak endometrium stanowi najczęstszy nowotwór złośliwy żeńskiego układu rozrodczego oraz czwartą co do częstości diagnozę onkologiczną u kobiet w Stanach Zjednoczonych. Każdego roku rozpoznaje się tam około 61,9 tys. nowych przypadków, a liczba zgonów sięga 12,2 tys. [74, 75]. W ujęciu globalnym największą zapadalność odnotowuje się u kobiet w wieku 65–75 lat [76, 77]. Choć najwyższy odsetek zachorowań utrzymuje się w Ameryce Północnej, w ostatnich trzech dekadach liczba nowych przypadków na świecie wzrosła o ponad 130% [78].

W USA średni wiek rozpoznania raka endometrium typu 1 obniżył się z 64 do 61 lat, co tłumaczy się m.in. narastającym problemem otyłości [75]. Prognozy wskazują, że do 2030 roku liczba nowych zachorowań może się podwoić, osiągając około 122 tys. przypadków rocznie [79]. Wzrost zapadalności jest szczególnie wyraźny w populacjach kobiet pochodzenia latynoskiego, azjatyckiego, wyspiarzy Pacyfiku oraz wśród czarnoskórych, w porównaniu z białymi kobietami niebędącymi latynoskami. Co istotne, w tej ostatniej grupie częściej stwierdza się nowotwory o wyższym stopniu zaawansowania i złośliwości w chwili diagnozy, a rokowanie jest gorsze, co może mieć związek z czynnikami społeczno-ekonomicznymi i barierami w dostępie do opieki medycznej [74, 79].

2.3.2. Obraz kliniczny

Rak endometrium w zdecydowanej większości przypadków objawia się nieprawidłowymi krwawieniami z dróg rodnych, które są pierwszym i najczęściej zgłaszanym symptomem, szczególnie u kobiet po menopauzie [80, 81]. U tej grupy pacjentek krwawienie pomenopauzalne jest traktowane jako objaw alarmowy, wymagający pilnej diagnostyki w kierunku chorób nowotworowych trzonu macicy. W populacji kobiet przed menopauzą obraz kliniczny może obejmować nieregularne krwawienia miesięczne, krwawienia międzymiesiączkowe lub przedłużające się miesiączki [80]. Rzadziej występuje wodnista lub surowiczo-krwista wydzielina z pochwy, która może być objawem wczesnym lub towarzyszyć chorobie w bardziej zaawansowanych stadiach [81].

Ból w podbrzuszu lub w miednicy mniejszej jest zazwyczaj objawem późnym i częściej obserwuje się go w przypadkach choroby o większym stopniu zaawansowania [80]. W sytuacjach, gdy proces nowotworowy nacieka sąsiednie narządy, mogą pojawić się

dodatkowe symptomy, takie jak ból przy oddawaniu moczu lub krwimocz w przypadku zajęcia pęcherza moczowego, czy też zaparcia w przypadku naciekania odbytnicy [81].

Znamienne jest, że dzięki objawom krwotocznym większość przypadków raka endometrium rozpoznaje się w stadium choroby ograniczonym do jamy macicy, co sprzyja wczesnemu wdrożeniu leczenia i wiąże się z lepszym rokowaniem [80, 81].

2.3.3. Patogeneza

Rak endometrium rozwija się zwykle od zmian przedinwazyjnych, które stopniowo przechodzą w postać inwazyjną naciekającą zrąb, mięsień macicy, a następnie szerzącą się drogą naczyń limfatycznych i krwionośnych [82]. Przerzuty obejmują w pierwszej kolejności węzły miednicze i okołocewkowe, szczególnie zaśłonowe, podczas gdy guzy zlokalizowane w dnie macicy lub przydatkach częściej zajmują węzły okołoaortalne [83]. Wraz z progresją nowotwór przekracza granice macicy, obejmując błonę surowiczą, otrzewną oraz sąsiednie narządy [82]. Niskiego stopnia raki endometrioidalne typu 1 zwykle pozostają ograniczone do macicy i rokują dobrze, natomiast raki wysokiego stopnia typu 2, często związane z mutacją *TP53* (tumor protein p53), cechują się agresywnym przebiegiem i późnym rozpoznaniem.

W rakach typu 1 proces transformacji złośliwej rozwija się zazwyczaj na podłożu zmian EIN (*Endometrial Intraepithelial Neoplasia*), wtórnych do stymulacji estrogenowej, z udziałem mutacji genów supresorowych, m.in. *PTEN* czy *ARID1A*, a także aktywacji szlaków zależnych od β -kateniny [79]. Raki surowicze i jasnokomórkowe typu 2 powstają częściej w zanikowym endometrium, z akumulacją mutacji *TP53* i progresją od dysplazji gruczołowej do raka śródnabłonkowego i inwazyjnego [79, 84, 85]. Mechanizmy molekularne raków endometrioidalnych wysokiego stopnia i jasnokomórkowych są słabiej poznane, jednak również prowadzą do ekspresji nieprawidłowego białka p53 [82]. Podobieństwa obserwuje się między rakami surowiczymi endometrium i przydatków, które mogą wcześniej rozsiewać się do jamy otrzewnowej [86]. Rola mutacji germinalnych *BRCA1/BRCA2* w raku surowiczym endometrium pozostaje niejednoznaczna [84, 87, 88]. W mikrośrodowisku nowotworowym stwierdza się wzrost liczby makrofagów związanych z guzem, korelujący z inwazją mięśniówki, naciekaniem naczyń, przerzutami oraz ekspresją Ki67 i p53 [79].

Tradycyjnie wyróżnia się dwa typy raka endometrium: typ 1 – endometrioidalny, częstszy, związany z ekspozycją na estrogeny i zmianami EIN, o zwykle niskim stopniu złośliwości, oraz typ 2 – obejmujący raki surowicze, jasnokomórkowe, nieodróżniane i mięsakoraki, związany

z gorszym rokowaniem [76, 89-91]. Stopniowanie wg FIGO i WHO opiera się na udziale komponentu litego i atypii jądrowej, z korektą w górę o jeden stopień przy nasilonej atypii [90]. Raki endometrioidalne niskiego stopnia z <50% naciekiem mięśniówki cechują się blisko 100% przeżyć pięcioletnich, podczas gdy raki wysokiego stopnia, w tym typ 2, mają istotnie gorsze rokowanie [91-97].

Ze względu na ograniczenia klasycznej oceny histopatologicznej coraz większe znaczenie ma klasyfikacja molekularna wg The Cancer Genome Atlas, wyróżniająca cztery podtypy:

- **POLE ultramutowany (POLEmut)** – z mutacjami w domenie egzonukleazowej genu *POLE*, obciążeniem >100 mutacji/Mb i bardzo dobrym rokowaniem [77, 79, 98, 99]
- **MMRd (mismatch repair deficient)** – z zaburzeniami naprawy DNA, cechujący się pośrednim rokowaniem i wysoką immunogennością [77, 79, 98, 99]
- **p53abn (copy-number high)** – guzy z mutacjami *TP53*, obejmujące głównie raki surowicze o agresywnym przebiegu [77, 79, 98, 99]
- **NSMP (no specific molecular profile, copy-number low)** – rak endometrioidalny o pośrednim rokowaniu, zależnym m.in. od statusu receptorów steroidowych [77, 79, 98, 99].

WHO rekomenduje łączenie klasyfikacji molekularnej z immunohistochemią p53 i MMR, a FIGO zaleca jej stosowanie także do modyfikacji stopnia zaawansowania nowotworów w stadiach I–II [99].

2.4. Zapalenie endometrium (*Endometritis*)

2.4.1. Epidemiologia

Ostre zapalenie endometrium najczęściej towarzyszy zapaleniu miednicy mniejszej, a jego głównymi czynnikami etiologicznymi są *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae* [100]. Poporodowe endometritis występuje przede wszystkim po cięciu cesarskim (10–20% przypadków), rzadziej po porodzie naturalnym, a śmiertelność pozostaje niska (<1%). Do czynników ryzyka należą młody wiek, otyłość i przedłużony poród [100]. Nowsze dane wskazują jednak na niższą zapadalność (<1%), przy czym w posiewach dominują bakterie jelitowe (*Enterobacterales*), *Escherichia coli* i *Streptococcus agalactiae* [101].

Przewlekłe zapalenie endometrium (*chronic endometritis*, CE) rozpoznaje się u ok. 24% kobiet poddanych biopsji endometrium, częściej w fazie proliferacyjnej niż wydzielniczej cyklu [102].

Występuje ono szczególnie często u pacjentek z nawracającymi niepowodzeniami implantacji, poronieniami nawracającymi, nieprawidłowymi krwawieniami z macicy czy rozrostem endometrium [102]. CE współwystępuje także z adenomiozą (60% przypadków vs. 10% przy mięśniakach), wiąże się z wyższym BMI oraz obniżoną płodnością [103].

2.4.2. Obraz kliniczny

Manifestacja zapalenia endometrium jest zróżnicowana w zależności od postaci choroby i nasilenia procesu zapalnego. W ostrej postaci, niezwiązanej z ciążą, najczęściej obserwuje się objawy zbliżone do zapalenia narządów miednicy mniejszej, takie jak gorączka, bóle w miednicy oraz upławy, przy czym nasilenie dolegliwości może wahać się od łagodnego do ciężkiego [104, 105]. W obrazie histopatologicznym ostre zapalenie charakteryzuje się obecnością mikroropni oraz naciekiem neutrofili w obrębie endometrium [106]. Chorobie może towarzyszyć ostre zapalenie jajowodów, jednak w przeciwieństwie do niego, sama ostra postać endometritis nie wiąże się istotnie ze spadkiem płodności [106, 107].

Przewlekłe zapalenie endometrium zwykle przebiega skąpoobjawowo, a część pacjentek pozostaje bez dolegliwości. Jeżeli objawy występują, należą do nich przede wszystkim nieprawidłowe krwawienia maciczne, ból przy stosunku płciowym oraz ból w miednicy mniejszej [106]. W obrazie histologicznym charakterystycznym wykładnikiem są komórki plazmatyczne obecne w podścielisku endometrium, którym mogą towarzyszyć inne cechy przewlekłego stanu zapalnego [108, 109]. Choroba bywa również wiązana z niepłodnością i nawracającymi poronieniami.

Poporodowe zapalenie endometrium, będące najczęstszą przyczyną gorączki w połogu [110], zwykle ujawnia się w pierwszych dniach po porodzie i może obejmować gorączkę, bolesność macicy, odchody połogowe o przykrym zapachu oraz ogólne objawy infekcji. W przypadkach o ciężkim przebiegu, szczególnie w zakażeniach wywołanych przez *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* lub beztlenowce z rodzaju *Clostridium*, może dojść do gwałtownego pogorszenia stanu ogólnego, w tym wstrząsu septycznego [111].

2.4.3. Patogeneza

Przewlekłe zapalenie endometrium jest wynikiem współdziałania mechanizmów immunologicznych, molekularnych i mikrobiologicznych, które prowadzą do obniżenia receptywności i zaburzeń implantacji. Fizjologicznie w endometrium obecne są komórki NK, makrofagi i limfocyty T, których proporcje zmieniają się w cyklu i ciąży [112-116]. W CE stwierdza się spadek liczby immunoregulacyjnych NK CD56^{bright}CD16⁻ i przewagę cytotoksycznych NK CD56^{dim}CD16⁺, czemu towarzyszy naciek limfocytów T i B, obecność plazmocytów oraz nadprodukcja immunoglobulin IgG2 [117-122]. Proces ten jest częściowo inicjowany przez lipopolisacharyd, który indukuje ekspresję selektyny E i chemokin, nasilając rekrutację limfocytów B i ich różnicowanie w plazmocyty [121]. Zaburzenia ekspresji genów związanych z proliferacją, apoptozą i implantacją (m.in. IGFBP-1 (*insulin-like growth factor-binding protein 1*), BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), BAX (*Bcl-2-associated X protein*), IL-11 (*interleukin 11*), IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*)) dodatkowo zakłócają przygotowanie endometrium i rekrutację komórek odpornościowych [123-129]. Prowadzi to do asynchronii między rozwojem endometrium a zarodka. U pacjentek z CE często występuje także dysbioza mikrobioty jamy macicy – utrata dominacji *Lactobacillus* i wzrost udziału bakterii patogennych, co wiąże się z obniżonymi wskaźnikami implantacji i ciąży [130-134]. Istotnym elementem jest również upośledzone przekształcanie doczesnej, związane ze spadkiem markerów takich jak prolaktyna czy IGFBP-1 oraz nieprawidłową regulacją receptorów dla estrogeny i progesteronu, co może powodować przesunięcie „okna implantacyjnego” [135-143]. Dodatkowo CE wpływa na czynność skurczową macicy, zmniejszając liczbę skurczów wspomagających migrację plemników i nasilając skurcze niekorzystne w fazie lutealnej [144].

3. Sygnalizacja purynergiczna

3.1. Wprowadzenie

Puryny, takie jak adenosynotrifosforan (ATP), adenosynodifosforan (ADP) czy adenozyne, należą do najstarszych cząsteczek biologicznych o fundamentalnym znaczeniu ewolucyjnym i odgrywają kluczową rolę nie tylko jako nośniki energii wewnątrzkomórkowej, ale także jako sygnały pozakomórkowe [145]. Już w 1929 roku Drury i Szent-Györgyi opisali wpływ adenosynowych nukleotydów na serce i naczynia krwionośne [146], co zapoczątkowało rozwój koncepcji, że puryny mogą pełnić funkcję przekaźników sygnałowych. Kilka dekad później Burnstock sformułował hipotezę o tzw. neurotransmisji purynergicznej, wskazując ATP jako

neuroprzekaźnik niezależny od układów adrenergicznego i cholinergicznego [147]. Początkowo koncepcja ta spotkała się z dużym sceptycyzmem, głównie z powodu wszechobecnej i „prostej” natury ATP, jednak kolejne odkrycia enzymów degradujących ATP pozakomórkowe oraz identyfikacja swoistych receptorów stopniowo potwierdziły jej prawdziwość [148].

Obecnie sygnalizacja purynergiczna jest uznawana za jeden z pierwotnych systemów komunikacji komórkowej, który zachował ogromne znaczenie w regulacji procesów fizjologicznych i patologicznych. Obejmuje ona zarówno mechanizmy uwalniania i metabolizmu nukleotydów, jak i szeroką sieć receptorów, które reagują na adenozyne, ATP i inne nukleotydy [149]. W rezultacie uczestniczy w kontroli proliferacji, różnicowania i śmierci komórek, w odpowiedzi immunologicznej, w procesach zapalnych, w hemostazie, a także w regulacji pracy układu nerwowego, sercowo-naczyniowego czy pokarmowego [147, 148]. Deregulacja tego układu wiąże się z rozwojem licznych chorób, w tym neurodegeneracyjnych, autoimmunologicznych, metabolicznych i nowotworowych [145, 147].

3.2. Klasyfikacja i charakterystyka receptorów purynergicznych

Receptory purynergiczne dzieli się na dwie główne grupy: **P1** – czyli receptory adenozynowe, oraz **P2** – reagujące na ATP i inne nukleotydy [146, 148].

Receptory P1 (adenozynowe)

Rodzina P1 obejmuje cztery podtypy: A1, A2A, A2B i A3. Są to receptory sprzężone z białkami G, które modulują aktywność cyklicznej adenylanowej – A1 i A3 hamują jej działanie, natomiast A2A i A2B ją aktywują [147, 148]. Receptory te różnią się powinowactwem do adenozyne – A1, A2A i A3 reagują na niskie, fizjologiczne stężenia adenozyne, podczas gdy aktywacja A2B wymaga jej znacznie wyższych, zwykle patologicznych poziomów [147]. Funkcjonalnie uczestniczą one m.in. w regulacji rytmu serca, procesach zapalnych, modulacji czynności ośrodkowego układu nerwowego czy w ochronie tkanek przed niedotlenieniem [145, 148].

Receptory P2

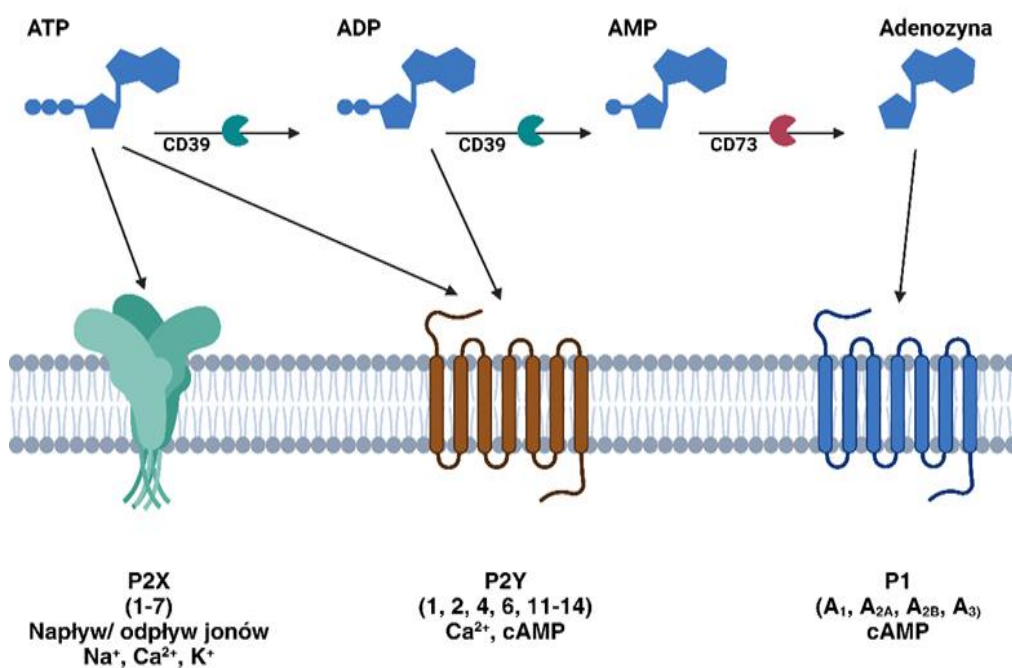
Rodzina P2 dzieli się na dwie podgrupy:

- **P2X** – są to receptory jonotropowe, będące kanałami kationowymi bramkowanymi przez ATP. Tworzą trimery, mogą występować jako homomery lub heteromery. Obecnie wyróżnia się siedem podtypów P2X (P2X1–P2X7). Różnią się one wrażliwością na ATP

i czasem desensytyzacji – np. P2X1 i P2X3 szybko reagują i szybko ulegają desensytyzacji, podczas gdy P2X7 wymaga wysokich stężeń ATP i praktycznie nie desensytyzuje [147]. Unikatową cechą P2X7 jest zdolność do przechodzenia z kanału jonowego w tzw. duży por, co prowadzi do napływu cząsteczek o większej masie, a nawet do śmierci komórki [147, 148].

- **P2Y** – to receptory metabotropowe związane z białkami G. Reagują na różne nukleotydy, w tym ATP, ADP, UTP (urydylotrifosforan) i UDP (urydylodifosforan). Obecnie znanych jest osiem receptorów P2Y (P2Y1,2,4,6,11,12,13,14). Różne podtypy aktywują odmienne szlaki – np. P2Y1, P2Y2, P2Y4 i P2Y6 poprzez białko Gq indukują szlak fosfolipazy C i mobilizację wapnia z retikulum endoplazmatycznego, podczas gdy P2Y12, P2Y13 i P2Y14 poprzez Gi hamują cyklazę adenylanową [147]. Receptory P2Y odgrywają kluczową rolę m.in. w agregacji płytek krwi (P2Y1 i P2Y12), w regulacji funkcji układu odpornościowego czy w procesach sekrecji [145, 148].

Schemat klasyfikacji i interakcji receptorów purynowych przedstawiono rycinie 5 oraz w tabeli 1.



Rycina 5. Szlak sygnalizacji purynowej: degradacja ATP do adenozyiny i aktywacja receptorów P2X, P2Y oraz P1. Na podstawie “Purinergic Receptors in the Airways: Potential Therapeutic Targets for Asthma?”, autorstwa Thompson, R. J., Sayers, I., Kuokkanen, K.,

Tabela 1. Klasyfikacja i charakterystyka receptorów purynergiczych

RODZINA	PODTYPY	CHARAKTERYSTYKA SYGNALIZACJI	LIGANDY	FUNKCJE BIOLOGICZNE
P1 (ADENOZYNOWE) [145, 147, 148]	A1, A2A, A2B, A3	Receptory metabotropowe (sprzężone z białkiem G). A1 i A3 – hamują cyklazę adenylnową (Gi), A2A i A2B – aktywują cyklazę adenylnową (Gs).	Adenozyna	Regulacja rytmu serca, procesy zapalne, neuroprotekcja, modulacja układu nerwowego
P2X (JONOTROPOWE) [147, 148]	P2X1– P2X7	Kanały jonowe bramkowane ATP, tworzą trimery (homo- lub heteromery). Różnice w szybkości desensytyzacji i wrażliwości na ATP.	ATP	Napływ kationów (Na ⁺ , Ca ²⁺), regulacja pobudliwości komórkowej, proliferacja, apoptoza
P2Y (METABOTROPOWE) [145, 147, 148]	P2Y1,2,4,6, 11,12,13,14	Receptory sprzężone z białkami G. P2Y1/2/4/6 → Gq → ↑Ca ²⁺ (PLC). P2Y12/13/14 → Gi → ↓cAMP. P2Y11 → Gq i Gs.	ATP, ADP, UTP, UDP	Agregacja płytek (P2Y1, P2Y12), regulacja odporności, sekrecja, proliferacja

Wśród receptorów purynergiczych szczególne miejsce zajmuje P2X7, dawniej określany jako receptor P2Z. Odnacza się on unikalną właściwością – przy przedłużonej stymulacji wysokimi stężeniami ATP ulega przejściu z klasycznego kanału jonowego w strukturę formującą duży por, co prowadzi do napływu makrocząsteczek i może inicjować lizę komórki [146-148]. Funkcja ta odróżnia go od pozostałych członków rodziny P2X i sprawia, że P2X7 jest

intensywnie badany w kontekście procesów zapalnych, śmierci komórkowej i odpowiedzi immunologicznej. Jego aktywacja wiąże się z uruchamianiem inflamasomu NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) i wydzielaniem cytokin, co wskazuje na istotną rolę tego receptora w mechanizmach patofizjologicznych [145, 147].

4. Receptor P2X7

4.1. Budowa receptora P2X7

4.1.1. Gen P2RX7

Gen kodujący receptor P2X7 (*P2RX7*) u człowieka zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 12, w regionie 12q24.31, w bliskim sąsiedztwie genu *P2RX4* (12q24.32). Takie rozmieszczenie sugeruje, że oba geny wywodzą się z duplikacji, co potwierdza wysoka homologia sekwencji białkowych (ok. 41%) [150, 151]. Gen *P2RX7* składa się z 13 egzonów, co jest typowe również dla innych ssaków, m.in. makaka, psa, pandy wielkiej, szczura, myszy i świnki morskiej. Wyjątkiem jest danio pręgowany, u którego gen zawiera 14 egzonów i leży na chromosomie 8 [151-153]. Do tej pory obecność genu *P2RX7* stwierdzono w ponad 50 gatunkach, jednak szczegółowe badania funkcjonalne prowadzono głównie u ssaków [152, 153].

Gen *P2RX7* cechuje się wysokim stopniem polimorfizmu. Zidentyfikowano ponad 150 jednonukleotydowych zmian (SNP), w tym w obrębie domeny zewnątrzkomórkowej i C-końca. Część z nich prowadzi do utraty funkcji receptora, jak np. mutacje E186K czy I568N, które zaburzają translokację białka do błony komórkowej [150, 153]. Inne zmiany, takie jak H155Y, H270R czy A348T, skutkują wzrostem aktywności receptora i ułatwiają formowanie porów [150, 153]. Polimorfizmy te były wiązane z podatnością na różne choroby, w tym gruźlicę, choroby neurodegeneracyjne, osteoporozę czy zaburzenia afektywne, choć dowody pozostają niejednoznaczne [150].

Gen *P2RX7* podlega także alternatywnemu splicingowi. U człowieka opisano co najmniej dziewięć wariantów transkryptu, od P2X7B do P2X7J. Część z nich koduje białka skrócone, pozbawione fragmentów domeny C-końcowej. Przykładem jest wariant P2X7B, który zachowuje funkcję kanału jonowego, ale nie tworzy dużego poru. Może on jednak łączyć się z podjednostkami pełnowymiarowego receptora P2X7A, modulując jego aktywność i w pewnych warunkach nasilając odpowiedź komórkową [150, 153]. Niektóre warianty,

jak P2X7J, tworzą nieaktywne kompleksy heterotrimeryczne, działając w sposób protekcyjny wobec komórki [153].

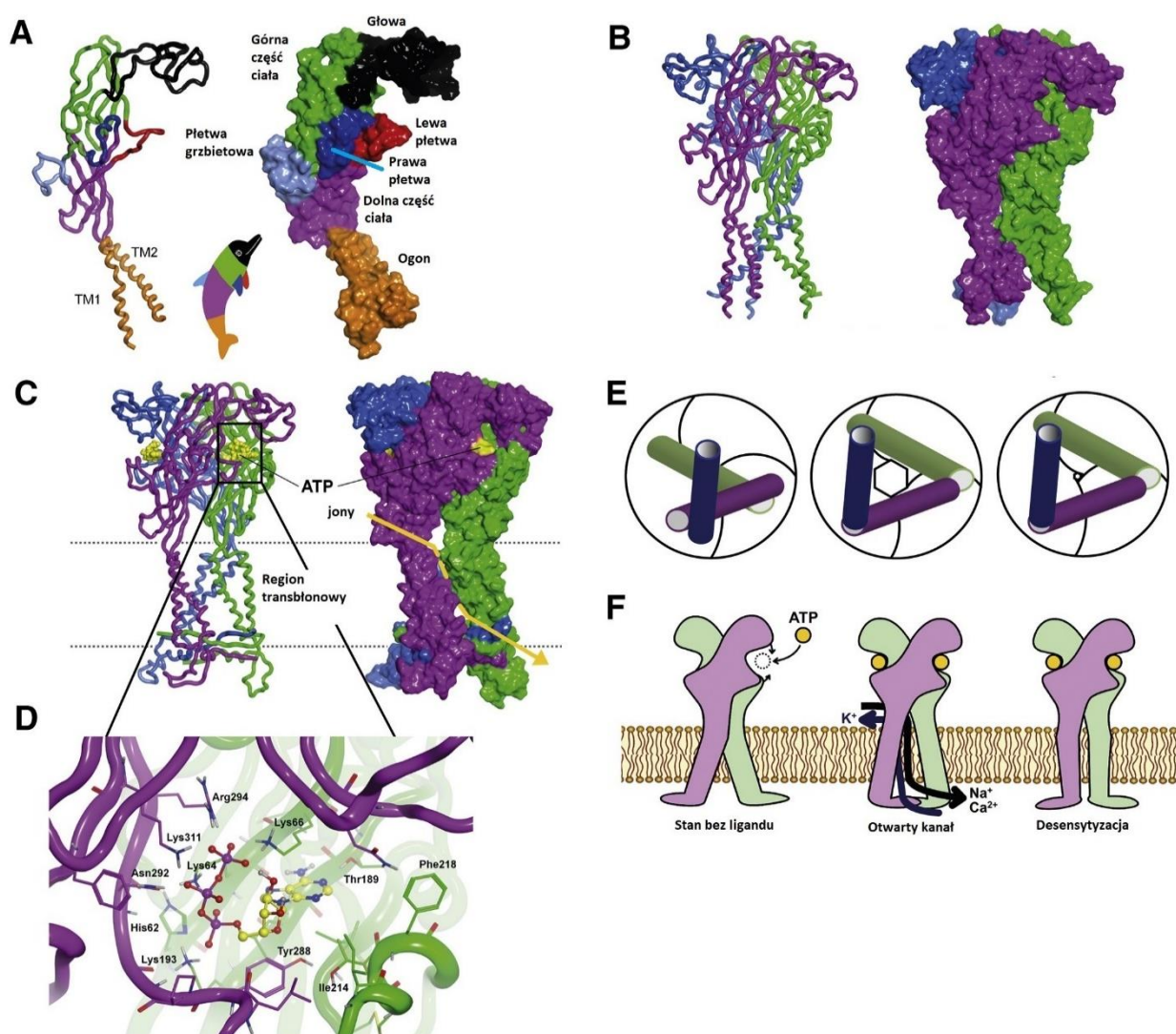
Regulacja transkrypcji genu *P2RX7* również jest złożona. Wykazano, że w jego promotorze wiąże się czynnik SP1, aktywowany w warunkach stresu komórkowego, a ekspresja w niektórych typach komórek (np. glejowych) może być indukowana przez HIF-1 α , co sugeruje znaczenie hipoksji w regulacji tego receptora [153].

Tabela 2. Warianty splicingowe genu P2RX7

WARIANT	CHARAKTERYSTYKA	FUNKCJA / EFEKT BIOLOGICZNY	ŹRÓDŁO
P2X7A	Pełnowymiarowy, 595 aa	Receptor kanoniczny, kanał + duży por	150, 153
P2X7B	Skrócony C-koniec	Kanał jonowy aktywny, brak dużego poru; może tworzyć heterotrimery z P2X7A i nasilać odpowiedź	150, 153
P2X7C	Brak eksonu 4	Zmieniona funkcja, szczegóły nie w pełni poznane	150
P2X7D	Brak eksonu 5	Zmieniona funkcja, szczegóły nie w pełni poznane	150
P2X7E	Brak eksonów 7 i 8	Skrócona forma, utrata części funkcji	150
P2X7F	Brak eksonów 4 i 8	Skrócona forma, utrata części funkcji	150
P2X7G	Dodatkowy ekson N3 → delecja TM1	Niefunkcjonalny	150
P2X7H	Dodatkowy ekson N3 → delecja TM1	Niefunkcjonalny	150
P2X7I	Mutacja w intronie 1	Allel niekodujący (brak białka)	150
P2X7J	Koniec po eksonie 7	Niefunkcjonalny, ale tworzy heterotrimery z P2X7A (efekt protekcyjny)	150, 153
P2X7K (MYSZ)	Alternatywny N-koniec i TM1	Zwiększona aktywność porotwórcza	150

4.1.2. Białko P2X7

Produkt genu *P2RX7* to białko o długości 595 aminokwasów, tworzące podjednostkę receptora P2X7. Każda podjednostka składa się z krótkiego fragmentu N-końcowego po stronie cytoplazmatycznej (ok. 26 reszt), dużej domeny zewnątrzkomórkowej (ok. 280 aminokwasów), dwóch helis transbłonowych (TM1 i TM2, po ok. 24 aminokwasy każda) oraz długiego ogona karboksylowego w cytoplazmie (239 aminokwasów) [150, 151]. Struktura domeny zewnątrzkomórkowej obejmuje 14 pasm β i cztery helisy α , co nadaje jej kształt określany jako „delfin” – z głową, tułowiem, płetwami i grzbietem, podczas gdy domeny transbłonowe przypominają ogon [150, 152, 154].



Rycina 6. Architektura ludzkiego receptora P2X7R zbudowana metodą modelowania homologicznego na podstawie struktury krystalicznej ludzkiego P2X3R.

(A) Monomer P2X7 przedstawiony w formie struktury drugorzędowej (po lewej) i powierzchni molekularnej (po prawej), opracowany przy użyciu struktury krystalicznej apo-formy

ludzkiego receptora P2X3 jako modelu. Kształt monomeru porównano do sylwetki delfina, z podziałem na poszczególne regiony według Hattori i Gouaux [155].

(B, C) Schematyczne ujęcie trimera P2X7R w stanie zamkniętym (B) i otwartym (C). W obu stanach trimer receptora pokazano jako strukturę drugorzędową (po lewej) oraz powierzchnię molekularną (po prawej). Trzy monomery oznaczono kolorami: niebieskim, fioletowym i zielonym. Częsteczka ATP zaznaczona kolorem żółtym.

(D) Szczegółowy widok miejsca wiązania ATP. Dwa sąsiadujące monomery (fioletowy i zielony) uczestniczą w tworzeniu miejsca wiązania. Zaznaczono kluczowe reszty aminokwasowe zaangażowane w interakcję z ligandem.

(E) Schemat przejścia kanału jonowego ze stanu zamkniętego (po lewej), przez otwarty (środek), do desensytyzacji (po prawej).

(F) Model poglądowy podsumowujący zmiany konformacyjne zachodzące podczas otwierania i desensytyzacji receptora oraz kierunki przepływu jonów. Na podstawie Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., & Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, 47(1), 15–31. Tłumaczenie i aranżacja własna.

Funkcjonalny receptor P2X7 powstaje w wyniku połączenia trzech identycznych podjednostek w homo-trimer. Miejsca wiązania ATP znajdują się na granicy sąsiadujących monomerów – każde z trzech miejsc tworzą fragmenty dwóch sąsiadujących podjednostek. Do aktywacji P2X7 wymagane jest związanie ATP we wszystkich trzech kieszeniach, w przeciwieństwie do innych P2XR, gdzie wystarczają dwie cząsteczki nukleotydu [153, 154]. Kluczowe aminokwasy zaangażowane w wiązanie ATP to m.in. Lys64, Lys66, Lys193, Arg294 i Lys311, które stabilizują grupy fosforanowe, oraz Thr189 odpowiadająca za interakcję z adenozyzną [150, 154].

Receptor P2X7 pełni funkcję nieselektywnego kanału kationowego, przewodzącego Na^+ i Ca^{2+} do wnętrza komórki oraz K^+ na zewnątrz. Charakterystyczną cechą tego receptora jest zdolność do formowania dużego poru przewodzącego hydrofilne cząsteczki o masie do kilkuset daltonów. Warunkiem powstania tego poru jest obecność pełnej domeny C-końcowej – jej skrócenie uniemożliwia powstawanie porów o dużej przepuszczalności, choć nie znosi przewodnictwa jonowego [150, 153]

Ogon C-terminalny receptora P2X7 zawiera unikalne dla tej podrodziny motywy – m.in. domenę bogatą w cysteiny oraz region wiążący lipopolisacharyd. Obecność tych struktur wiąże

się z regulacją procesów sygnalizacyjnych, interakcjami z cytoszkieletem oraz kontrolą aktywności odpornościowej [150, 152, 153]. Dodatkowo wykazano, że reszty cystein w tej domenie mogą ulegać palmitoilacji, co wpływa na lokalizację i funkcje białka w błonie [151].

W obrębie receptora P2X7 zachodzą również inne modyfikacje potranslacyjne. N-glikozylacja zmienia jego mobilność elektroforetyczną w analizie Western blot, a w przypadku myszy specyficzne reszty w domenie zewnątrzkomórkowej mogą ulegać ADP-rybozylacji, co znacząco obniża próg aktywacji receptora [151].

Dane krystalograficzne uzyskane m.in. dla receptora P2X7 pandy wielkiej, a także dla ludzkiego P2X3 i P2X4 danio pręgowanego, potwierdziły trójpodjednostkową organizację i dostarczyły informacji na temat mechanizmu otwierania kanału. Analiza porównawcza struktur w stanie związanym i niezwiązanym z ligandem wykazała, że związanie ATP powoduje konformacyjne przesunięcia podjednostek, które prowadzą do otwarcia kanału jonowego poprzez zmianę orientacji helis TM2 [150-152, 154].

4.2. Mechanizm działania receptora P2X7

Receptor P2X7 jest jednym z kluczowych elementów sygnalizacji purinergericznej związanej z układem odpornościowym i odpowiedzią zapalną. Jego unikalne właściwości funkcjonalne sprawiają, że pełni on rolę swoistego czujnika stresu tkankowego, aktywowanego w warunkach podwyższonego stężenia ATP, typowego dla procesów martwicy, zapalenia i nowotworzenia. Krótkotrwała aktywacja receptora prowadzi do otwarcia nieselektywnego kanału kationowego, umożliwiającego napływ jonów sodu i wapnia oraz wypływ potasu. Przy długotrwałej lub intensywnej stymulacji P2X7R przechodzi jednak w drugi stan funkcjonalny, związany z powstawaniem tzw. dużego poru w błonie komórkowej [156-158].

Co istotne, zakres efektów zależy od stopnia i czasu aktywacji receptora. Umiarkowane, pobudzenie sprzyja procesom proliferacyjnym i proangiogenным, wspierając przeżycie komórek oraz ich adaptację do środowiska o podwyższonym stężeniu ATP. Dopiero silna i przedłużona stymulacja prowadzi do formowania dużego poru, utraty homeostazy jonowej i aktywacji szlaków śmierci komórkowej [156, 159]. Ta dwoistość działania sprawia, że P2X7R jest białkiem o efektach silnie uwarunkowanych kontekstem biologicznym, łączącym funkcje wspierające proliferację i przeżycie z mechanizmami cytotoksycznymi.

Mechanizm powstawania dużego poru nie został jednoznacznie wyjaśniony. Z jednej strony sugeruje się, że por powstaje w wyniku progresywnego rozszerzenia samego kanału P2X7R, z drugiej – że jest on efektem rekrutacji i aktywacji dodatkowych białek błonowych, takich jak kanały przejściowego potencjału receptorowego (TRP, transient receptor potential) czy kanały maxi-anionowe, które pośredniczą w zwiększonej przepuszczalności błony [157, 158]. Funkcjonalnie powstawanie dużego poru stanowi istotny element działania cytotoksycznego receptora, prowadząc do utraty homeostazy jonowej, napływu jonów wapnia i wycieku metabolitów, a w konsekwencji do aktywacji kaspaz, stresu oksydacyjnego i inicjacji różnych form śmierci komórkowej – w tym apoptozy, nekrozy i piroptozy [156, 157]. W badaniach *in vitro* proces ten jest rutynowo wykorzystywany jako wskaźnik aktywności receptora, zwłaszcza w testach wychwyty barwników fluorescencyjnych [158].

Aktywacja receptora P2X7 wywołuje ponadto szereg efektów immunoregulacyjnych, czyniąc go centralnym elementem odpowiedzi zapalnej. Wpływ jonów potasu z cytoplazmy jest sygnałem inicjującym aktywację inflamasomu NLRP3, który odpowiada za proteolityczną konwersję pro-IL-1 β i pro-IL-18 (interleukina 18) do ich aktywnych form, a następnie ich uwolnienie do środowiska zewnątrzkomórkowego. Dodatkowo pobudzenie P2X7R aktywuje produkcję tlenku azotu i reaktywnych form tlenu oraz uruchamia wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe kinaz MAP (MAPK, mitogen-activated protein kinases), NF- κ B i fosfolipazę D, co prowadzi do wzmożonej transkrypcji wielu genów prozapalnych [150, 156, 157, 160]. W konsekwencji komórki odpornościowe stymulowane przez ATP, poprzez P2X7, wydzielają szerokie spektrum cytokin i chemokin, m.in. IL-6, TNF, IL-8 czy MCP-1/CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1/chemokina C-C ligand 2), które wzmacniają i podtrzymują reakcję zapalną [150, 157].

Receptor ten odgrywa również istotną rolę w modulacji limfocytów T. Jego aktywacja zwiększa sekrecję interleukiny 2, sprzyja przeprogramowaniu limfocytów regulatorowych w stronę fenotypu pomocniczych limfocytów Th17 i wspiera wydzielanie cytokin prozapalnych przez te komórki. Efekt ten nasila odpowiedź zapalną i odpornościową, choć w pewnych warunkach P2X7R może również sprzyjać wydzielaniu cytokin przeciwzapalnych, takich jak interleukina 10 czy TGF- β , co wskazuje na złożoną regulację zależną od kontekstu biologicznego [156, 160].

Znaczenie P2X7R widoczne jest szczególnie w przebiegu zakażeń. W przypadku wirusów receptor wspiera aktywację odpowiedzi przeciwwirusowej – na przykład w infekcji wirusem vesicular stomatitis virus indukuje produkcję interferonu typu I, a w zakażeniu SARS-CoV-2

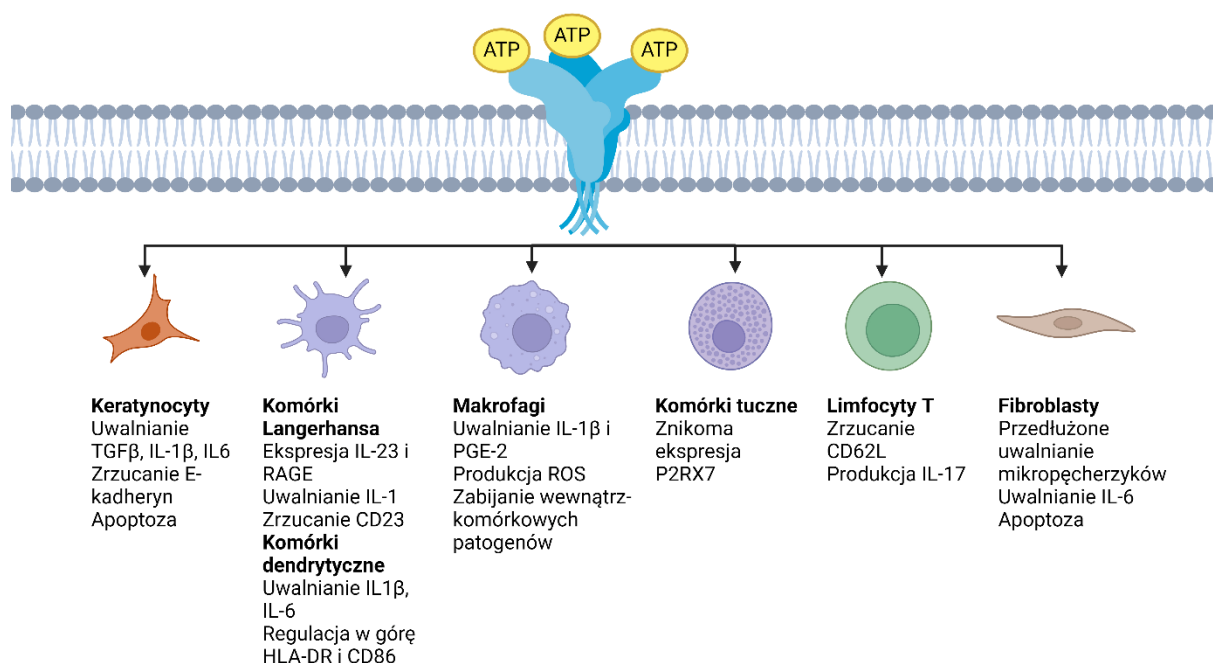
obserwowano jego udział w aktywacji inflamasomu NLRP3 [160]. Równocześnie jednak w przypadku zakażenia wirusem HIV aktywacja P2X7R może mieć efekt odwrotny, sprzyjając uwalnianiu nowych wirionów i progresji infekcji [160, 161]. W infekcjach bakteryjnych sygnalizacja ATP–P2X7R ogranicza namnażanie *Chlamydia trachomatis*, odgrywa rolę w odpowiedzi przeciw *Mycobacterium tuberculosis* oraz infekcjach Gram-dodatnich, w tym przebiegających w postaci sepsy [157, 160, 161]. W zakażeniach grzybiczych, takich jak kandydoza czy parakokcydioidomykoza, blokada P2X7R zmniejsza wydzielanie IL-1 β i redukuje uszkodzenia zapalne tkanek [160]. Z kolei w infekcjach wywołanych przez pierwotniaki i helminty receptor wspiera eliminację patogenów, w tym *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* czy *Schistosoma mansoni*, działając zarówno poprzez mechanizmy zapalne, jak i bezpośrednie indukowanie śmierci zakażonych komórek [160, 161].

Rola P2X7R jest również istotna w chorobach przewlekle zapalnych i autoimmunizacyjnych. Doświadczenia na modelach zwierzęcych wykazały, że genetyczna delecja lub farmakologiczna blokada receptora znacząco łagodzi przebieg chorób takich jak zapalenie mięśni w dystrofii Duchenne’a, odrzucanie przeszczepu czy choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi [150, 156]. W stanach przewlekłego zapalenia jego aktywność przyczynia się do amplifikacji reakcji odpornościowej, wzmacniając uszkodzenia tkankowe i utrwalając patologię [157, 159].

Szczególne znaczenie ma aktywność P2X7R w nowotworach. Mikrośrodowisko guza charakteryzuje się wysokim stężeniem ATP, które skutecznie aktywuje receptor. Efekty tej aktywacji są jednak ambiwalentne. Z jednej strony P2X7R może inicjować odpowiedź antynowotworową – jego aktywacja w komórkach dendrytycznych stymuluje powstawanie inflamasomu NLRP3 i wydzielanie IL-1 β , co prowadzi do aktywacji limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ oraz indukcji śmierci komórek nowotworowych [156, 160]. Z drugiej jednak strony przewlekła, niska aktywność receptora może sprzyjać rozwojowi nowotworu, wspierając proliferację komórek, angiogenezę i procesy przerzutowe poprzez aktywację szlaków takich jak NFATc1 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1), NF- κ B, PI3K-Akt (phosphoinositide 3-kinase–protein kinase B) czy HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha) [156, 159, 161].

Poza rolą w zapaleniu, infekcjach i nowotworach, receptor P2X7 uczestniczy również w innych procesach biologicznych. Reguluje uwalnianie egzosomów i mikrocząsteczek, które transportują białka, lipidy i RNA, stanowiąc istotny element komunikacji międzykomórkowej [159]. Uczestniczy także w mechanizmach odczuwania bólu – zarówno ostrego, jak

i przewlekłego – poprzez wpływ na aktywność neuronalną i powiązane procesy zapalne [158]. Jego przewlekła aktywacja może prowadzić do reorganizacji szlaków przewodnictwa bólowego i rozwoju nadwrażliwości bólowej, co wskazuje na potencjał P2X7R jako celu terapeutycznego w leczeniu bólu neuropatycznego [158].



Rycina 7. Mechanizm aktywacji receptora P2X7 i jego rola w aktywacji inflammasomu NLRP3. Na podstawie „P2X7 receptor in skin biology and diseases”, autorstwa Geraghty NJ, Watson D, Adhikary SR, Sluyter R. World J Dermatol 2016; 5(2): 72-83 DOI: 10.5314/wjd.v5.i2.72. Tłumaczenie i aranżacja własna.

4.3. Rola sygnalizacji purynergicznej i receptora P2X7 w żeńskim układzie rozrodczym ze szczególnym uwzględnieniem endometrium

Sygnalizacja purynergiczna, a w szczególności aktywacja receptora P2X7, odgrywa istotną rolę w licznych strukturach żeńskiego układu rozrodczego. Obecność i aktywność tego receptora wykazano m.in. w jajniku, gdzie ATP uczestniczy w regulacji dojrzewania oocytów i owulacji, w jajowodach – gdzie wpływa na ruch rzęsek i transport zarodka, w szyjce macicy – regulując przebudowę tkanki łącznej i odpowiedź układu odpornościowego, w pochwie – gdzie może modulować procesy obronne błony śluzowej, a także w łożysku – gdzie uczestniczy w regulacji interakcji immunologicznych między matką a płodem [162]. Szczególne znaczenie przypisuje

się jednak endometrium, które w cyklu miesięczkowym ulega cyklicznym procesom proliferacji, różnicowania, złuszczenia i regeneracji, a w ciąży – złożonej przebudowie związanej z implantacją i utrzymaniem zarodka.

W badaniach nad eMSCs wykazano, że wysokie stężenie ATP (≥ 5 mmol/L) hamuje proliferację i migrację tych komórek w sposób zależny od dawki, powodując zatrzymanie cyklu w fazie G1 przy zachowanej żywotności [163]. Ponieważ eMSCs odpowiadają za regenerację endometrium w każdym cyklu, zaburzenie ich funkcji może sprzyjać rozwojowi patologii, takich jak cienkie endometrium, nieprawidłowa implantacja zarodka czy choroby związane z niepłodnością, m.in. endometrioza czy adenomioza. W eMSCs potwierdzono obecność mRNA i białka P2X7R, choć funkcjonalna odpowiedź wapniowa występowała jedynie w niewielkiej części populacji, a modulacja receptora nie miała istotnego wpływu na proces gojenia ran *in vitro* [163].

Obecność receptora P2X7R została również udokumentowana w zrębie endometrium szczura podczas rui, szczególnie w eozynofilach, makrofagach i fibroblastach [164]. Komórki te odgrywają kluczową rolę w remodelowaniu macicy, regulacji lokalnej odpowiedzi immunologicznej oraz wydzielaniu cytokin, takich jak IL-1 i IL-6, które są niezbędne dla skutecznej implantacji [164]. W tym kontekście P2X7R uczestniczy zarówno w regulacji apoptozy, jak i w ATP-zależnej modulacji odpowiedzi immunologicznej. Badania histologiczne wykazały zwiększoną liczbę komórek apoptotycznych w zrębie podczas rui oraz obecność komórek nabłonkowych dodatnich dla P2X7 w bezpośrednim sąsiedztwie implantującego się zarodka [162, 164].

W ludzkim endometrium ekspresja P2X7R jest zmienna w zależności od fazy cyklu. W początkowym okresie proliferacyjnym receptory rozmieszczone są równomiernie w błonie komórkowej komórek nabłonkowych, natomiast w późniejszych fazach cyklu lokalizują się preferencyjnie w błonie apikalnej. Aktywacja receptora przez agonistę prowadzi do powstawania porów i apoptozy w obszarze apikalnym, co sugeruje jego udział w terminalnym różnicowaniu nabłonka i przygotowaniu powierzchni endometrium do implantacji zarodka [162]. Zjawisko to potwierdzono również w badaniach na zwierzętach – w macicy szczura ekspresja P2X7R osiąga maksimum w okresie implantacji (dzień 6 ciąży), czemu towarzyszy nasilona apoptoza komórek nabłonkowych w rejonie kontaktu z blastocystą [162].

Z klinicznego punktu widzenia deregulacja ekspresji receptora P2X7R w endometrium może mieć znaczenie w patogenezie nowotworów. W zmianach przedrakowych i rakowych stwierdza

się obniżony poziom P2X7R, co koreluje ze zmniejszoną podatnością komórek na apoptozę. Mechanizmy tego zjawiska obejmują hipermetylację genu P2X7, nasilony rozkład transkryptu mRNA oraz zaburzenia potranslacyjne, takie jak niewystarczająca glikozylacja [162]. Istotną rolę odgrywają także alternatywne izoformy receptora, np. P2X7J, który działa dominująco negatywnie poprzez tworzenie nieaktywnych heterooligomerów z pełnowartościowym receptorem i blokowanie indukowanej ATP apoptozy [162].

4.4. Rola receptora P2X7 w patologiach endometrium

4.4.1. Endometrioza

Mimo rosnącego zainteresowania rolą sygnalizacji purinergetycznej w patogenezie chorób zapalnych i nowotworowych, udział receptora P2X7 w endometriozie pozostaje stosunkowo słabo poznany.

W trakcie przeszukiwania bazy PubMed z użyciem hasła „P2X7 AND endometriosis” odnalazłem zaledwie dwa artykuły, co wskazuje na ograniczoną liczbę dostępnych badań eksperymentalnych w tym obszarze. Publikacje te jednak wnoszą istotne informacje dotyczące mikrośrodowiska ektopowych zmian endometrialnych oraz mechanizmów związanych z regulacją poziomu ATP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a także roli receptorów purynerygetycznych – w tym P2X7R – w modulacji proliferacji komórek endometrialnych, śmierci komórkowej oraz powstawania dolegliwości bólowych związanych z endometriozą.

W pierwszym badaniu wykazano, że w ektopowych ogniskach endometrialnych stężenie ATP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest wyraźnie podwyższone. Utrzymujące się wysokie poziomy tego nukleotydu prowadzą do przewlekłej aktywacji receptorów purynerygetycznych, w tym P2X7R, obecnych zarówno na komórkach zrębu, jak i na komórkach nabłonka endometrialnego. Taki stan sprzyja utrwaleniu reakcji zapalnej, a także wspiera proliferację komórek, co zwiększa zdolność zmian ektopowych do dalszego rozwoju. Nadmiar ATP oraz wtórna aktywacja P2X7R zostały również powiązane z nasileniem procesów włóknienia oraz angiogenezy, które są uznawane za kluczowe dla utrzymywania się zmian endometrialnych i ich progresji. Autorzy wskazali ponadto, że P2X7R może pełnić funkcję mediatora apoptozy komórek endometrialnych – zaburzenia w regulacji jego aktywności prowadzą do braku równowagi między proliferacją a śmiercią komórek, co dodatkowo sprzyja patologicznemu utrwaleniu ognisk choroby [165].

Drugie badanie koncentrowało się na mechanizmach bólowych związanych z endometriozą. Zaobserwowano, że przewlekłe podwyższony poziom ATP w otoczeniu zmian ektopowych aktywuje receptory P2X7 zlokalizowane na komórkach układu odpornościowego oraz na włóknach nerwowych. Efektem tej aktywacji jest nasilone uwalnianie cytokin prozapalnych, zwłaszcza interleukiny-1 β , które odgrywają centralną rolę w amplifikacji odpowiedzi zapalnej. Wzrost stężenia cytokin sprzyja z kolei sensytyzacji nocycceptorów, co prowadzi do rozwoju i utrwalenia przewlekłego bólu w obrębie miednicy, typowego dla pacjentek z endometriozą. Istotnym elementem tego badania było wykazanie, że farmakologiczne blokowanie aktywności P2X7R skutkowało zmniejszeniem intensywności bólu w modelach eksperymentalnych. Wynik ten sugeruje, że receptor może być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu bólu towarzyszącego endometriozie [166].

Podsumowując, dostępne badania wskazują, że P2X7R uczestniczy zarówno w regulacji proliferacji i przeżycia komórek endometrialnych, jak i w procesach zapalnych odpowiedzialnych za powstawanie bólu. Choć dane te pochodzą z ograniczonej liczby prac, stanowią podstawę do dalszych badań nad rolą P2X7R jako potencjalnego biomarkera oraz celu terapeutycznego w endometriozie.

4.4.2. Adenomioza

Przeszukiwanie bazy PubMed z użyciem zapytania „P2X7 AND adenomyosis” nie wykazało żadnych publikacji bezpośrednio analizujących udział receptora P2X7 w patogenezie adenomiozy, co wskazuje na istotną lukę badawczą w tym obszarze.

Dostępne dane na temat sygnalizacji purynergicznej w tej chorobie są nieliczne i dotyczą głównie ektonukleotydaz – enzymów błonowych odpowiedzialnych za hydrolizę nukleotydów w środowisku pozakomórkowym, regulujących m.in. stężenie ATP i adenozyiny. Wykazano m.in. obecność i aktywność NTPDase2 (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2) w komórkach zrębu zmian adenomiotycznych. Enzym ten katalizuje hydrolizę trifosforanów i difosforanów nukleozydów, wpływając na lokalne stężenia ATP i adenozyiny w niszy komórek progenitorowych – wyspecjalizowanym mikrośrodowisku zapewniającym utrzymanie i różnicowanie komórek macierzystych.

NTPDase2, współdziałając z innymi ektonukleotydazami (np. CD39 i CD73), może modulować aktywność mezenchymalnych komórek macierzystych oraz procesy regeneracyjne i zapalne w obrębie endometrium [167]. Choć rola P2X7 w adenomiozie pozostaje niepoznana,

obecność mechanizmów sygnalizacji purynergicznej sugeruje, że receptor ten – podobnie jak w innych schorzeniach ginekologicznych – może odgrywać istotną rolę w patogenezie choroby.

4.4.3. Rak endometrium

Przeszukiwanie bazy PubMed z użyciem hasła „P2X7 AND endometrial cancer” pozwoliło zidentyfikować jedynie cztery prace, co podkreśla bardzo ograniczoną wiedzę na temat roli receptora P2X7 w patogenezie raka endometrium. Pomimo małej liczby publikacji, wszystkie wskazują zgodnie, że zmiany w ekspresji i funkcji P2X7R mogą mieć istotne znaczenie dla inicjacji i progresji tego nowotworu, a także stanowić potencjalny kierunek poszukiwań biomarkerów diagnostycznych.

Pierwsza praca analizowała kontekst niedoboru estrogenów i terapii hormonalnej w modelu zwierzęcym. Wykazano, że P2X7R pełni funkcję regulatora aktywacji inflamasyonu NLRP3 oraz produkcji cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β i IL-18. W warunkach niedoboru estrogenów ekspresja P2X7 w hipokampie była zwiększona, co wiązało się z nasileniem reakcji zapalnych. W wymiarze klinicznym autorzy podkreślili, że klasyczna terapia estrogenowa, mimo łagodzenia objawów, zwiększa ryzyko przerostu endometrium, rozwoju hiperplazji atypowej oraz raka endometrium. Wskazuje to, że P2X7R należy rozpatrywać w szerszym kontekście regulacji zapalenia i wpływu terapii hormonalnej na ryzyko karcynogenezy [168].

Druga praca dotyczyła roli P2X7R w różnych nowotworach nabłonkowych, ze szczególnym uwzględnieniem raka endometrium. Wykazano, że poziom funkcjonalnego wariantu P2X7 w raku endometrium jest istotnie niższy niż w prawidłowym endometrium. Obniżenie to stwierdzano już w komórkach dysplastycznych i we wczesnych stadiach raka, co sugeruje, że redukcja ekspresji P2X7 jest procesem inicjującym transformację nowotworową. Co istotne, w tkankach nowotworowych obecny był także skrócony wariant receptora – P2X7J, co sprzyja proliferacji i progresji raka [169].

W kolejnej pracy porównano ekspresję P2X7 w prawidłowym endometrium, w złożonej hiperplazji atypowej oraz w tkance raka. Wyniki potwierdziły istotnie niższe poziomy P2X7 w tkankach przedrakowych i nowotworowych w porównaniu z prawidłowymi. Kluczowym mechanizmem okazała się przyspieszona degradacja mRNA P2X7 w obrębie regionu 3'UTR, co powoduje zmniejszenie stabilności transkryptu. Odkrycie to wskazuje, że obniżona ekspresja P2X7 nie jest wyłącznie efektem regulacji transkrypcji, ale także zmian w kontroli posttranskrypcyjnej. Fakt, że spadek poziomu P2X7 występował już w hiperplazji atypowej,

sugeruje, że receptor może pełnić rolę wczesnego wskaźnika ryzyka rozwoju raka endometrium [170].

Ostatnie z badań również wykazało wyraźną różnicę w poziomach P2X7 między tkankami prawidłowymi a nowotworowymi. Zarówno mRNA, jak i białko pełnej długości P2X7 były znacznie częściej wykrywane w endometrium prawidłowym niż w raku. Co ważne, obniżenie to było niezależne od wieku pacjentek i statusu menopauzalnego, co oznacza, że utrata ekspresji P2X7 jest cechą charakterystyczną dla nowotworu, a nie zmian fizjologicznych związanych z gospodarką hormonalną. Ponadto wykazano, że redukcja P2X7 pojawia się już w łagodnych dysplazjach, co wzmacnia hipotezę, iż utrata funkcjonalnego receptora jest wczesnym etapem karcynogenezy. Autorzy zaproponowali, że ocena P2X7 może być przydatna jako biomarker różnicujący tkanki prawidłowe, przedrakowe i nowotworowe [171].

Podsumowując, wszystkie dostępne badania wskazują zgodnie, że w raku endometrium dochodzi do istotnej redukcji poziomu funkcjonalnego receptora P2X7. Proces ten rozpoczyna się już w stanach przedrakowych i obejmuje zarówno zmiany w stabilności mRNA, jak i pojawianie się niepełnych wariantów receptora pozbawionych funkcji proapoptotycznych. Zmiany te sprzyjają transformacji nowotworowej i progresji raka, a jednocześnie wskazują na możliwość wykorzystania P2X7 jako biomarkera diagnostycznego.

4.4.4. Endometritis

Przeszukanie bazy PubMed pod kątem związku między receptorem P2X7 a endometritis przyniosło jedynie dwa wyniki, co wskazuje, że temat ten pozostaje nieopracowany i wymaga dalszych badań. Obie dostępne prace sugerują jednak, że P2X7R i powiązane z nim szlaki sygnałowe mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie zapalenia błony śluzowej macicy.

Pierwsze badanie zostało przeprowadzone w modelu mysiego endometritis wywołanego zakażeniem *Staphylococcus aureus*. Wykazano w nim, że aktywacja P2X7R sprzyja rozwojowi stanu zapalnego poprzez indukcję inflamasomu NLRP3, co prowadzi do wzrostu produkcji cytokin prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworów, interleukina 1 beta oraz interleukina 6. W pracy oceniano także potencjalne działanie terapeutyczne pueraryny – flawonoidu izolowanego z *Pueraria lobata*. Związek ten łagodził objawy zapalenia endometrium, redukując ekspresję P2X7R, komponentów inflamasomu oraz zmniejszając markery ferroptozy, co wskazuje na potencjalną rolę tego związku jako alternatywy dla antybiotyków w leczeniu endometritis. Wyniki te podkreślają, że P2X7R może stanowić ważny

punkt uchwytu terapeutycznego w regulacji procesu zapalnego związanego z zakażeniem bakteryjnym [172].

Drugie badanie dotyczyło przewlekłego zapalenia endometrium indukowanego zakażeniem *Chlamydia trachomatis*. Autorzy wykazali, że białko chlamydiowe CT135 aktywuje inflamasom NLRP3 w makrofagach poprzez szlak TLR2/MyD88, co prowadzi do rozwoju przewlekłego, makrofagozależnego endometritisu. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa pozakomórkowe ATP, uwalniane z zakażonych neutrofilów i komórek nabłonka endometrium, które działa jako cząsteczka sygnałowa typu DAMP (damage-associated molecular pattern) aktywująca P2X7R w makrofagach podśluzówkowych. Co istotne, u myszy pozbawionych genu *P2rx7* nie rozwijała się patologia związana z CT135, co potwierdza bezpośredni udział tego receptora w mechanizmie chorobowym. Badanie to sugeruje, że aktywacja P2X7R pośredniczy w tzw. sterylnej odpowiedzi zapalnej (sterile inflammation), która mimo braku bezpośredniego zakażenia makrofagów prowadzi do przewlekłego zapalenia i niepłodności [173].

Podsumowując, choć dostępne dane są ograniczone, obie prace wskazują, że receptor P2X7 pełni kluczową rolę w patogenezie endometritisu wywołanego bakteryjnie. Aktywacja P2X7R sprzyja uwalnianiu cytokin prozapalnych, aktywacji inflamasomu NLRP3 oraz procesom komórkowej śmierci związanym z ferroptozą. Wyniki te pozwalają uznać P2X7R za potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu stanów zapalnych endometrium.

VI. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Receptor purynowy P2X7 jest jednym z kluczowych elementów sygnalizacji pozakomórkowego ATP, biorącym udział w regulacji zapalenia, apoptozy oraz odpowiedzi immunologicznej. Pomimo rosnącego zainteresowania purynoreceptorami w kontekście chorób zapalnych i nowotworowych, ich rola w patofizjologii chorób endometrium, takich jak endometrioza i rak endometrium, pozostaje w dużej mierze niepoznana. Szczególnie mało wiadomo o znaczeniu receptora P2X7 w komórkach endometrialnych, mimo jego znanego udziału w aktywacji inflamasomu i regulacji cytokin prozapalnych.

Dogodnym modelem do tego rodzaju badań wydają się być linie komórkowe wyprowadzone ze zmian chorobowych. W związku z tym celem niniejszej pracy była charakterystyka ekspresji, lokalizacji i funkcjonalnej aktywności receptora P2X7 w dwóch liniach komórkowych: 12Z (zimmortalizowanej linii nabłonkowej pochodzącej z ogniska endometriozy) [174] oraz Ishikawa (wywodzącej się z gruczolakoraka endometrium typu I) [175]. Ponadto postanowiono zbadać, czy aktywacja P2X7R wpływa na kluczowe procesy komórkowe, takie jak proliferacja, ekspresja cytokin oraz czy różnice między obiema liniami komórkowymi mogą odzwierciedlać odmienne mechanizmy molekularne w endometriozie i raku endometrium.

Szczegółowe cele obejmowały:

1. Charakterystykę morfologiczną komórek 12Z i Ishikawa w warunkach hodowli *in vitro* w celu oceny podstawowych różnic fenotypowych między modelami.
2. Ocenę ekspresji receptora P2X7 na poziomie mRNA w obu liniach komórkowych.
3. Ocenę ekspresji P2X7 na poziomie białka, przy zastosowaniu technik immunochemicznych.
4. Analizę lokalizacji receptora P2X7, z wykorzystaniem immunofluorescencji i mikroskopii fluorescencyjnej.
5. Funkcjonalną ocenę aktywności receptora P2X7 w odpowiedzi na stymulację agonistą BzATP, jak i antagonistą A438079, poprzez pomiar zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz wychwyty barwnika fluorescencyjnego YO-PRO-1.
6. Ocenę wpływu aktywacji receptora P2X7 na proliferację komórek obu linii, w warunkach kontrolnych i stymulowanych.

7. Ocenę zmian ekspresji genu *P2RX7* po stymulacji agonistą BzATP.
8. Analizę wpływu stymulacji receptora P2X7 na ekspresję mRNA cytokin, w odpowiedzi na BzATP.
9. Ocenę wpływu cytokin prozapalnych (IL-1 α , TNF, TGF- β) na ekspresję genu *P2RX7*.

VII. MATERIAŁY I METODY

1. Hodowle komórkowe

W badaniach wykorzystano dwie linie komórkowe: Ishikawa (RRID:CVCL_2529) oraz 12Z (RRID:CVCL_0Q73).

Linia Ishikawa to ludzka linia wywodząca się z dobrze zróżnicowanego gruczolakoraka endometrium, szeroko stosowana jako model nowotworu endometrium typu I oraz receptorów hormonalnych. Została pozyskana z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Wielka Brytania) [175].

Linia 12Z to nieśmiertelniona ludzka linia komórkowa wyprowadzona z otrzewnowego ogniska endometriozy, pozyskanego laparoskopowo od 37-letniej pacjentki i transfekowana wirusem SV40. Komórki wykazują ekspresję markerów endometriozy *in vivo* i stanowią uznany model do badań nad patogenezą choroby. Linia została udostępniona dzięki uprzejmości prof. Martina Götte z Uniwersytetu w Münster [174].

Obie linie hodowano w pożywce DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific, USA) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, Thermo Fisher Scientific, USA) i 1% antybiotyków (penicylina/streptomycyna, Thermo Fisher Scientific, USA). Komórki utrzymywano w standardowych warunkach: 37°C, 5% CO₂, 90% wilgotności. Pożywkę wymieniano co 2–3 dni, a pasażowanie przeprowadzano po osiągnięciu 80–90% konfluencji z użyciem TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, USA).

2. Stymulacja komórek oraz ocena proliferacji

Komórki linii 12Z oraz Ishikawa wysiewano na 12-dołkowe płytki (Nest Biotechnology, Chiny) w gęstości odpowiednio 1×10^5 i $1,5 \times 10^5$ komórek/dołek. Po 24 godzinach hodowli w pożywce pełnej (DMEM/F-12 z 10% FBS), komórki przenoszono na pożywkę zredukowaną (4% FBS) i poddawano stymulacji agonistą receptora P2X7 – BzATP (50 lub 300 µM; Jena Bioscience, Niemcy). Inkubację prowadzono przez 24 lub 48 godzin w warunkach standardowej hodowli (37°C, 5% CO₂, 90% wilgotności).

W celu oceny wpływu BzATP na proliferację i żywotność komórek, po zakończonej stymulacji komórki zbierano z płytek przy użyciu TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, 5 minut w 37°C), a następnie analizowano za pomocą automatycznego licznika ADAM-MC

(NanoEntek, Korea Południowa). Oceniano całkowitą liczbę komórek (total cell count), liczbę komórek martwych (necrotic cell count) oraz obliczano liczbę komórek żywych (viable cells).

3. Stymulacja komórek cytokinami prozapalnymi

W odrębnym eksperymencie, komórki 12Z oraz Ishikawa poddawano stymulacji cytokinami prozapalnymi: IL-1 α (10 ng/ml), TNF (10 ng/ml) oraz TGF- β 1 (10 ng/ml) – wszystkie zakupione w Thermo Fisher Scientific, USA. Po 24-godzinnej hodowli w pełnej pożywce (10% FBS), komórki przenoszono na pożywkę zawierającą 4% FBS i inkubowano z cytokinami przez 24 lub 48 godzin. Po zakończeniu inkubacji komórki wykorzystywano do izolacji RNA i analizy ekspresji genów metodą qRT-PCR.

4. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

Całkowite RNA izolowano z komórek poddanych takiej samej stymulacji, jak w przypadku oceny proliferacji i żywotności, z wykorzystaniem zestawu Total RNA Mini Plus Concentrator (A&A Biotechnology, Polska). Komórki zawieszano w buforze FenoZol Plus, a następnie oczyszczano próbki z białek oraz DNA za pomocą buforu płuczącego, uzyskując 15 μ L RNA zawieszonego w sterylnej wodzie. Czystość i stężenie otrzymanego RNA oceniano spektrofotometrycznie przy użyciu NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Do dalszych analiz wykorzystywano RNA o współczynniku absorbancji A260/280 wyższym niż 1,9.

Roztwory RNA rozcieńczano wodą w taki sposób, aby do każdej reakcji odwrotnej transkrypcji użyć jednakowej ilości RNA (700 ng). Następnie 10 μ L RNA mieszano z 10 μ L uprzednio przygotowanej mieszaniny reakcyjnej, zawierającej: 2 μ L buforu reakcyjnego, 0,8 μ L mieszaniny dNTP (100 mM), 2 μ L mieszaniny starterów, 1 μ L odwrotnej transkryptazy oraz 4,2 μ L sterylnej wody – zgodnie z instrukcją producenta (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, USA).

Reakcję prowadzono w termocyklerze (Mastercycler, Eppendorf, USA) według następującego programu: 10 minut w 25°C, 120 minut w 37°C oraz 5 minut w 85°C. Otrzymane cDNA przechowywano w –20°C do czasu dalszych analiz.

5. Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Do oceny ekspresji genów *P2RX7*, *IL1A*, *TGFB1* oraz *TNF* zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). W każdej reakcji użyto 20 ng cDNA zawieszonego w 10 µL wody oraz 10 µL mieszaniny reakcyjnej PCR (SensiFAST™ Probe Lo-ROX Kit, Meridian Bioscience, USA), wraz z sondami TaqMan (Thermo Fisher Scientific, USA). Wykorzystane sondy zostały przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3. Lista sond TaqMan wykorzystanych w badaniu qRT-PCR

Czynnik / Gen	Symbol genu	Numer sondy TaqMan
Receptor P2X7	<i>P2RX7</i>	Hs00951605_m1
Interleukina 1 alfa	<i>IL1A</i>	Hs00174092_m1
Transformujący czynnik wzrostu β1	<i>TGFB1</i>	Hs00998133_m1
Czynnik martwicy nowotworu α	<i>TNF</i>	Hs00174128_m1
Gliceroloaldehydo-3-fosforanowa dehydrogenaza (kontrola endogenna)	<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1

Reakcje przeprowadzano w systemie 7500 Fast (Applied Biosystems, USA), zgodnie z zalecanym programem termocyklera: 2 minuty w 50°C, 20 sekund w 95°C, następnie 40 cykli (3 sekundy w 95°C i 30 sekund w 60°C).

Wszystkie próbki analizowano w co najmniej dwóch powtórzeniach technicznych. Względą ekspresję genów obliczano na podstawie różnic w automatycznie wyznaczonym cyklu progowym (Ct, z ang. *threshold cycle*), stosując metodę pojedynczej (ΔCt) lub podwójnej delty ($\Delta\Delta Ct$).

6. Western Blot

Do analizy western blot wykorzystano lizaty białkowe frakcji cytoplazmatycznej oraz błonowej, pozyskane z hodowli ciągłych linii komórkowych 12Z i Ishikawa, z użyciem zestawu Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Stężenie uzyskanych białek oznaczano metodą kolorymetryczną, stosując zestaw Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) na czytniku mikropłytek Spark (Tecan, Szwajcaria) i z wykorzystaniem płytek 96-dołkowych (Greiner Bio-One International GmbH, Austria).

Następnie 20 µg białka rozdzielano w żelu SDS–PAGE 8% (czas: ok. 80 minut, napięcie: 80–150 V), a białka przenoszono na membranę nitrocelulozową (Amersham Protran 0.45 NC)

przez 90 minut przy natężeniu prądu 0,35 A. Membranę blokowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w TBST, a następnie inkubowano przez noc (4°C) z przeciwciałami pierwotnymi. Po inkubacji z przeciwciałami pierwotnymi membrany trzykrotnie płukano (3×5 minut) w TBST, a następnie inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami wtórnymi. Wykorzystane przeciwciała zostały przedstawione w tabeli 4.

Po zakończonej inkubacji z przeciwciałami wtórnymi, membrany ponownie trzykrotnie płukano w TBST (3×5 minut). Sygnał chemiluminescencyjny wykrywano z użyciem odczynnika SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA), a wizualizację prowadzono za pomocą systemu Syngene GBox Chemi XX9 (Syngene, Wielka Brytania).

Tabela 4. Przeciwciała zastosowane w analizie Western blot

Rodzaj przeciwciała	Cel molekularny / Typ	Gatunek	Numer katalogowy	Producent	Stężenie robocze
Pierwszorzędowe	P2X7 (domena zewnątrzkomórkowa)	królik	PA5-111048	Thermo Fisher Scientific, USA	1:200
Pierwszorzędowe	β -aktyna	mysz	A2228	Sigma-Aldrich, USA	1:3000
Drugorzędowe	IgG anty-królik	koza	GTX213110-01	GeneTex, USA	1:5000
Drugorzędowe	IgG anty-mysz	koza	GTX213111-01	GeneTex, USA	1:5000

7. Pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia

Komórki linii 12Z i Ishikawa wysiewane były na czarną, 96-dołkową płytkę z transparentnym dnem (Thermo Fisher Scientific, USA) w liczbie 1×10^4 komórek/dołek w pożywce pełnej. Poziom jonów wapnia oznaczano z wykorzystaniem zestawu Fluo-8 Calcium Flux Assay Kit – No Wash (Abcam, UK). Następnego dnia po wysianiu komórki przepłukiwano w DPBS i dodawano do nich 100 μ L buforu reakcyjnego, przygotowanego zgodnie z instrukcją producenta. Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C.

Po zakończonej inkubacji do komórek dodawano:

- BzATP w stężeniu 50 μM lub 300 μM ,
- lub mieszaninę BzATP i inhibitora A438079 (100 μM).

W próbkach, w których badano wpływ inhibitora w połączeniu z agonistą, po inkubacji z buforem reakcyjnym komórki preinkubowano przez 20 minut z A438079, a następnie dodawano odpowiednie stężenie BzATP. Po aplikacji związków przystępowano do pomiaru intensywności fluorescencji przy długościach fal Ex/Em = 490/525 nm, z 15% odcięciem sygnału. Pomiar trwał 2 minuty; na wykresach przedstawiono dane z pierwszych 50 sekund. Każdorazowo przed właściwym pomiarem wykonywano pomiar kalibracyjny dla każdej próbki. Pomiar realizowano na czytniku mikropłytek Spark (Tecan, Szwajcaria).

8. Pomiar aktywności „dużego poru”

Komórki linii 12Z i Ishikawa wysiewano na czarne 96-dołkowe płytki z transparentnym dnem w liczbie 1×10^4 komórek/dołek w pożywce DMEM/F-12 z 10% FBS. Następnego dnia komórki przepłukiwano w DPBS, po czym dodawano do każdego dołka 100 μL 2 μM roztworu YO-PRO1 (Thermo Fisher Scientific, USA). Płytkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C, bez wypłukiwania barwnika.

Po zakończonej inkubacji do komórek dodawano:

- BzATP w stężeniach 300, 500 lub 1000 μM ,
- lub mieszaninę BzATP i inhibitora A438079 (100 μM).

W przypadku próbek, w których oceniano wpływ inhibitora w połączeniu z agonistą, prowadzono 20-minutową preinkubację z A438079, a następnie dodawano BzATP. Następnie przystępowano do pomiaru intensywności fluorescencji przy długościach fal Ex/Em = 491/509 nm, z zastosowaniem 15% odcięcia sygnału. Pomiar trwał 2 minuty, natomiast na wykresach przedstawiono dane z pierwszych 50 sekund. Każdorazowo przed właściwym pomiarem wykonywano pomiar kalibracyjny dla każdej próbki. Pomiar realizowano przy użyciu czytnika mikropłytek Spark (Tecan, Szwajcaria).

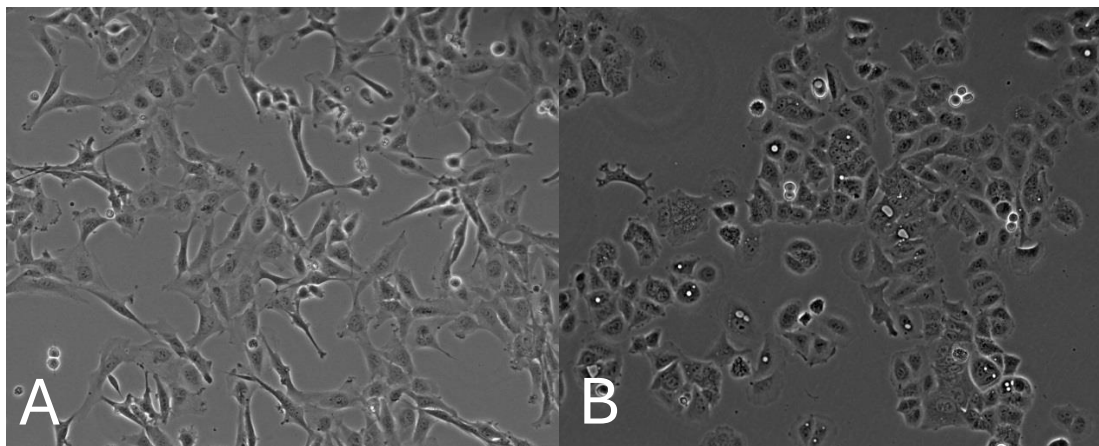
9. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne wszystkich wyników przeprowadzono w programie GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

VIII. WYNIKI

1. Morfologia komórek linii 12Z i Ishikawa w hodowli *in vitro*

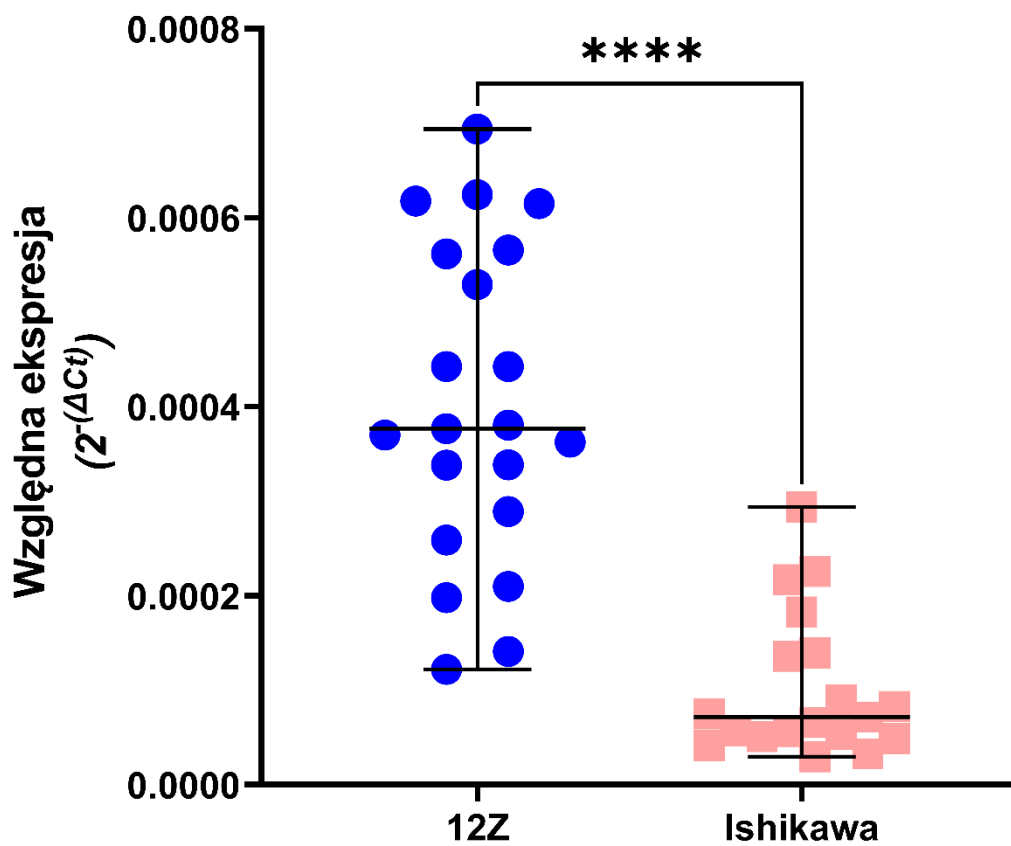
Porównanie komórek linii 12Z i Ishikawa w warunkach hodowli *in vitro* wykazało, że oba rodzaje komórek zachowują wielokątny kształt typowy dla morfologii komórek nabłonkowych oraz tworzą połączenia międzykomórkowe (Ryc. 8).



Rycina 8. Morfologia komórek linii 12Z (A) i Ishikawa (B) hodowanych *in vitro*. Obraz w jasnym polu przy użyciu mikroskopii kontrastowo-fazowej (powiększenie x10).

2. Ekspresja P2X7 na poziomie mRNA

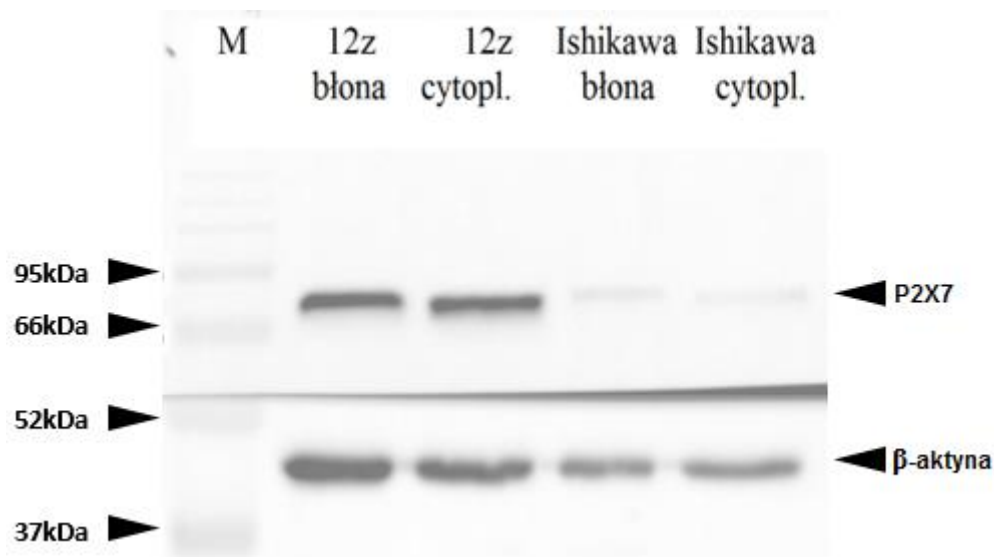
Analiza względnej ekspresji mRNA receptora P2X7 (*P2RX7*), przeprowadzona metodą ilościowego RT-PCR, wykazała jego obecność w obu badanych liniach komórkowych – 12Z oraz Ishikawa – hodowanych w warunkach standardowych (Ryc. 9). Poziom ekspresji P2RX7 był istotnie wyższy w komórkach 12Z w porównaniu do linii Ishikawa. Różnica ta była statystycznie istotna (**** $P < 0,0001$, test Manna–Whitneya) i odpowiadała około 5,3-krotnie wyższej medianie ekspresji w komórkach 12Z.



Rycina 9. Względna ekspresja *P2RX7* mRNA w liniach komórkowych 12Z (n=21) i Ishikawa (n=19) oceniana metodą qRT-PCR. Wykres przedstawia pojedyncze wyniki, ich rozrzut oraz medianę. Mediana ekspresji w komórkach 12Z wyniosła $3,77 \times 10^{-4}$, natomiast w komórkach Ishikawa $7,13 \times 10^{-5}$. **** $P < 0,0001$, test Manna–Whitneya.

3. Ekspresja P2X7 na poziomie białka

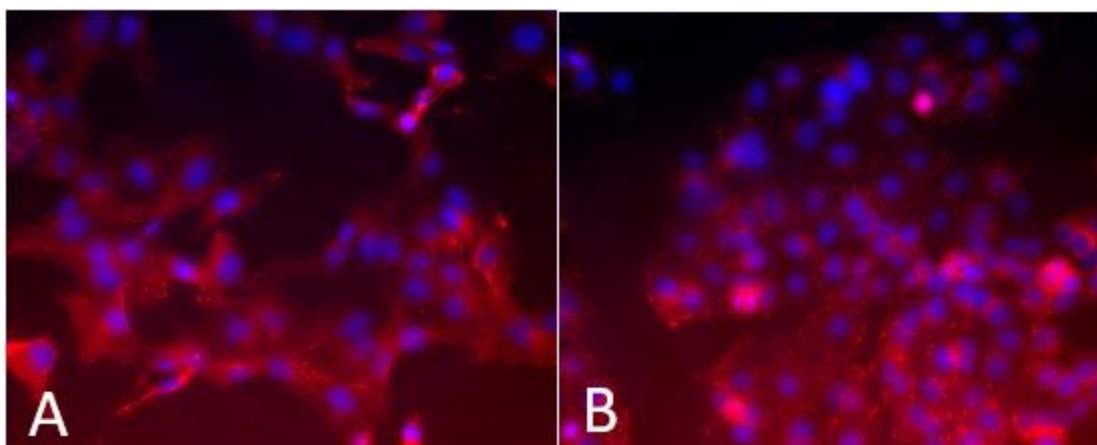
Obecność białka P2X7 w komórkach linii 12Z i Ishikawa potwierdzono metodą Western blot, analizując osobno frakcje błonowe i cytoplazmatyczne (Ryc. 10). W obu liniach wykryto immunoreaktywne prążki o masie cząsteczkowej około 75 kDa, odpowiadające białku P2X7. Intensywność sygnału była wyraźnie wyższa w frakcjach komórek 12Z, zarówno błonowej, jak i cytoplazmatycznej, w porównaniu do odpowiadających frakcji komórek Ishikawa. Ekspresja białka referencyjnego β -aktyny (~42 kDa) była porównywalna we wszystkich próbkach.



Rycina 10. Analiza ekspresji białka P2X7 w frakcjach błonowej i cytoplazmatycznej komórek 12Z i Ishikawa metodą Western blot. Prążki o masie ~75 kDa odpowiadają P2X7. Wskazano również prążki β -aktyny (~42 kDa) jako kontrolę załadunku. M – marker masy cząsteczkowej białek.

4. Ekspresja powierzchniowa P2X7 – analiza immunofluorescencyjna

Analiza ekspresji receptora P2X7 w komórkach linii 12Z i Ishikawa za pomocą immunofluorescencji wykazała w obu przypadkach obecność sygnału immunoreaktywnego (Ryc. 11). Barwienie miało częściowo charakter dyfuzyjny, jednak dominował ziarnisty rozkład sygnału, zgodny z lokalizacją receptora w obrębie błony komórkowej.



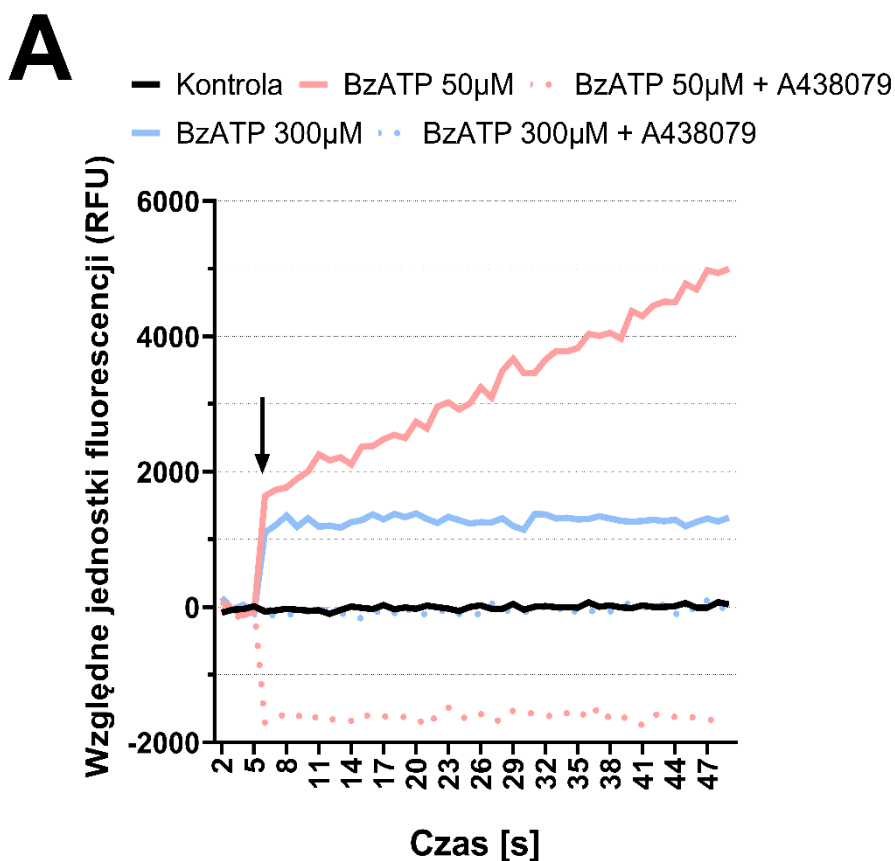
Rycina 11. Immunofluorescencyjna analiza ekspresji receptora P2X7 w komórkach linii 12Z (A) i Ishikawa (B) hodowanych *in vitro*. Czerwony sygnał odpowiada obecności receptora P2X7 (barwienie przeciwciałem skierowanym przeciwko domenie

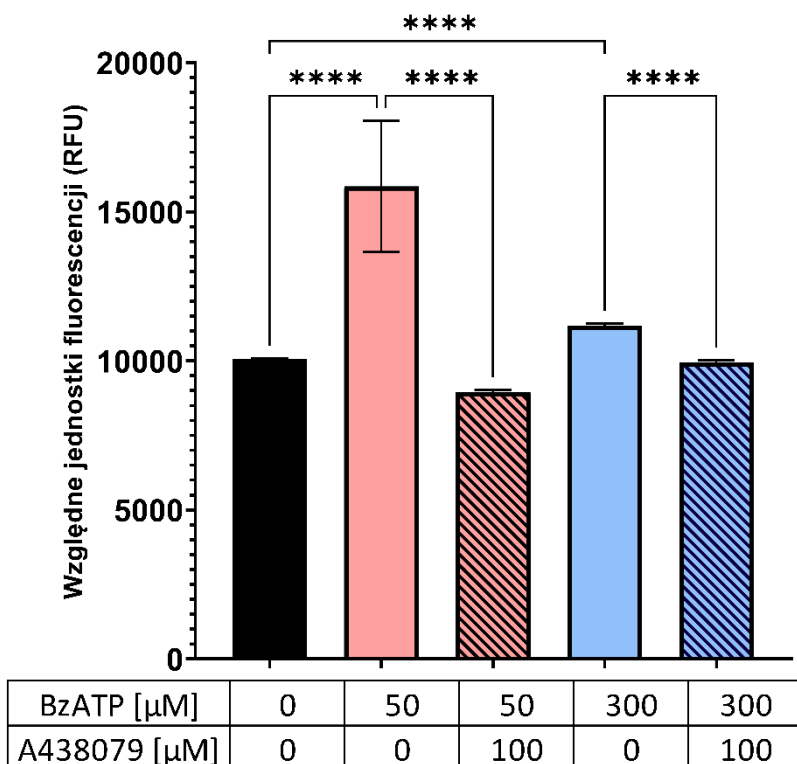
zewnątrzkomórkowej), natomiast jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem DAPI (niebieski). Obrazy uzyskano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej (powiększenie x20).

5. Ocena aktywności biologicznej receptora P2X7

Aktywność receptora P2X7 w komórkach linii 12Z i Ishikawa oceniano za pomocą pomiaru wewnątrzkomórkowego napływu jonów Ca^{2+} po stymulacji swoistym agonistą receptora – BzATP. Jak przedstawiono na Ryc. 12A, podanie BzATP (50 μM) do hodowli komórek 12Z wywołało gwałtowny wzrost sygnału fluorescencji barwnika Fluo-8 NW, który utrzymywał się przez kilkadziesiąt sekund. Efekt ten był wyraźnie hamowany przez selektywnego antagonistę P2X7 – A438079 (100 μM), co potwierdza zależność zjawiska od aktywności receptora.

Rycina 12B prezentuje zestawienie średnich wartości fluorescencji dla poszczególnych wariantów eksperymentalnych. Co istotne, silniejszą odpowiedź odnotowano przy niższej dawce agonisty (50 μM) w porównaniu do 300 μM , co może wskazywać na efekt desensytyzacji receptora lub mechanizm regulacyjny zależny od stężenia ligandu. Zarówno stymulacja BzATP, jak i jej hamowanie przez A438079 były statystycznie istotne (**** $P < 0,0001$, test Kruskala-Wallisa).



B

Rycina 12. Ocena aktywności kanału wapniowego receptora P2X7 w komórkach linii 12Z.

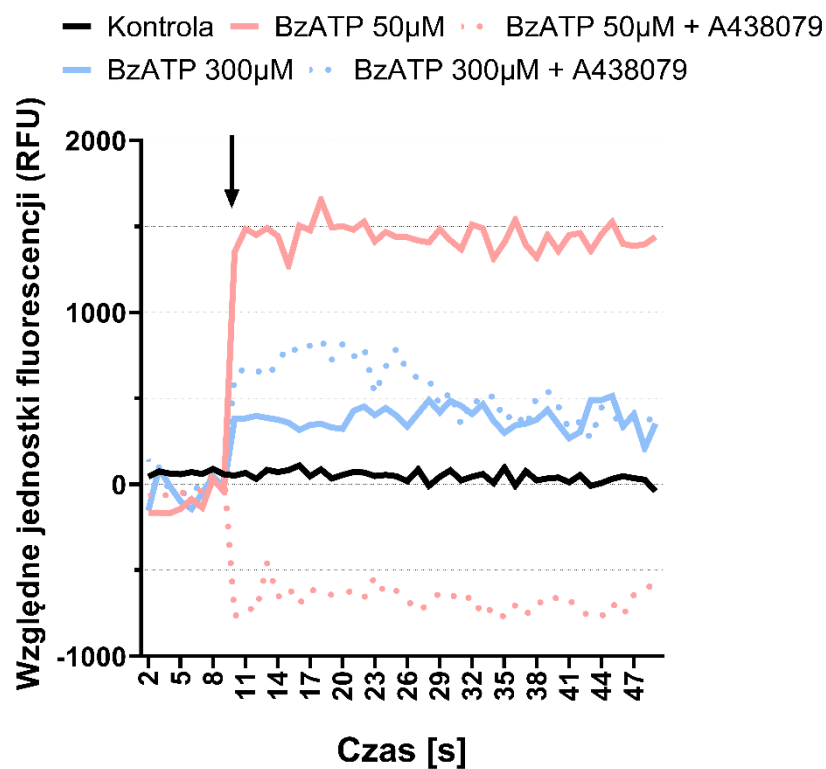
(A) Kinetyka zmian poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (RFU – względne jednostki fluorescencji) po stymulacji komórek BzATP w dwóch dawkach (50 μM i 300 μM), z lub bez antagonisty A438079 (100 μM). Strzałka wskazuje moment dodania agonisty. (B) Podsumowanie średnich wartości RFU dla każdej grupy. Analizę statystyczną przeprowadzono testem Kruskala–Wallisa; **** $P < 0,0001$.

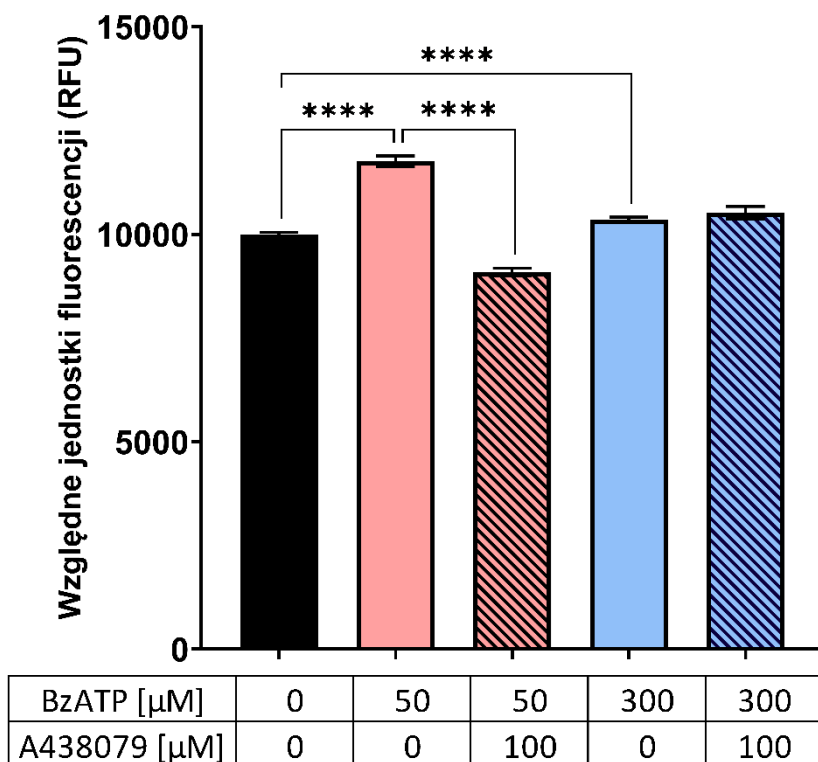
Odpowiedź komórek linii Ishikawa na stymulację swoistym agonistą receptora P2X7 – BzATP – przedstawiono na Ryc. 13A. Zarejestrowano charakterystyczny, gwałtowny wzrost poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+} , który utrzymywał się w czasie, co potwierdza funkcjonalną obecność aktywnego receptora P2X7. Dodatek selektywnego antagonisty A438079 (100 μM) skutecznie tłumił odpowiedź, jednak efekt ten był zauważalny wyłącznie przy niższej dawce agonisty (50 μM), a nie przy stężeniu 300 μM .

Porównanie średnich wartości fluorescencji (Ryc. 13B) potwierdziło istotną statystycznie aktywację receptora P2X7 po stymulacji BzATP ($P < 0,0001$, test Kruskala-Wallisa), a także

istotny efekt hamujący obecności inhibitora przy niższym stężeniu agonisty. Brak istotności w warunkach wysokiego stężenia BzATP może sugerować wysycenie lub mechanizmy niezależne od P2X7.

A



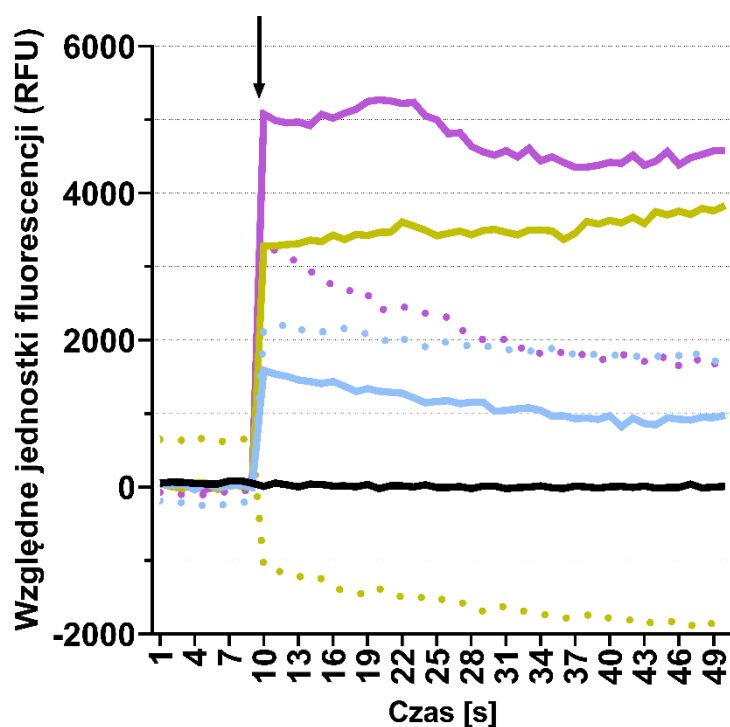
B

Rycina 13. Ocena aktywności receptora P2X7 w komórkach linii Ishikawa. (A) Kinetyka zmian stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie po stymulacji BzATP w dawkach 50 i 300 μM , z lub bez antagonisty P2X7 – A438079 (100 μM). Strzałka wskazuje moment dodania BzATP. (B) Porównanie średnich wartości względnych jednostek fluorescencji (RFU). Pomiar wykonano z użyciem barwnika Fluo-8 NW. Analiza statystyczna: test Kruskala-Wallisa; **** $P < 0,0001$.

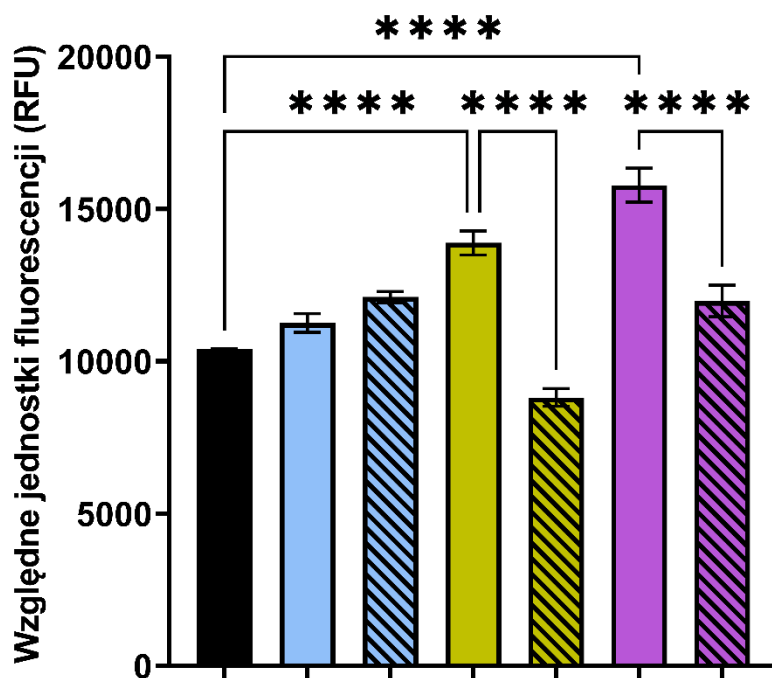
Zdolność receptora P2X7 do formowania tzw. „dużego poru” oceniano przy użyciu testu wychwyty barwnika fluorescencyjnego YO-PRO-1, który wnika do komórki przez kanał utworzony w błonie komórkowej po aktywacji receptora przez agonistę BzATP. W komórkach 12Z zaobserwowano zależny od dawki wzrost sygnału fluorescencji po stymulacji BzATP w zakresie 300–1000 μM , co świadczy o aktywacji mechanizmu formowania poru (Ryc. 14A). Najsilniejszy efekt wystąpił przy najwyższej zastosowanej dawce (1000 μM). Dodatek selektywnego antagonisty receptora P2X7, A438079 (100 μM), skutecznie znosił efekt napływu YO-PRO-1 zarówno przy 500 μM , jak i 1000 μM BzATP. Analiza średnich wartości fluorescencji (Ryc. 14B) potwierdziła istotne statystycznie różnice między grupami (**** $P < 0,0001$, test Kruskala–Wallisa).

A

— Kontrola — BzATP 300μM ··· BzATP 300μM + A438079
 — BzATP 500μM ··· BzATP 500μM + A438079 — BzATP 1000μM
 ··· BzATP 1000μM + A438079



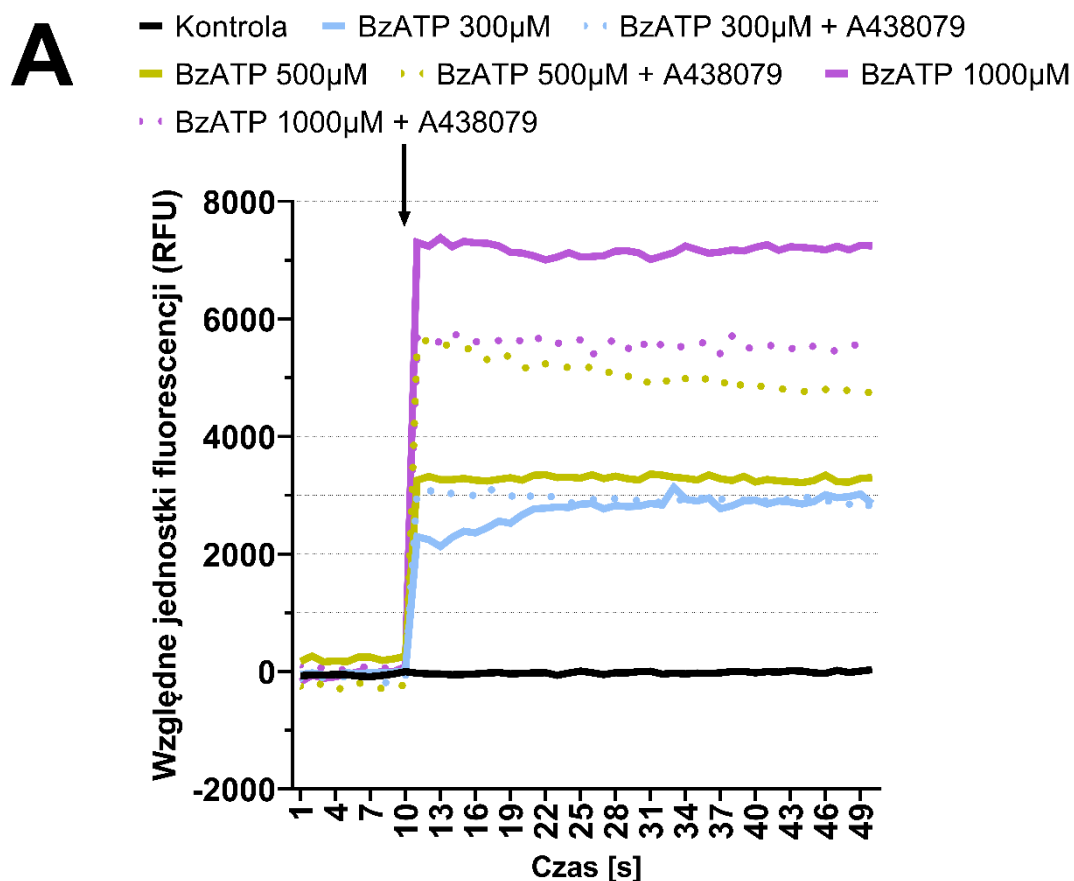
B

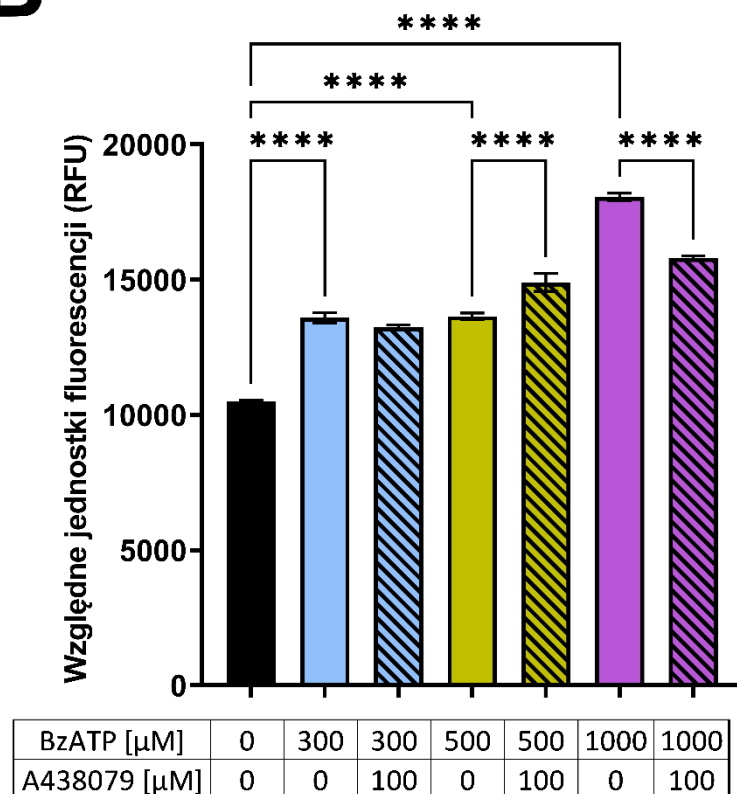


BzATP [μM]	0	300	300	500	500	1000	1000
A438079 [μM]	0	0	100	0	100	0	100

Rycina 14. Ocena zdolności receptora P2X7 do tworzenia „dużego poru” w komórkach linii 12Z. (A) Kinetyka napływu barwnika YO-PRO-1 do cytoplazmy komórek po stymulacji BzATP (300–1000 μM), z lub bez dodatku antagonisty A438079 (100 μM). Strzałka wskazuje moment dodania agonisty. (B) Podsumowanie średnich wartości fluorescencji (RFU). Analizę statystyczną przeprowadzono testem Kruskala–Wallisa; **** $P < 0,0001$.

Podobny wzorec aktywności receptora P2X7 zaobserwowano w komórkach linii Ishikawa. Jak przedstawiono na Ryc. 15A, stymulacja wysokimi stężeniami BzATP (300–1000 μM) prowadziła do zależnego od dawki wzrostu fluorescencji barwnika YO-PRO-1, co wskazuje na tworzenie struktury dużego poru. W warunkach zastosowania antagonisty A438079 (100 μM) zaobserwowano częściowe zniesienie efektu napływu barwnika, jednak było ono istotne jedynie przy najwyższym stężeniu agonisty (1000 μM). Analiza zbiorcza danych (Ryc. 15B) wykazała istotne statystycznie różnice między grupami ($P < 0,0001$, test Kruskala–Wallisa).



B

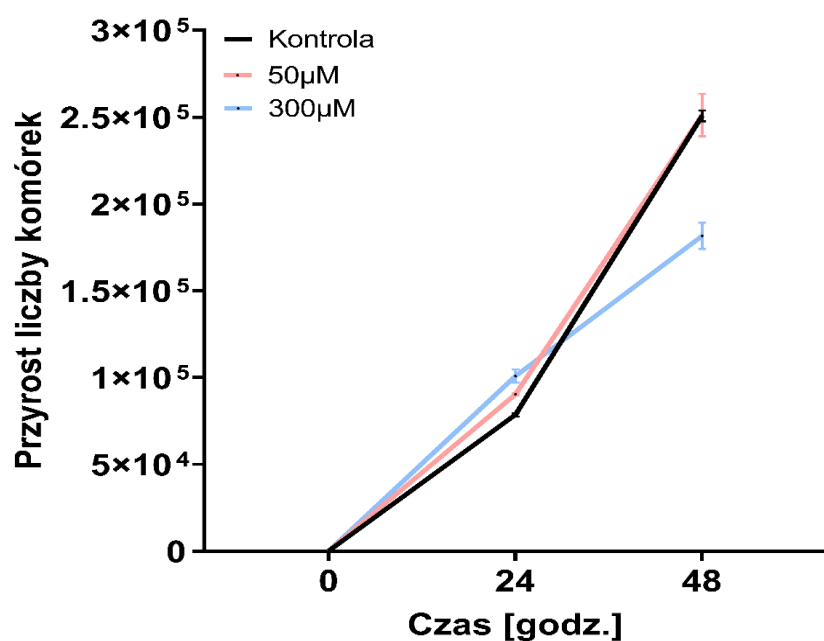
Rycina 15. Ocena zdolności receptora P2X7 do tworzenia „dużego poru” w komórkach linii Ishikawa. (A) Kinetyka napływu barwnika YO-PRO-1 do komórek po stymulacji BzATP (300–1000 μ M), z lub bez dodatku selektywnego antagonisty P2X7 – A438079 (100 μ M). Strzałka wskazuje moment podania agonisty. (B) Podsumowanie średnich wartości względnych jednostek fluorescencji (RFU). Analiza statystyczna: test Kruskala–Wallisa; **** $P < 0,0001$.

6. Ocena wpływu aktywacji receptora P2X7 na proliferację komórek

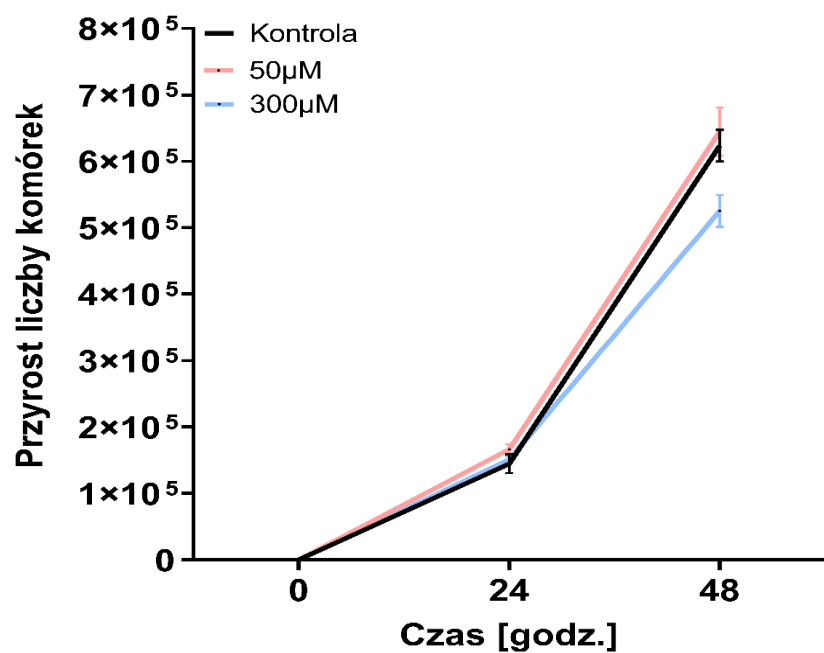
Wpływ stymulacji receptora P2X7 na proliferację komórek oceniano po 24 i 48 godzinach hodowli, mierząc przyrost liczby komórek po podaniu BzATP w stężeniu 50 μ M lub 300 μ M (Ryc. 16). W przypadku komórek 12Z, po 24 godzinach nie odnotowano istotnych różnic między grupami. Jednak po 48 godzinach stymulacja wyższą dawką BzATP (300 μ M) doprowadziła do znaczącego zahamowania przyrostu liczby komórek w porównaniu do kontroli ($P < 0,05$). Stężenie 50 μ M nie wywierało istotnego wpływu na proliferację. W komórkach linii Ishikawa nie stwierdzono różnic w proliferacji po 24 godzinach inkubacji. Po 48 godzinach zaobserwowano tendencję do obniżonego przyrostu liczby komórek w grupie traktowanej 300 μ M BzATP, jednak różnica ta nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej.

($P = 0,14$). Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu post-hoc Tukey'a.

A Proliferacja komórek linii 12Z



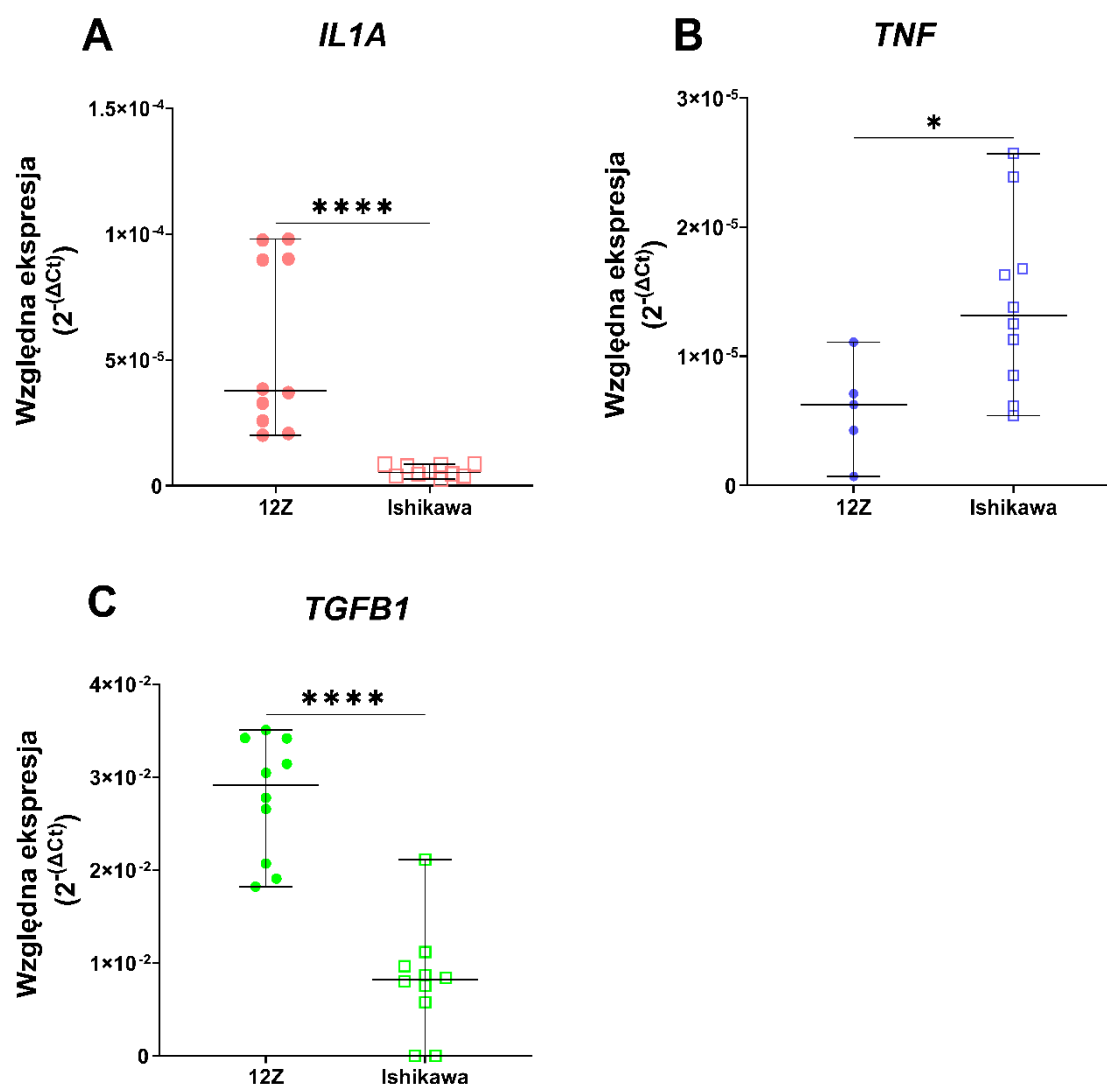
B Proliferacja komórek linii Ishikawa



Rycina 16. Wpływ stymulacji BzATP (50 μ M lub 300 μ M) na proliferację komórek linii 12Z (A) i Ishikawa (B). Wyniki przedstawiono jako przyrost liczby komórek względem wartości wyjściowej (czas 0 godz.). Punkty oznaczają średnie wartości z 6 niezależnych eksperymentów; słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (SD).

7. Porównanie ekspresji mRNA cytokin prozapalnych w komórkach linii 12Z i Ishikawa

Analiza względnej ilości mRNA metodą qRT-PCR wykazała, że w warunkach standardowej hodowli obie linie komórkowe wykazują ekspresję *IL1A*, *TNF* oraz *TGFB1* (Ryc. 17). Dla *IL1A* stwierdzono istotnie wyższy poziom transkryptu w komórkach 12Z niż w komórkach Ishikawa (Welch's t-test, $P < 0,0001$). Dla *TNF* ekspresja była wyższa w komórkach Ishikawa (test Manna-Whitneya, $P = 0,036$), natomiast w przypadku *TGFB1* ekspresja była istotnie wyższa w komórkach 12Z (test Manna-Whitneya, $P < 0,0001$).

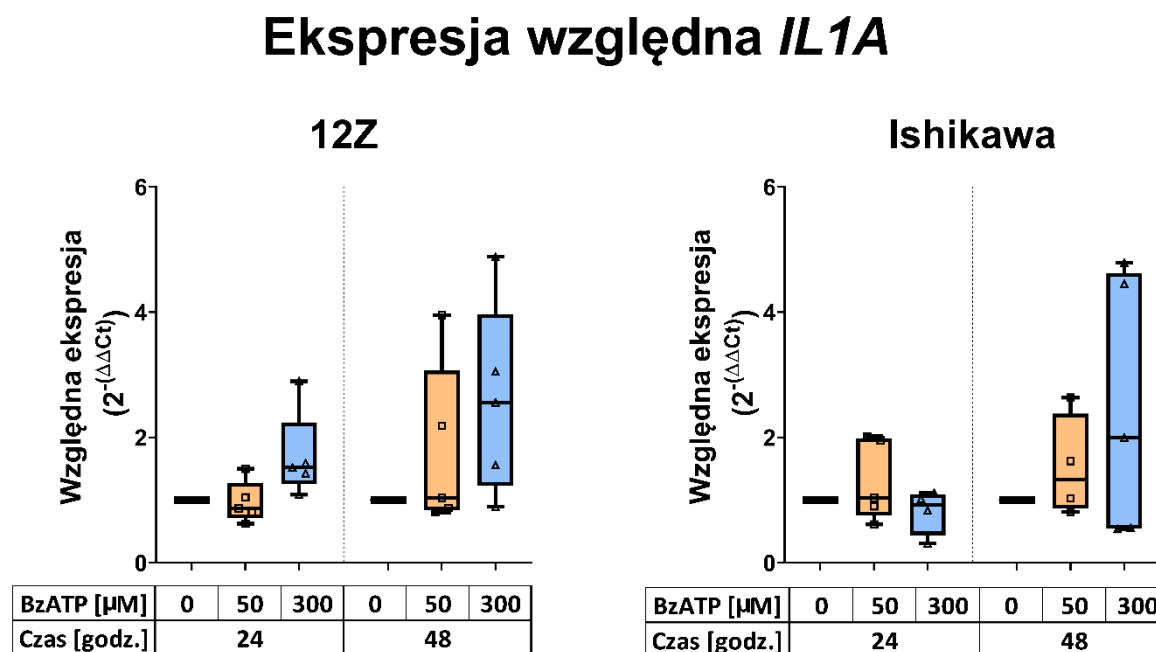


Rycina 17. Względna ekspresja mRNA dla *IL1A* (A), *TNF* (B) oraz *TGFB1* (C) w komórkach linii 12Z i Ishikawa w warunkach standardowej hodowli. Ekspresję oceniono metodą qRT-PCR i przedstawiono jako $2^{-(\Delta Ct)}$, znormalizowane względem *GAPDH*. Każdy punkt reprezentuje pojedynczy pomiar biologiczny. N = 10; N (12Z *TNF*) = 5. Linie poziome oznaczają medianę, a słupki – zakres wartości (min–max). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Welcha (*IL1A*) lub testu Manna-Whitneya (*TNF*, *TGFB1*).

8. Analiza wpływu stymulacji receptora P2X7 na ekspresję mRNA wybranych cytokin

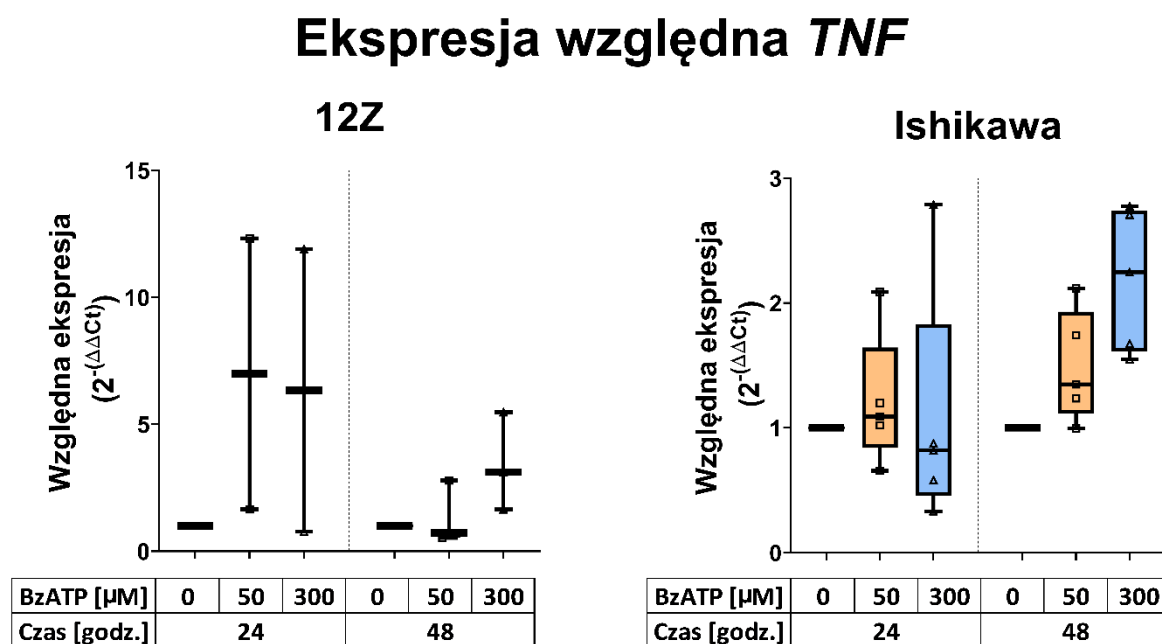
Stymulacja BzATP wpływała na ekspresję *IL1A*, *TNF* i *TGFB1* w sposób zależny od typu komórek, dawki i czasu trwania stymulacji (Ryc. 18–20).

W komórkach 12Z zaobserwowano wzrost ekspresji *IL1A* po stymulacji BzATP, szczególnie dla wyższej dawki (300 μ M) po 48 godzinach inkubacji (Ryc. 18). Podobny efekt obserwowano w komórkach linii Ishikawa. Jednak różnice te nie osiągnęły istotności statystycznej (ANOVA, $P = 0,4576$ dla 12Z; $P = 0,2378$ dla Ishikawa).



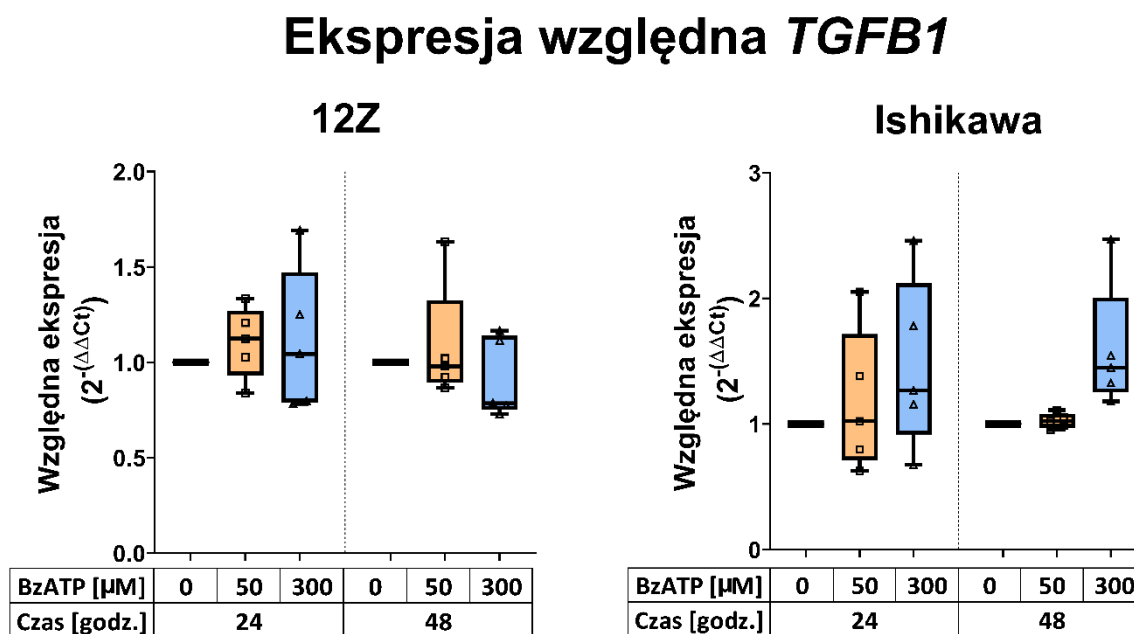
Rycina 18. Względna ekspresja mRNA dla *IL1A* w komórkach linii 12Z oraz Ishikawa po stymulacji BzATP. Ekspresję oceniono metodą qRT-PCR i przedstawiono jako $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, znormalizowane względem *GAPDH*. Dane przedstawiono jako mediany z rozstępem międzykwartylowym oraz indywidualnymi wartościami. Analiza statystyczna: ANOVA.

Analiza ekspresji mRNA dla *TNF* w komórkach 12Z wykazała wzrost ekspresji tej cytokiny po 24 godzinach stymulacji BzATP w obu badanych stężeniach, jednak ze względu na duży rozrzut wyników analiza statystyczna nie została przeprowadzona (Ryc. 19). Podobny trend obserwowano po 48 godzinach. W komórkach Ishikawa ekspresja *TNF* nie uległa istotnym zmianom po 24 godzinach stymulacji (test Kruskala-Wallisa, $P = 0,7825$), ani po 48 godzinach (ANOVA, $P = 0,1189$).



Rycina 19. Względna ekspresja mRNA dla *TNF* w komórkach linii 12Z oraz Ishikawa po stymulacji BzATP. Ekspresję oceniono metodą qRT-PCR i przedstawiono jako $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, znormalizowane względem *GAPDH*. Dane przedstawiono jako mediany z rozstępem międzykwartylowym oraz indywidualnymi wartościami. Analiza statystyczna: nie przeprowadzono (12Z); test Kruskala–Wallisa (24h Ishikawa), ANOVA (48h Ishikawa).

Badanie wpływu BzATP na ekspresję mRNA dla *TGFBI* nie wykazało istotnych różnic w komórkach 12Z, niezależnie od dawki agonisty i czasu stymulacji (wszystkie porównania $P > 0,97$; Ryc. 20). W komórkach Ishikawa również nie odnotowano istotnych różnic po 24 godzinach (ANOVA, $P = 0,5348$) ani po 48 godzinach stymulacji (test Kruskala–Wallisa, $P = 0,4441$).

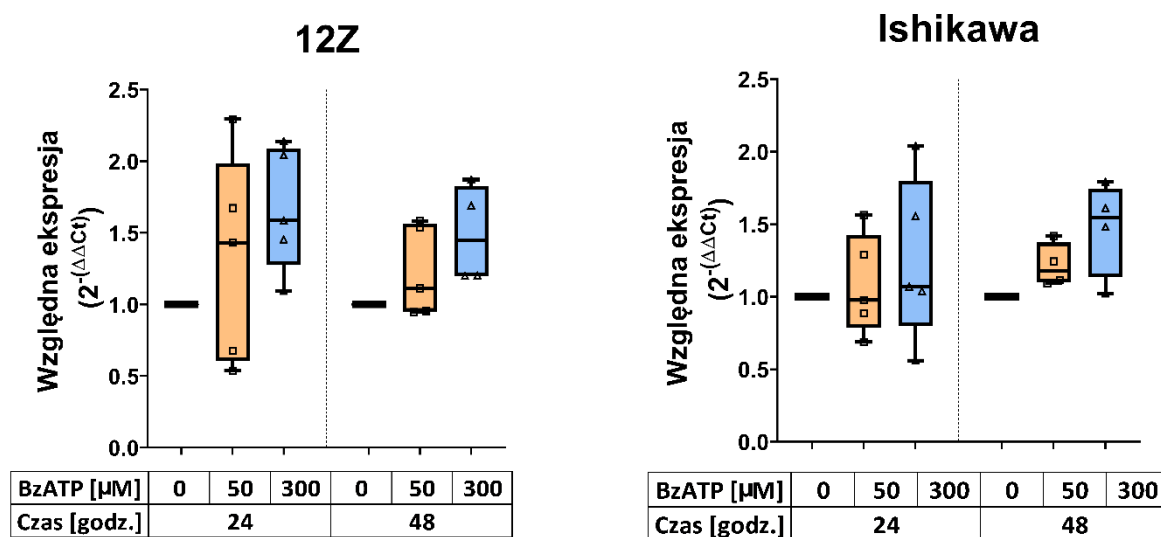


Rycina 20. Względna ekspresja mRNA dla *TGFB1* w komórkach linii 12Z oraz Ishikawa po stymulacji BzATP. Ekspresję oceniono metodą qRT-PCR i przedstawiono jako $2^{-\Delta\Delta C_t}$, znormalizowane względem *GAPDH*. Dane przedstawiono jako mediany z rozstępem międzykwartylowym oraz indywidualnymi wartościami. Analiza statystyczna: ANOVA (12Z – 24 h i 48 h; Ishikawa – 24 h), test Kruskala–Wallisa (Ishikawa – 48 h).

9. Wpływ stymulacji BzATP na ekspresję *P2RX7*

Aby ocenić, czy stymulacja receptora P2X7 wpływa na jego własną ekspresję, komórki 12Z i Ishikawa inkubowano z agonistą BzATP. W komórkach 12Z obserwowano wzrost ekspresji *P2RX7* po 48 godzinach inkubacji z BzATP w dawce 300 μM , jednak różnica ta nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ($P = 0,2112$). Pozostałe porównania również nie wykazały istotnych zmian (wszystkie $P > 0,36$; Ryc. 21). W komórkach Ishikawa ekspresja *P2RX7* pozostała stabilna we wszystkich analizowanych warunkach. Najwyższy poziom ekspresji odnotowano po 48 godzinach w dawce 300 μM , jednak nie był on statystycznie różny od kontroli ($P = 0,7707$).

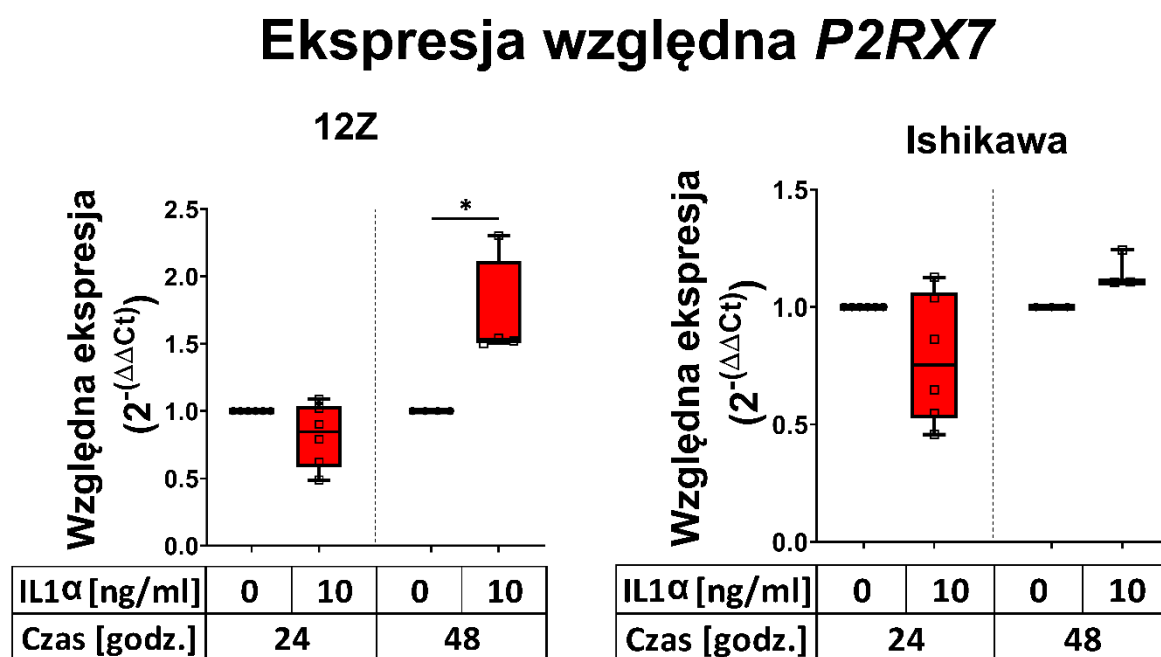
Ekspresja względna *P2RX7*



Rycina 21. Względna ekspresja mRNA dla *P2RX7* w komórkach linii 12Z oraz Ishikawa po stymulacji BzATP. Ekspresję oceniono metodą qRT-PCR i przedstawiono jako $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$, znormalizowane względem *GAPDH*. Dane przedstawiono w postaci wykresów pudełkowych z medianą, zakresem międzykwartylowym i wartościami indywidualnymi dla każdej próbki. Analiza statystyczna: ANOVA z porównaniami post-hoc dla wybranych warunków.

10. Wpływ stymulacji wybranymi cytokinami na ekspresję genu *P2RX7*

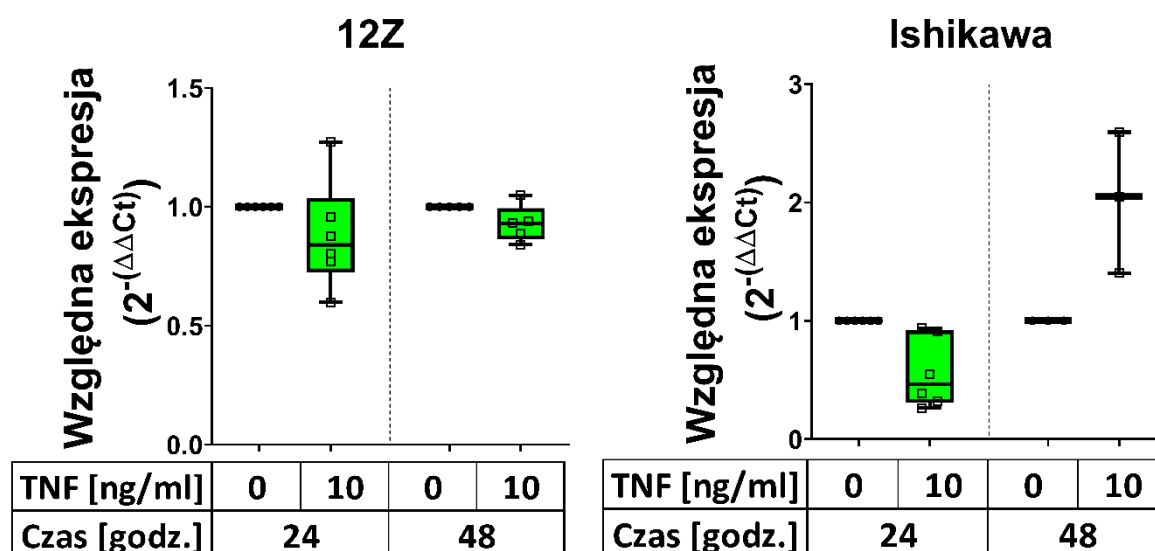
W komórkach linii 12Z stymulacja cytokiną IL1 α nie wpływała na ekspresję *P2RX7* po 24 godzinach inkubacji (Welch ANOVA, $P = 0,2997$). Po 48 godzinach obserwowano istotny wzrost ekspresji *P2RX7* względem kontroli (Mann–Whitney, $P = 0,0286$). W komórkach linii Ishikawa IL1 α nie wpływała na ekspresję receptora P2X7 ani po 24 godzinach (Welch ANOVA, $P = 0,3702$), ani po 48 godzinach (Mann–Whitney, $P = 0,4$).



Rycina 22. Względna ekspresja mRNA genu *P2RX7* w komórkach linii 12Z i Ishikawa po stymulacji IL1 α (10 ng/ml). Ekspresję oceniono metodą qRT-PCR i przedstawiono jako $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, znormalizowane względem *GAPDH*. Dane zaprezentowano jako wykresy pudełkowe z medianą, zakresem międzykwartylowym oraz wartościami indywidualnymi. Do analiz statystycznych zastosowano test Welch ANOVA (24 h) lub Mann–Whitney (48 h).

W komórkach 12Z nie zaobserwowano istotnego wpływu TNF na ekspresję *P2RX7* ani po 24 godzinach (Welch ANOVA, $p = 0,1754$), ani po 48 godzinach (Mann–Whitney, $p = 0,2$). W komórkach linii Ishikawa TNF powodował obniżenie ekspresji *P2RX7* po 24 godzinach stymulacji, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie (Welch ANOVA, $p = 0,0794$). Po 48 godzinach obserwowano wzrost ekspresji, który również nie osiągnął istotności statystycznej (Mann–Whitney, $p = 0,1$).

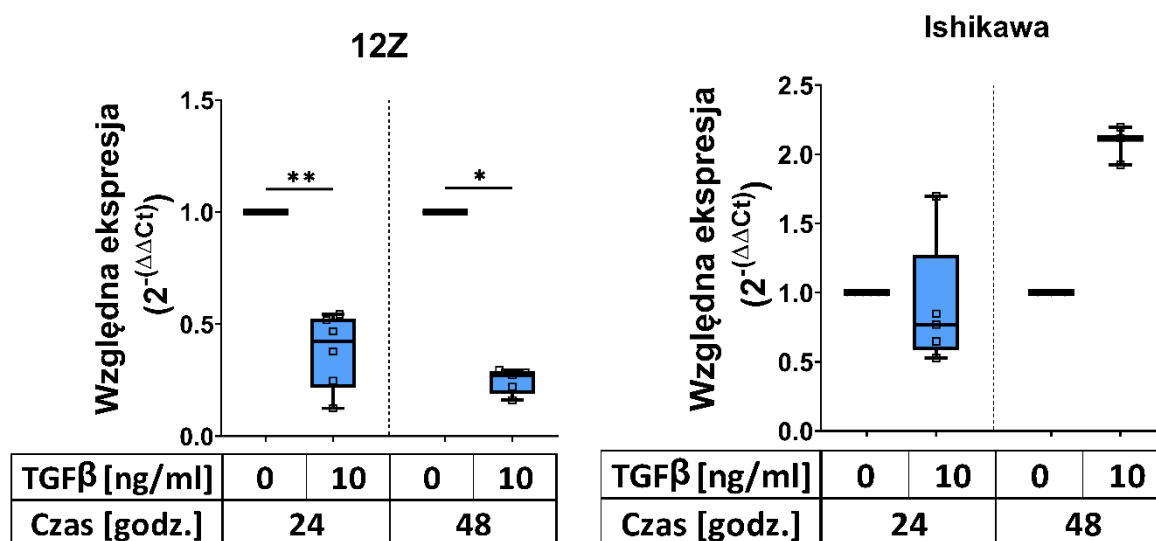
Ekspresja względna *P2RX7*



Rycina 23. Względna ekspresja mRNA genu *P2RX7* w komórkach linii 12Z i Ishikawa po stymulacji TNF (10 ng/ml). Ekspresję oceniono metodą qRT-PCR i przedstawiono jako $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, znormalizowane względem *GAPDH*. Dane przedstawiono jako wykresy pudełkowe z medianą, zakresem międzykwartylowym i wartościami indywidualnymi. Do analiz zastosowano test Welch ANOVA (24 h) lub Mann–Whitney (48 h).

Stymulacja komórek 12Z cytokiną TGF β prowadziła do istotnego obniżenia ekspresji *P2RX7* zarówno po 24 godzinach (Welch ANOVA, $p = 0,0022$), jak i po 48 godzinach (Mann–Whitney, $p = 0,0286$). W komórkach linii Ishikawa TGF β nie wpływał istotnie na ekspresję genu *P2RX7* po żadnym z badanych czasów inkubacji (24 h: Welch ANOVA, $p = 0,8898$; 48 h: Mann–Whitney, $p = 0,1$).

Ekspresja względna *P2RX7*



Rycina 24. Względna ekspresja mRNA genu *P2RX7* w komórkach linii 12Z i Ishikawa po stymulacji TGFβ (10 ng/ml). Ekspresję oceniono metodą qRT-PCR i przedstawiono jako $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, znormalizowane względem *GAPDH*. Dane przedstawiono jako wykresy pudełkowe z medianą, zakresem międzykwartylowym i wartościami indywidualnymi. Do analiz statystycznych zastosowano test Welch ANOVA (24 h) lub Mann–Whitney (48 h).

IX. DYSKUSJA

Receptor P2X7 od ponad dwóch dekad pozostaje przedmiotem intensywnych badań ze względu na swoją unikatową zdolność do pełnienia zarówno funkcji kanału kationowego, jak i induktora formowania dużego poru [176]. Wykazano jego udział w regulacji proliferacji, apoptozy i uwalniania cytokin prozapalnych, co czyni go jednym z kluczowych elementów układu odpornościowego [177]. W chorobach nowotworowych P2X7 może wspierać wzrost i inwazyjność komórek, choć w innych kontekstach pełni funkcję ograniczającą proliferację, co podkreśla jego zależny od środowiska, dualny charakter [178]. W odniesieniu do endometrium i chorób z nim związanych, takich jak endometrioza czy rak endometrium, dane literaturowe są ograniczone. Linie komórkowe 12Z i Ishikawa, reprezentujące odpowiednio model endometrioidalny i nowotworowy, stanowią zatem cenne narzędzie do porównania różnic w ekspresji i aktywności P2X7.

W warunkach hodowli *in vitro* obserwowałem, że komórki linii 12Z [174] i Ishikawa [175] zachowują wielokątny kształt typowy dla nabłonka i tworzą połączenia międzykomórkowe (Ryc. 8). Komórki 12Z, wyprowadzone z biopsji endometriozy otrzewnowej po transformacji antygenem T wirusa SV40, wykazują fenotyp $CK^{+}/E-cad^{-}$, co wskazuje na utratę klasycznych połączeń nabłonkowych i obecność cech fenotypu mezenchymalnego, takich jak ekspresja N-kadheryny [174]. W literaturze opisano, że taki profil może wynikać z metaplastji nabłonkowo-mezenchymalnej lub pochodzenia ze stromalnych/fibroblastycznych komórek $CK^{-}/E-cad^{-}$ [174]. Dodatkowo, fakt pochodzenia ze zmian endometriotycznych może oznaczać, że fenotyp tej linii nie jest jednorodny i może obejmować cechy zarówno nabłonkowe, jak i mezenchymalne. Z kolei według danych literaturowych linia Ishikawa, pochodząca z dobrze zróżnicowanego gruczolakoraka endometrium, charakteryzuje się heterogenicznością morfologiczną oraz utrzymaniem ekspresji ER i PR w większości klonów, mimo stopniowej utraty cech zróżnicowania w kolejnych pasażach [175]. Podkreśla to znaczenie ograniczania liczby pasażu w badaniach wymagających zachowania stabilnego fenotypu [175].

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach stwierdziłem, że zarówno w komórkach linii 12Z, jak i Ishikawa dochodzi do ekspresji mRNA i białka receptora P2X7, a poziom tej ekspresji był istotnie wyższy w linii 12Z. Analiza ilościowa metodą qRT-PCR wykazała około 5,3-krotnie wyższą medianę ekspresji transkryptu *P2RX7* w komórkach 12Z w porównaniu do linii Ishikawa (Ryc. 9). Brak jest jednak badań określających referencyjny poziom ekspresji P2X7 w linii 12Z, co uniemożliwia jednoznaczną ocenę czy wartości te odpowiadają poziomowi

charakterystycznemu dla komórek prawidłowych czy transformowanych. Analiza Western blot (Ryc. 10) została przeprowadzona oddzielnie dla frakcji błonowej i cytoplazmatycznej, co pozwoliło ocenić lokalizację białka P2X7 w komórce. W obu frakcjach wykrywałem wyraźny sygnał w postaci prążków o masie cząsteczkowej około 75 kDa, odpowiadającej pełnowymiarowemu wariantowi P2X7A [179, 180]. Intensywność prążków była większa w komórkach 12Z niż w komórkach Ishikawa. Co istotne, sygnał w frakcji błonowej i cytoplazmatycznej był porównywalny, co wskazuje, że istotna pula białka P2X7R nie jest ograniczona wyłącznie do błony komórkowej, ale może być obecna także w mitochondriach czy jądrze komórkowym [181]. Obecność prążków w frakcji cytoplazmatycznej może dodatkowo odzwierciedlać pulę białka w trakcie transportu, recyklingu lub degradacji.

W badaniu immunofluorescencyjnym (Ryc. 11) w obu liniach obserwowałem sygnał immunoreaktywny o dominującym ziarnistym rozkładzie w obrębie błony komórkowej, częściowo o charakterze dyfuzyjnym, bez istotnych różnic w intensywności pomiędzy liniami. Brak tych różnic może wynikać z mniejszej czułości metody IF w detekcji ilości całkowitego białka lub z parametrów obrazowania, dlatego nie wyklucza on różnic ilościowych wykrytych metodą Western blot. Na etapie dyskusji zestawilem uzyskane wyniki z danymi dostępnymi w Human Protein Atlas [182]. Dane te wskazują, że w prawidłowym endometrium poziom mRNA P2X7 wynosi 4,0 nTPM, a ekspresja białka ma charakter średni w komórkach gruczołowych, przy braku wykrywalnego białka w zrębie. Choć wartości nTPM i wyniki qRT-PCR nie są bezpośrednio porównywalne, oba źródła sugerują umiarkowaną ekspresję P2X7 w prawidłowym nabłonku endometrium oraz jej przewagę nad poziomem obserwowanym w komórkach nowotworowych.

W literaturze opisano, że w komórkach nowotworowych często obserwuje się obniżenie poziomu pełnowymiarowego, funkcjonalnego wariantu P2X7A [170, 183, 184]. Skrócone izoformy, takie jak P2X7B czy P2X7J, wywierają wpływ na proliferację komórek, ale pozbawione są funkcji proapoptotycznych [183, 184]. Wykazano także, że obniżenie poziomu P2X7A w raku endometrium może wynikać z przyspieszonej degradacji mRNA [170]. W świetle tych danych niższy sygnał P2X7A w linii Ishikawa, który zaobserwowałem w Western blot, może wskazywać na zmniejszenie udziału formy proapoptotycznej na rzecz wariantów sprzyjających proliferacji. Z kolei wyższy poziom P2X7A w komórkach 12Z może świadczyć o zachowaniu fenotypu bliższego komórkom prawidłowego endometrium, choć brak badań porównawczych uniemożliwia jednoznaczną ocenę.

W badaniach funkcjonalnych wykazałem, że komórki obu analizowanych linii – 12Z i Ishikawa – odpowiadają wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} na stymulację BzATP. Zaobserwowany efekt miał typową dla tego receptora kinetykę szybkiej aktywacji i utrzymywania się podwyższonego poziomu jonów wapnia, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [185, 186]. Zastosowanie antagonisty A438079 ograniczało odpowiedź przy stężeniu 50 μM agonisty, natomiast przy 300 μM efekt ten zanikał. Może to wynikać z aktywacji dodatkowych szlaków napływu jonów oraz różnic pomiaru Ca^{2+} w stosunku do testu formowania poru. W kolejnych doświadczeniach wykazałem, że w obu liniach stymulacja BzATP prowadziła do zależnego od dawki napływu YO-PRO-1, co wskazuje na aktywację mechanizmu formowania dużego poru. Antagonista A438079 skutecznie hamował ten efekt w 12Z, natomiast w Ishikawa tylko przy najwyższym stężeniu agonisty. Wyniki te wpisują się w literaturę, gdzie opisywano udział nie tylko samego kanału P2X7, ale też białek towarzyszących, takich jak paneksyna 1 czy kanały TRP [187-191]. Różnice pomiędzy liniami mogą więc wynikać zarówno z odmiennego poziomu ekspresji receptora, jak i składu izoform oraz kompleksów białkowych. Biorąc pod uwagę mechanistyczne modele formowania dużego poru, obejmujące zarówno otwarcie kanału jonowego, jak i udział szlaków wewnątrzkomórkowych zależnych od Ca^{2+} i kinaz MAPK, można przyjąć, że obserwowane różnice między liniami mogą odzwierciedlać odmienne mechanizmy sprzęgania aktywacji P2X7 z formowaniem dużego poru [192].

Analiza proliferacji ujawniła, że umiarkowane stężenia agonisty (50 μM BzATP) nie wpływały na dynamikę wzrostu komórek, natomiast wyższe (300 μM) hamowały proliferację komórek 12Z po 48 godzinach. W komórkach Ishikawa obserwowałem jedynie trend w tym kierunku. Takie dwufazowe działanie receptora P2X7 – proliferacyjne przy słabszej aktywacji i cytotoksyczne przy silnej – opisano również w innych modelach, w tym w endometrialnych komórkach macierzystych i komórkach ectopowego endometrium [193-195]. Różnice w stosunku do nowotworów, gdzie P2X7 częściej wspiera wzrost i migrację [196-198], mogą wynikać z odmiennych warunków mikrośrodowiska, zwłaszcza stężenia ATP oraz obecności ektonukleotydaz CD39 i CD73.

W analizach wykazałem także spontaniczną ekspresję *IL1A*, *TNF* oraz *TGFBI* w obu badanych liniach, przy czym poziomy różniły się pomiędzy badanymi liniami komórkowymi. W linii 12Z istotnie wyższa była ekspresja *IL1A* i *TGFBI*, natomiast w Ishikawa dominowała ekspresja *TNF*. Wpisuje się to w charakter prozapalny komórek endometrioidalnych oraz nowotworowe mechanizmy adaptacyjne komórek Ishikawa [199-205]. Jeśli chodzi o wpływ cytokin na

ekspresję *P2RX7*, stwierdziłem, że IL-1 α zwiększała poziom *P2RX7* w komórkach 12Z, natomiast w komórkach Ishikawa nie obserwowałem takiego efektu. TNF nie wywołał istotnych zmian, a TGF- β 1 obniżał ekspresję receptora w 12Z. Z kolei stymulacja BzATP prowadziła do niewielkich zmian w profilu cytokinowym – ekspresja *IL1A* i *TNF* wzrastała głównie w 12Z, natomiast ekspresja *TGFB1* pozostawała niezmienną [206-215]. Wyniki te wskazują na obustronną regulację: cytokiny modulują ekspresję receptora, a P2X7 wpływa na profil cytokinowy komórek endometrium.

W moich doświadczeniach stymulacja komórek 12Z i Ishikawa agonistą BzATP nie prowadziła do istotnych zmian ekspresji mRNA *P2RX7*, choć w komórkach 12Z widoczny był trend wzrostowy po 48 godzinach przy 300 μ M. Zgodnie z literaturą regulacja P2X7 po aktywacji zachodzi głównie potranslacyjnie, poprzez zmiany lokalizacji i stabilności białka. W komórkach RAW264.7 (linia komórkowa mysich makrofagów, pochodząca z guza wywołanego przez wirus białaczki Abelsona) długotrwała ekspozycja na ATP powodowała internalizację i utratę receptora z powierzchni, a jego powrót następował dopiero po usunięciu nukleotydu [216]. Podobne zjawiska opisano w komórkach CaSki (komórki raka szyjki macicy pochodzące z ludzkiego nabłonka płaskonabłonkowego) oraz komórkach HEK293 (komórki ludzkiej nerki embrionalnej), gdzie aktywacja receptora prowadziła do fosforylacji, rekrutacji GRK-3 (kinazy receptorów sprzężonych z białkiem G, regulującej internalizację) i β -arrestyny-2 oraz endocytozy receptora z częściową degradacją i recyklingiem [217]. W komórkach mięśniowych dystroficznych obserwowano dodatkowo proteolizę P2X7 przez MMP-2 [218]. Wszystko to sugeruje, że aktywacja częściej obniża dostępność receptora na powierzchni niż zwiększa jego ekspresję genową. W niektórych modelach, takich jak sepsa CLP (cecal ligation and puncture – eksperymentalny model sepsy u gryzoni) obserwowano wzrost poziomu białka P2X7 po traktowaniu zwierząt BzATP [219]. Wzrost ekspresji obserwowany był także w komórkach gwiazdzistych wątroby, co tłumaczono internalizacją z ponownym wbudowywaniem w błonę oraz wtórną regulacją zapalną z udziałem ERK i NF- κ B [220].

Brak istotnych zmian w moim układzie, przy jedynie kierunkowym wzroście w 12Z, wskazuje więc na dominację regulacji potranslacyjnej i zależność od dodatkowych sygnałów zapalnych [219, 221].

Podsumowując, moje wyniki wskazują, że receptor P2X7 jest obecny i funkcjonalny w badanych liniach endometrialnych, jednak jego poziom i aktywność różnią się pomiędzy modelem endometrioidalnym (12Z) a nowotworowym (Ishikawa). Linia 12Z wykazywała wyższy poziom ekspresji pełnowymiarowego wariantu P2X7A, większą wrażliwość na silną

stymulację i wyraźniejsze interakcje z cytokinami prozapalnymi. W linii komórek Ishikawa obserwowałem obniżenie sygnału P2X7A oraz cechy adaptacyjne typowe dla komórek nowotworowych. Dane te sugerują, że np. w endometriozie P2X7 może pełnić rolę ograniczającą proliferację i sprzyjającą odpowiedzi zapalnej, podczas gdy w raku endometrium mechanizmy regulacyjne wydają się powodować utratę wrażliwości na potencjalne cytotoksyczne działanie receptora. Ograniczeniem pracy pozostaje brak danych referencyjnych dla prawidłowych komórek endometrium oraz brak oceny izoform receptora, które mogą różnicować jego funkcje. Kierunki dalszych badań powinny obejmować analizę wariantów P2X7 w próbkach pacjentek oraz badania in vivo nad jego rolą w mikrośrodku endometrium.

X. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

- 1. Charakterystyka fenotypowa:** Komórki 12Z i Ishikawa zachowują cechy nabłonkowe, jednak różnią się profilem molekularnym – 12Z wykazuje cechy endometrioidalne, a Ishikawa nowotworowe, co należy uwzględnić przy interpretacji wyników.
- 2. Ekspresja receptora P2X7:** Receptor P2X7 jest obecny w obu liniach, z istotnie wyższym poziomem w linii 12Z. Western blot potwierdził obecność wariantu P2X7A w frakcjach błonowej i cytoplazmatycznej.
- 3. Lokalizacja receptora:** Immunofluorescencja potwierdziła obecność P2X7 na powierzchni obu linii, bez wyraźnych różnic ilościowych.
- 4. Aktywność funkcjonalna:** Stymulacja BzATP wywoływała napływ Ca^{2+} i formowanie dużego poru w obu liniach, hamowane przez A438079. Efekt był silniejszy i bardziej podatny na inhibicję w 12Z.
- 5. Proliferacja:** Silna aktywacja P2X7 (300 μM BzATP) hamowała proliferację linii 12Z, podczas gdy w linii Ishikawa widoczny był tylko trend. Potwierdza to dwufazowe działanie receptora – proliferacyjne przy słabej i cytotoksyczne przy silnej stymulacji.
- 6. Regulacja cytokinowa:** Obie linie spontanicznie ekspresowały *IL1A*, *TNF* i *TGFB1*, z różnicami w dominujących transkryptach. BzATP wywoływał jedynie nieistotne zmiany, z trendem wzrostowym *IL1A* i *TNF* w linii 12Z.
- 7. Regulacja ekspresji *P2RX7*:** BzATP nie zmieniał istotnie ekspresji genu *P2RX7*, co wskazuje na przewagę mechanizmów potranslacyjnych. Cytokiny modulowały ekspresję różnie w zależności od linii: IL-1 α zwiększała, TGF- β 1 obniżał poziom w linii 12Z, a TNF nie miał istotnego wpływu. W linii Ishikawa stymulacja receptora nie wywołała istotnych zmian.

Wnioski ogólne: Receptor P2X7 pełni odmienne role w badanych modelach: w 12Z sprzyja odpowiedzi zapalnej i ogranicza proliferację przy silnej aktywacji, natomiast w Ishikawa jego cytotoksyczny potencjał jest ograniczony. Wyniki podkreślają dualny charakter P2X7 i jego znaczenie w chorobach endometrium.

XI. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ameer MA, Fagan SE, Sosa-Stanley JN, Peterson DC. Anatomy, abdomen and pelvis: uterus. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Dec 6.
- [2] Mescher AL. Junqueira's basic histology: text and atlas. 16th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2021.
- [3] Tempest N, Jansen M, Baker AM, Hill CJ, Hale M, Magee D, Treanor D, Wright NA, Hapangama DK. Histological 3D reconstruction and in vivo lineage tracing of the human endometrium. *J Pathol*. 2020 Aug;251(4):440-51. doi:10.1002/path.5478. PMID:32476144.
- [4] Tempest N, Hill CJ, Maclean A, Marston K, Powell SG, Al-Lamee H, Hapangama DK. Novel microarchitecture of human endometrial glands: implications in endometrial regeneration and pathologies. *Hum Reprod Update*. 2022 Feb;28(2):153-71. doi:10.1093/humupd/dmab039. PMID:34875046; PMCID:PMC8888994.
- [5] Hapangama DK, Drury J, Da Silva L, Al-Lamee H, Earp A, Valentijn AJ, Edirisinghe DP, Murray PA, Fazleabas AT, Gargett CE. Abnormally located SSEA1+/SOX9+ endometrial epithelial cells with a basalis-like phenotype in the eutopic functionalis layer may play a role in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod*. 2019 Jan;34(1):56-68. doi:10.1093/humrep/dey336. PMID:30496412; PMCID:PMC6295963.
- [6] Cousins FL, O DF, Gargett CE. Endometrial stem/progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 Jul;50:27-38. doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.01.011. PMID:29503126.
- [7] Łuszczynski K, Komorowski M, Soszyńska M, Lewandowska P, Zdanowski R, Szafarowska M, Kamiński P, Niemcewicz M, Malejczyk J, Lutyńska A, Ścieżyńska A. Surface molecular markers for the isolation of viable fibroblast subpopulations in the female reproductive tract: a comprehensive review. *Int J Mol Sci*. 2024 Dec 30;26(1):233. doi:10.3390/ijms26010233. PMID:39796089; PMCID:PMC11720034.
- [8] Ścieżyńska A, Komorowski M, Soszyńska M, Malejczyk J. NK cells as potential targets for immunotherapy in endometriosis. *J Clin Med*. 2019 Sep;8(9):1468. doi:10.3390/jcm8091468. PMID:31540116; PMCID:PMC6780982.

- [9] Gargett CE, Nguyen HP, Ye L. Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012 Dec;13(4):235-51. doi:10.1007/s11154-012-9221-9. PMID:22847235.
- [10] Munro MG, Critchley HOD, Fraser IS; FIGO Menstrual Disorders Committee. The two FIGO systems for normal and abnormal uterine bleeding symptoms and classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years: 2018 revisions. *Int J Gynaecol Obstet*. 2018 Dec;143(3):393-408. doi:10.1002/ijgo.12666. PMID:30306584.
- [11] Nguyen HPT, Xiao L, Deane JA, Tan KS, Cousins FL, Masuda H, Sprung CN, Rosamilia A, Gargett CE. N-cadherin identifies human endometrial epithelial progenitor cells by in vitro stem cell assays. *Hum Reprod*. 2017 Nov;32(11):2254-68. doi:10.1093/humrep/dex289. PMID:29040564.
- [12] Blanco-Breindel MF, Singh M, Kahn J. Endometrial receptivity. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jun 7 [updated 2025 Jan]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK587449/>
- [13] Mutter GL, Zaino RJ, Baak JP, Bentley RC, Robboy SJ. Benign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2007 Apr;26(2):103-14. doi:10.1097/PGP.0b013e31802e4696. PMID:17413975.
- [14] Pandey J, Yonder S. Premalignant lesions of the endometrium. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jul 25 [updated 2025 Jan]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562215/>
- [15] Keyif B, Yavuzcan A, Yurtçu E, Başbuğ A, Düzenli F, Keyif E, Goynumer FG. Exploring the inflammatory basis of endometrial polyps: clinical implications of hematological biomarkers in a retrospective study. *J Clin Med*. 2025;14:2754. doi:10.3390/jcm14082754.
- [16] Martire FG, Costantini E, D'Abate C, Schettini G, Sorrenti G, Centini G, Zupi E, Lazzeri L. Endometriosis and adenomyosis: from pathogenesis to follow-up. *Curr Issues Mol Biol*. 2025;47:298. doi:10.3390/cimb47050298.
- [17] Zhang H, Li C, Li W, Xin W, Qin T. Research advances in adenomyosis-related signaling pathways and promising targets. *Biomolecules*. 2024 Nov;14(11):1402. doi:10.3390/biom14111402. PMID:39595579; PMCID:PMC11591984.

- [18] Zhang Y, Yu M, Tian Y, et al. The role of NLRP3 inflammasome in endometriosis. *Front Immunol.* 2021;12:630235. doi:10.3389/fimmu.2021.630235. PMID:33692626; PMCID:PMC7938420.
- [19] Maggiore ULR, Ferrero S, Mangili G, Bergamini A, Inversetti A, Giorgione V, Viganò P, Candiani M. A systematic review on endometriosis during pregnancy: diagnosis, misdiagnosis, complications and outcomes. *Hum Reprod Update.* 2016 Jan;22(1):70-103. doi:10.1093/humupd/dmv045. PMID:26566892.
- [20] Defrère S, Lousse JC, González-Ramos R, Colette S, Donnez J, Van Langendonckt A. Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2008 Jul;14(7):377-85. doi:10.1093/molehr/gan033. PMID:18515802.
- [21] Eskenazi B, Warner M. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997 Jun;24(2):235-58. doi:10.1016/S0889-8545(05)70302-8. PMID:9163765.
- [22] Signorile PG, Baldi F, Bussani R, D'Armiento M, De Falco M, Boccellino M, Quagliuolo L, Baldi A. New evidence of the presence of endometriosis in the human fetus. *Reprod Biomed Online.* 2010 Jul;21(2):142-7. doi:10.1016/j.rbmo.2010.04.002. PMID:20570280.
- [23] Martin JD, Hauck AE. Endometriosis in the male. *Am Surg.* 1985 Jul;51(7):426-30. PMID:4014529.
- [24] Lu P, Ory S. Endometriosis: current management. *Mayo Clin Proc.* 1995 May;70(5):453-63. doi:10.4065/70.5.453. PMID:7726167.
- [25] Dmowski W. Endometriosis at the end of the millennium: the controversy remains. *Pol J Gyn Investig.* 1999;1(3):175-86.
- [26] Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology.* 2002 Jun;143(6):2119-38. doi:10.1210/endo.143.6.8885. PMID:12021179.
- [27] Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Apr;955:11-22. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02761.x. PMID:11949939.
- [28] Gadomska H, Kamiński P, Marianowski L. Endometrioza. *Medipress Ginekol.* 1997;3:2-5.

- [29] Goldstein DP, de Chohnoky C, Emans SJ, Leventhal JM. Laparoscopy in the diagnosis and management of pelvic pain in adolescents. *J Reprod Med.* 1980 Sep;25(3):251-6. PMID:7418301.
- [30] Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, Brodsky V, Canis M, Colombo GL, DeLeire T, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod.* 2012 May;27(5):1292-9. doi:10.1093/humrep/des073. PMID:22422778.
- [31] Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol.* 1927;3(2):93-110. PMID:19969738; PMCID:PMC1931445.
- [32] Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927;14(4):422-69. doi:10.1016/S0002-9378(15)30003-X.
- [33] Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 Jan;96(1):21-34. doi:10.1016/S0301-2115(00)00405-X. PMID:11146060.
- [34] Witz CA, Schenken RS. Pathogenesis of endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol.* 1997;15(3):199-208. doi:10.1055/s-2008-1068749. PMID:9629377.
- [35] Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C, Dmowski WP. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1996 May;65(5):925-30. doi:10.1016/S0015-0282(16)58262-4. PMID:8612825.
- [36] Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2001 Jan;75(1):1-10. doi:10.1016/S0015-0282(00)01630-7. PMID:11163805.
- [37] Sinaii N, Cleary SD, Ballweg ML, Nieman LK, Stratton P. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum Reprod.* 2002 Oct;17(10):2715-24. doi:10.1093/humrep/17.10.2715. PMID:12351536.
- [38] Fujii S. Secondary Müllerian system and endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Jul;165(1):219-25. doi:10.1016/0002-9378(91)90255-P. PMID:1859627.

- [39] Laganà AS, Garzon S, Götte M, Viganò P, Franchi M, Ghezzi F, Martin DC. The pathogenesis of endometriosis: molecular and cell biology insights. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov;20(22):5615. doi:10.3390/ijms20225615. PMID:31752378; PMCID:PMC6888477.
- [40] Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update*. 1998 Sep-Oct;4(5):741-51. doi:10.1093/humupd/4.5.741. PMID:10027602.
- [41] Laschke MW, Giebels C, Menger MD. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum Reprod Update*. 2011 Sep-Oct;17(5):628-36. doi:10.1093/humupd/dmr023. PMID:21788265.
- [42] McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 1996 Feb;11(1):220-3. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a019023. PMID:8671260.
- [43] Halis G, Arici A. Endometriosis and inflammation in infertility. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Mar;1034:300-15. doi:10.1196/annals.1335.032. PMID:15731320.
- [44] Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Painter R. Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. *BMJ*. 1993 Jan;306(6871):182-4. doi:10.1136/bmj.306.6871.182. PMID:8435572; PMCID:PMC1676619.
- [45] Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004 Apr;18(2):177-200. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.01.007. PMID:15157638.
- [46] Bourdel N, Matsusaki S, Roman H, Lenglet Y, Botchorishvili R, Mage G, Canis M. Endometriosis in teenagers. *Gynecol Obstet Fertil*. 2006 Sep;34(9):727-34. doi:10.1016/j.gyobfe.2006.07.008. PMID:16963291.
- [47] Kowalczyk-Amico K, Szubert M, Suzin J. Angiogenesis and inflammatory response in endometriosis. *Prz Menopauzalny*. 2009;5:261-4. PMID:19936588.
- [48] Jakiel G, Robak-Chołubek D, Tkaczuk-Włach J. Endometriosis. *Prz Menopauzalny*. 2006;2:126-9. PMID:17679499.
- [49] Fraga MV, Oliveira Brito LG, Yela DA, de Mira TA, Benetti-Pinto CL. Pelvic floor muscle dysfunctions in women with deep infiltrative endometriosis: an underestimated association. *Int J Clin Pract*. 2021 Sep;75(9):e14350. doi:10.1111/ijcp.14350. PMID:33951346.

- [50] Mabrouk M, Raimondo D, Arena A, Iodice R, Altieri M, Sutherland N, Salucci P, Moro E, Seracchioli R. Parametrial endometriosis: the occult condition that makes the hard harder. *J Minim Invasive Gynecol*. 2019 Jul-Aug;26(5):871-6. doi:10.1016/j.jmig.2018.08.022. PMID:30189364.
- [51] Hoyle AT, Puckett Y. Endometrioma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jun 5 [updated 2025 Jan]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559230/>
- [52] Damario MA, Rock JA. Classification of endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol*. 1997;15(3):235-43. doi:10.1055/s-2008-1068753. PMID:9629381.
- [53] Gilmour JA, Huntington A, Wilson HV. The impact of endometriosis on work and social participation. *Int J Nurs Pract*. 2008 Dec;14(6):443-8. doi:10.1111/j.1440-172X.2008.00718.x. PMID:19094157.
- [54] Szamatowicz M. Endometriosis—still an enigmatic disease. What are the causes, how to diagnose it and how to treat successfully? *Gynecol Endocrinol*. 2008 Nov;24(11):535-6. doi:10.1080/09513590802296062. PMID:19012070.
- [55] Tuttles F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, Buchweitz O, Greb R, Kandolf O, Mangold R, et al. ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis. *Zentralbl Gynakol*. 2005 Jun;127(5):275-81. doi:10.1055/s-2005-836904. PMID:15986217.
- [56] Plodeck V, Sommer U, Baretton GB, Aust DE, Laniado M, Hoffmann RT, Platzek I. A rare case of pancreatic endometriosis in a postmenopausal woman and review of the literature. *Acta Radiol Open*. 2016 Sep;5(9):2058460116669385. doi:10.1177/2058460116669385. PMID:27651958; PMCID:PMC5025119.
- [57] Andrade MT, de Freitas CV, Câmara SF, Vieira JJ. Umbilical nodule with cyclical bleeding: a case report and literature review of atypical endometriosis. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2016;2016:7401409. doi:10.1155/2016/7401409. PMID:27034889; PMCID:PMC4785705.
- [58] Adilbayeva A, Kunz J. Pathogenesis of endometriosis and endometriosis-associated cancers. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul;25(14):7624. doi:10.3390/ijms25147624. PMID:37570060; PMCID:PMC10418339.

- [59] Pašalić E, Tambuwala MM, Hromić-Jahjefendić A. Endometriosis: classification, pathophysiology, and treatment options. *Pathol Res Pract*. 2023 Nov;251:154847. doi:10.1016/j.prp.2023.154847. PMID:37638131.
- [60] Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2012 Sep;98(3):511-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.06.029. PMID:22819144; PMCID:PMC3836682.
- [61] Horne AW, Missmer SA. Pathophysiology, diagnosis, and management of endometriosis. *BMJ*. 2022 Oct;379:e070750. doi:10.1136/bmj-2022-070750. PMID:36219320.
- [62] Wang Y, Nicholes K, Shih IM. The origin and pathogenesis of endometriosis. *Annu Rev Pathol*. 2020 Jan;15:71-95. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032654. PMID:31610147.
- [63] Lamceva J, Uljanovs R, Strumfa I. The main theories on the pathogenesis of endometriosis. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb;24(5):4254. doi:10.3390/ijms24054254. PMID:36901685; PMCID:PMC10001466.
- [64] Upson K, Missmer SA. Epidemiology of adenomyosis. *Semin Reprod Med*. 2020 May;38(2-3):89-107. doi:10.1055/s-0040-1718920. PMID:33105509; PMCID:PMC7927213.
- [65] Gunther R, Walker C. Adenomyosis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jun 12 [updated 2025 Jan]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539868/>
- [66] Taran FA, Stewart EA, Brucker S. Adenomyosis: epidemiology, risk factors, clinical phenotype and surgical and interventional alternatives to hysterectomy. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2013 Sep;73(9):924-31. doi:10.1055/s-0033-1350840. PMID:24771944; PMCID:PMC3859152.
- [67] Moawad G, Fruscalzo A, Youssef Y, Kheil M, Tawil T, Nehme J, Pirtea P, Guani B, Afaneh H, Ayoubi JM, Feki A. Adenomyosis: an updated review on diagnosis and classification. *J Clin Med*. 2023 Jul;12(14):4828. doi:10.3390/jcm12144828. PMID:37510943; PMCID:PMC10381628.
- [68] Vannuccini S, Tosti C, Carmona F, Huang SJ, Chapron C, Guo SW, Petraglia F. Pathogenesis of adenomyosis: an update on molecular mechanisms. *Reprod Biomed Online*. 2017 Nov;35(5):592-601. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.016. PMID:28827142.

- [69] Bourdon M, Santulli P, Jeljeli M, Vannuccini S, Marcellin L, Doridot L, Petraglia F, Batteux F, Chapron C. Immunological changes associated with adenomyosis: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2021 Jan;27(1):108-29. doi:10.1093/humupd/dmaa029. PMID:33049065.
- [70] Khan KN, Fujishita A, Mori T. Pathogenesis of human adenomyosis: current understanding and its association with infertility. *J Clin Med*. 2022 Jul;11(14):4057. doi:10.3390/jcm11144057. PMID:35885295; PMCID:PMC9330513.
- [71] Rossi M, Vannuccini S, Capezzuoli T, et al. Mechanisms and pathogenesis of adenomyosis. *Curr Obstet Gynecol Rep*. 2022;11:95-102. doi:10.1007/s13669-022-00326-7. PMID:36105071; PMCID:PMC9448335.
- [72] Zhai J, Vannuccini S, Petraglia F, Giudice LC. Adenomyosis: mechanisms and pathogenesis. *Semin Reprod Med*. 2020 May;38(2-3):129-43. doi:10.1055/s-0040-1716687. PMID:33032339; PMCID:PMC7932680.
- [73] Bulun SE, Yildiz S, Adli M, Wei JJ. Adenomyosis pathogenesis: insights from next-generation sequencing. *Hum Reprod Update*. 2021 Nov;27(6):1086-97. doi:10.1093/humupd/dmab018. PMID:34320505.
- [74] Liu L, Habeshian TS, Zhang J, Peeri NC, Du M, De Vivo I, Setiawan VW. Differential trends in rising endometrial cancer incidence by age, race, and ethnicity. *JNCI Cancer Spectr*. 2023 Jan;7(1):pkac091. doi:10.1093/jncics/pkac091. PMID:36623722; PMCID:PMC9834371.
- [75] Smrz SA, Calo C, Fisher JL, Salani R. An ecological evaluation of the increasing incidence of endometrial cancer and the obesity epidemic. *Am J Obstet Gynecol*. 2021 May;224(5):506.e1-506.e8. doi:10.1016/j.ajog.2020.12.118. PMID:33412265.
- [76] Brooks RA, Fleming GF, Lastra RR, Lee NK, Moroney JW, Son CH, Tatebe K, Veneris JL. Current recommendations and recent progress in endometrial cancer. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jul;69(4):258-79. doi:10.3322/caac.21561. PMID:31180590.
- [77] Oaknin A, Bosse TJ, Creutzberg CL, Giordelli G, Harter P, Joly F, Lorusso D, Marth C, Makker V, Mirza MR, Ledermann JA, Colombo N; ESMO Guidelines Committee. Endometrial cancer: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2022 Sep;33(9):860-77. doi:10.1016/j.annonc.2022.07.003. PMID:35987354.

- [78] Gordhandas S, Zammarrelli WA, Rios-Doria EV, Green AK, Makker V. Current evidence-based systemic therapy for advanced and recurrent endometrial cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2023 Feb;21(2):217-26. doi:10.6004/jnccn.2022.7063. PMID:36727995.
- [79] Makker V, MacKay H, Ray-Coquard I, Levine DA, Westin SN, Aoki D, Oaknin A. Endometrial cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Dec;7(1):88. doi:10.1038/s41572-021-00328-8. PMID:34857767.
- [80] Gu B, Shang X, Yan M, et al. Variations in incidence and mortality rates of endometrial cancer at the global, regional, and national levels, 1990–2019. *Gynecol Oncol*. 2021 Dec;161(3):573-80. doi:10.1016/j.ygyno.2021.02.019. PMID:33610816.
- [81] Gredmark T, Kvint S, Havel G, Mattsson LA. Histopathological findings in women with postmenopausal bleeding. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995 Feb;102(2):133-6. doi:10.1111/j.1471-0528.1995.tb09067.x. PMID:7756192.
- [82] Mahdy H, Vadakekut ES, Crotzer D. Endometrial cancer. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Apr 20 [updated 2025 Jan]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525981/>
- [83] Daniilidis A, Margioulas-Siarkou C, Margioulas-Siarkou G, Papandreou P, Papanikolaou A, Dinas K, Petousis S. Sentinel lymph node mapping in endometrial cancer to reduce surgical morbidity: always, sometimes, or never. *Prz Menopauzalny*. 2022 Sep;21(3):207-13. doi:10.5114/pm.2022.120716. PMID:36254244; PMCID:PMC9573678.
- [84] Casey MJ, Bewtra C, Lynch HT, Snyder CL, Stacey M. Endometrial cancers in mutation carriers from hereditary breast ovarian cancer syndrome kindreds: report from the Creighton University Hereditary Cancer Registry with review of the implications. *Int J Gynecol Cancer*. 2015 May;25(4):650-6. doi:10.1097/IGC.0000000000000406. PMID:25790075.
- [85] Hoang LN, Han G, McConechy M, Lau S, Chow C, Gilks CB, Huntsman DG, Köbel M, Lee CH. Immunohistochemical characterization of prototypical endometrial clear cell carcinoma—diagnostic utility of HNF-1 β and oestrogen receptor. *Histopathology*. 2014 Mar;64(4):585-96. doi:10.1111/his.12301. PMID:24117471.
- [86] Lim D, Murali R, Murray MP, Veras E, Park KJ, Soslow RA. Morphological and immunohistochemical reevaluation of tumors initially diagnosed as ovarian endometrioid carcinoma with emphasis on high-grade tumors. *Am J Surg Pathol*. 2016 Mar;40(3):302-12. doi:10.1097/PAS.0000000000000563. PMID:26630250.

- [87] Howitt BE, Hanamornroongruang S, Lin DI, Conner JE, Schulte S, Horowitz N, Crum CP, Meserve EE. Evidence for a dualistic model of high-grade serous carcinoma: BRCA mutation status, histology, and tubal intraepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2015 Mar;39(3):287-93. doi:10.1097/PAS.0000000000000367. PMID:25581752.
- [88] Casey MJ, Colanta AB. Müllerian intra-abdominal carcinomatosis in hereditary breast ovarian cancer syndrome: implications for risk-reducing surgery. *Fam Cancer*. 2016 Jul;15(3):371-84. doi:10.1007/s10689-016-9871-7. PMID:27272660.
- [89] Chelmow D, Brooks R, Cavens A, Huber-Keener K, Scott DM, Sheth SS, Whetstone S, Worly B, Burke W. Executive summary of the uterine cancer evidence review conference. *Obstet Gynecol*. 2022 Apr;139(4):626-43. doi:10.1097/AOG.0000000000004706. PMID:35353184.
- [90] Berek JS, Matias-Guiu X, Creutzberg C, Fotopoulou C, Gaffney D, Kehoe S, Lindemann K, Mutch D, Concin N; FIGO Women's Cancer Committee. FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *Int J Gynaecol Obstet*. 2023 Aug;162(2):383-94. doi:10.1002/ijgo.14753. PMID:37427837.
- [91] Murali R, Davidson B, Fadare O, Carlson JA, Crum CP, Gilks CB, Irving JA, Malpica A, Matias-Guiu X, McCluggage WG, Mittal K, Oliva E, Parkash V, Rutgers JKL, Staats PN, Stewart CJR, Tornos C, Soslow RA. High-grade endometrial carcinomas: morphologic and immunohistochemical features, diagnostic challenges and recommendations. *Int J Gynecol Pathol*. 2019 Jan;38 Suppl 1:S40-63. doi:10.1097/PGP.0000000000000518. PMID:30557297.
- [92] Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Beller U, Benedet JL, Heintz A, Ngan H, Pecorelli S. Carcinoma of the corpus uteri. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006 Nov;95 Suppl 1:S105-43. doi:10.1016/S0020-7292(06)60031-3. PMID:17161167.
- [93] Lax SF, Kurman RJ, Pizer ES, Wu L, Ronnett BM. A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advance-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2000 Sep;24(9):1201-8. doi:10.1097/00000478-200009000-00002. PMID:10976697.
- [94] Brinton LA, Felix AS, McMeekin DS, Creasman WT, Sherman ME, Mutch D, Cohn DE, Walker JL, Moore RG, Downs LS, Soslow RA, Zaino R. Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. *Gynecol Oncol*. 2013

May;129(2):277-84. doi:10.1016/j.ygyno.2013.01.024. PMID:23399904; PMCID:PMC3643746.

[95] Conlon N, Leita MM, Abu-Rustum NR, Soslow RA. Grading uterine endometrioid carcinoma: a proposal that binary is best. *Am J Surg Pathol*. 2014 Dec;38(12):1583-7. doi:10.1097/PAS.0000000000000305. PMID:25188892.

[96] Altman AD, Ferguson SE, Atenafu EG, Köbel M, McAlpine JN, Panzarella T, Lau S, Gien LT, Gilks B, Clarke B, Cameron A, Nelson G, Han G, Samouëlian V, Ho TC, Louie K, Bernardini MQ. Canadian high risk endometrial cancer (CHREC) consortium: analyzing the clinical behavior of high risk endometrial cancers. *Gynecol Oncol*. 2015 Nov;139(2):268-74. doi:10.1016/j.ygyno.2015.09.002. PMID:26348398.

[97] Hamilton CA, Cheung MK, Osann K, Chen L, Teng NN, Longacre TA, Powell MA, Hendrickson MR, Kapp DS, Chan JK. Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. *Br J Cancer*. 2006 Mar;94(5):642-6. doi:10.1038/sj.bjc.6603003. PMID:16495918; PMCID:PMC2361225.

[98] Paleari L, Pesce S, Rutigliani M, Greppi M, Obino V, Gorlero F, Vellone VG, Marcenaro E. New insights into endometrial cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar;13(7):1644. doi:10.3390/cancers13071644. PMID:33801647; PMCID:PMC8036943.

[99] Correction to "FIGO staging of endometrial cancer". *Int J Gynaecol Obstet*. 2024 Sep;166(3):1374. doi:10.1002/ijgo.15635. PMID:39084443.

[100] Taylor M, Jenkins SM, Pillarisetty LS. Endometritis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Oct 26 [updated 2025 Jan]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553124/>

[101] San-Juan R, Sanz-Prieto A, Contreras-Mora J, Fojo-Suárez I, Caso-Laviana JM, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Rodríguez-Goncer I, Fayos M, Brañas P, Barbero Casado P, García-Burguillo A, Aguado JM. Comprehensive analysis of current epidemiology, clinical features and prognostic factors of puerperal endometritis: a retrospective cohort analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X*. 2023;18:100199. doi:10.1016/j.eurox.2023.100199. PMID:37672420; PMCID:PMC10477246.

[102] Song D, Feng X, Zhang Q, Xia E, Xiao Y, Xie W, Li TC. Prevalence and confounders of chronic endometritis in premenopausal women with abnormal bleeding or reproductive failure.

Reprod Biomed Online. 2018 Jan;36(1):78-83. doi:10.1016/j.rbmo.2017.09.008. PMID:29129392.

[103] Li J, Wei J, Chen S, et al. Prevalence and risk factors for chronic endometritis in patients with adenomyosis and infertility: a retrospective cohort study. BMC Womens Health. 2024;24:403. doi:10.1186/s12905-024-03245-2. PMID:38719542; PMCID:PMC11243122.

[104] Ravel J, Moreno I, Simón C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease. Am J Obstet Gynecol. 2021 Mar;224(3):251-7. doi:10.1016/j.ajog.2020.11.030. PMID:33253896; PMCID:PMC7880140.

[105] Soper DE, Wiesenfeld HC. The continued challenges in the diagnosis of acute pelvic inflammatory disease: focus on clinically mild disease. J Infect Dis. 2021 Aug;224(Suppl 2):S75-9. doi:10.1093/infdis/jiab107. PMID:34347909.

[106] Kitaya K, Takeuchi T, Mizuta S, Matsubayashi H, Ishikawa T. Endometritis: new time, new concepts. Fertil Steril. 2018 Aug;110(3):344-50. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.04.012. PMID:30049395.

[107] Gradison M. Pelvic inflammatory disease. Am Fam Physician. 2012 Apr;85(8):791-6. PMID:22534245.

[108] Gonzalo-Carballe M, Ríos-Vives MÁ, Fierro EC, Azogue XG, Herrero SG, Rodríguez AE, Rus MN, Planes-Conangla M, Escudero-Fernandez JM, Coscojuela P. A pictorial review of postpartum complications. Radiographics. 2020 Nov;40(7):2117-31. doi:10.1148/rg.2020200042. PMID:33021836.

[109] Cicinelli E, Vitagliano A, Kumar A, Lasmar RB, Bettocchi S, Haimovich S; International Working Group for Standardization of Chronic Endometritis Diagnosis. Unified diagnostic criteria for chronic endometritis at fluid hysteroscopy: proposal and reliability evaluation through an international randomized-controlled observer study. Fertil Steril. 2019 Jul;112(1):162-73.e2. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.03.029. PMID:31078403.

[110] Chaim W, Bashiri A, Bar-David J, Shoham-Vardi I, Mazor M. Prevalence and clinical significance of postpartum endometritis and wound infection. Infect Dis Obstet Gynecol. 2000;8(2):77-82. doi:10.1155/S1064744900000124. PMID:10950824; PMCID:PMC1784562.

- [111] Donders G, Greenhouse P, Donders F, Engel U, Paavonen J, Mendling W. Genital tract GAS infection ISIDOG guidelines. *J Clin Med*. 2021 May;10(9):1959. doi:10.3390/jcm10091959. PMID:33925631; PMCID:PMC8125249.
- [112] Kim CJ, Kim DJ, Kang JH. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw*. 2015 Feb;15(1):16-26. doi:10.4110/in.2015.15.1.16. PMID:25713505; PMCID:PMC4338060.
- [113] Wan RT, Liu QD, Xu HL, Chen Q. Causal association of immune cells and endometritis: a Mendelian randomization study. *Sci Rep*. 2024;14:24822. doi:10.1038/s41598-024-75827-x. PMID:39166382; PMCID:PMC11222963.
- [114] Li Y, Wang L, Lin S, Xu H. Causality of immune cells and endometriosis: a bidirectional Mendelian randomization study. *BMC Womens Health*. 2024;24:574. doi:10.1186/s12905-024-03417-0. PMID:38939913; PMCID:PMC11294926.
- [115] Liu X, Liu D, Song W. Research update for the immune microenvironment of chronic endometritis. *J Reprod Immunol*. 2022 Sep;152:103637. doi:10.1016/j.jri.2022.103637. PMID:35760237.
- [116] Zhu Y, Li H, He F, Liu S, Yang X, Wang L, et al. Recombinant humanized collagen remodels endometrial immune microenvironment of chronic endometritis through macrophage immunomodulation. *Regen Biomater*. 2023 Oct;10:rbad033. doi:10.1093/rb/rbad033. PMID:37731744; PMCID:PMC10509564.
- [117] Chichester CO, Gotsch F, Sentman CL, Romero R, Sharma S. Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol*. 2008 May;59(5):425-32. doi:10.1111/j.1600-0897.2008.00595.x. PMID:18399949.
- [118] Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev*. 2005 Feb;26(1):44-62. doi:10.1210/er.2003-0021. PMID:15689573.
- [119] Cicinelli E, Greco P, Massenzio F, Baldini D, Falagario T, Rosenberg P, et al. Abnormal pattern of lymphocyte subpopulations in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. *Am J Reprod Immunol*. 2009 Apr;61(4):322-9. doi:10.1111/j.1600-0897.2009.00698.x. PMID:19298390.

- [120] Alonso L, Laganà AS, Ghezzi F, Casarin J, Carugno J. Chronic endometritis: old problem, novel insights and future challenges. *Int J Fertil Steril*. 2020 Apr;13(4):250-6. doi:10.22074/ijfs.2020.5779. PMID:32373391; PMCID:PMC7197792.
- [121] Kitaya K, Yasuo T. Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis. *Mod Pathol*. 2010 Sep;23(9):1136-46. doi:10.1038/modpathol.2010.98. PMID:20512151.
- [122] Tada Y, Hayashi T, Taguchi S, Funabiki M, Nakamura Y. Comprehensive endometrial immunoglobulin subclass analysis in infertile women suffering from repeated implantation failure with or without chronic endometritis. *Am J Reprod Immunol*. 2014 Oct;72(4):386-91. doi:10.1111/aji.12270. PMID:24894916.
- [123] Cicinelli E, Guglielmino MR, Ragusa M, Farina M, Palumbo MA, Cianci A, et al. Altered transcriptional regulation of cytokines, growth factors, and apoptotic proteins in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. *Am J Reprod Immunol*. 2013 May;69(5):509-17. doi:10.1111/aji.12079. PMID:23398048.
- [124] White F, Allard C, James K, Majid S, Aguet F, Ardlie KG, et al. Placental IGFBP1 levels during early pregnancy and the risk of insulin resistance and gestational diabetes. *Nat Med*. 2024 Oct;30(10):1689-95. doi:10.1038/s41591-024-02936-5. PMID:37813301.
- [125] Manzan Martins C, Cresti L, Romagnoli R, Paulesu L, Ietta F, Ermini L, et al. Lysosome dynamics during human endometrial stromal cells decidualization: effect of para-nonylphenol. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2024 Jul;327(1):C113-21. doi:10.1152/ajpcell.00604.2023. PMID:38831810.
- [126] White CA, Serrat MA. Dysregulation of insulin-like growth factor-1 signaling in postnatal bone elongation. *Biochem Cell Biol*. 2023 Aug;101(4):388-93. doi:10.1139/bcb-2023-0025. PMID:37410040.
- [127] Gao M, Yao Y, Shen H, Li H, Sun J, Wang L, et al. Enhancing endometrial receptivity: the roles of human chorionic gonadotropin in autophagy and apoptosis regulation in endometrial stromal cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2024 Apr;22(1):37. doi:10.1186/s12958-024-01205-x. PMID:38720957; PMCID:PMC11157312.
- [128] Robb L, Liu YX, Enders AC, Martin H, Stoikos C, Wallace E, et al. IL-11 and IL-11R α immunolocalisation at primate implantation sites supports a role for IL-11 in placentation and

fetal development. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 May;1:34. doi:10.1186/1477-7827-1-34. PMID:12801407; PMCID:PMC156648.

[129] Vitagliano A, Andrisani A, Santarsiero CM, Cicinelli R, Nardelli C, Ambrosini G, et al. Chronic endometritis and altered embryo implantation: a unified pathophysiological theory from a literature systematic review. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Dec;37(12):2897-911. doi:10.1007/s10815-020-01955-8. PMID:33145663; PMCID:PMC7706429.

[130] Yamada H, Shimada S, Fukushi Y, Wada S. Chronic endometritis and uterine endometrium microbiota in recurrent implantation failure and recurrent pregnancy loss. *Biomedicines*. 2023 Sep;11(9):2391. doi:10.3390/biomedicines11092391. PMID:37759386; PMCID:PMC10535788.

[131] Matsubayashi H, Takaya Y, Nishiyama R, Yamaguchi K, Takeuchi T, Ishikawa T, et al. Live birth rate following oral antibiotic treatment for chronic endometritis in infertile women with repeated implantation failure. *Am J Reprod Immunol*. 2017 Oct;78(4):e12719. doi:10.1111/aji.12719. PMID:28782865.

[132] Liu Q, Wang X, Li T, Li H, Li G, Tan L, et al. Deciphering the role of female reproductive tract microbiome in reproductive health: a review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14:1351540. doi:10.3389/fcimb.2024.1351540. PMID:38989742; PMCID:PMC11287630.

[133] Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, Alonso R, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Dec;215(6):684-703. doi:10.1016/j.ajog.2016.09.075. PMID:27640941.

[134] Mangogna A, Bossi F, Ricci G, Kishore U, Bulla R. Uterine immunity and microbiota: a shifting paradigm. *Front Immunol*. 2019 Nov;10:2387. doi:10.3389/fimmu.2019.02387. PMID:31787965; PMCID:PMC6874798.

[135] Wu Y, Tang HL, Wang Y, Li B, He YY, Yan GJ, et al. Embryo-derived cathepsin B promotes implantation and decidualization by activating pyroptosis. *Adv Sci (Weinh)*. 2024 May;11(13):e2402299. doi:10.1002/advs.202402299. PMID:38797213; PMCID:PMC11242272.

- [136] Shi JW, Wang L, Li MQ. NK cells: shielding senescence homeostasis in the decidua during early pregnancy. *Semin Immunopathol.* 2025 Jan;47(1-2):22. doi:10.1007/s00281-025-01048-7. PMID:39831607.
- [137] Deryabin PI, Borodkina AV. Stromal cell senescence contributes to impaired endometrial decidualization and defective interaction with trophoblast cells. *Hum Reprod.* 2022 Jun;37(6):1505-24. doi:10.1093/humrep/deac112. PMID:35583083.
- [138] Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol.* 2018 Jun;17(3):220-7. doi:10.1002/rmb2.12088. PMID:29977536; PMCID:PMC6011144.
- [139] Vinketova K, Mourdjeva M, Oreshkova T. Human decidual stromal cells as a component of the implantation niche and a modulator of maternal immunity. *J Pregnancy.* 2016;2016:8689436. doi:10.1155/2016/8689436. PMID:27239344; PMCID:PMC4879019.
- [140] Di Simone N, Campagnolo L, Fazleabas A. Clinical consequences of defective decidualization. *Tissue Cell.* 2021 Nov;72:101586. doi:10.1016/j.tice.2021.101586. PMID:34592423.
- [141] Kimura F, Zheng L, Ishida M, Niwa Y, Hirata K, Takebayashi A, et al. Chronic endometritis modifies decidualization in human endometrial stromal cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017 Feb;15(1):16. doi:10.1186/s12958-017-0233-x. PMID:28193154; PMCID:PMC5307809.
- [142] Matsubayashi H, Yamaguchi K, Nishiyama R, Takaya Y, Ishikawa T, Yasuo T, et al. Chronic endometritis: potential cause of infertility and obstetric and neonatal complications. *Am J Reprod Immunol.* 2016 Jan;75(1):13-22. doi:10.1111/aji.12443. PMID:26663527.
- [143] Takebayashi A, Ishida M, Nakamura A, Kitazawa J, Morimune A, Hirata K, et al. Chronic endometritis and its effect on reproduction. *J Obstet Gynaecol Res.* 2019 May;45(5):951-60. doi:10.1111/jog.13947. PMID:30834603.
- [144] Matteo M, Tinelli R, Mitola PC, De Ziegler D, Cicinelli E. Altered uterine contractility in women with chronic endometritis. *Fertil Steril.* 2015 Apr;103(4):1049-52. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.01.007. PMID:25681858.

- [145] Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*. 2012 Dec;367(24):2322-33. doi:10.1056/NEJMr1205750. PMID:23234515; PMCID:PMC3675791.
- [146] Linden JM. Purinergic receptors. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27952/>.
- [147] Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Apr;6(1):162. doi:10.1038/s41392-021-00553-z. PMID:33879462; PMCID:PMC8056346.
- [148] Burnstock G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv*. 2018 Dec;2:2398212818817494. doi:10.1177/2398212818817494. PMID:32166165; PMCID:PMC7058212.
- [149] Sluyter R. Purinergic signalling in physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun;24(11):9196. doi:10.3390/ijms24119196. PMID:37372400; PMCID:PMC10301354.
- [150] Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*. 2017 Jul;47(1):15-31. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.020. PMID:28723549.
- [151] Di Virgilio F, Jiang LH, Roger S, Falzoni S, Sarti AC, Vultaggio-Poma V, et al. Structure, function and techniques of investigation of the P2X7 receptor (P2X7R) in mammalian cells. *Methods Enzymol*. 2019;629:115-50. doi:10.1016/bs.mie.2019.07.043. PMID:31537461.
- [152] Sluyter R. The P2X7 receptor. In: Atassi MZ, editor. *Protein Reviews. Adv Exp Med Biol*. 2017;1051:59-100. doi:10.1007/5584_2017_59. PMID:28815416.
- [153] Martínez-Cuesta MA, Blanch-Ruiz MA, Ortega-Luna R, Sánchez-López A, Álvarez Á. Structural and functional basis for understanding the biological significance of P2X7 receptor. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov;21(22):8454. doi:10.3390/ijms21228454. PMID:33182829; PMCID:PMC7696479.
- [154] Jiang LH, Caseley EA, Muench SP, Roger S. Structural basis for the functional properties of the P2X7 receptor for extracellular ATP. *Purinergic Signal*. 2021 Sep;17(3):331-44. doi:10.1007/s11302-021-09790-x. PMID:33987781; PMCID:PMC8410900.

- [155] Hattori M, Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*. 2012 May;485(7397):207-12. doi:10.1038/nature11010. PMID:22535247; PMCID:PMC3367321.
- [156] Cai X, Yao Y, Teng F, Li Y, Wu L, Yan W, et al. The role of P2X7 receptor in infection and metabolism: based on inflammation and immunity. *Int Immunopharmacol*. 2021 Nov;101(Pt A):108297. doi:10.1016/j.intimp.2021.108297. PMID:34325191.
- [157] Alves LA, Bezerra RJ, Faria RX, Ferreira LGB, Da Silva Frutuoso V. Physiological roles and potential therapeutic applications of the P2X7 receptor in inflammation and pain. *Molecules*. 2013 Sep;18(9):10953-72. doi:10.3390/molecules180910953. PMID:23999585; PMCID:PMC6268576.
- [158] Cevoli F, Arnould B, Peralta FA, Grutter T. Untangling macropore formation and current facilitation in P2X7. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul;24(13):10896. doi:10.3390/ijms241310896. PMID:37446655; PMCID:PMC10354846.
- [159] Golia MT, Gabrielli M, Verderio C. P2X7 receptor and extracellular vesicle release. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun;24(12):9805. doi:10.3390/ijms24129805. PMID:37371501; PMCID:PMC10305191.
- [160] Rotondo JC, Mazziotta C, Lanzillotti C, Stefani C, Badiale G, Campione G, et al. The role of purinergic P2X7 receptor in inflammation and cancer: novel molecular insights and clinical applications. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar;14(5):1116. doi:10.3390/cancers14051116. PMID:35267424; PMCID:PMC8909580.
- [161] Savio LEB, de Andrade Mello P, da Silva CG, Coutinho-Silva R. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: angel or demon? *Front Pharmacol*. 2018 Jan;9:52. doi:10.3389/fphar.2018.00052. PMID:29467669; PMCID:PMC5815792.
- [162] Burnstock G. Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. *Purinergic Signal*. 2014 Mar;10(1):157-87. doi:10.1007/s11302-013-9399-7. PMID:24271059; PMCID:PMC3944042.
- [163] Semenova S, Shatrova A, Vassilieva I, Shamatova M, Pugovkina N, Negulyaev Y. Adenosine-5'-triphosphate suppresses proliferation and migration capacity of human endometrial stem cells. *J Cell Mol Med*. 2020 Apr;24(8):4580-8. doi:10.1111/jcmm.15115. PMID:32150662; PMCID:PMC7176887.

- [164] Koshi R, Coutinho-Silva R, Cascabulho CM, Henrique-Pons A, Knight GE, Loesch A, et al. Presence of the P2X7 purinergic receptor on immune cells that invade the rat endometrium during oestrus. *J Reprod Immunol*. 2005 Oct;66(2):127-40. doi:10.1016/j.jri.2005.04.006. PMID:15916859.
- [165] Zhou L, Cai E, Liu H, Cheng H, Ye X, Zhu H, et al. Extracellular ATP inhibits the progression of endometriosis and enhances the immune function of macrophages. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2024 Jan;1870(1):166895. doi:10.1016/j.bbadis.2023.166895. PMID:37827468.
- [166] Trapero C, Martín-Satué M. Purinergic signaling in endometriosis-associated pain. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov;21(22):8512. doi:10.3390/ijms21228512. PMID:33198179; PMCID:PMC7697899.
- [167] Trapero C, Vidal A, Rodríguez-Martínez A, Sévigny J, Ponce J, Coroleu B, et al. The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: a novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells. *Purinergic Signal*. 2019 Jun;15(2):225-36. doi:10.1007/s11302-019-09656-3. PMID:31123897; PMCID:PMC6657408.
- [168] Menze ET, Ezzat H, Shawky S, Sami M, Selim EH, Ahmed S, et al. Simvastatin mitigates depressive-like behavior in ovariectomized rats: possible role of NLRP3 inflammasome and estrogen receptors' modulation. *Int Immunopharmacol*. 2021 Apr;95:107582. doi:10.1016/j.intimp.2021.107582. PMID:33588174.
- [169] Li X, Qi X, Zhou L, Fu W, Abdul-Karim FW, MacLennan G, et al. P2X7 receptor expression is decreased in epithelial cancer cells of ectodermal, urogenital sinus, and distal paramesonephric duct origin. *Purinergic Signal*. 2009 Sep;5(3):351-68. doi:10.1007/s11302-009-9161-3. PMID:19399640; PMCID:PMC2717318.
- [170] Li X, Qi X, Zhou L, Catera D, Rote NS, Potashkin J, et al. Decreased expression of P2X7 in endometrial epithelial pre-cancerous and cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2007 Jul;106(1):233-43. doi:10.1016/j.ygyno.2007.03.032. PMID:17482244; PMCID:PMC2398694.
- [171] Li X, Zhou L, Feng YH, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI. The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Oct;15(10):1906-13. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0407. PMID:17035398; PMCID:PMC2376759.

- [172] Yuan C, Liu L, Zhao Y, Wang K. Puerarin inhibits *Staphylococcus aureus*-induced endometritis through attenuating inflammation and ferroptosis via regulating the P2X7/NLRP3 signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 2024 Jul;28(14):e18550. doi:10.1111/jcmm.18550. PMID:39042561; PMCID:PMC11265464.
- [173] Yang C, Lei L, Collins JWM, Briones M, Ma L, Sturdevant GL, et al. Chlamydia evasion of neutrophil host defense results in NLRP3 dependent myeloid-mediated sterile inflammation through the purinergic P2X7 receptor. *Nat Commun*. 2021 Sep;12(1):5454. doi:10.1038/s41467-021-25749-3. PMID:34526512; PMCID:PMC8443728.
- [174] Zeitvogel A, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model. *Am J Pathol*. 2001 Nov;159(5):1839-52. doi:10.1016/S0002-9440(10)63030-1. PMID:11696434; PMCID:PMC1891727.
- [175] Nishida M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell*. 2002 Sep;15(3):104-17. doi:10.1111/j.1749-0774.2002.tb00105.x. PMID:12416547.
- [176] Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*. 1996 May;272(5262):735-8. doi:10.1126/science.272.5262.735. PMID:8614837.
- [177] Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*. 2006 Apr;176(7):3877-83. doi:10.4049/jimmunol.176.7.3877. PMID:16547218.
- [178] Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, et al. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res*. 2012 Jun;72(12):2957-69. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1947. PMID:22564798.
- [179] Ollà I, Santos-Galindo M, Elorza A, Lucas JJ. P2X7 receptor upregulation in Huntington's disease brains. *Front Mol Neurosci*. 2020 Oct;13:567430. doi:10.3389/fnmol.2020.567430. PMID:33122998; PMCID:PMC7573237.
- [180] Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, et al. A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem*. 2009 Sep;284(38):25813-22. doi:10.1074/jbc.M109.033134. PMID:19546214; PMCID:PMC2757983.

- [181] Penolazzi L, Notarangelo MP, Lambertini E, Vultaggio-Poma V, Tarantini M, Di Virgilio F, et al. Unorthodox localization of P2X7 receptor in subcellular compartments of skeletal system cells. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Apr;11:1180774. doi:10.3389/fcell.2023.1180774. PMID:37214913; PMCID:PMC10194725.
- [182] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015 Jan;347(6220):1260419. doi:10.1126/science.1260419. PMID:25613900.
- [183] Feng YH, Li X, Wang L, Zhou L, Gorodeski GI. A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem.* 2006 Jun;281(25):17228-37. doi:10.1074/jbc.M602999200. PMID:16624800; PMCID:PMC2409001.
- [184] Pegoraro A, De Marchi E, Adinolfi E. P2X7 variants in oncogenesis. *Cells.* 2021 Jan;10(1):189. doi:10.3390/cells10010189. PMID:33477845; PMCID:PMC7832898.
- [185] Yan Z, Khadra A, Sherman A, Stojilkovic SS. Calcium-dependent block of P2X7 receptor channel function is allosteric. *J Gen Physiol.* 2011 Oct;138(4):437-52. doi:10.1085/jgp.201110647. PMID:21911484; PMCID:PMC3182445.
- [186] Liang X, Samways DS, Wolf K, Bowles EA, Richards JP, Bruno J, et al. Quantifying Ca²⁺ current and permeability in ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem.* 2015 Mar;290(12):7930-42. doi:10.1074/jbc.M114.627810. PMID:25645917; PMCID:PMC4367291.
- [187] Michel AD, Kaur R, Chessell IP, Humphrey PP. Antagonist effects on human P2X7 receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br J Pharmacol.* 2000 Jun;130(3):513-20. doi:10.1038/sj.bjp.0703368. PMID:10821778; PMCID:PMC1572117.
- [188] Faria RX, Reis RA, Ferreira LG, Cezar-de-Mello PF, Moraes MO. P2X7R large pore is partially blocked by pore-forming protein antagonists in astrocytes. *J Bioenerg Biomembr.* 2016 Jun;48(3):309-24. doi:10.1007/s10863-016-9649-9. PMID:26830892.
- [189] Di Virgilio F, Schmalzing G, Markwardt F. The elusive P2X7 macropore. *Trends Cell Biol.* 2018 May;28(5):392-404. doi:10.1016/j.tcb.2018.01.005. PMID:29439897.

- [190] Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*. 2006 Nov;25(21):5071-82. doi:10.1038/sj.emboj.7601378. PMID:17036048; PMCID:PMC1630421.
- [191] Alberto AV, Faria RX, Couto CG, Ferreira LG, Souza CA, Teixeira PC, et al. Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2013 Sep;386(9):775-87. doi:10.1007/s00210-013-0868-x. PMID:23657251.
- [192] Liang L, Schwiebert EM. Large pore formation uniquely associated with P2X7 purinergic receptor channels. Focus on "Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Feb;288(2):C240-2. doi:10.1152/ajpcell.00532.2004. PMID:15643049.
- [193] Lara R, Adinolfi E, Harwood CA, Philpott M, Barden JA, Di Virgilio F, et al. P2X7 in cancer: from molecular mechanisms to therapeutics. *Front Pharmacol*. 2020 Jun;11:793. doi:10.3389/fphar.2020.00793. PMID:32581783; PMCID:PMC7306022.
- [194] Zhou L, Cai E, Liu H, Cheng H, Ye X, Zhu H, et al. Extracellular ATP inhibits the progression of endometriosis and enhances the immune function of macrophages. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2024 Jan;1870(1):166895. doi:10.1016/j.bbadis.2023.166895. PMID:37827468.
- [195] Semenova S, Shatrova A, Vassilieva I, Shamatova M, Pugovkina N, Negulyaev Y. Adenosine-5'-triphosphate suppresses proliferation and migration capacity of human endometrial stem cells. *J Cell Mol Med*. 2020 Apr;24(8):4580-8. doi:10.1111/jcmm.15115. PMID:32150662; PMCID:PMC7176887.
- [196] Ji Z, Xie Y, Guan Y, Zhang Y, Cho KS, Ji M, et al. Involvement of P2X7 receptor in proliferation and migration of human glioma cells. *Biomed Res Int*. 2018 Jan;2018:8591397. doi:10.1155/2018/8591397. PMID:29546069; PMCID:PMC5818963.
- [197] Yang X, Ji Y, Mei L, Jing W, Yang X, Liu Q. Potential role of the P2X7 receptor in the proliferation of human diffuse large B-cell lymphoma. *Purinergic Signal*. 2024 Sep;20(3):273-84. doi:10.1007/s11302-023-09947-w. PMID:37222921; PMCID:PMC11189370.
- [198] Zhang GP, Liao JX, Liu YY, Zhu FQ, Huang HJ, Zhang WJ. Ion channel P2X7 receptor in the progression of cancer. *Front Oncol*. 2024 Dec;13:1297775. doi:10.3389/fonc.2023.1297775. PMID:38198336; PMCID:PMC10884464.

- [199] Tabibzadeh S, Sun XZ. Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod.* 1992 Sep;7(9):1214-21. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137829. PMID:1281375.
- [200] Laird SM, Tuckerman EM, Li TC. Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online.* 2006 Jul;13(1):13-23. doi:10.1016/s1472-6483(10)62011-1. PMID:16820108.
- [201] Luckow Invitti A, Schor E, Martins Parreira R, Kopelman A, Kamergorodsky G, Gonçalves GA, et al. Inflammatory cytokine profile of co-cultivated primary cells from the endometrium of women with and without endometriosis. *Mol Med Rep.* 2018 Aug;18(2):1287-96. doi:10.3892/mmr.2018.9137. PMID:29845254.
- [202] Björk E, Vinnars MT, Nagaev I, Nagaeva O, Lundin E, Ottander U, et al. Enhanced local and systemic inflammatory cytokine mRNA expression in women with endometriosis evokes compensatory adaptive regulatory mRNA response that mediates immune suppression and impairs cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol.* 2020 Oct;84(4):e13298. doi:10.1111/aji.13298. PMID:32677021.
- [203] Zakrzewski PK. Canonical TGF β signaling and its contribution to endometrial cancer development and progression—underestimated target of anticancer strategies. *J Clin Med.* 2021 Aug;10(17):3900. doi:10.3390/jcm10173900. PMID:34501944; PMCID:PMC8430890.
- [204] Azadehrah M, Vosoogh S, Azadehrah M. The roles and therapeutic applications of cytokines in endometrial cancer. *J Reprod Immunol.* 2022 Dec;152:103652. doi:10.1016/j.jri.2022.103652. PMID:36334913.
- [205] Smith HO, Stephens ND, Qualls CR, Fligelman T, Wang T, Lin CY, et al. The clinical significance of inflammatory cytokines in primary cell culture in endometrial carcinoma. *Mol Oncol.* 2013 Feb;7(1):41-54. doi:10.1016/j.molonc.2012.07.002. PMID:22944067; PMCID:PMC3790272.
- [206] Humphreys BD, Dubyak GR. Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J Leukoc Biol.* 1998 Aug;64(2):265-73. doi:10.1002/jlb.64.2.265. PMID:9715263.
- [207] Zou J, Vetreno RP, Crews FT. ATP-P2X7 receptor signaling controls basal and TNF α -stimulated glial cell proliferation. *Glia.* 2012 Apr;60(4):661-73. doi:10.1002/glia.22302. PMID:22298391; PMCID:PMC3276752.

- [208] Gadeock S, Tran JN, Georgiou JG, Jalilian I, Taylor RM, Wiley JS, et al. TGF- β 1 prevents up-regulation of the P2X7 receptor by IFN- γ and LPS in leukemic THP-1 monocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Nov;1798(11):2058-66. doi:10.1016/j.bbame.2010.07.022. PMID:20696258.
- [209] Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*. 2006 Apr;176(7):3877-83. doi:10.4049/jimmunol.176.7.3877. PMID:16547218.
- [210] Amini M, Frisch J, Jost P, Sarakpi T, Selejan SR, Becker E, et al. Purinergic receptor P2X7 regulates interleukin-1 α mediated inflammation in chronic kidney disease in a reactive oxygen species-dependent manner. *Kidney Int*. 2025 Mar;107(3):457-75. doi:10.1016/j.kint.2024.10.024. PMID:39392534.
- [211] Miguel V. Mitochondrial ROS connects P2X7-mediated Ca²⁺ influx with IL-1 α release by monocytes upon chronic tissue damage. *Kidney Int*. 2025 Mar;107(3):389-91. doi:10.1016/j.kint.2024.12.002. PMID:39392531.
- [212] Barberà-Cremades M, Gómez AI, Baroja-Mazo A, Martínez-Alarcón L, Martínez CM, de Torre-Mingueta C, et al. P2X7 receptor induces tumor necrosis factor- α converting enzyme activation and release to boost TNF- α production. *Front Immunol*. 2017 Jul;8:862. doi:10.3389/fimmu.2017.00862. PMID:28791020; PMCID:PMC5523084.
- [213] Lis-López L, Bauset C, Seco-Cervera M, Macias-Ceja D, Navarro F, Álvarez Á, et al. P2X7 receptor regulates collagen expression in human intestinal fibroblasts: relevance in intestinal fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug;24(16):12936. doi:10.3390/ijms241612936. PMID:37568914; PMCID:PMC10415972.
- [214] Mounieb F, Abdel-Sattar SA, Balah A, Shafik NM, Gomaa R, Elshazly SM, et al. P2X7 receptor is a critical regulator of extracellular ATP-induced profibrotic gene expression in rat kidney: implication of transforming growth factor- β /Smad signaling pathway. *Purinergic Signal*. 2024 Dec;20(4):421-30. doi:10.1007/s11302-023-09977-4. PMID:37942771; PMCID:PMC10628717.
- [215] Wang CM, Chang YY, Sun SH. Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF- β 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell Signal*. 2003 Dec;15(12):1129-37. doi:10.1016/s0898-6568(03)00112-8. PMID:14575867.

- [216] Hiken JF, Steinberg TH. ATP downregulates P2X7 and inhibits osteoclast formation in RAW cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Aug;287(2):C403-12. doi:10.1152/ajpcell.00361.2003. PMID:15084614.
- [217] Feng YH, Wang L, Wang Q, Li X, Zeng R, Gorodeski GI. ATP stimulates GRK-3 phosphorylation and β -arrestin-2-dependent internalization of P2X7 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Jun;288(6):C1342-56. doi:10.1152/ajpcell.00315.2004. PMID:15689421.
- [218] Young CN, Chira N, Róg J, Al-Khalidi R, Benard M, Galas L, et al. Sustained activation of P2X7 induces MMP-2-evoked cleavage and functional purinoceptor inhibition. *J Mol Cell Biol*. 2018 Jun;10(3):229-42. doi:10.1093/jmcb/mjy016. PMID:29893916.
- [219] Wu X, Ren J, Chen G, Li L, Ma H, Han Y, et al. Systemic blockade of P2X7 receptor protects against sepsis-induced intestinal barrier disruption. *Sci Rep*. 2017 Jun;7:4364. doi:10.1038/s41598-017-04231-5. PMID:28615669; PMCID:PMC5471050.
- [220] Wu X, Wang Y, Wang S, Xu R, Lv X. Purinergic P2X7 receptor mediates acetaldehyde-induced hepatic stellate cells activation via PKC-dependent GSK3 β pathway. *Int Immunopharmacol*. 2017 Aug;43:164-71. doi:10.1016/j.intimp.2016.12.014. PMID:28042921.
- [221] Janho dit Hreich S, Juhel T, Hofman P, Fasseu M, Assou S, Djerada Z, et al. Protocol for evaluating in vivo the activation of the P2RX7 immunomodulator. *Biol Proced Online*. 2023 Jan;25(1):1. doi:10.1186/s12575-022-00188-6. PMID:36640022; PMCID:PMC9834067.