

mgr Marta Soszyńska

**Ekspresja receptora P2X7 w pierwotnych liniach ludzkich
melanocytów i komórkach czerniaka**

**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

Zakład Histologii i Embriologii



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2025 r.

Słowa kluczowe: P2X7 skóra melanocyty czerniak

Keywords: P2X7 skin melanocytes melanoma

Praca była częściowo finansowana w ramach projektu 523/2017/DA MON realizowanego w ramach programu Kościuszko II (2018-2020).

Tytuł projektu: **"Genetyczno-proteomiczna analiza receptora purynergicznego P2X7 w warunkach fizjologicznych i patologicznych"**

Kierownik projektu: Prof. dr hab. Dariusz Górecki

Pragnę złożyć podziękowania wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy doktorskiej.

Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do promotora prof. dr hab. Jacka Malejczyka oraz promotor pomocniczej Anety Ścieżyńskiej za okazaną pomoc w realizacji badań, cenne wskazówki merytoryczne i poświęcony czas.

Składam też serdeczne podziękowania dla wszystkich osób, które wniosły wkład w pozyskanie wyników przedstawionych w niniejszej pracy, w szczególności Michałowi Komorowskiemu za nieocenioną pomoc w realizacji badań i wspólną pracę, oraz prof. dr hab. Dariuszowi Góreckiemu, prof. dr hab. Krzysztofowi Zabłockiemu i Justynie Róg za możliwość realizacji analiz i merytoryczną pomoc.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Centrum Badań Przedklinicznych WUM za życzliwość i wspólne budowanie przyjaznej atmosfery w pracy.

Z głębi serca dziękuję również moim Bliskim, w szczególności mojemu partnerowi życiowemu Piotrowi, Rodzicom i Przyjaciółom za cierpliwość, wyrozumiałość i nieustające wsparcie.

Spis treści

Spis rycin	9
Spis tabel	11
Wykaz stosowanych skrótów	12
Streszczenie	14
Abstract	16
1. Wstęp	18
1.1. Budowa skóry	18
1.2. Sygnalizacja purynergiczna i receptory purynergiczne	20
1.2.1. Receptory purynergiczne P1	21
1.2.2. Receptory purynergiczne P2Y	22
1.2.3. Receptory purynergiczne P2X	23
1.3. Receptor P2X7	24
1.3.1. Lokalizacja genu receptora P2X7, warianty jego składowania i polimorfizmy	25
1.3.2. Budowa białka receptora P2X7	27
1.3.3. Aktywacja receptora P2X7	29
1.3.4. Zahamowanie aktywności receptora P2X7	30
1.4. Rola P2X7 w skórze	32
1.4.1. Fibroblasty	33
1.4.2. Keratynocyty	34
1.4.3. Melanocyty	35
1.4.4. Komórki układu odpornościowego	36
2. Materiały i metody	38
2.1. Hodowla komórkowa	38
2.1.1. Hodowla linii komórkowych czerniaka ludzkiego	38
2.1.2. Izolacja metodą eksplantów pierwotnych komórek skóry ludzkiej i komórek czerniaka i ich hodowla	38
2.1.3. Pierwotne komórki skóry ludzkiej	39
2.1.4. Pierwotne komórki czerniaka ludzkiego	41
2.2. Ocena proliferacji i żywotności komórek	42
2.3. Immunofluorescencja	42
2.4. Izolacja RNA i analiza ekspresji genów (qRT-PCR i TaqMan™ Array, Human Cytokine Network)	43
2.5. Western blot	46
2.5.1. Przygotowanie lizatów białkowych z pierwotnych komórek wyizolowanych ze skóry ludzkiej, linii komórkowych oraz preparatów tkankowych	46

2.5.2.	Oznaczenie stężenia białka w lizatach komórkowych	47
2.5.3.	Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym i Western Blotting	47
2.6.	Oznaczanie poziomu wapnia	48
3.	Założenie i cel pracy	50
4.	Wyniki.....	51
4.1.	Analiza lokalizacji receptora P2X7 w skórze ludzkiej	51
4.2.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>P2X7</i> w wyizolowanych komórkach ludzkiej skóry na poziomie mRNA	52
4.3.	Analiza ilości białka P2X7 w wyizolowanych komórkach skóry ludzkiej.....	53
4.4.	Analiza lokalizacji komórkowej receptora P2X7 w pierwotnych ludzkich melanocytach, keratynocytach i fibroblastach	54
4.5.	Analiza funkcjonalności receptora P2X7 w pierwotnych ludzkich melanocytach.....	55
4.6.	Wpływ aktywacji receptora P2X7 na tempo proliferacji ludzkich pierwotnych melanocytów	56
4.7.	Porównanie poziomu ekspresji genu <i>P2RX7</i> w pierwotnych ludzkich melanocytach pod wpływem jego aktywacji	58
4.8.	Wpływ aktywacji receptora P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach na ekspresję cytokin prozapalnych	59
4.9.	Porównanie ekspresji genu P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach i komórkach czerniaka	60
4.10.	Analiza funkcjonalności receptora P2X7 w komórkach czerniaka ludzkiego.....	63
4.11.	Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji komórek czerniaka	66
5.	Dyskusja.....	69
6.	Podsumowanie wyników i wnioski.....	80
	Referencje	81
	Opinie Komisji Bioetycznej	89

Spis rycin

Rycina 1. Schemat budowy skóry

Rycina 2. Schematyczne przedstawienie sygnalizacji purynergicznej w komórce

Rycina 3 Graficzne przedstawienie stanów aktywacji receptora P2X7

Rycina 4 Graficzne przedstawienie wybranych wariantów alternatywnego składania genu receptora P2X7

Rycina 5 Przedstawienie struktury drugorzędowej monomeru P2X7R z pięcioma domenami: zewnątrzkomórkową, dwiema transbłonowymi (TM1 i TM2), wewnątrzkomórkowym N-końcem oraz wewnątrzkomórkowym C-końcem

Rycina 6 Zdjęcie eksplantu skóry ludzkiej wraz z migrującymi komórkami

Rycina 7 Zdjęcie hodowli komórek skóry ludzkiej zebranych z eksplantów przed wykonaniem seryjnej trypsynizacji różnicującej melanocyty i keratynocyty

Rycina 8 Zdjęcia komórek skóry ludzkiej wyizolowanych metodą eksplantów

Rycina 9 Zdjęcia przykładowych wyizolowanych z węzła chłonnego pierwotnych linii komórkowych czerniaka ludzkiego

Rycina 10 Immunofluorescencyjna analiza ekspresji i lokalizacji receptora P2X7 w preparatach skóry ludzkiej.

Rycina 11 Porównanie względnej ekspresji *P2RX7* mRNA w pierwotnych komórkach skóry ludzkiej: keratynocytach (n=5), fibroblastach (n=6) i melanocytach (n=5).

Rycina 12 Porównanie poziomu białka receptora P2X7 w komórkach wyizolowanych ze skóry ludzkiej: melanocytach, keratynocytach i fibroblastach

Rycina 13 Immunofluorescencyjna analiza ekspresji i lokalizacja receptora P2X7 w komórkach skóry ludzkiej: keratynocytach (A), melanocytach (B), fibroblastach (C)

Rycina 14 Analiza funkcjonalności receptora P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach

Rycina 15 Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji i żywotność pierwotnych

Rycina 16 Porównanie względnej ekspresji *P2RX7* mRNA w ludzkich pierwotnych melanocytach pod wpływem aktywacji i zahamowania funkcji receptora

Rycina 17 Porównanie względnej ekspresji genów cytokin należących do grupy cytokin prozapalnych w melanocytach wyizolowanych ze zdrowej skóry ludzkiej pod wpływem aktywacji i zahamowania funkcji receptora P2X7.

Rycina 18 Porównanie względnej ekspresji genu P2X7 w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego i melanocytach wyizolowanych ze zdrowej skóry ludzkiej

Rycina 19 Porównanie poziomu białka receptora P2X7 w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego oraz pierwotnych melanocytach wyizolowanych ze zdrowej skóry ludzkiej

Rycina 20 Analiza funkcjonalności receptora P2X7 badana na podstawie napływu jonów wapnia do wnętrza komórki w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego po stymulacji receptora P2X7 z użyciem BzATP

Rycina 21 Analiza funkcjonalności receptora P2X7 w ustalonych liniach komórkowych czerniaka ludzkiego, A375 i MeWO

Rycina 22 Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji i żywotność komórek czerniaka linii MeWO

Rycina 23 Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji i żywotność komórek czerniaka linii MM16

Rycina 24. Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji i żywotność komórek czerniaka linii MM9

Spis tabel

Tabela 1 Porównanie efektywności inhibitorów receptora P2X7 z uwzględnieniem różnic pomiędzy gatunkami

Tabela 2 Zestawienie badań klinicznych i przedklinicznych z wykorzystaniem inhibitorów receptora P2X7 oraz ich sugerowanym wskazaniem

Tabela 3 Przeciwciała pierwszorzędowe użyte w barwieniu immunofluorescencyjnym

Tabela 4 Pochodzenie ludzkich pierwotnych melanocytów oraz komórek linii komórkowych czerniaka wykorzystanych w analizie qRT-PCR

Tabela 5 Przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe wykorzystane w metodzie Western blot

Wykaz stosowanych skrótów

AC - cyklaza adenylowa (*ang. adenylate cyclase*)

ADP - adenozy-no-5'-difosforan

AMP - adenozy-no-5'-monofosforan

ATP - adenozy-no-5'-trifosforan

ATP γ S - adenozy-no 5-(γ -tio) trójfosforan

BBG - błękit brylatnowy (*ang. Brilliant Blue G*)

BCA - kwas bis-cynchoninowy (*ang. bicinchoninic acid*)

RAGE - receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji (*ang. receptor for advanced glycation endproducts*)

BSA - albumina z surowicy bydłowej (*ang. bovine serum albumin*)

BzATP - 2',3'-O-(4-benzoylo-benzoyl)adenozy-no 5'-trójfosforan

cAMP - cykliczny adenozy-no-3',5'-monofosforan (*ang. cyclic adenosine monophosphate*)

DAMP - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (*ang. damage-associated molecular pattern*)

DMEM - pożywka hodowlana (*ang. Dulbecco's modified eagle medium*)

EDTA - kwas wersenowy (*ang. ethylenediaminetetraacetic acid*)

EMU – naskórkowa jednostka melaninowa (*ang. epidermal melanin unit*)

FBS - surowica płodowa bydłowa (*ang. fetal bovine serum*)

GPCR – receptory sprzężonymi z białkiem G (*ang. G-protein-coupled receptors*)

HMGB1 – *ang. high-mobility group box 1*

HRP - peroksydaza chrzanowa (*ang. horseradish peroxidase*)

IFN- γ - interferon- γ

IP₃ - 1,4,5-trisfosforan inozytolu

LPS - lipopolisacharyd

LTA - limfotoksyna

MMP-2 metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (*ang. matrix metalloproteinase-2*)

oATP - nadjodan ATP (*ang. oxidized ATP*)

Panx1 – paneksyna 1

PBS - sól fizjologiczna buforowana fosforanami (*ang. phosphate buffer saline*)

PLC β - fosfolipaza C (*ang. phospholipase C*)

PPADS - 6-azofenilo-2',4'-disulfonowy fosforan pirydoksalu

qRT-PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą (*ang. reverse transcription polymerase chain reaction*)

SDS - siarczan dodecyłu sodu (*ang. sodium dodecyl sulphate*)

TBST - sól fizjologiczna buforowana Tris z detergentem Triton X-100 (*ang. Tris buffer saline with Triton X-100*)

UVA / UVB - promieniowanie ultrafioletowe A/B (*ang. ultraviolet A/B radiation*)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej (*ang. vascular endothelial growth factor*)

α -SMA – białko aktyny (*ang. alpha smooth muscle actin*)

Streszczenie

Sygnalizacja purynergiczna obejmuje złożoną sieć receptorów obecnych na powierzchni niemal wszystkich komórek organizmu i odgrywa znaczącą rolę w wielu szlakach sygnałowych, regulując tym samym odpowiedzi komórkowe zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych. Receptor P2X7, ze względu na swoje unikalne cechy, wyróżnia się na tle innych receptorów należących do tej rodziny. Odpowiada on na stymulację ATP, który wydzielany do środowiska zewnętrznego działa jako wzorzec molekularny związany z uszkodzeniem (DAMP). Receptor P2X7 w warunkach fizjologicznych działa jako kanał jonowy, natomiast w warunkach przedłużonej lub zwiększonej stymulacji może tworzyć duży por błonowy i w konsekwencji powodować śmierć komórki. W związku z powyższym, receptor P2X7 jest szeroko badany na całym świecie. Niestety, wyniki, które dostępne są w literaturze przynoszą często niejednoznaczne wnioski, wskazując na jego rolę zarówno w rozwoju stanów patologicznych i chorobowych, jak i protekcyjną rolę receptora w stanie fizjologicznym. Co ciekawe, niewiele dostępnych dotychczas prac naukowych skupia się na funkcji tego receptora w komórkach skóry, czyli największego narządu człowieka odgrywającego istotną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu.

Niniejsza praca miała na celu analizę ekspresji receptora w pierwotnych komórkach skóry ludzkiej, ze szczególnym uwzględnieniem melanocytów oraz komórek czerniaka, obejmującą zarówno linie ustalone jak i pierwotne. Porównanie ekspresji P2X7 w komórkach wyizolowanych ze skóry ludzkiej wykazało, że melanocyty wyróżniały się znacząco wyższą ekspresją tego receptora w porównaniu do keratynocytów i fibroblastów, co może świadczyć o istotnej roli tego receptora w fizjologii tych komórek. Stwierdzono ponadto, że receptor obecny na powierzchni melanocytów, w odpowiedzi na jego stymulację z wykorzystaniem specyficznego agonisty, BzATP, przejawia aktywność kanału jonowego, potwierdzając jego funkcjonalność. Co więcej, aktywacja receptora moduluje ekspresję niektórych cytokin prozapalnych w melanocytach, a jego zwiększona stymulacji wpływa także na zahamowanie tempa proliferacji tych komórek. Może to zatem wskazywać na udział receptora P2X7 w odpowiedzi komórkowej melanocytów. Co więcej, analiza porównawcza ekspresji P2X7 w pierwotnych liniach melanocytów i komórkach czerniaka wykazała, że to komórki czerniaka charakteryzowały się znacząco niższym poziomem ekspresji tego receptora. Obniżony poziom ekspresji receptora P2X7 w komórkach czerniaka powiązany był również z jego znacznie słabszą aktywnością w odpowiedzi na stymulację specyficznym agonistą, BzATP. Choć

mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska w komórkach czerniaka wymaga dalszego wyjaśnienia, można jednak przypuszczać, że obniżona ekspresja receptora P2X7 w komórkach czerniaka może mieć znaczenie w procesie transformacji nowotworowej melanocytów. Dodatkowo, brak lub niezwykle słaba odpowiedź komórek czerniaka na BzATP może wiązać się również z wieloma innymi czynnikami, w tym występowaniem nieaktywnych izoform tego receptora na powierzchni komórek, a także występowaniem w środowisku czynników zmniejszających dostępność agonisty bądź wpływających na zmianę reaktywności receptora. Dlatego też, wątek ten wymaga wciąż dalszych badań. Niemniej jednak, przedstawione wyniki po raz pierwszy opisują porównanie ekspresji receptora P2X7 w komórkach skóry oraz melanocytach i czerniakach, które wskazuje jednoznacznie na zwiększony jego poziom w ludzkich pierwotnych melanocytach.

Abstract

Title of dissertation: P2X7 receptor expression in primary human melanocyte cell lines and melanoma cells.

Purinergic signaling comprises a complex network of cell-surface receptors present in nearly all cell types and plays a key role in diverse signaling pathways, regulating cellular responses under both physiological and pathological conditions. Within this family, the P2X7 receptor is notable for its unique properties. It is activated by extracellular ATP, which can be released into extracellular environment as a damage-associated molecular pattern (DAMP). Under normal conditions P2X7 functions as an ion channel, but prolonged or intense stimulation drives the opening of a large non-selective membrane pore, a process that can trigger cell death. Because of these distinctive properties, P2X7 has become an intensive focus of research worldwide. Nevertheless, findings to date are inconsistent, implicating the receptor in both pathological processes and protective physiological functions. Its function in skin cells, the largest organ in the body and an essential regulator of systemic homeostasis, remains poorly explored.

This study aimed to examine P2X7 receptor expression in primary human skin cells, with particular emphasis on melanocytes and melanoma cells, including both established cell lines and primary cultures. A comparison of P2X7 expression in cells isolated from human skin revealed significantly higher expression in melanocytes than in keratinocytes and fibroblasts, suggesting an important role for this receptor in the physiology of melanocytes. Furthermore, the receptor on melanocyte surfaces exhibited ion-channel activity in response to stimulation with the specific agonist BzATP, confirming its functionality. Activation of the receptor also modulated the expression of certain pro-inflammatory cytokines in melanocytes, and sustained stimulation inhibited their proliferation, indicating the involvement of P2X7 in melanocyte cellular responses. A comparative analysis of P2X7 expression in primary melanocyte lines and melanoma cells demonstrated that melanoma cells exhibit significantly lower P2X7 expression than primary melanocytes and display much weaker activation in response to BzATP. The mechanisms underlying this down-regulation remain to be elucidated, but reduced receptor levels may contribute to the malignant transformation of melanocytes. Additional factors, such as the presence of non-functional receptor isoforms or extracellular conditions that limit agonist availability or modify receptor sensitivity could also account for the diminished response, highlighting the need for further investigation. Taken together, these findings provide the first

direct comparison of P2X7 receptor expression across human skin cells, melanocytes, and melanomas, clearly demonstrating elevated receptor levels in primary human melanocytes.

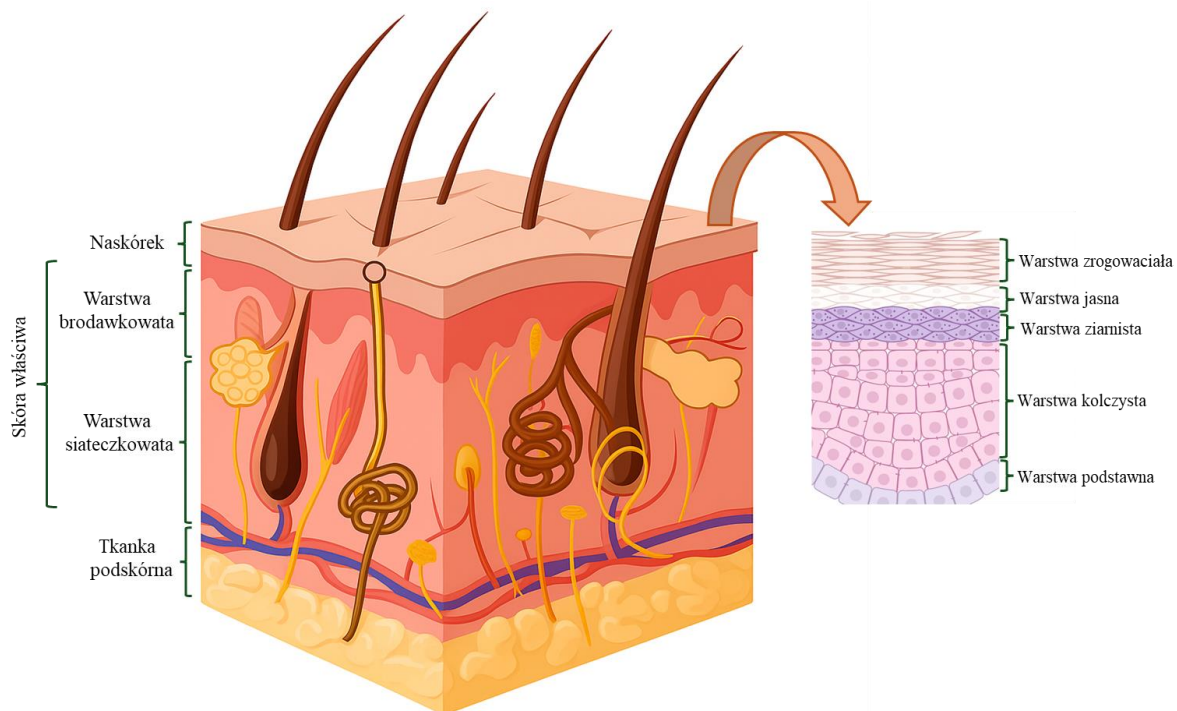
1. Wstęp

1.1. Budowa skóry

Skóra jest największym ludzkim organem, który stanowi u ludzi od 15 do 20% masy ciała, a jej łączna powierzchnia może wynosić nawet 2 m². Grubość skóry waha się od 0,3 do 4 mm w zależności od okolicy ciała, a także wieku i płci. Skóra stanowi zewnętrzną powłokę ciała człowieka, a w jej strukturze wyróżniamy dwie warstwy, naskórek oraz skórę właściwą. Bezpośrednio pod skórą właściwą usytuowana jest warstwa tkanki łącznej nazywana tkanką podskórną [1]. Skóra pełni istotne funkcje w utrzymaniu homeostazy organizmu, stanowi barierę ochronną przed czynnikami zewnętrznymi zapobiegając inwazji patogenów i odpierając wpływ czynników chemicznych, mechanicznych i fizycznych. Organ ten uczestniczy w procesach termoregulacji i gospodarce wodno-elektrolitowej, a dzięki obecności receptorów, umożliwia percepcję bodźców środowiskowych. Dodatkowo, warto wspomnieć również, że skóra bierze udział w procesie syntezy witaminy D [1-3].

Naskórek, stanowi najbardziej zewnętrzną warstwę ludzkiego ciała i jest bezpośrednio narażony na wiele czynników pochodzących ze środowiska zewnętrznego. Dominującym typem komórek w naskórku są keratynocyty, które stanowią aż 95% wszystkich komórek w tej warstwie skóry. Poza keratynocytami w naskórku występują również inne typy komórek: melanocyty produkujące melaninę, komórki Merkla pełniące funkcję receptorów czuciowych, komórki Langerhansa uczestniczące w odpowiedzi immunologicznej oraz limfocyty T. W obrębie naskórka keratynocyty układają się w cztery warstwy do których należą warstwa podstawna, koleczysta, ziarnista, jasna i zrogowaciała. Naskórek jest tkanką dynamiczną, ulegającą ciągłej odnowie. Komórki macierzyste znajdujące się w warstwie podstawnej naskórka ulegają podziałom, a nowo powstałe komórki przesuwają się ku jego powierzchni, aż do warstwy zrogowaciej ulegając zmianom biochemicznym i morfologicznym. Końcowym etapem ich różnicowania są komórki zrogowaciałe, które ulegają złuszczeniu. W warunkach fizjologicznych, w procesie tym liczba komórek ulegających złuszczeniu i nowo powstałych jest taka sama [1, 3]. Melanocyty znajdujące się w warstwie podstawnej naskórka odpowiedzialne są za produkcję melaniny, a zatem odpowiadają za pigmentację skóry [4]. Melanocyty zatem, wspólnie z keratynocytami tworzą tzw. naskórkową jednostkę melaninową (EMU, *ang. epidermal melanin unit*), w skład której wchodzi jeden melanocyt i 30- 40

keratynocytów. Melanina, upakowana w melanosomy transportowana jest do keratynocytów, gdzie pełni kluczową rolę w ochronie komórek przed promieniowaniem UV [5].



Rycina 1. Schemat budowy skóry. (Zmodyfikowane wg. Rube i wsp., 2024) [6]

Skóra właściwa zbudowana jest z tkanki łącznej właściwej i oddzielona od naskórka poprzez błonę podstawą bogatą w kolagen typu IV. W skórze właściwej znajdują się naczynia krwionośne i limfatyczne, a także zakończenia nerwowe i gruczoły. W jej strukturze wyróżnia się dwie warstwy, położoną bliżej naskórka warstwę brodawkową oraz warstwę siateczkową. Warstwę brodawkową tworzy tkanka łączna luźna, która buduje wpuklenia do naskórka nazywane brodawkami, natomiast warstwa siateczkowa zbudowana jest z tkanki łącznej zbitej [1]. Warstwa brodawkowa charakteryzuje się znacznie większą gęstością komórek [7], a także większą zawartością proteoglikanów [8] i mniej uporządkowanym układem włókien kolagenowych w porównaniu do warstwy siateczkowej [9]. Macierz zewnątrzkomórkowa warstwy siateczkowej ma bardziej wyraźną strukturę, gdzie pęczki kolagenowe są uporządkowane w gęste włókna, które wraz z pasmami włókien elastynowych tworzą zorganizowaną sieć [10].

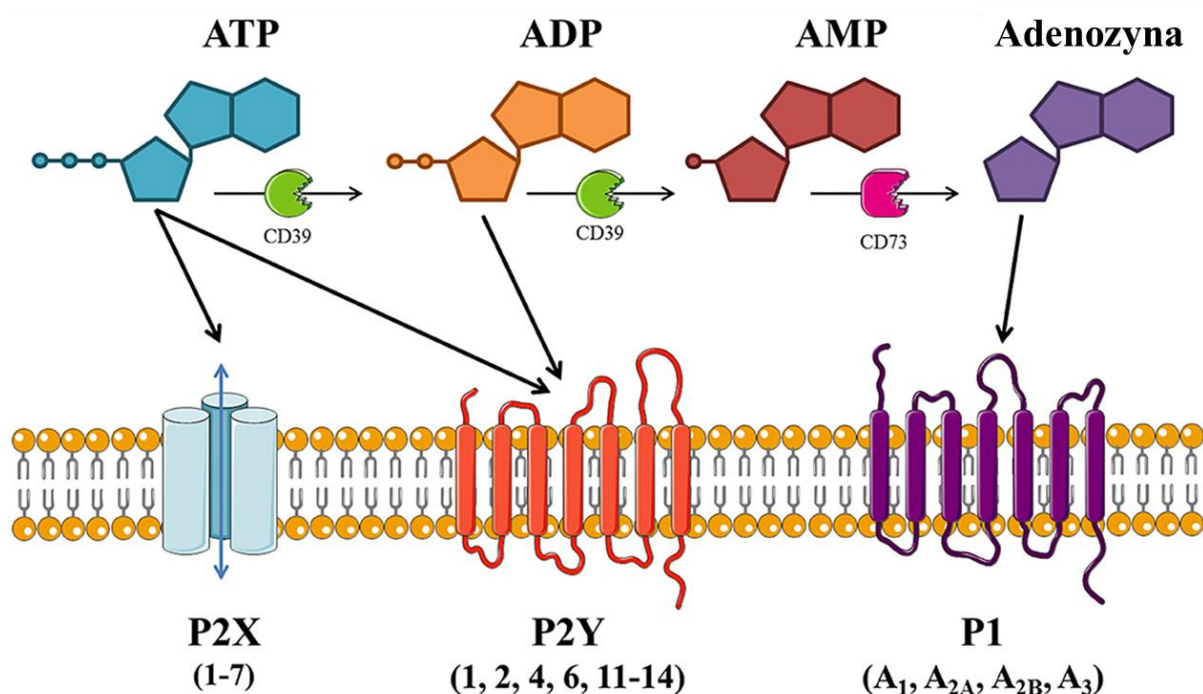
Najliczniej występującym w skórze właściwej typem komórek są fibroblasty, a charakterystyczną cechą tych komórek jest zdolność do syntezy i przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej [11]. Fibroblasty skóry właściwej są zróżnicowaną populacją, a ich

cechy różnią się w zależności od lokalizacji w warstwach skóry właściwej. W warstwie brodawkowatej większa część fibroblastów wykazuje wysoką aktywność enzymatyczną w porównaniu do warstwy siateczkowatej. Istotne różnice między tymi dwoma typami fibroblastów zaobserwowano w ekspresji specyficznych składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz markerów [12, 13]. Znajdująca się po skórą właściwą warstwa tkanki podskórnej zbudowana jest z komórek tłuszczowych, które są przedzielone tkanką łączną tworzącą zraziki. Warstwa ta zawiera również części wydzielnicze gruczołów potowych, liczne naczynia krwionośne oraz zakończenia nerwowe. Tkanka tłuszczowa przyczynia się do izolacji termicznej i magazynowania energii oraz działa jako amortyzator wstrząsów [14]. Schemat budowy skóry przedstawiono na rycinie 1.

1.2. Sygnalizacja purynergiczna i receptory purynergiczne

ATP odgrywa fundamentalną rolę w organizmach żywych będąc wewnątrzkomórkowym magazynem i nośnikiem energii. Niezwykle istotne jest jednak, że ATP po uwolnieniu z wnętrza komórek pełni również kluczową funkcję jako cząsteczka sygnalizacyjna [15]. W przestrzeni międzykomórkowej ATP może ulegać hydrolizie do ADP, AMP i adenozyne. Pozakomórkowe ATP, enzymy odpowiedzialne za jego hydrolizę (CD39 oraz CD73) i powstająca w jej skutek adenozyne wraz ze specyficznymi dla nich receptorami tworzą wspólnie purynergiczną sieć sygnalizacyjną. Sieć ta zaangażowana jest w kontrolę zarówno procesów fizjologicznych jak i patologicznych [16]. Pojęcie sygnalizacji purynergicznej zostało zaproponowane po raz pierwszy przez Geoffreya Burnstocka, który w 1972 roku zaprezentował dowody na to, że ATP może pełnić funkcję neuroprzekaźnika w tkance nerwowej [17]. W kolejnych latach badania farmakologiczne prowadzone przez Burnstocka zaowocowały zidentyfikowaniem receptorów błonowych odpowiadających na zewnątrzkomórkowe nukleotydy i nukleozydy. Receptory te, opisane po raz pierwszy w 1976 roku nazwane zostały receptorami purynergicznymi [18]. W wyniku dalszych badań Burnstock zaproponował również ich klasyfikację, która rozwijała się przez kolejne lata. Pierwotnie wśród receptorów purynergicznych wyróżniono dwie rodziny - P1, do której należą receptory aktywowane w odpowiedzi na adenozyne oraz P2, do której należą receptory stymulowane przez ATP/ADP. W 1985 roku Burnstock i Kennedy zaproponowali dalszy podział receptorów należących do rodziny receptorów purynergicznych P2 na dwa podtypy – P2X i P2Y, ze względu na ich właściwości farmakologiczne [19]. Receptory te wykazują jednak zupełnie odmienny mechanizm działania. Obecnie wyróżnia się siedem podtypów receptorów

jonotropowych P2X i osiem podtypów receptorów metabotropowych P2Y, do których należą receptory wrażliwe zarówno na nukleotydy purynowe, jak i pirymidynowe [20] (Rycina 2). Aktualnie wiadomo, że receptory purynergiczne obecne są na powierzchni niemal wszystkich komórek organizmu, a sygnalizacja purynergiczna odgrywa znaczącą rolę w wielu szlakach sygnałowych i odpowiedziach komórkowych. W związku z tym receptory purynergiczne stanowią ciągle interesujący temat wielu badań naukowych na całym świecie w kontekście ich roli zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych.



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie sygnalizacji purynergicznej w komórce. Receptory P2X aktywowane są w odpowiedzi na ATP, P2Y są stymulowane przez ATP i ADP. Receptory z rodziny P1 odpowiadają natomiast na adenozynę. Ektonukleotydazy hydrolyzujące ATP do ADP, AMP i adenozyny (CD39 i CD73) odpowiadają za regulację stężenia nukleotydów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Zmodyfikowane na podstawie Thompson i wsp., 2021) [21].

1.2.1. Receptory purynergiczne P1

Rodzina receptorów purynergicznych P1 to receptory aktywowane przez adenozynę, wśród których wyróżniono cztery podtypy: A1, A2A, A2B i A3. Wszystkie receptory purynergiczne

należące do rodziny P1 są receptorami metabotropowymi, sprzężonymi z białkiem G (GPCR, ang. *G-protein-coupled receptors*). Receptory te wykazują wspólny schemat struktury i zbudowane są z siedmiu domen transbłonowych mających budowę α -helisy. Domeny połączone są ze sobą poprzez łańcuch aminokwasowy, który tworzy trzy pętle zewnątrzkomórkowe oraz trzy cytoplazmatyczne [22]. Domeny transbłonowe receptora tworzą kieszeń będącą miejscem wiązania liganda. Koniec aminowy białka usytuowany jest na zewnątrz błony komórkowej i posiada sekwencje aminokwasowe będące miejscami glikozylacji, która może mieć wpływ na przemieszczanie się receptora do błony komórkowej. Koniec karboksylowy białka znajduje się natomiast wewnątrz komórki i zawiera sekwencje aminokwasów, które służą jako miejsca fosforylacji umożliwiając utratę wrażliwości (desensytyzację) receptora [23].

Receptory purynergiczne należące do kolejnych podtypów rodziny P1 różnią się od siebie pod względem powinowactwa do adenozyiny, rodzaju białek G, z którymi oddziałują oraz szlaków sygnałowych, które w wyniku tego oddziaływania są aktywowane. Receptory należące do podrodzin A₁, A_{2A} i A₃ charakteryzują się wysokim powinowactwem do adenozyiny, natomiast receptory A_{2B} wykazują niskie powinowactwo do tego agonisty [24]. Receptory adenozynowe są szeroko rozpowszechnione. Występują między innymi w układach nerwowym, sercowo-naczyniowym, oddechowym, żołądkowo-jelitowym, moczowo-płciowym i odpornościowym, a także w tkance tłuszczowej, tkance mięśniowej i narządach wzroku [25] i mogą pełnić różne funkcje w zależności od ich lokalizacji.

1.2.2. Receptory purynergiczne P2Y

Receptory P2Y to receptory metabotropowe, które aktywowane są przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy purynowe i pirymidynowe. Rodzina receptorów P2Y składa się z ośmiu podtypów receptorów, do których należą: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄. Receptory te należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G, pod względem budowy i mechanizmu przekazywania sygnału wykazują zatem podobieństwo do receptorów adenozynowych z rodziny P1. Zbudowane są z siedmiu domen transbłonowych połączonych trzema pętlami zewnątrzkomórkowymi i trzema wewnątrzkomórkowymi. N- koniec białka receptora znajduje się na zewnątrz komórki, podczas gdy koniec zawierający wolną grupę

karboksylową umiejscowiony jest wewnątrzkomórkowo [26]. Trzy domeny transbłonowe, do których należą TM3, TM6 i TM7 tworzą miejsce rozpoznawania liganda [27].

Receptory P2Y można podzielić na dwie grupy w oparciu o podobieństwa w strukturze i ścieżce przekazywania sygnału, która jest określona przez ich oddziaływanie z różnymi podrodzinami białek G. Pierwsza grupa receptorów to receptory związane są z białkiem G_q , do której należą receptory P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 i P2Y11. W wyniku aktywacji tych receptorów dochodzi do przekazania sygnału poprzez białko G_q i aktywacji szlaku fosfolipazy C typu beta ($PLC\beta$), co powoduje zwiększenie stężenia trisfosforanu inozytolu (IP_3), i w efekcie prowadzi do mobilizacji oraz wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} . Receptory należące do tej grupy mogą przekazywać sygnał poprzez oddziaływanie również z innymi podrodzinami białek G. Receptor P2Y1 jest jedynym receptorem, który wiąże się wyłącznie z białkiem G_q . Do drugiej grupy należą receptory P2Y12, P2Y13 i P2Y14. Receptory te oddziałują z białkami $G_{i/o}$, a ich aktywacja prowadzi do hamowania cykazy adenylanowej (AC, *ang. adenylate cyclase*) i obniżenia poziomu cAMP w komórce [28].

1.2.3. Receptory purynergiczne P2X

Receptory purynergiczne P2X to kanały jonowe, które są aktywowane w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowy ATP. Wyodrębniono siedem podtypów receptorów należących do tej rodziny: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 i P2X7, a podobieństwo w budowie białka pomiędzy różnymi podtypami P2X wynosi od 30% do 50% [29]. Receptory te występują w wielu tkankach i liniach komórkowych, gdzie pełnią różnorodne funkcje [30, 31]. Receptory P2X tworzą funkcjonalne kanały jonowe poprzez formowanie homo- lub heterooligomerów składających się zazwyczaj z trzech podjednostek. Wyjątkiem wśród tych receptorów jest P2X6, który nie tworzy funkcjonalnych homotrimerów [32, 33]. Podjednostki receptorów P2X wykazują wspólny schemat budowy, składają się z dwóch domen transbłonowych połączonych ze sobą poprzez zewnątrzkomórkową pętlę oraz usytuowanych wewnątrz komórki NH_2 - i $COOH$ - końców białka.

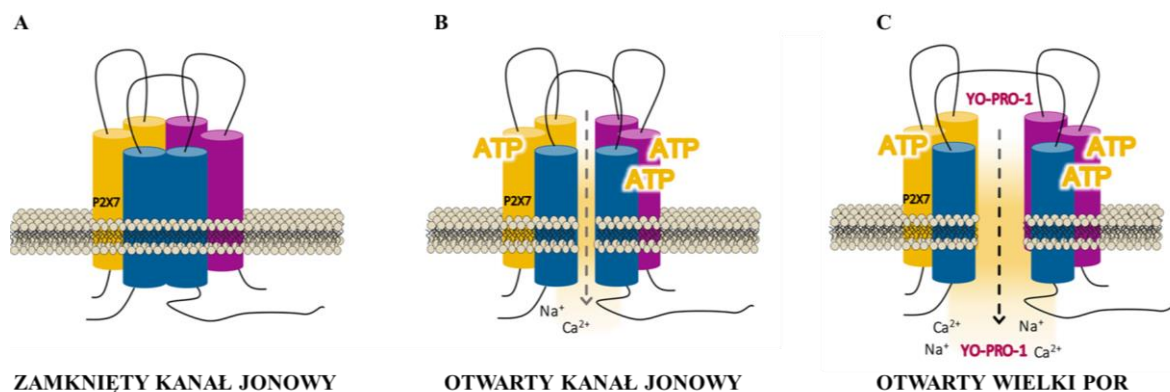
Miejsce wiązania ATP oraz selektywnych antagonistów zlokalizowane jest w zewnątrzkomórkowej pętli łączącej dwie domeny transbłonowe, które zaangażowane są w regulację przewodnictwa przez kanał jonowy i jego formowanie [34]. Długość końców karboksylowych białka jest różna w zależności od podtypu receptora P2X i wynosi od 26

(P2X6) do 239 (P2X7) aminokwasów. Homologia sekwencji ogranicza się do pierwszych 25 reszt aminokwasowych, co sugeruje specyficzne funkcje C- końców białka dla różnych podtypów P2X [35, 36]. W odpowiedzi na przyłączenie się cząsteczek zewnątrzkomórkowego ATP dochodzi do zmiany konformacji receptora i otwarcia kanału jonowego co powoduje natychmiastową depolaryzację błony komórkowej spowodowaną przepływem jonów (Na^+ , K^+ i Ca^{2+}) i zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. W efekcie tego dochodzi do aktywacji szeregu ścieżek sygnałowych. Stężenie ATP niezbędne do aktywacji receptorów P2X różni się w zależności od typu receptora. Receptory P2X1 i P2X3 wykazują największą wrażliwość na agonistę, ulegając aktywacji już przy stężeniu ATP poniżej 1 μM . Receptory te charakteryzują się również najszybciej występującą utratą wrażliwości wskutek ich przedłużonej aktywacji [37, 38]. Najniższym powinowactwem wyróżnia się natomiast receptor P2X7, a do jego aktywacji niezbędne jest stężenie ATP powyżej 100 μM [39].

1.3. Receptor P2X7

P2X7 jest receptorem, który poprzez swoje właściwości znacząco wyróżnia się wśród rodziny receptorów purynergiczych. Pierwotnie receptor ten zyskał nazwę P2Z, ponieważ odróżniał się zarówno od receptorów z rodziny P2X, jak i P2Y znacznie wyższym stężeniem ATP niezbędnym do jego aktywacji [40].

W toku dalszych badań nad receptorem wykazano jednak, że receptor ten charakteryzuje się wysoką homologią sekwencji białka w stosunku do pozostałych sześciu receptorów rodziny P2X i dlatego też dokonano jego reklasyfikacji i zakwalifikowano go jako P2X7 [41]. Wyjątkową cechą receptora P2X7 jest także modulacja jego aktywności w zależności od stężenia ATP. Przy niskich stężeniach ATP receptor ten tworzy kanał jonowy. Natomiast przy wysokich stężeniach ATP lub jego długotrwałej stymulacji receptor tworzy nieselektywny por, który powoduje przepuszczalność błony komórkowej i umożliwia przechodzenie przez błonę cząsteczkom o masie cząsteczkowej do 900 Da, co w konsekwencji może indukować śmierć komórki [42, 43] (Rycina 3).

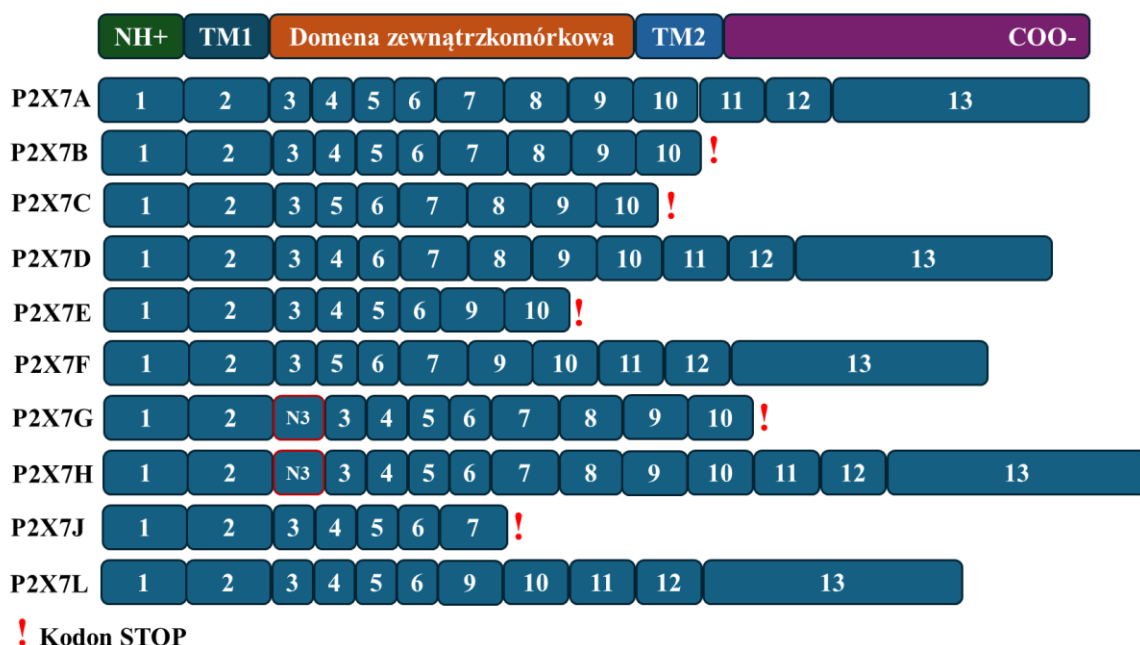


Rycina 3 Graficzne przedstawienie stanów aktywacji receptora P2X7. **A)** Stan spoczynkowy receptora, w którym agonista (ATP) jest nieobecny lub występuje w niewystarczającym stężeniu, przez co konformacja receptora nie prowadzi do otwarcia jego kanału jonowego. **B)** Początkowa aktywacja receptora w ciągu milisekund przy niskim stężeniu ATP, powodująca selektywne otwarcie kanału dla kationów. **C)** Faza przedłużonej aktywacji, w której dochodzi do otwarcia poru komórkowego, co umożliwia nieselektywny przepływ dużych cząsteczek takich jak YO-PRO-1 (Zmodyfikowane wg. Martínez-Cuesta i wsp, 2020) [44].

1.3.1. Lokalizacja genu receptora P2X7, warianty jego składania i polimorfizmy

Ludzki receptor P2X7 kodowany jest przez gen *hP2RX7* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 12, w pozycji 12q24.31 [45]. Na chromosomie 12, w jego pobliżu znajduje się również gen kodujący receptor P2X4 (*P2RX4*) zlokalizowany w pozycji 12.q24.32. Uważa się, że oba geny pochodzą z kolejnych duplikacji genów [46, 47]. Gen *P2RX7* został zidentyfikowany u co najmniej 55 gatunków ssaków i kręgowców. Dokładna struktura i umiejscowienie tego genu zostały natomiast szczegółowo opisane między innymi u gatunków, do których należą mysz, szczur, makak królewski i kawia domowa. U niemal wszystkich ssaków, w tym również u ludzi, gen *P2RX7* składa się z 13 eksonów, ale różni się umiejscowieniem na chromosomach [48]. Dla przykładu, geny kodujące receptor P2X7 u myszy i szczura wykazują odpowiednio 81% i 80% podobieństwa do genu ludzkiego pod względem budowy [41, 49]. Funkcje receptora P2X7 mogą być modyfikowane poprzez alternatywne składanie jego genu. Zidentyfikowanych zostało dotychczas trzynaście różnych wariantów składania genu *P2RX7*, wybrane przedstawiono na rycinie 4. Warianty te różnią się

miejscem rozpoczęcia i zakończenia transkrypcji czy liczbą eksonów, a w efekcie długością mRNA i strukturą kodowanego białka [50, 51].



Rycina 4 Graficzne przedstawienie wybranych wariantów alternatywnego składania genu receptora P2X7 (Zmodyfikowane wg. Andrejew i wsp., 2020 oraz De Salis i wsp., 2022) [52, 53].

Cheewatrakoolpong i współpracownicy opisali w 2005 roku pierwsze osiem wariantów składania genu *P2RX7*. Pierwszy z nich, gen oznaczony symbolem P2X7A składa się z wszystkich 13 eksonów, a w wyniku jego translacji powstaje podjednostka receptora reprezentująca pełnowymiarowe białko składające się z 595 aminokwasów. Inne warianty składania genu receptora charakteryzują się zmianami w sekwencji, które wpływają na funkcję receptora. P2X7B, E i G są skrócone z powodu wstawienia intronu między eksonami 10 i 11, co skutkuje wprowadzeniem przedwczesnego kodonu stop. P2X7B jest najczęściej występującą skróconą formą receptora, która zachowuje aktywność kanału jonowego. Utrata części końca karboksylowego uniemożliwia mu funkcję formowania pora komórkowego i dlatego też długotrwała stymulacja P2X7B nie prowadzi do śmierci komórkowej. Jednakże, występowanie zarówno P2X7B jak i P2X7A prowadzi do powstania receptora, który wykazuje znacznie większą efektywność w porównaniu do receptora zbudowanego wyłącznie z podjednostek P2X7A. Wykazano, że receptor P2X7A-P2X7B wykazuje wyższe powinowactwo do ATP i zwiększoną zdolność do wspomagania metabolizmu energetycznego i proliferacji komórek [54]. Izoforma P2X7E dodatkowo nie posiada eksonów siódmego i

ósmego, a w wyniku jego translacji powstaje białko ze skróconym końcem karboksylowym, nie posiadające kluczowych do wiązania ATP fragmentów domeny zewnątrzkomórkowej. Warianty P2X7C, D i F charakteryzują się delecjami eksonów. P2X7C i D nie mają odpowiednio eksonów czwartego i piątego, natomiast P2X7F nie posiada zarówno eksonu czwartego jak i ósmego. Warianty G i H zawierają dodatkowy ekson N3, który występuje pomiędzy eksonami drugim i trzecim [55].

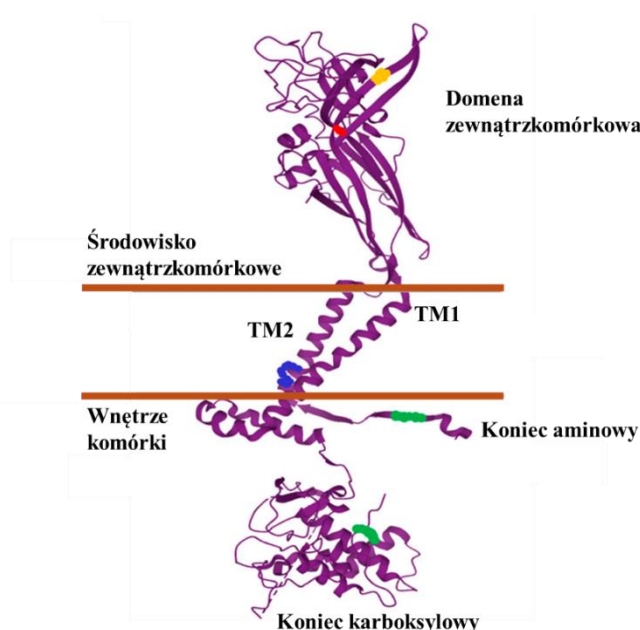
Dalsze badania zidentyfikowały m.in. wariant P2X7I powstały w wyniku mutacji w miejscu składania intronu 1, prowadzącej do braku ekspresji białka [56]. Kolejny z wariantów składania genu, P2X7J jest pozbawiony eksonu ósmego, a białko powstałe w wyniku jego translacji pozbawione jest fragmentu domeny zewnątrzkomórkowej, jednej z domen transbłonowych i końca karboksylowego. Tak zbudowany receptor nie ma możliwości wiązania ligandu, a zatem jest niefunkcjonalny. Dodatkowo, wykazano również, że P2X7J łącząc się z P2X7A hamuje jego aktywność, a taki heterotrimer wpływał na zwiększenie odporności komórek raka szyjki macicy na zewnątrzkomórkowe ATP [57]. P2X7L natomiast charakteryzuje się, tak jak P2X7E, brakiem fragmentu domeny zewnątrzkomórkowej spowodowanym delecją eksonów ósmego i siódmego. Po transfekcji do komórek HEK 293 P2X7L ułatwiał fagocytozę w odpowiedzi na ATP, nie indukował natomiast typowych efektów P2X7A, takich jak tworzenie kanału jonowego czy nieselektywnego poru [51]. Natomiast, niefunkcjonalny wariant P2X7 nazwany nfP2X7, który wykazuje obecność epitopu E200A, nie jest zdolny do tworzenia cytotoksycznego poru [58].

W obrębie ludzkiego genu receptora P2X7 zidentyfikowano ponad 150 niesynonimicznych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, które wpływają na modulację funkcji receptora. Różne warianty genetyczne powiązane zostały zarówno z wzmocnieniem funkcji receptora P2X7 jak i z jego całkowitą utratą.

1.3.2. Budowa białka receptora P2X7

Funkcjonalny receptor P2X7 składa się z trzech podjednostek kodowanych przez gen *P2RX7*. Podjednostka receptora P2X7 jest białkiem złożonym z 595 aminokwasów, a w jego budowie wyróżnia się dwie domeny transbłonowe (TM1 i TM2), usytuowane wewnątrzkomórkowo koniec aminowy i koniec karboksylowy oraz dużą pętlę zewnątrzkomórkową (rycina 5).

Zarówno koniec karboksylowy jak i aminowy podjednostki receptora P2X7 pełnią istotną rolę w jego biologii.



Rycina 5 Przedstawienie struktury drugorzędowej monomeru P2X7R z pięcioma domenami: zewnątrzkomórkową, dwiema transbłonowymi (TM1 i TM2), wewnątrzkomórkowym N-końcem oraz wewnątrzkomórkowym C-końcem (Zmodyfikowane wg. Martínez-Cuesta i wsp., 2020) [44].

Udowodniono, że krótki koniec aminowy odgrywa rolę w regulacji przepływu jonów wapnia przez kanał jonowy [59] oraz wpływa na aktywację kinaz sygnałowych [60]. Unikalny dla P2X7R, wydłużony o 200 aminokwasów w porównaniu do innych receptorów z rodziny P2X koniec karboksylowy odgrywa kluczową rolę w procesie oligomeryzacji białka receptora oraz formowania poru błonowego [36, 54, 61-64]. Co więcej, koniec karboksylowy receptora posiada fragment bogaty w reszty cysteinowe, który ulega palmitoilacji, a proces ten odgrywa kluczową rolę w transporcie receptora do błony komórkowej i w zapobieganiu jego desensytyzacji [65, 66].

W obrębie końca karboksylowego receptora P2X7 zidentyfikowane zostało również miejsce wiązania lipopolisacharydu (LPS), co sugeruje istotny udział receptora P2X7 w modulowaniu odpowiedzi zapalnej [67, 68]. Ponadto, w strukturze końca karboksylowego P2X7R obecne są również domeny zdolne do interakcji z różnorodnymi białkami [41]. Miejsca wiązania ATP zlokalizowane są w domenach zewnątrzkomórkowych P2X7R, na styku każdej pary

sąsiadujących podjednostek. Natomiast, kanał jonowy tworzony jest poprzez ich domeny transbłonowe TM2.

Szereg badań nad strukturą krystaliczną i mutagenezą pozwoliło również na identyfikację miejsc allosterycznych dla antagonistów, które znajdują się w pobliżu kieszeni wiążącej ATP. Badanie, w którym uzyskano strukturę krystaliczną ssaczego P2X7R ze skróconej podjednostki receptora z pandy wielkiej (*Ailuropoda melanoleuca*) sugeruje również, że kieszeń wiążąca ATP w P2X7R charakteryzuje się ograniczonym dostępem, co może wyjaśniać, dlaczego wielu agonistów receptorów z rodziny P2X jest nieaktywnych w przypadku P2X7R [69].

1.3.3. Aktywacja receptora P2X7

Naturalnym agonistą receptora P2X7 jest zewnątrzkomórkowy ATP, a jego stężenie efektywnie aktywujące receptor różni się w zależności od gatunku, z którego receptor pochodzi i wynosi od 50 μ M do 2,5 mM. Aktywacja receptora może być stymulowana również poprzez syntetyczne analogi ATP, do których należą 2(3)-O-(4-benzoylbenzoyl) ATP (BzATP) oraz adenozyne 5-(γ -tio) trójfosforan (ATP γ S). Powinowactwo receptora różni się natomiast w stosunku do syntetycznych agonistów w porównaniu do jego naturalnego agonisty. Stężenie, szeroko wykorzystywanego w badaniach BzATP niezbędne do aktywacji receptora P2X7 jest 10-krotnie lub nawet 100-krotnie mniejsze od niezbędnego stężenia ATP. Z kolei ATP γ S jest słabszym agonistą P2X7 w porównaniu do zarówno BzATP, jak i jego naturalnego agonisty. Stężenia agonistów konieczne do aktywacji receptora różnią się również w zależności od gatunku, z którego receptor pochodzi [70]. Aktywacja sygnalizacji za pośrednictwem P2X7R charakteryzuje się niezwykłą plastycznością i może zależeć także od innych czynników niż tylko zewnątrzkomórkowy ATP. Istnieją dowody sugerujące, że szereg czynników nie będących nukleotydami może działać jako pozytywne modulatory allosteryczne receptora P2X7. Należą do nich między innymi amyloid- β [71], surowiczy amyloid A [72], polimyksyna B [73], a także LL-37, antybakteryjny peptyd należący do rodziny katelicydyn. Co ciekawe, wstępne badania sugerowały możliwość bezpośredniej aktywacji receptora P2X7 z wykorzystaniem LL-37 [74]. Kolejne badania przedstawiły jednak dowody na to, że nie aktywuje on receptora bezpośrednio, a pełni funkcję pozytywnego modulatora jego aktywacji z użyciem agonisty [75]. Wszystkie te związki zwiększają wrażliwość receptora na ATP i

potęgują związane z jego aktywacją odpowiedzi takie jak napływ jonów wapnia do komórki, przepuszczalność błony czy cytotoksyczność [73].

Receptor P2X7 wykazuje także zdolność do aktywacji poprzez zupełnie odmienny mechanizm, który jest zależny od lipopolisacharydów, endotoksyn pochodzących z bakterii gram-ujemnych. Wykazano bowiem, że nagromadzenie LPS-u wewnątrz komórki może wpływać na aktywację receptora P2X7. LPS wewnątrzkomórkowo stymuluje kaspazę-11, która z kolei aktywuje paneksynę 1, nieselektywny kanał odpowiedzialny za uwalnianie nukleotydów, w tym również ATP. W ten sposób dochodzi do zwiększonego uwalniania ATP z komórki i zwrotnej aktywacji P2X7R [76]. Postuluje się, że LPS może brać również zwiększać wrażliwość receptora na agonistę poprzez oddziaływanie z domeną na jego końcu karboksylowym [67].

1.3.4. Zahamowanie aktywności receptora P2X7

Funkcje receptora mogą być hamowane poprzez szereg selektywnych lub nieselektywnych antagonistów. Pierwsza generacja antagonistów receptora P2X7 cechowała się niską specyficznością, a ich wykorzystanie prowadziło do hamowania aktywności również innych receptorów z rodziny P2X, a nawet receptorów z rodziny P2Y i innych cząsteczek [70]. Do grupy tej należą związki takie jak suramina i PPADS [77, 78], które charakteryzują się niewielkim powinowactwem do receptora, czy błękit brylantowy (BBG), który hamuje także inne receptory z rodziny P2X oraz paneksynę-1 [79, 80]. Inny z przedstawicieli tej grupy inhibitorów, oATP hamuje funkcje receptora w sposób nieodwracalny poprzez modyfikację struktury kowalencyjnej białka, co wpływa na jego atrakcyjność w kontekście badań *in vivo*. Inhibitor ten, choć wykazuje większą selektywność, hamuje również receptory P2X2 i P2X3 [81, 82]. W odpowiedzi na potrzebę bardziej precyzyjnego oddziaływania na receptor P2X7 i wraz z poznaniem jego struktury, opracowano inhibitory drugiej generacji charakteryzujące się wysoką selektywnością w stosunku do inhibitorów pierwszej generacji, a także lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi. Dzięki temu inhibitory te są wykorzystywane z sukcesem w badaniach *in vivo*. Do grupy tych inhibitorów należą między innymi AZ10606120, który wpływał na zmniejszenie guza i wykazywał działanie anti-angiogenne w mysich modelach nowotworów [83], a także A-839977, który wykazuje działanie przeciwbólowe w szczurzych i mysich modelach bólu związanego z zapaleniem [84]. Porównanie efektywności

wybranych inhibitorów receptora P2X7, zarówno pierwszej jak i drugiej generacji z uwzględnieniem różnic pomiędzy gatunkami przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1 Porównanie efektywności inhibitorów receptora P2X7 z uwzględnieniem różnic pomiędzy gatunkami (Zmodyfikowane na podstawie Bartlett i wsp., 2014) [70].

Inhibitor	Wskazanie	Faza badania klinicznego	Rezultat	Sponsor badania klinicznego	Numer NCT
JNJ-54175446	Depresja	II	-	Janssen Pharmaceuticals	NCT04116606
JNJ-55308942	Depresja dwubiegunowa	II	-	Janssen Pharmaceuticals	NCT05328297
PTM-001	Zapalenie gruczołów potowych	II	-	Phoenicis Therapeutics	NCT05020730
CE-224,535	Reumatoidalne zapalenie stawów	II	Brak efektu	Pfizer	NCT00628095
AZD-9056	Reumatoidalne zapalenie stawów	II	Brak efektu	AstraZeneca	NCT00520572
GSK1482160	Ból związany z zapaleniem	I	Brak efektu	GlaxoSmithKline	NCT00849134
BSCT (Anti-nf-P2X7)	Rak podstawanokomórkowy	I	Zmniejszenie zmiany chorobowej	Biosceptre	NCT02587819
SGM-1019	Niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby	II	Niekorzystny stosunek ryzyko/korzyść	Second Genome	NCT03676231
[18F] JNJ-64413739	Glejak wielopostaciowy/ Badanie diagnostyczne: obrazowanie PET	-	-	Janssen Pharmaceuticals	NCT05753995

Zahamowanie funkcji receptora możliwe jest również poprzez użycie przeciwciał monoklonalnych lub nanociał, które stanowią alternatywę dla inhibitorów w postaci małych cząsteczek chemicznych. Dla przykładu, badania wykazały, że użycie nanociał specyficznych dla P2X7 złagodziło objawy choroby w dwóch różnych eksperymentalnych mysich modelach chorób zapalnych, kłębuszkowego zapalenia nerek wywołanego przeciwciałami i alergicznego kontaktowego zapalenia skóry. Przeciwciała skierowane przeciwko niefunkcjonalnemu receptorowi P2X7 (nfP2X7) testowane w badaniu klinicznym przynosiły efekty w terapii raka podstawanokomórkowego [58]. Dodatkowo, wykazano również, że na inhibicję receptora może wpływać wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia, magnezu, cynku i miedzi, a kationy dwuwartościowe oddziałują z domeną pozakomórkową receptora wpływając na wiązanie agonisty [85]. Podobnie składnik lipidowy błony plazmatycznej znacząco wpływa na funkcję P2X7, badania potwierdzają wpływ cholesterolu na hamowanie P2X7 poprzez jego łączenie się z końcami, zarówno aminowym jak i karboksylowym receptora [86].

Wiele drobnocząsteczkowych antagonistów receptora P2X7 jest obecnie komercyjnie dostępnych do użytku w laboratoriach badawczych, A ze względu na rosnące zainteresowanie receptorem P2X7 jako potencjalnym celem terapeutycznym w różnych schorzeniach, jego inhibitory są obecnie również testowane w ramach badań klinicznych. Zestawienie badań klinicznych z ostatnich lat przedstawiono w tabeli 2. Co warto zauważyć, żaden z opracowanych wysoce selektywnych antagonistów P2X7 nie wykazał skuteczności w zaawansowanych badaniach klinicznych na poziomie, który pozwoliłby na wprowadzenie go na rynek.

Tabela 2 Zestawienie badań klinicznych i przedklinicznych z wykorzystaniem inhibitorów receptora P2X7 oraz ich sugerowanym wskazaniem (Zmodyfikowane na podstawie Al-Aqtash, 2024) [87].

Inhibitor	Wskazanie	Faza badania klinicznego	Rezultat	Sponsor badania klinicznego	Numer NCT
JNJ-54175446	Depresja	II	-	Janssen Pharmaceuticals	NCT04116606
JNJ-55308942	Depresja dwubiegunowa	II	-	Janssen Pharmaceuticals	NCT05328297
PTM-001	Zapalenie gruczołów potowych	II	-	Phoenicis Therapeutics	NCT05020730
CE-224,535	Reumatoidalne zapalenie stawów	II	Brak efektu	Pfizer	NCT00628095
AZD-9056	Reumatoidalne zapalenie stawów	II	Brak efektu	AstraZeneca	NCT00520572
GSK1482160	Ból związany z zapaleniem	I	Brak efektu	GlaxoSmithKline	NCT00849134
BSCT (Anti-nf-P2X7)	Rak podstawanokomórkowy	I	Zmniejszenie zmiany chorobowej	Biosceptre	NCT02587819
SGM-1019	Niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby	II	Niekorzystny stosunek ryzyko/ korzyść	Second Genome	NCT03676231
[18F] JNJ-64413739	Glejak wielopostaciowy/ Badanie diagnostyczne: obrazowanie PET	-	-	Janssen Pharmaceuticals	NCT05753995

1.4. Rola P2X7 w skórze

Obecność receptora P2X7 została potwierdzona w różnych typach komórek skóry, w tym melanocytach, fibroblastach, keratynocytach, a także w komórkach układu odpornościowego,

takich jak komórki Langerhansa. Uważa się, że P2X7 może odgrywać istotną rolę w utrzymaniu homeostazy skóry. Ponadto, receptor ten został powiązany z różnymi schorzeniami dermatologicznymi i stanowi potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu chorób skóry.

1.4.1. Fibroblasty

Fibroblasty stanowią niezwykle zróżnicowaną populację komórek występującą w skórze odgrywając kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy, biorąc udział w procesie gojenia ran oraz reakcjach zapalnych [88]. Ludzkie fibroblasty wyizolowane ze skóry wykazują ekspresję receptora P2X7, a jego aktywność w tych komórkach została po raz pierwszy opisana w 1999 roku. Badania przeprowadzone przez Solini i wsp. wykazały, że receptor ten wpływa na wydzielanie interleukiny 6 (IL-6) z fibroblastów oraz bierze udział w regulacji apoptozy tych komórek. Co więcej badacze zaobserwowali również, że odpowiedzi receptora w fibroblastach mogą być modulowane w zależności od zawartości glukozy w środowisku. Wyższe stężenie glukozy zwiększało wrażliwość receptora na jego agonistę, zatem niższe jego dawki wywoływały silniejszy efekt. Autorzy sugerowali, że efekt ten nie wynikał ze zwiększonego poziomu ekspresji P2X7, lecz ze zmianą w jego lokalizacji komórkowej pod wpływem większego stężenia glukozy w środowisku [89, 90]. Badanie fibroblastów wyizolowanych ze skóry pacjentów ze sklerodermą (twardziną układową) wykazało zwiększoną ekspresję receptora P2X7 na powierzchni komórek oraz wzmożony napływ wapnia do komórek w wyniku aktywacji receptora. Stymulacja tych fibroblastów z użyciem BzATP zwiększała ekspresję markera miofibroblastów α -SMA, co sugeruje, że P2X7 może wpływać na różnicowanie tych komórek. Ponadto, aktywacja receptora przyspieszała migrację komórek oraz zwiększała produkcję kolagenu, a oba te efekty są istotnymi czynnikami postępu zwłóknienia. Wyniki sugerują, że mechanizm wewnątrzkomórkowy leżący u podstaw efektów fibrogennych wywołanych poprzez aktywację P2RX7 w tych komórkach związany jest z aktywacją ścieżki sygnałowej kinazy ERK 1/2. Co więcej, P2X7 jest również zaangażowany w produkcję prozapalnej IL-6 w komórkach pochodzących od pacjentów ze sklerodermą [91]. Z kolei inne, niedawno opisane badania wykazują, że P2X7R negatywnie reguluje migrację fibroblastów pochodzących ze skóry poprzez wpływ na dynamikę cytoszkieletu aktynowego. Blokowanie P2X7R z użyciem antagonisty powodowało reorganizację cytoszkieletu aktynowego i tym samym przyspieszało migrację tych komórek. Flores-Muñoz i wsp. opisują również funkcjonalne połączenie pomiędzy receptorem P2X7 i paneksyną 1 (Panx1), białkiem

odpowiedzialnym za komunikację międzykomórkową. Analizy sugerują, że między kanałami P2X7R a Panx1 zachodzi interakcja w formie pętli sprzężenia zwrotnego, gdzie ATP uwalniane przez Panx1 indukuje aktywację P2X7R, który następnie modeluje aktywność Panx1 [92].

1.4.2. Keratynocyty

Keratynocyty stanowią główną populację komórek naskórka, pełniąc funkcję bariery ochronnej oraz odgrywając kluczową rolę w odpowiedzi odpornościowej [93]. Receptor P2X7 jest obecny w keratynocytach, a jego aktywacja prowadzi do śmierci komórek, co zostało potwierdzone zarówno w badaniach *in vivo*, jak i *in vitro* [94, 95]. Obecność P2X7 w górnych warstwach naskórka oraz jego kolokalizacja z markerami apoptozy sugerują, że uczestniczy w kontrolowanej śmierci dojrzałych keratynocytów, co jest istotne dla prawidłowego różnicowania naskórka [94]. Ekspresja receptora P2X7 w keratynocytach wzrasta pod wpływem interferonu gamma (IFN- γ), a jego podwyższony poziom został zaobserwowany w zmianach skórnych u pacjentów z łuszczycą oraz atopowym zapaleniem skóry [96]. Ponadto, receptor ten pośredniczy w autofagii indukowanej przez LL-37, która jest kluczowa dla homeostazy skóry i prawidłowego różnicowania keratynocytów [97, 98]. Proces ten wpływa również na integralność bariery naskórka poprzez regulację połączeń ścisłych, co podkreśla znaczenie P2X7 w ochronie skóry przed czynnikami zewnętrznymi. Receptor P2X7 bierze również udział w migracji keratynocytów i procesie gojenia ran, szczególnie pod wpływem peptydów przeciwdrobnoustrojowych LL-37 i Pep19-2.5 [99, 100]. Jego aktywacja jest również istotna dla procesu gojenia ran indukowanego średniocząsteczkowym kwasem hialuronowym (100–300 kDa; MMW-HA). Badania wykazały, że zastosowanie inhibitora P2X7, BBG całkowicie hamuje korzystny wpływ MMW-HA na gojenie ran i proliferację fibroblastów, co sugeruje, że receptor ten jest kluczowy dla efektów terapeutycznych kwasu hialuronowego [101]. P2X7 odgrywa również istotną rolę w odpowiedzi na promieniowanie UVA.

Badania na linii komórkowej HaCaT wykazały, że receptor ten pośredniczy w produkcji prozapalnej interleukiny 6 w odpowiedzi na promieniowanie UVA. Mechanizm ten obejmuje pośrednią rolę P2X7 w uwalnianiu ATP, które następnie aktywuje receptory purynergiczne P2Y11 i P2Y13, prowadząc do indukcji IL-6 [102]. Biorąc pod uwagę znaczenie IL-6 w procesach zapalnych skóry, fotostarzeniu oraz degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej,

ukierunkowanie na receptor P2X7 lub receptory P2Y może stanowić potencjalną strategię terapeutyczną w ochronie skóry przed uszkodzeniami spowodowanymi promieniowaniem UVA. Dodatkowo, P2X7 uczestniczy w aktywacji inflamasomu w keratynocytach pod wpływem ATP, co skutkuje aktywacją kaspazy-1 i wydzielaniem cytokin prozapalnych IL-1 β oraz IL-18. Zwiększona aktywność inflamasomu może również prowadzić do wzrostu ekspresji chemokiny CXCL9, odpowiedzialnej za rekrutację komórek układu odpornościowego. W konsekwencji, keratynocyty mogą wpływać na sąsiadujące melanocyty, co może mieć znaczenie w patogenezie chorób zapalnych skóry [103].

1.4.3. Melanocyty

Melanocyty są komórkami, które odpowiadają w skórze za pigmentację, ale mogą również brać udział w odpowiedzi odpornościowej [104]. Ludzkie melanocyty charakteryzują się występowaniem na ich powierzchni receptora P2X7, który ulega aktywacji w odpowiedzi na jego stymulację z użyciem ATP. W ostatnim czasie pojawił się szereg doniesień literaturowych dotyczących wpływu aktywacji receptora P2X7 na proces melanogenezy. Badacze zaobserwowali uwalnianie ATP pod wpływem promieniowania UVB zarówno z keratynocytów i melanocytów. Potwierdzili oni, że zarówno ATP, jak i jego analog BzATP aktywują P2X7 w melanocytach, a proces ten jest blokowany przez agonistę receptora, A438079. Lee i wsp. zasugerowali, że ATP pochodzące z naświetlanych promieniowaniem UVB keratynocytów może odpowiadać za aktywację receptora na melanocytach. Wyniki badań wykazały, że P2X7 uczestniczy w aktywacji szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za melanogenezę poprzez wpływ na zwiększenie poziomu ekspresji MITF, jednego z najważniejszych jądrowych czynników transkrypcyjnych regulujących proces melanogenezy. Aktywacja receptora skutkowała zwiększeniem zawartości melaniny w melanocytach, co potwierdza, że P2X7 może być istotnym czynnikiem wpływającym na pigmentację skóry. Tym samym również, badacze sugerują, że P2X7 powinien być rozważany jako cel terapeutyczny w zaburzeniach pigmentacji skóry [2].

Kolejne badania podkreślające rolę receptora w procesie melanogenezy wykazały pozytywny wpływ ATP na poziom białek związanych z melanogenezą, w tym tyrozynazy, MITF oraz gp100. Efekt ten był osłabiony, gdy komórki były wstępnie inkubowane z użyciem inhibitora receptora P2X7, AZD-9056. Użycie tego antagonisty hamowało również indukowaną przez

ATP syntezę melaniny [105]. W badaniu Ahn i wsp. naukowcy zbadali potencjalną rolę receptora P2X7 w patogenezie bielactwa, choroby autoimmunologicznej charakteryzującej się utratą funkcjonalnych melanocytów prowadzącą do depigmentacji skóry. Badanie to wykazało, że aktywacja P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach prowadzi do aktywacji kaspazy 1, co skutkuje zwiększoną produkcją prozapalnych cytokin IL-1 β i IL-18. Dodatkowo, w melanocytach poddanych działaniu wysokich stężeń ATP zaobserwowano wzrost poziomu aktywnej kaspazy 3, będącej markerem apoptozy. Barwienie aneksyną V, umożliwiające detekcję komórek podlegających apoptozie, wykazało istotny wzrost liczby komórek z dodatnią reakcją po traktowaniu ATP. Efekt ten został zahamowany przez zastosowanie antagonisty receptora P2X7, A438079. Dodatkowo, w badaniu *ex vivo* skóra stymulowana ATP również wykazywała podwyższony poziom aktywnej kaspazy 3, a pod wpływem traktowania zmniejszała się liczba melanocytów wykazujących ekspresję MITF. Ponadto, w linii komórkowej melanocytów pochodzących od pacjentów z bielactwem (PIG3V) wykazano obecność aktywnej kaspazy-1, której poziom wzrastał pod wpływem traktowania ATP. Autorzy sugerują zatem, że aktywacja receptora P2X7 przez ATP może odgrywać rolę w ścieżce sygnałowej odpowiedzialnej za patogenezę bielactwa [103].

1.4.4. Komórki układu odpornościowego

Obecność receptora P2X7 w komórkach układu odpornościowego oraz jego rola w odpowiedzi odpornościowej i w odpowiedzi zapalnej została szeroko opisana w literaturze. Początkowo uważano nawet, że jest on obecny wyłącznie w komórkach układu odpornościowego [106]. Niewiele jest natomiast badań wykazujących występowanie receptora i jego aktywność w komórkach układu odpornościowego pochodzących ze skóry. W literaturze istnieją doniesienia o obecności receptora w komórkach dendrytycznych, które są komórkami prezentującymi antygen i odgrywają ważną rolę w tworzeniu odporności adaptacyjnej i utrzymywaniu tolerancji obwodowej. Wyodrębnia się spośród nich komórki Langerhansa, które zlokalizowane są w naskórku. Badania potwierdzają, że zarówno ludzkie jak i mysie komórki Langerhansa wyizolowane z naskórka wykazują ekspresję receptora P2X7 [107, 108]. Obecność receptora potwierdzono także w komórkach dendrytycznych pochodzących ze skóry, a badanie to wykazało, że blokowanie receptora w tych komórkach hamuje ich potencjał do aktywacji limfocytów T. Warto jednak zauważyć, że badanie to wykonane było na komórkach

pochodzących ze skóry płodu [109]. Killen i wsp. wykazali badaniu *ex vivo*, że stymulacja receptora P2X7 aktywuje dojrzewanie i różnicowanie komórek dendrytycznych w skórze i komórek Langerhansa w naskórku. Oba typy komórek wykazywały podwyższoną ekspresję markera różnicowania komórek dendrytycznych, DC-LAMP pod wpływem aktywacji receptora. Pobudzenie receptora w tych komórkach prowadziło również do wydzielania cytokin prozapalnych IL-1 β , IL-6, IL-23, a także czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF). Co więcej, zwiększone wydzielanie IL-1 β i IL-23 przez komórki dendrytyczne sprzyjało różnicowaniu limfocytów Th17. W odpowiedzi na aktywację receptora zarówno komórki dendrytyczne, jak i komórki Langerhansa wydzielały także białko HMGB1 (*ang. High-mobility group box 1*), które promuje odpowiedź zapalną, a dodatkowo zwiększona była również ekspresja receptora dla tego białka, RAGE (*ang. receptor for advanced glycation endproducts*) [110]. Nie istnieją bezpośrednie dowody na ekspresję receptora P2X7 w takich komórkach jak makrofagi czy limfocyty T zasiedlające skórę czy też napływające granulocyty. Wiele badań wykazuje natomiast, że komórki te wyizolowane z innych tkanek charakteryzują się obecnością receptora na ich powierzchni, a aktywacja receptora generuje w tych komórkach różne odpowiedzi [111]. Wykazano między innymi, że aktywacja receptora może prowadzić w makrofagach do zwiększonego wydzielania IL-1 β i prostaglandyny 1 [112], wydzielanie reaktywnych form tlenu [113], czy może wspomagać zabijanie wewnątrzkomórkowych pasożytów [114]. W limfocytach wykazano, że aktywacja receptora może prowadzić do wydzielania CD62L, molekuly adhezyjnej która może wpływać na migrację limfocytów T w miejsce zapalenia [115, 116]. Natomiast, komórki tuczne pochodzące ze skóry wykazują niewielką ekspresję receptora P2X7, w odróżnieniu do komórek pochodzących z innych tkanek. Badanie Kurashimy i wsp. sugeruje, że ekspresja receptora w komórkach tucznych może być blokowana poprzez enzym Cyp26b1, który odpowiada za rozkładanie kwasu retinowego. Dokładny mechanizm nie jest jednak poznany [117].

2. Materiały i metody

Izolacja pierwotnych komórek skóry ludzkiej oraz komórek czerniaka ludzkiego, a także wszystkie dalsze badania histologiczne, biochemiczne i molekularne przeprowadzone na materiale ludzkim bądź wyizolowanych komórkach ludzkich odbywały się na podstawie pozytywnych opinii Komisji Bioetycznych wydanych w Uchwale Komisji Bioetycznej przy Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego nr 87/PB/2020 z dnia 15 czerwca 2020 roku oraz Uchwale Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym KB/34/2022 z dnia 14 marca 2022 roku. Skany pozytywnych opinii Komisji Bioetycznych zostały załączone na końcu rozprawy.

2.1. Hodowla komórkowa

2.1.1. Hodowla linii komórkowych czerniaka ludzkiego

Wykorzystane do badania ustalone linie komórkowe czerniaka ludzkiego, MeWO i A375 hodowano w podłożu hodowlanym RPMI wzbogaconym 10% surowicą bydlęcą i 1% antybiotyków (Thermo Fisher Scientific). Komórki hodowano w naczyniach hodowlanych z zmodyfikowanego plastiku, przystosowanego do hodowli komórkowych (Nest Scientific Biotechnology). Hodowle prowadzone były w inkubatorze w temperaturze 37°C oraz atmosferze zawierającej 5% CO₂ oraz 95% wilgotności. Pasażowanie komórek przeprowadzano po osiągnięciu 70–80% ich zagęszczenia, stosując 0,05% roztwór trypsyny w EDTA lub TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific).

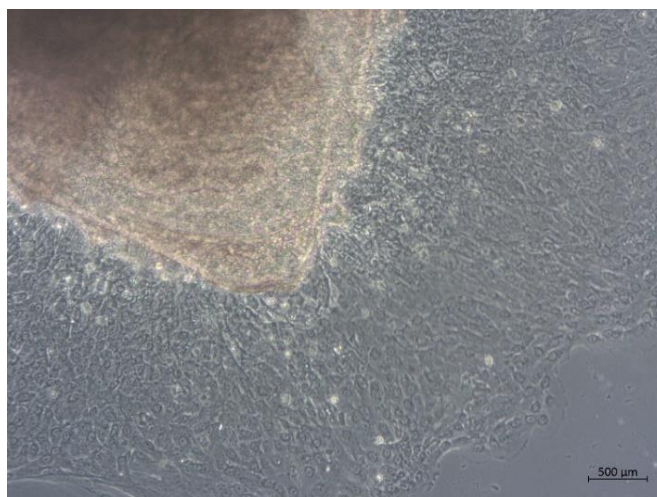
2.1.2. Izolacja metodą eksplantów pierwotnych komórek skóry ludzkiej i komórek czerniaka i ich hodowla

Izolacja pierwotnych komórek skóry ludzkiej i komórek czerniaka ludzkiego prowadzona była metodą eksplantów opisaną dla melanoctytów i komórek czerniaka przez Ścieżyńską i wsp. [118] z modyfikacjami. Fragmenty skóry ludzkiej i węzłów chłonnych pobrane chirurgicznie transportowane były do laboratorium na lodzie, w sterylnym medium hodowlanym DMEM (Thermo Fisher Scientific). Następnie, fragmenty tkanki płukane były dwukrotnie PBS

(Thermo Fisher Scientific) i przenoszone do dedykowanego, pełnego podłoża hodowlanego. Cienkie paski ludzkiego naskórka oddzielano mechanicznie od skóry właściwej za pomocą nożyczek, a następnie cięto na mniejsze fragmenty o wymiarach około 1 x 1 mm i regularnych bokach. Fragmenty węzłów chłonnych również cięto na mniejsze fragmenty, które następnie rozdrabniano na fragmenty o wielkości około 1 x 1 mm. Tak przygotowane eksplanty naskórka lub węzłów chłonnych umieszczano w 6-dołkowej płytce hodowlanej (Nest Scientific Biotechnology) i pozostawiano do wyschnięcia na maksymalnie 15 minut. Następnie do naczynia hodowlanego z eksplantami dodawano 1,5 ml medium hodowlanego DMEM z dodatkiem 20% surowicy bydlęcej i 1% roztworu antybiotyków. Naczynia hodowlane z eksplantami inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ w powietrzu i 95% wilgotności.

2.1.3. Pierwotne komórki skóry ludzkiej

Komórki skóry migrujące z eksplantów odklejano od powierzchni naczynia hodowlanego poprzez 5-minutową inkubację z 0,5 ml 0.025% roztworu trypsyny z EDTA (Thermo Fisher Scientific). Po tym czasie trypsynę inaktywowano poprzez dodanie 2 mL podłoża hodowlanego DMEM z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej. Komórki w zawieszynie odwirowywano, zawieszano w świeżym podłożu hodowlanym i wysiewano do naczynia hodowlanego w sposób opisany poniżej. Komórki migrujące z eksplantów naskórka zbierano codziennie, począwszy od drugiego dnia inkubacji eksplantów. W dniach od drugiego do piątego w sposób opisany powyżej zbierano melanocyty i keratynocyty, a następnie wysiewano je do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² (Nest Scientific Biotechnology) w pożywkę hodowlaną Medium 254 z dodatkiem HMGS-2 (Thermo Fisher Scientific) i 1% roztworu antybiotyków.



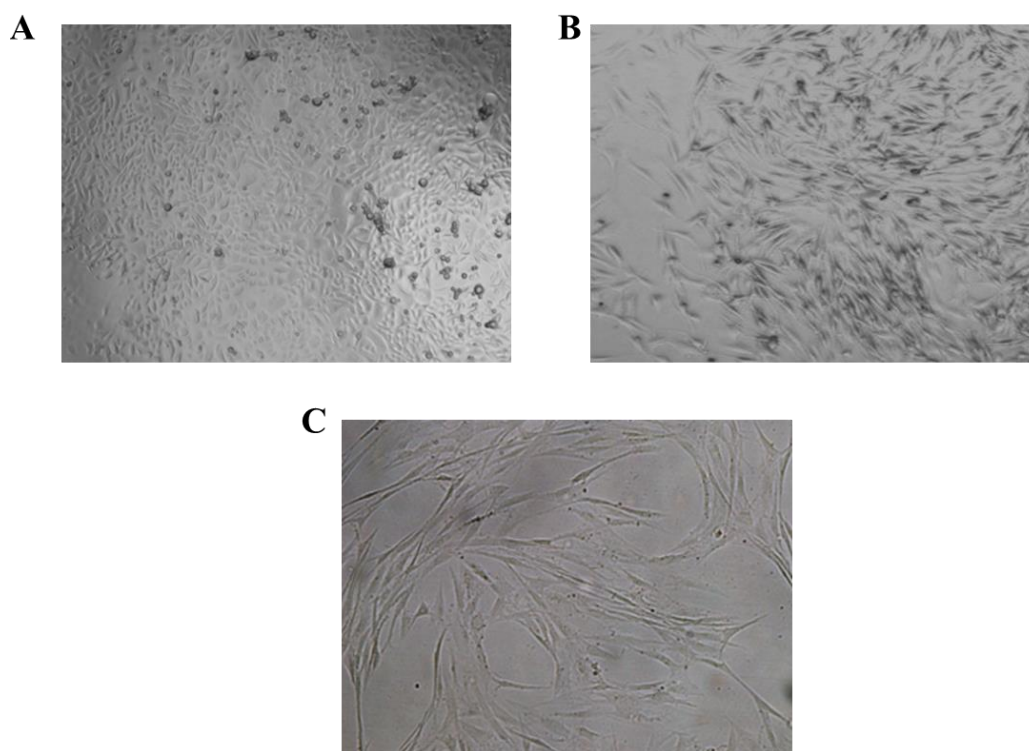
Rycina 6 Zdjęcie eksplantu skóry ludzkiej wraz z migrującymi komórkami.

W dalszych etapach hodowli melanocyty i keratynocyty oddzielano poprzez seryjną trypsynizację z użyciem 0,25% Trypsyny-EDTA. Melanocyty odrywano od powierzchni butelki hodowlanej po 2 minutowej inkubacji z 0,25% Trypsyną-EDTA i wysiewano je do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² (Nest Scientific Biotechnology) w medium hodowlanym Medium 254 z dodatkiem HMGS-2 (Human Melanocyte Growth Supplement-2; Thermo Fisher Scientific) i 1% roztworu antybiotyków. Keratynocyty zbierano natomiast po kolejnych 3 minutach inkubacji w 0,25% roztworze trypsyny z EDTA i wysiewano do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² (Nest Scientific Biotechnology) w medium hodowlanym Keratinocyte Growth Medium (KGM; PromoCell) z dodatkiem Keratinocyte Supplement Mix (PromoCell) i 1% roztworu antybiotyków.



Rycina 7 Zdjęcie hodowli komórek skóry ludzkiej zebranych z eksplantów przed wykonaniem seryjnej trypsynizacji różnicującej melanocyty i keratynocyty.

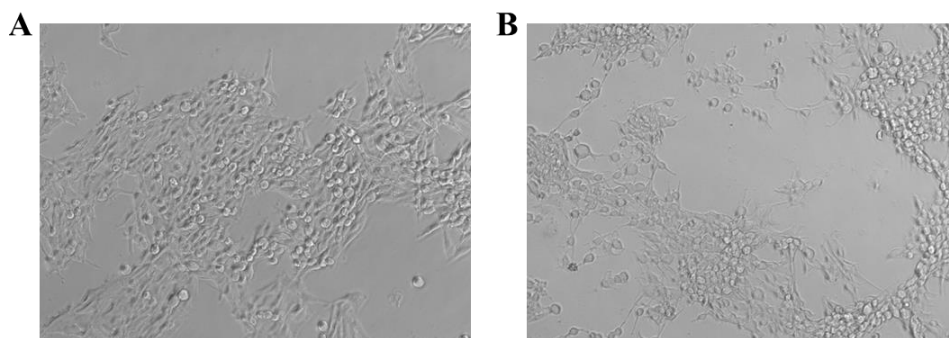
Fibroblasty zbierano począwszy od szóstego dnia inkubacji eksplantów, w sposób opisany powyżej i wysiewano do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² (Nest Scientific Biotechnology) w medium hodowlanym DMEM z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej i 1% antybiotyków. Melanocyty, keratynocyty i fibroblasty były rutynowo hodowane w standardowych warunkach w temperaturze 37°C z 5% zawartością CO₂ w powietrzu i pasażowane z użyciem 0,05% roztworu trypsyny w EDTA lub TrypLE Express, gdy osiągały 70-80% zagęszczenia.



Rycina 8 Zdjęcia komórek skóry ludzkiej wyizolowanych metodą eksplantów (powiększenie x 20):
A) Keratynocyty B) Melanocyty C) Fibroblasty

2.1.4. Pierwotne komórki czerniaka ludzkiego

Komórki czerniaka ludzkiego zbierano z hodowli eksplantów po raz pierwszy piątego dnia inkubacji. Komórki odrywano od naczynia hodowlanego z użyciem 0,05% Trypsyny w EDTA, a następnie wysiewano do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² w medium hodowlanym RPMI 1640 z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej i 1% antybiotyków.



Rycina 9 Zdjęcia przykładowych wyizolowanych z węzła chłonnego pierwotnych linii komórkowych czerniaka ludzkiego, powiększenie x 10. **A)** MM9 **B)** MM16

2.2. Ocena proliferacji i żywotności komórek

Melanocyty były wysiewane na 24-dołkowe płytki (Nest Biotechnology) w liczbie 0.8×10^5 komórek na dołek w pożywce hodowlanej Medium 254 z dodatkiem HMGS-2 i 1% roztworu antybiotyków. Po 24 godzinach podłoże hodowlane wymieniano i uzupełniano o BzATP (Jena Bioscience) w stężeniu 10, 100 i 300 μM . W przypadku badania wpływu hamowania receptora komórki inkubowano przez 20 minut z A438079 (Tocris), a następnie pożywkę uzupełniano 300 μM BzATP. Podczas dwóch kolejnych dni hodowli melanocyty były zdejmowane z naczyń hodowlanych poprzez 5 minutową inkubację w roztworze TrypLE Express w temperaturze 37°C. Następnie liczba i żywotność komórek były analizowane przy użyciu automatycznego licznika komórek z obrazowaniem fluorescencyjnym ADAM-MC (NanoEntek) zgodnie z instrukcją producenta.

2.3. Immunofluorescencja

Przeznaczone do barwienia immunofluorescencyjnego fragmenty skóry poddawano procesowi zamrażania w medium Tissue Freezing Medium firmy Leica. Następnie, za pomocą kriostatu Leica CM 1860, wykonano z nich cienkie skrawki o grubości 10 μm , które umieszczano na szkiełkach podstawowych. Przeznaczone do barwienia immunofluorescencyjnego hodowane in vitro komórki skóry przygotowywano poprzez hodowlę w odpowiednim dla typu komórek podłożu hodowlanym opisanym powyżej. Hodowle prowadzono na 24-dołkowych naczyniach hodowlanych przez 24 godziny w standardowych warunkach. Tak przygotowane kriosekcje fragmentów skóry i komórki utrwalano w 4% paraformaldehydzie przez 20 minut, a błonę komórkową permeabilizowano poprzez inkubację w 0,1% Triton X-100 (ThermoFisher

Scientific) przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Próbki przepłukiwano trzy razy w PBS (ThermoFisher Scientific) i blokowano niespecyficzne wiązania przeciwciał poprzez inkubację w 3% roztworze BSA w PBS (ThermoFisher Scientific) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbki inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z przeciwciałami I-rzędowymi (Tabela 3). Do detekcji przeciwciał pierwszorzędowych użyto przeciwciał drugorzędowych, sprzężonego z Alexa Fluor 594 (anty-królicze IgG, anty-kozie IgG) oraz sprzężonego z Alexa Fluor 488 (anty-mysie IgG) (Thermo Fisher Scientific) użytych w rozcieńczeniu 1:200. Jądra komórkowe barwiono DAPI (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 3 Przeciwciała pierwszorzędowe użyte w barwieniu immunofluorescencyjnym

Przeciwciała pierwszorzędowe				
Antygen	Numer katalogowy	Pochodzenie	Producent	Rozcieńczenie
anty-inwolukryna	MA5-11803	mysie monoklonalne	ThermoFisher Scientific	1:100
anty-P2X7	PA5-77665	królicze monoklonalne	ThermoFisher Scientific	1:100
anty-SERCA2	GTX55790	królicze poliklonalne	GeneTex	1:100
anty-P2X7	SAB2501287	kozie poliklonalne	Sigma Aldrich	1:100

2.4. Izolacja RNA i analiza ekspresji genów (qRT-PCR i TaqMan™ Array, Human Cytokine Network)

Wykorzystane do analizy qRT-PCR linie komórkowe opisane zostały w Tabeli 4. Proces izolacji całkowitego RNA z komórek przeprowadzono wykorzystując zestaw Total RNA Mini Plus Concentrator firmy A&A Biotechnology, zgodnie z zaleceniami producenta. W pierwszym etapie komórki poddano lizie przy użyciu buforu FenoZol Plus, a następnie oczyszczono z białek i DNA w kolejnych płukaniach z użyciem buforu płuczającego. W końcowym etapie uzyskiwano 15 µL RNA rozpuszczonego w sterylnej wodzie, którego stężenie i jakość oceniano spektrofotometrycznie przy użyciu urządzenia NanoDrop 2000

(Thermo Fisher Scientific). Następnie, w celu wyrównania ilości RNA w każdej reakcji odwrotnej transkrypcji, roztwory RNA rozcieńczono wodą sterylną, tak aby każda próbka zawierała tę samą ilość RNA. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), zgodnie z zaleceniami producenta. Próbkę przygotowano poprzez zmieszanie 10 μ L RNA i 10 μ L mieszaniny reakcyjnej, która zawierała 2 μ L buforu, 0,8 μ L 100 mM dNTP, 2 μ L starterów, 1 μ L odwrotnej transkryptazy i 4,2 μ L wody sterylnej. Inkubację przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf) z zastosowaniem następującego profilu temperaturowego: 10 minut w 25°C, 120 minut w 37°C oraz 5 minut w 85°C. Otrzymany produkt cDNA przechowywano w temperaturze -20°C. Ekspresję genu *P2RX7* oceniano z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) lub z wykorzystaniem zestawu TaqMan™ Array, Human Cytokine Network, Fast 96-well (Thermo Fisher Scientific). Próbkę do reakcji qRT-PCR przygotowano poprzez zmieszanie cDNA zawieszonego w 10 μ L wody sterylnej oraz 10 μ L mieszaniny reakcyjnej SensiFAST™ Probe Lo-ROX Kit (Meridian Bioscience), z sondami dla genów *P2RX7* (Hs00951605_m1) oraz GAPDH (Hs02758991_g1), endogennej kontroli (Thermo Fisher Scientific), a następnie tak przygotowaną zawiesinę przenoszono na 96-dołkową płytkę reakcyjną. Próbkę do analizy z wykorzystaniem zestawu TaqMan™ Array, Human Cytokine przygotowano również poprzez zmieszanie jednakowej ilości cDNA zawieszonej w 10 μ L wody sterylnej z 10 μ L mieszaniny reakcyjnej a następnie nanoszono na dołączoną do zestawu płytkę reakcyjną zawierającą zestaw sond dla genów cytokin. Reakcje przeprowadzano w termocyklerze 7500 Fast (Applied Biosystems) w następujących warunkach: 50°C przez 2 minuty, 95°C przez 20 sekund, a następnie 40 cykli (95°C przez 3 sekundy i 60°C przez 30 sekund). Wszystkie próbki oceniono w co najmniej dwóch powtórzeniach, a analiza względnej ekspresji genów opierała się na wartościach cykli progowych (C_t , z ang. *threshold cycle*) z zastosowaniem metod ΔC_t lub $\Delta\Delta C_t$.

Tabela 4 Pochodzenie ludzkich pierwotnych melanocytów oraz komórek linii komórkowych czerniaka wykorzystanych w analizie qRT-PCR.

Linia komórkowa	Pochodzenie
NHM 12, NHM 14, NHM 18, NHM 6, NHM 8	Pierwotne ludzkie melanocyty wyizolowane ze skóry pacjentek w wieku 38- 55 lat pochodzącej z redukcji powłok brzusznych; komórki wyizolowano metodą eksplantów
A375-P	Linia komórkowa czerniaka wyizolowana ze skóry 54-letniej pacjentki z czerniakiem złośliwym; silnie przerzutowa linia wyselekcjonowana z linii A375
MeWo	Linia komórkowa czerniaka wyizolowana ze skóry 79-letniego pacjenta z czerniakiem złośliwym
SK-MEL-1	Linia komórkowa czerniaka wyizolowana ze skóry 29-letniej pacjentki
WCCm1 (MM1)	Pierwotne ludzkie komórki czerniaka wyizolowane z węzłów chłonnych 76-letniego pacjenta; komórki wyizolowano metodą eksplantów WMCCd- węzeł chłonny czerniaka duży WMMCM- węzeł chłonny czerniaka mały
WCCm7 (MM7)	
WCCd9 (MM9)	
WCCm16 (MM16)	
WCCm28 (MM28)	
WM266-4	Linia komórkowa czerniaka wyizolowana z węzłów chłonnych 55-letniej pacjentki czerniakiem złośliwym *
WM35	Linia komórkowa czerniaka wyizolowana ze skóry 24-letniej pacjentki z czerniakiem złośliwym
WM115	Linia komórkowa czerniaka wyizolowana ze skóry 55-letniej pacjentki czerniakiem złośliwym *
* Linie komórkowe WM115 i WM266-4 pochodzą od jednej pacjentki	

2.5. Western blot

2.5.1. Przygotowanie lizatów białkowych z pierwotnych komórek wyizolowanych ze skóry ludzkiej, linii komórkowych oraz preparatów tkankowych

Lizaty białkowe były przygotowywane zarówno z pobranych chirurgicznie fragmentów skóry ludzkiej, jak i wyizolowanych pierwotnych komórek skóry ludzkiej oraz pierwotnych i ustalonych linii komórkowych czerniaka. W celu uzyskania całkowitych lizatów białkowych z komórek, po ukończonym eksperymencie lub gdy osiągały one maksymalnie 80% zagęszczenia komórki przepłukiwano dwukrotnie PBS w temperaturze 4°C. Następnie komórki zawieszano w odpowiedniej ilości buforu RIPA zawierającym 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoksydianu sodu i 0.1% SDS (Thermo Fisher Scientific) z dodatkiem mieszanki inhibitorów proteaz (Thermo Fisher Scientific). Komórki zdejmowano z naczynia hodowlanego z użyciem skrobaczki, a następnie zawiesinę komórek i buforu RIPA przenoszono do probówek typu Eppendorf. Mieszaninę inkubowano na lodzie przez około 30 minut, a podczas inkubacji próbki mieszano co 5 minut. Po inkubacji lizaty białkowe wirowano przez 20 minut w temperaturze 4°C z prędkością 12500 rpm. Nadsącz uzyskany po wirowaniu przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf. W celu uzyskania lizatów białkowych z naskórka skóry ludzkiej mechanicznie, z użyciem nożyczek oddzielano fragmenty naskórka od skóry właściwej. Następnie fragmenty naskórka dwukrotnie przepłukiwano PBS i umieszczano w probówce i ważono. Fragmenty naskórka rozdrabniano mechanicznie, a następnie dodawano do nich bufor RIPA zawierający 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoksydianu sodu i 0.1% SDS (Thermo Fisher Scientific, USA), w objętości dwukrotnie większej niż objętość tkanki. Tkankę w buforze homogenizowano z użyciem ręcznego homogenizatora utrzymując probówkę na lodzie. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano następnie na lodzie przez 30 minut, a podczas inkubacji mieszano co 5 minut. Po inkubacji lizaty białkowe wirowano przez 20 minut w temperaturze 4°C z prędkością 12500 rpm. Nadsącz uzyskany po wirowaniu przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf.

2.5.2. Oznaczenie stężenia białka w lizatach komórkowych

Pomiar stężenia białek w lizatach otrzymanych metodą opisaną powyżej wykonywano metodą z kwasem biscynchoninowym (BCA) z użyciem zestawu Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) według instrukcji producenta. Do pomiarów wykorzystywano 96-dołkowe płytki (Greiner Bio-One International GmbH), a odczyt absorbancji prowadzono przy długości fali 562 nm wykorzystując czytnik mikropłytek Spark (Tecan). Stężenie białka w lizatach określano względem krzywej wzorcowej, wyznaczonej każdorazowo za użyciem roztworów BSA o znanym stężeniu. Pomiar białka każdorazowo wykonywano w dwóch powtórzeniach technicznych.

2.5.3. Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym i Western Blotting

Rozdział białek pod względem masy cząsteczkowej przeprowadzano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Lizaty białkowe analizowano na żelu poliakrylamidowym z 8% żelem rozdzielającym i żelem zagęszczającym. Przed elektroforezą, lizaty rozmrażano na lodzie i odpowiednią objętość próbki (zawierającą 10 lub 20 µg białka) przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf. Tak przygotowane lizaty zawieszano w Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) w stosunku objętościowym 4 części lizatu do 1 części Lane Marker Reducing Sample Buffer. Próbkę następnie denaturowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 5 minut. Do identyfikacji mas cząsteczkowych używano markera BlueEasy Prestained Protein Marker (Nippon Genetics). Elektroforezę prowadzono w aparacie Mini Trans-Blot® Cell (BioRad) w buforze Tris-glicynowym z SDS (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyny, 0,1% SDS). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 80 V, które zwiększano do 120V po około 20 minutach od rozpoczęcia elektroforezy, aż do momentu migracji całego markera. Po przeprowadzonej elektroforezie wykonywano transfer białek na membranę nitrocelulozową (AmershamProtran 0.45 NC). Transfer mokry wykonywano z wykorzystaniem systemu do transferu Mini Trans-Blot® Cell (BioRad). Transfer mokry wykonywano przez 90 min przy natężeniu prądu 0.35 A. Następnie, w celu zablokowania miejsc mogących niespecyficznie wiązać przeciwciała membranę inkubowano w TBST z dodatkiem 5% odtłuszczonego mleka w temperaturze pokojowej przez około godzinę. Tak przygotowane membrany inkubowano przez około 14 godzin z przeciwciałami

pierwszorzędowymi w temperaturze 4°C (Tabela 5). W celu usunięcia nieprzyłączonych przeciwciał pierwszorzędowych, membrany trzykrotnie przepłukano buforem TBST. Następnie inkubowano je z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonym z peroksydazą chrzanową (HRP) przez około godzinę w temperaturze pokojowej (Tabela 5). Sygnał wykrywano przy użyciu substratu chemiluminescencyjnego SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific), a jego wizualizację wykonano z wykorzystaniem systemu Syngene GBox Chemi XX9 (Syngene).

Tabela 5 Przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe wykorzystane w metodzie Western blot

Przeciwciała pierwszorzędowe				
Antygen	Numer katalogowy	Pochodzenie	Producent	Rozcieńczenie
anty- β -actin	A2228-200	mysie monoklonalne	SIGMA	1:2000
anty-P2X7	PA5-111048	królicze monoklonalne	ThermoFisher Scientific	1:500

Przeciwciała drugorzędowe					
Antygen		Numer katalogowy	Pochodzenie	Producent	Rozcieńczenie
Przeciwciało kozie sprzężone z HRP	IgG mysie	GTX213111-01	kozie	GeneTex	1:5000
Przeciwciało kozie sprzężone z HRP	IgG królicze	GTX213110-01	kozie	GeneTex	1:5000

2.6. Oznaczanie poziomu wapnia

Komórki hodowano na szkiełkach nakrywkowych w 6-dołkowej płytce przez 48 godzin w warunkach opisanych powyżej. Komórki (o konfluencji 70–80%) inkubowano z Fura-2 AM (Molecular Probes) w medium hodowlanym pozbawionym surowicy bydlęcej przez 15 minut w temperaturze 37°C w atmosferze 95% O₂ i 5% CO₂. Po dwukrotnym krótkim przepłukaniu w buforze do analizy (5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM Na₂HPO₄, 25 mM HEPES, 130 mM NaCl, 1 mM pirogronianu, 5 mM D-glukozy i 2 mM CaCl₂; pH 7,4) szkiełka nakrywkowe umieszczano w kuwecie i utrzymywano w buforze do analizy z wysoką zawartością wapnia (2 mM CaCl₂) w temperaturze pokojowej w komorze pomiarowej spektrofлуorymetru RF5301PC

(Shimadzu). Fluorescencję rejestrowano przy 510 nm z wzbudzeniem przy 340/380 nm. Na końcu każdego eksperymentu fluorescencję Fura-2 kalibrowano przez dodanie jonomycyny w celu określenia maksymalnej fluorescencji.

3. Założenie i cel pracy

W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest informacji na temat roli receptora P2X7 w komórkach skóry, zarówno w stanie fizjologicznym jak i patologicznym. Dlatego też celem niniejszej pracy było zbadanie ekspresji receptora w komórkach skóry ludzkiej, ze szczególnym uwzględnieniem melanocytów oraz wywodzących się z nich komórek czerniaka.

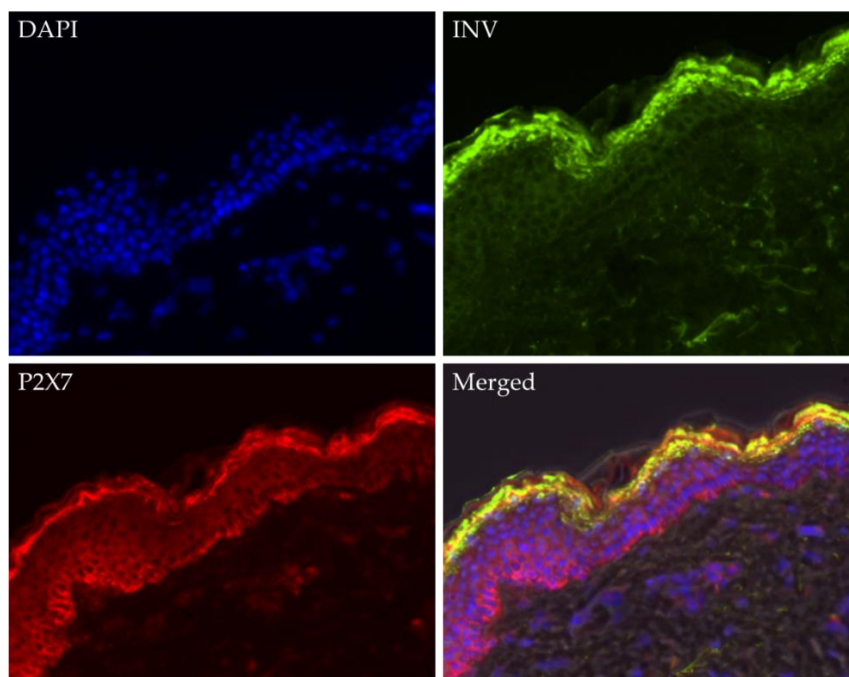
Postawiony cel pracy zdecydowano się realizować poprzez wykonywanie opisanych poniżej zadań badawczych:

1. Przeanalizowanie poziomu ekspresji receptora P2X7 w komórkach ludzkiej skóry na poziomie mRNA i białka z wykorzystaniem techniki qRT-PCR, Western blot i barwienia immunofluorescencyjnego
2. Analiza funkcjonalności receptora P2X7 w pierwotnych melanocytach
3. Ocena funkcji receptora P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach: wpływ aktywacji receptora na tempo proliferacji i żywotność komórek, wpływ aktywacji receptora na jego poziom ekspresji oraz wpływ aktywacji receptora na poziom ekspresji cytokin prozapalnych
4. Porównanie poziomu ekspresji receptora P2X7 na poziomie mRNA i białka w ludzkich pierwotnych melanocytach i komórkach czerniaka ludzkiego, zarówno linii ustalonych jak i pierwotnych linii wyizolowanych od pacjentów
5. Ocena funkcjonalności receptora P2X7 w komórkach czerniaka ludzkiego oraz analiza wpływu stymulacji receptora P2X7 na ich żywotność i tempo proliferacji

4. Wyniki

4.1. Analiza lokalizacji receptora P2X7 w skórze ludzkiej

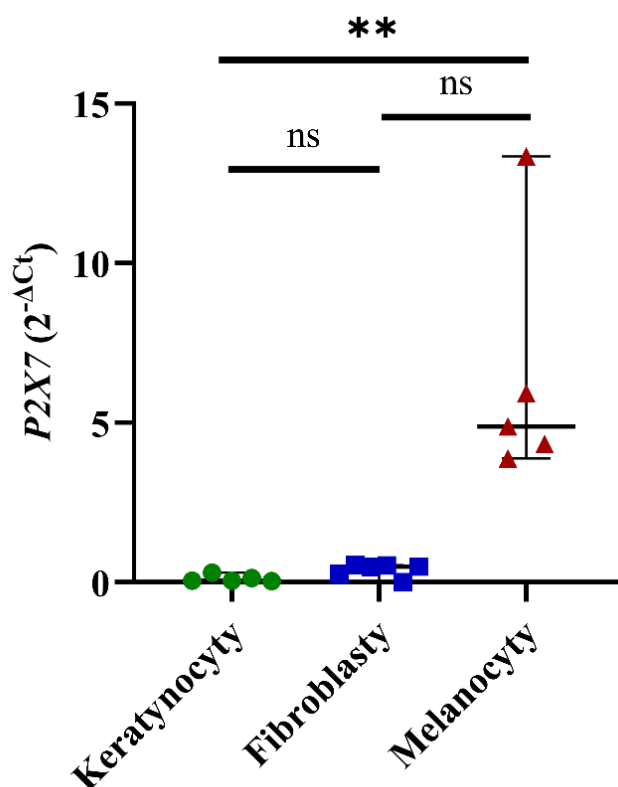
Analiza ekspresji i lokalizacji białka P2X7 w preparatach skóry ludzkiej wykonana przy użyciu barwienia immunofluorescencyjnego i mikroskopii fluorescencyjnej wykazała ekspresję tego receptora w preparatach zdrowej skóry ludzkiej, zlokalizowaną głównie w naskórku. Zwiększoną intensywność sygnału immunofluorescencyjnego zaobserwowano w warstwie ziarnistej naskórka, a dodatkową ekspresję wykryto również w warstwie podstawnej. W wykonanym barwieniu immunofluorescencyjnym zaobserwowano częściowe nakładanie się sygnału pochodzącego z barwienia receptora P2X7 i inwolukryny, która jest markerem różnicowania keratynocytów. Co więcej, analiza ta wykazała zmniejszoną intensywność sygnału dla receptora P2X7 również w pozostałych warstwach skóry. Reprezentatywny wynik przeprowadzonego barwienia immunofluorescencyjnego preparatów skóry ludzkiej przedstawiono na rycinie 10.



Rycina 10 Immunofluorescencyjna analiza ekspresji i lokalizacji receptora P2X7 w preparatach skóry ludzkiej. Barwienie immunofluorescencyjne preparatów skóry ludzkiej przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko P2X7 (czerwony sygnał) i inwolukrynie (INV; zielony sygnał). Jądra komórkowe wybarwione zostały z użyciem DAPI (niebieski). Obrazy uzyskano z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej, powiększenie x10.

4.2. Analiza poziomu ekspresji genu *P2X7* w wyizolowanych komórkach ludzkiej skóry na poziomie mRNA

Analiza poziomu ekspresji genu *P2RX7* z użyciem metody PCR w czasie rzeczywistym wykazała jego ekspresję we wszystkich badanych komórkach wyizolowanych ze skóry: keratynocytach, fibroblastach i melanocytach. Poziom ekspresji genu receptora różnił się jednak w zależności od rodzaju komórek. W otrzymanych wynikach zaobserwowano, iż ludzkie pierwotne melanocyty wykazują statystycznie istotnie wyższy poziom ekspresji genu *P2X7* w porównaniu do ludzkich pierwotnych fibroblastów i keratynocytów, co zostało przedstawione na rycinie 11.

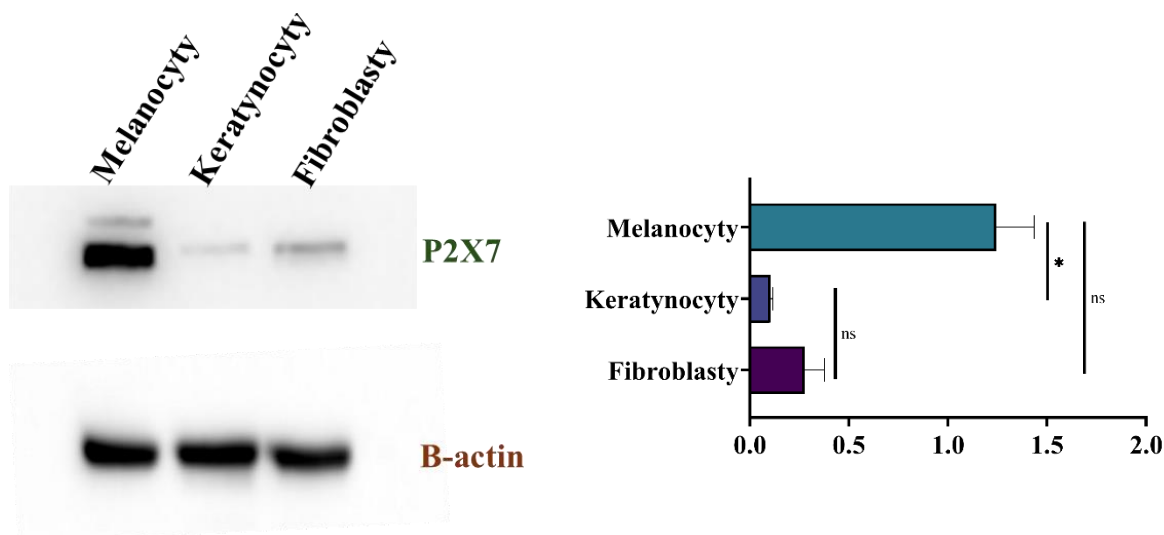


Rycina 11 Porównanie względnej ekspresji *P2RX7* mRNA w pierwotnych komórkach skóry ludzkiej: keratynocytach (n=5), fibroblastach (n=6) i melanocytach (n=5). Poziom względnej ekspresji *P2RX7* mRNA oceniono metodą qRT-PCR, a wykres przedstawia rozrzut pojedynczych wyników wraz z ich medianą. Analiza statystyczna została wykonana z użyciem testu Kruskala-Wallisa i testu post-hoc Dunna’a. **, p= 0.0034.

Poziom względną ekspresji genu P2X7 w melanocytach był dziewięciokrotnie wyższy niż w fibroblastach, jednak różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (Test Kruskala-Wallisa i test post-hoc Dunn'a; $p=0.0725$). Istotną statystycznie okazała się natomiast różnica w poziomie ekspresji genu P2X7 pomiędzy melanocytami i keratynocytami (Test Kruskala-Wallisa i test post-hoc Dunn'a; **, $p=0.0034$), mediana ekspresji w melanocytach wynosiła 4,89 a w keratynocytach $5,2 \times 10^{-2}$. Znacznie niższa była różnica w poziomie ekspresji genu receptora pomiędzy keratynocytami i fibroblastami wyizolowanymi ze zdrowej skóry ludzkiej. W tym przypadku fibroblasty wykazywały wyższym niż keratynocyty poziom ekspresji genu, lecz różnica ta nie była istotna statystycznie (Test Kruskala-Wallisa i test post-hoc Dunn'a, $p=0.7570$).

4.3. Analiza ilości białka P2X7 w wyizolowanych komórkach skóry ludzkiej

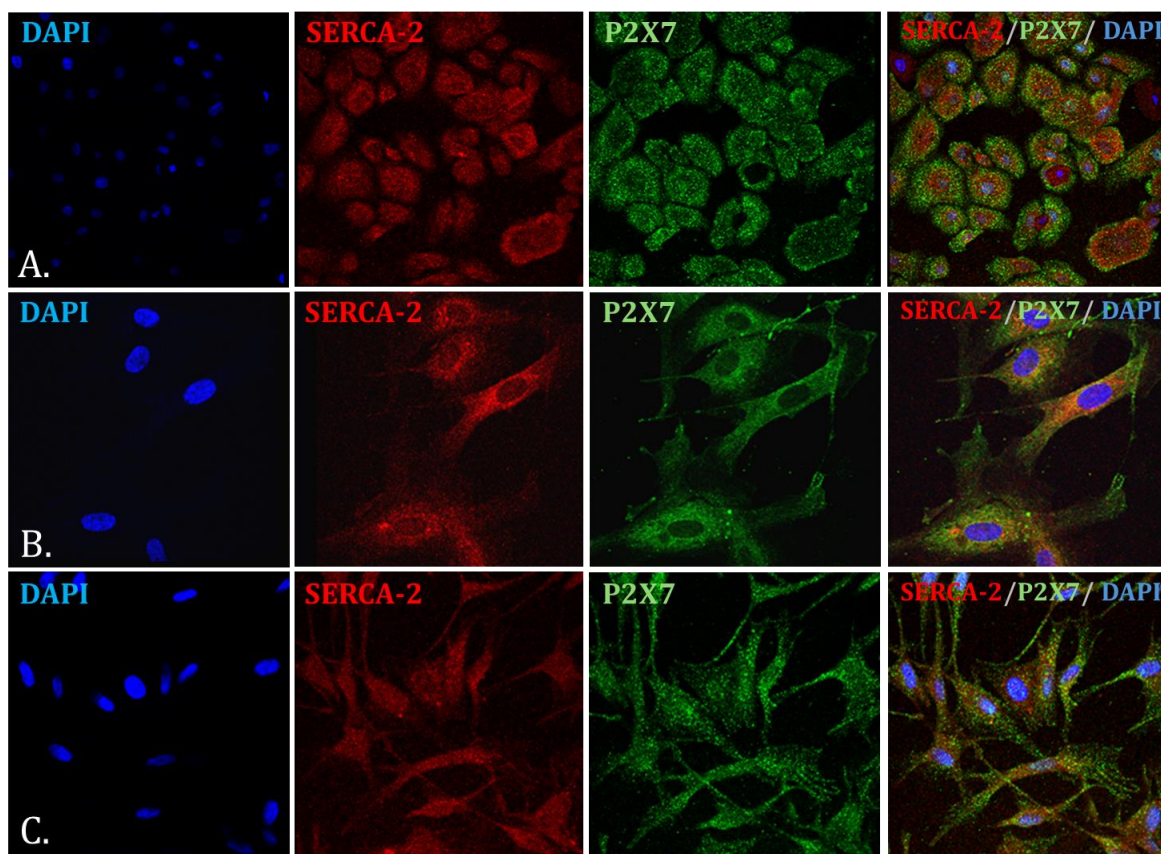
Obecność białka receptora P2X7 potwierdzono przy użyciu metody Western Blot we wszystkich badanych komórkach wyizolowanych ze skóry ludzkiej: melanocytach, keratynocytach i fibroblastach. We wszystkich pierwotnych liniach komórek skóry ludzkiej zaobserwowano sygnał na wysokości około 75 kDa, odpowiadający masie receptora P2X7. Najwyższą intensywność sygnału zaobserwowano w lizatach białkowych wyizolowanych z pierwotnych melanocytów, podczas gdy w lizatach z fibroblastów i keratynocytów była ona wyraźnie niższa. Poziom ekspresji białka referencyjnego β -aktyny (~42 kDa) był porównywalny w próbkach wyizolowanych z wszystkich komórek skóry. Reprezentatywny Western Blot został przedstawiony na rycinie 12. Analiza densytometryczna wykonana dla trzech niezależnych eksperymentów wykazała, że poziom białka receptora P2X7 w ludzkich melanocytach jest ponad dziesięciokrotnie wyższy niż w keratynocytach a wynik ten okazał się istotny statystycznie (Test Kruskala-Wallisa i test post-hoc Dunn'a; *, $p=0.0148$). Różnica w poziomie białka pomiędzy melanocytami a fibroblastami była natomiast pięciokrotnie wyższa, nie jest ona jednak istotna statystycznie (Test Kruskala-Wallisa i test post-hoc Dunn'a, $p=0.3904$). Różnica w poziomie białka receptora pomiędzy keratynocytami i fibroblastami jest znacznie mniejsza- fibroblasty charakteryzują się dwukrotnie większą ilością białka niż keratynocyty (Test Kruskala-Wallisa i test post-hoc Dunn'a, $p=0.6747$).



Rycina 12 Porównanie poziomu białka receptora P2X7 w komórkach wyizolowanych ze skóry ludzkiej: melanocytach, keratynocytach i fibroblastach. Analiza wykonana metodą Western blot, reprezentatywny wynik z trzech niezależnych powtórzeń. Immunoreaktywne prążki o masie około 75 kDa odpowiadają białku receptora P2X7. β -aktyna, białko o masie około 42 kDa została użyta jako białko referencyjne w celu porównania ilości białka w poszczególnych próbkach. Analiza densytometryczna wykonana z trzech niezależnych eksperymentów (n=3).

4.4. Analiza lokalizacji komórkowej receptora P2X7 w pierwotnych ludzkich melanocytach, keratynocytach i fibroblastach

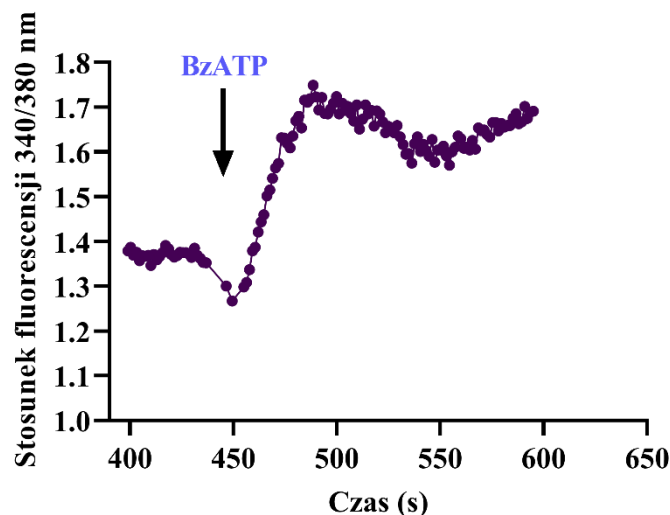
Analiza wykonana z wykorzystaniem barwienia immunofluorescencyjnego wykazała obecność receptora P2X7 we wszystkich typach komórek skóry ludzkiej: melanocytach, fibroblastach i keratynocytach. Na rycinie 13 przedstawiono obrazy uzyskane po zastosowaniu przeciwciał przeciwko P2X7 oraz SERCA2- markera siateczki śródplazmatycznej. Silniejszy sygnał immunofluorescencyjny obserwowano zarówno w błonie komórkowej, jak i w cytoplazmie wszystkich badanych typów komórek skóry. Ponadto zaobserwowano również częściowe nakładanie się sygnałów pochodzących z barwienia dla P2X7 i SERCA2.



Rycina 13 Immunofluorescencyjna analiza ekspresji i lokalizacja receptora P2X7 w komórkach skóry ludzkiej: keratynocytach (A), melanocytach (B), fibroblastach (C). Barwienie immunofluorescencyjne pierwotnych komórek skóry ludzkiej wykonane z użyciem przeciwciał przeciwko P2X7 (zielony) i SERCA2 (czerwony). Jądra komórkowe wybarwione z użyciem DAPI (niebieski). Obrazy uzyskano z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej (powiększenie x20).

4.5. Analiza funkcjonalności receptora P2X7 w pierwotnych ludzkich melanocytach

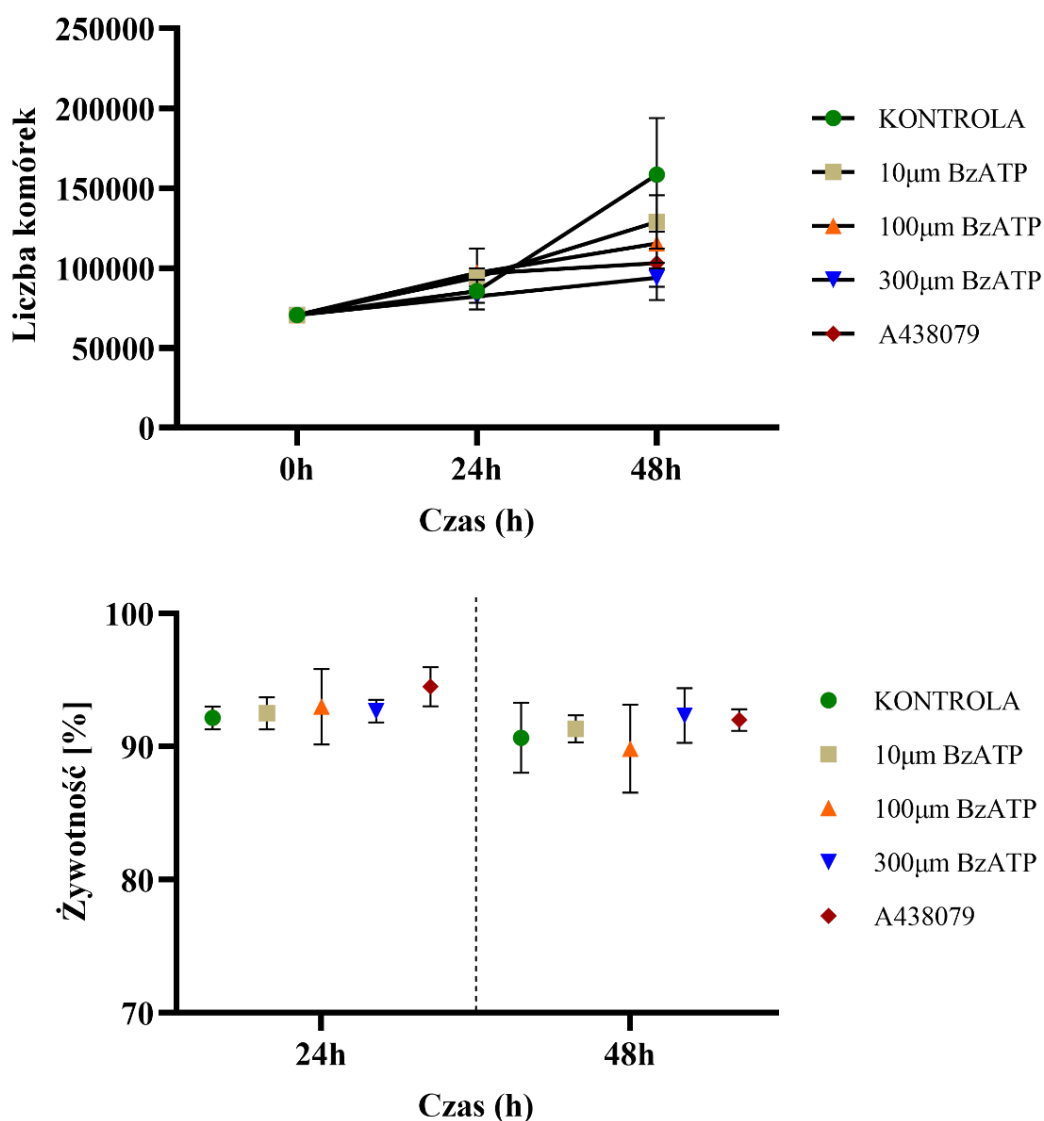
Aktywność receptora P2X7 w pierwotnych melanocytach oceniano na podstawie analizy napływu jonów wapnia do wnętrza komórki po pobudzeniu receptora z użyciem jego syntetycznego agonisty- BzATP. Zmiany stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie mierzono z wykorzystaniem fluorescencyjnej sondy Fura-2. Podanie BzATP skutkowało zwiększeniem sygnału fluorescencji barwnika Fura-2AM w ludzkich pierwotnych melanocytach hodowanych w standardowych warunkach, co zilustrowano na rycinie 14.



Rycina 14 Analiza funkcjonalności receptora P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach. Aktywność receptora oceniana poprzez zmianę stężenia wolnych jonów wapnia po pobudzeniu receptora P2X7 z użyciem BzATP. Strzałka w górnej części wykresu wskazuje moment rozpoczęcia stymulacji receptora poprzez dodanie jego agonisty (BzATP).

4.6. Wpływ aktywacji receptora P2X7 na tempo proliferacji ludzkich pierwotnych melanocytów

Wpływ aktywacji i inhibicji receptora P2X7 na tempo proliferacji ludzkich pierwotnych melanocytów oceniano po 24 i 48 godzinach, mierząc przyrost liczby komórek. Dodatkowo mierzono również żywotność komórek. Dane przedstawione na rycinie 15 wykazują, że 24-godzinna inkubacja zarówno z BzATP, jak i A438079 nie powodowała istotnych zmian w liczebności komórek względem liczebności komórek hodowanych w warunkach kontrolnych. Zaobserwowano natomiast spadek tempa proliferacji komórek po 48-godzinnej stymulacji receptora P2X7, a obserwowany efekt zależny był od użytego stężenia BzATP. Stymulacja komórek z wykorzystaniem BzATP w stężeniu 300 μM zahamowała wzrost melanocytów w największym stopniu w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych. Liczebność komórek po ich stymulacji z BzATP w stężeniu 100 μM była większa niż komórek traktowanych 300 μM . Najmniejszy spadek tempa proliferacji zaobserwowano po zastosowaniu BzATP w stężeniu 10 μM .

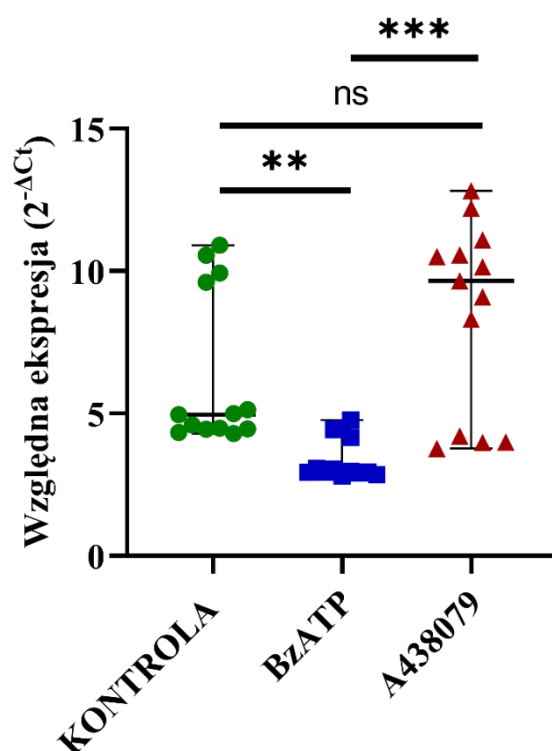


Rycina 15 Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji i żywotność pierwotnych ludzkich melanocytów. Wyniki przedstawiono jako przyrost liczby komórek względem wartości wyjściowej. Punkty oznaczają średnie wartości z 3 niezależnych eksperymentów.

Inkubacja komórek z antagonistą receptora również nie wpłynęła na zmniejszenie tempa ich proliferacji. Nie stwierdzono istotnych różnic w żywotności komórek traktowanych BzATP lub A438079 w porównaniu z komórkami hodowanymi w warunkach kontrolnych, zarówno po 24, jak i 48 godzinach inkubacji. We wszystkich przypadkach utrzymywała się ona na poziomie około 90%, a niewielki spadek zaobserwowano wyłącznie po zastosowaniu BzATP w stężeniu 100 μM po 48 godzinach. Wyniki przedstawiono na rycinie 15.

4.7. Porównanie poziomu ekspresji genu *P2RX7* w pierwotnych ludzkich melanocytach pod wpływem jego aktywacji

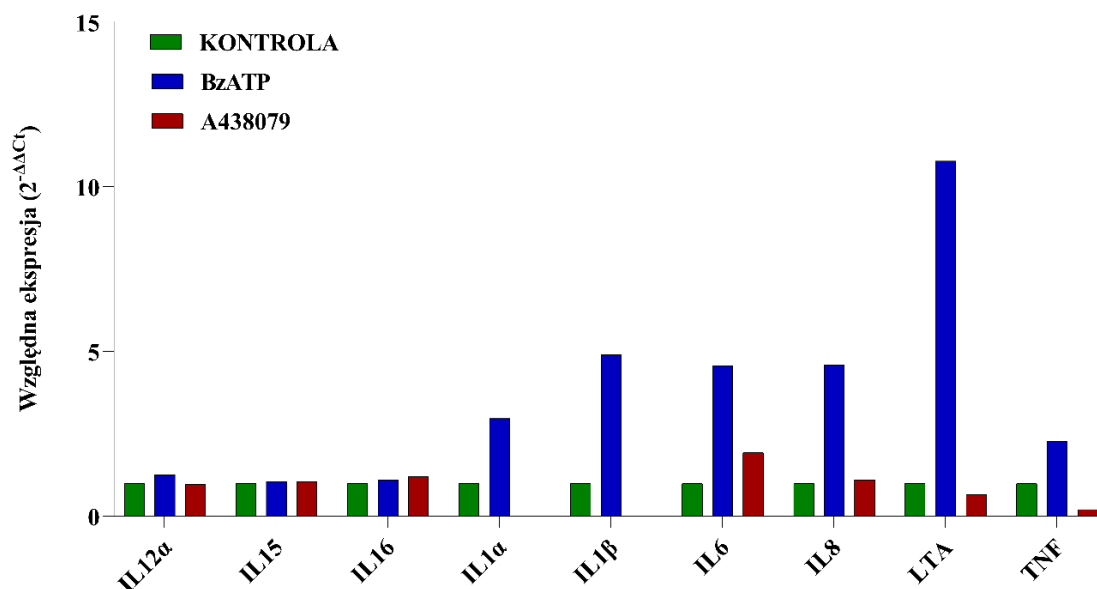
W celu oceny wpływu stymulacji receptora P2X7 na jego własną ekspresję w ludzkich pierwotnych melanocytach komórki te poddawano inkubacji z antagonistą receptora, BzATP. Poziom transkryptu genu P2X7 w melanocytach po stymulacji analizowano z wykorzystaniem metody qRT-PCR. Jak pokazano na rycinie 16, melanocyty eksponowane na BzATP wykazywały istotne obniżenie poziomu ekspresji genu P2X7 względem komórek kontrolnych po 24 godzinach stymulacji. Blokowanie receptora za pomocą inhibitora A438079 prowadziło natomiast do zwiększenia ekspresji P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach, wynik ten jednak nie jest istotny statystycznie (Test Kruskala-Wallisa i test post-hoc Dunn'a, $p > 0,9999$). Różnice w poziomie ekspresji genu P2X7 zaobserwowane pomiędzy grupą kontrolną i komórkami traktowanymi BzATP oraz pomiędzy komórkami inkubowanymi z BzATP i komórkami traktowanymi A438079 były istotne statystycznie (Test Kruskala-Wallisa i test post-hoc Dunn'a, **, $p = 0.0021$; ***, $p = 0.0003$).



Rycina 16 Porównanie względnej ekspresji *P2RX7* mRNA w ludzkich pierwotnych melanocytach ($n=13$) pod wpływem aktywacji i zahamowania funkcji receptora. Poziom względnej ekspresji *P2RX7* mRNA oceniono metodą qRT-PCR, a wykres przedstawia rozrzut pojedynczych wyników wraz z ich medianą. Analiza statystyczna została wykonana z użyciem testu Kruskala-Wallisa i testu post-hoc Dunna'a. **, $p = 0.0021$; ***, $p = 0.0003$.

4.8. Wpływ aktywacji receptora P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach na ekspresję cytokin prozapalnych

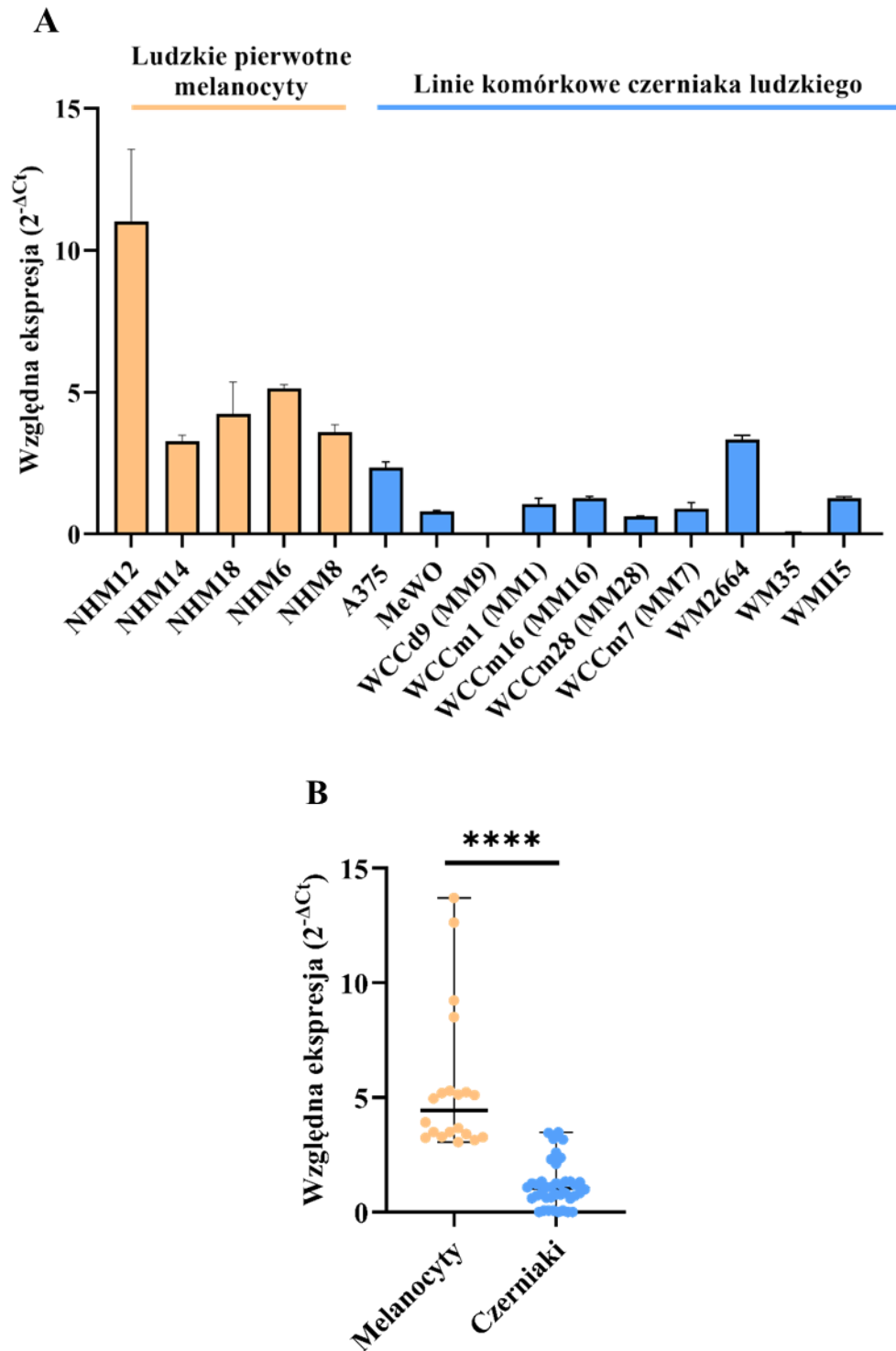
W związku z podwyższonym poziomem ekspresji receptora P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach, przeprowadzono analizę wpływu jego aktywacji i zahamowania jego funkcji na ekspresję cytokin należących do grupy cytokin prozapalnych. W tym celu komórki inkubowano z agonistą (BzATP) i inhibitorem (A438079) receptora P2X7 przez 24 godziny, a następnie mierzono względny poziom ekspresji genów wykorzystaniem TaqMan™ Array, Human Cytokine Network. Analiza ta, której wyniki przedstawiono na rycinie 17 wykazała znaczący wzrost poziomu ekspresji cytokin prozapalnych takich jak IL-1 α IL-1 β , IL-6 oraz IL-8 po stymulacji komórek z użyciem BzATP. Zastosowanie inhibitora P2X7- A438079 wpłynęło na zmniejszenie poziomu ekspresji genów IL-1 α , IL-1 β , ale nie wpłynęło znacząco na poziom ekspresji IL-6 oraz IL-8. Zauważono również wzrost ekspresji TNF- α i limfotoksyny (LTA) po stymulacji BzATP w porównaniu z komórkami kontrolnymi. W przypadku LTA wzrost ekspresji był największy. Aktywacja i inhibicja receptora P2X7 nie miały natomiast znaczącego wpływu na poziom ekspresji cytokin takich jak IL-12 α , IL-15 czy IL-16, a poziom ich ekspresji w ludzkich melanocytach pozostał praktycznie niezmienny niezależnie od zastosowanego traktowania komórek.



Rycina 17 Porównanie względnej ekspresji genów cytokin należących do grupy cytokin prozapalnych w melanocytach wyizolowanych ze zdrowej skóry ludzkiej pod wpływem aktywacji i zahamowania funkcji receptora P2X7. Poziom względnej ekspresji genów oceniano z wykorzystaniem zestawu TaqMan™ Array, Human Cytokine.

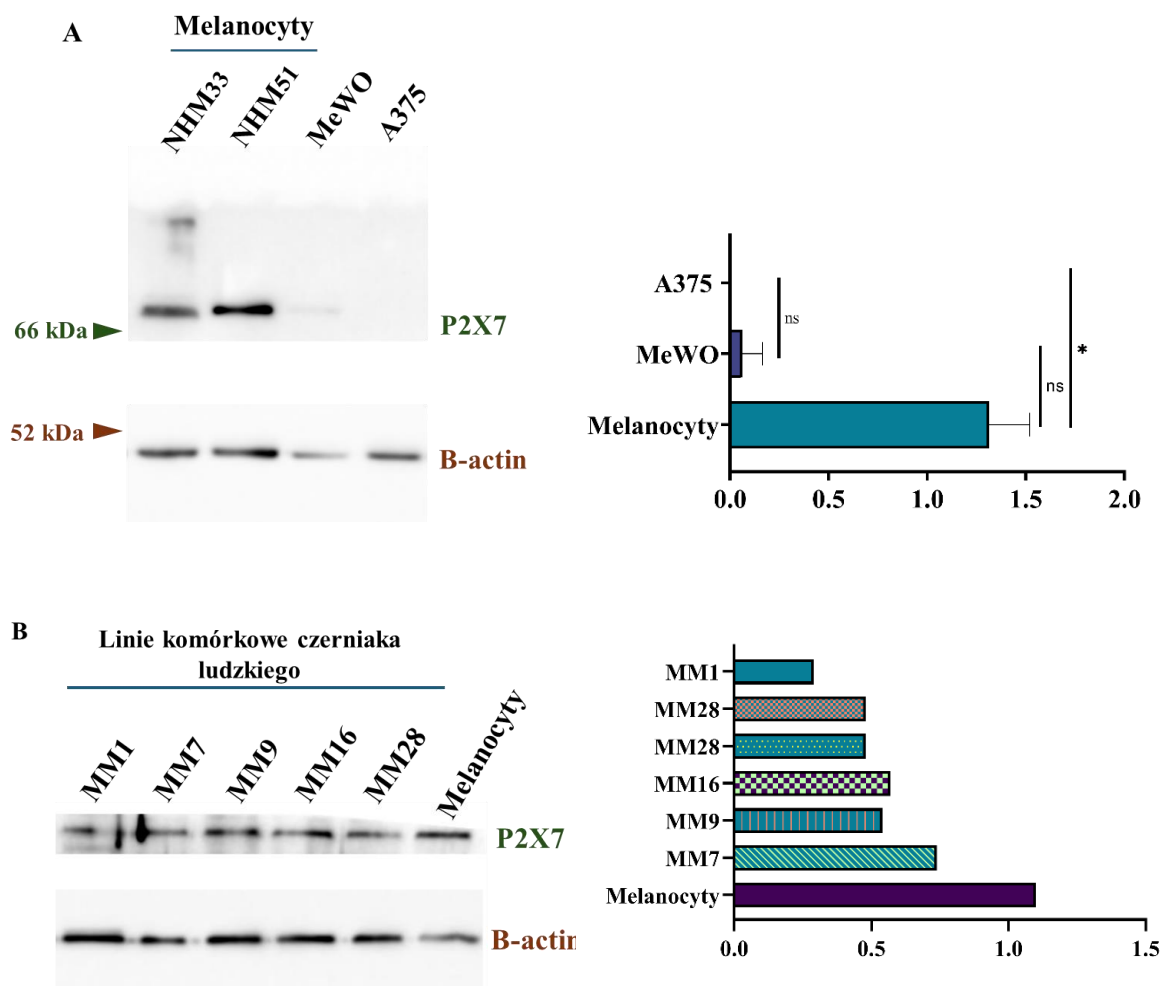
4.9. Porównanie ekspresji genu P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach i komórkach czerniaka

Z uwagi na wysoką ekspresję genu i poziom białka receptora P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach, postanowiono zbadać i porównać jego obecność także w komórkach czerniaka. W tym celu przeanalizowano szereg linii komórkowych, jak również pierwotne komórki czerniaka wyizolowane od pacjentów. Szczegółowe informacje dotyczące wykorzystanych w badaniu komórek czerniaka oraz melanocytów zawarte są w materiałach i metodach. W celu oceny poziomu ekspresji genu P2X7 wykonano analizę qRT-PCR, a następnie porównano wyniki dla komórek czerniaka oraz dla ludzkich melanocytów pierwotnych pochodzących ze zdrowej skóry pięciu osób. Analiza ta potwierdziła ekspresję genu receptora *P2X7* w badanych komórkach czerniaka, co zostało przedstawione na rycinie 18. Przeprowadzona analiza wykazała natomiast obniżoną ekspresję genu P2X7 w komórkach czerniaka w porównaniu do pierwotnych ludzkich melanocytów. Wśród wszystkich analizowanych linii komórkowych czerniaka jedynie linia SKmel1 charakteryzowała się wyższą ekspresją genu P2X7 w porównaniu do badanych melanocytów. Pozostałe komórki czerniaka wykazywały niższą ekspresję genu P2X7, a linie WCCD9 oraz WM35 wykazywały najniższą ekspresję tego genu spośród wszystkich badanych linii komórkowych czerniaka. Jak przedstawiono na rycinie 18B w zgrupowanej analizie ekspresja genu P2X7 w komórkach czerniaka była ponad dwukrotnie niższa niż w pierwotnych wyizolowanych melanocytach, a otrzymana różnica była istotna statystycznie (test Manna-Whitneya, ****, $p < 0.0001$).



Rycina 18 Porównanie względnej ekspresji genu P2X7 w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego i melanocytach wyizolowanych ze zdrowej skóry ludzkiej. **A)** Wyniki analizy ekspresji genu P2X7 wykonane metodą qRT-PCR dla ludzkich melanocytów wyizolowanych od pięciu pacjentów (NHM6, 8, 12, 14 i 18) oraz 11 linii komórkowych czerniaka ludzkiego. **B)** Zgrupowany wynik analizy ekspresji genu P2X7 dla ludzkich pierwotnych melanocytów pochodzących od zdrowych dawców oraz linii komórkowych czerniaka ludzkiego pochodzących z różnych stadiów chorobowych. Poziomą względną ekspresję *P2RX7* mRNA oceniono metodą qRT-PCR, a wykres przedstawia rozrzut pojedynczych wyników wraz z ich medianą. Analiza statystyczna została wykonana z użyciem testu Manna-Whitneya. ****, $p < 0.0001$.

Analiza poziomu białka receptora P2X7 za pomocą metody Western Blot przeprowadzona dla dwóch linii komórkowych czerniaka (MeWO i A375) oraz melanocytów wyizolowanych z naskórka zdrowej skóry ludzkiej wykazała znaczące różnice w jego ilości pomiędzy tymi komórkami. W linii komórkowej MeWO oraz ludzkich pierwotnych melanocytach zaobserwowano sygnał na wysokości około 75 kDa, który odpowiada masie receptora P2X7. Jednak intensywność sygnału była wyraźnie wyższa w pierwotnych melanocytach. Natomiast komórki linii A375 nie wykazywały ekspresji białka receptora P2X7 na wykrywalnym w tej metodzie poziomie.

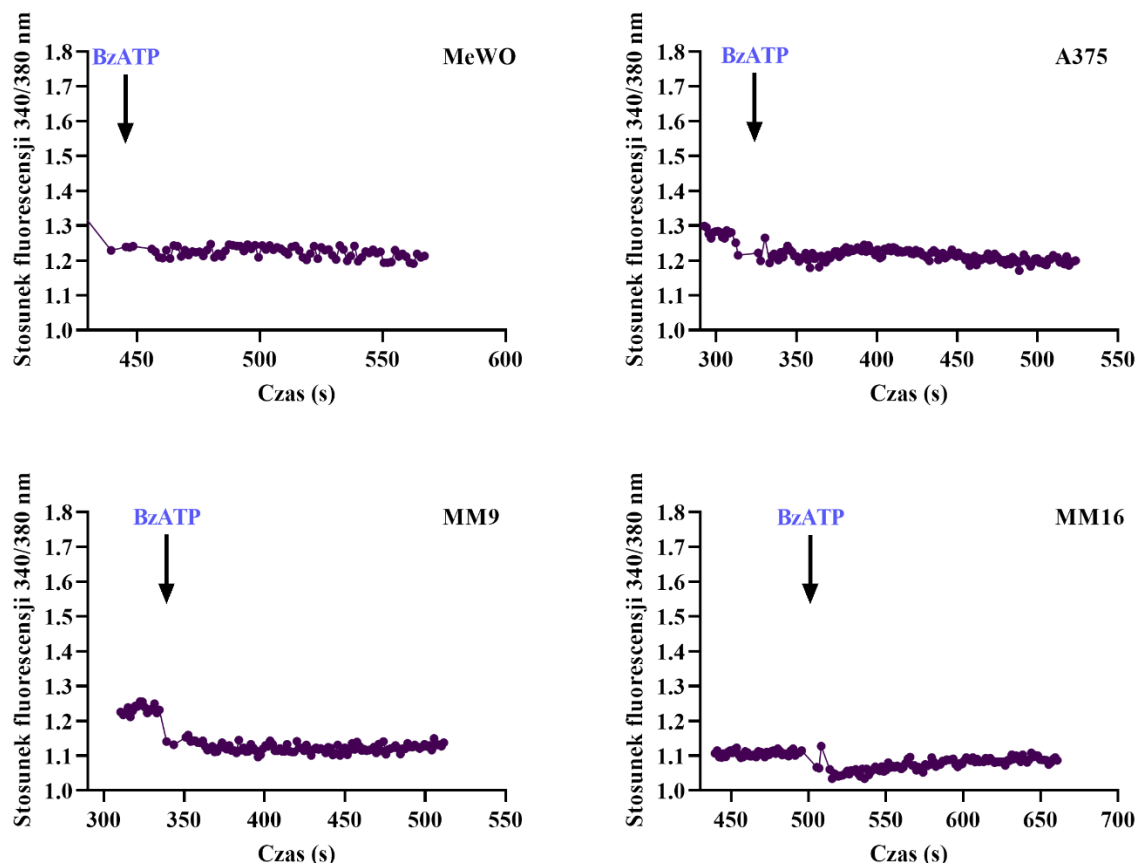


Rycina 19 Porównanie poziomu białka receptora P2X7 w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego oraz pierwotnych melanocytach wyizolowanych ze zdrowej skóry ludzkiej. Immunoreaktywne prążki o masie około 75 kDa odpowiadają białku receptora P2X7. β -aktyna, białko o masie około 42 kDa została użyta jako białko referencyjne w celu porównania ilości białka w poszczególnych próbkach. (A) Porównanie poziomu białka w ustalonych liniach czerniaka i melanocytach. (B) Porównanie poziomu białka w pierwotnych komórkach czerniaka i melanocytach.

Reprezentatywny Western blot został przedstawiony na rycinie 19A, a analiza densytometryczna wykonana z trzech niezależnych powtórzeń wykazała ponad sześciokrotnie większą zawartość białka w melanocytach względem komórek czerniaka. Wynik uzyskany dla różnicy w ilości białka pomiędzy melanocytami a komórkami linii A375 był istotny statystycznie (Test Kruskala-Wallisa i testu post-hoc Dunna'a; *, $p=0.0429$). Dodatkowo, analiza Western Blot dla pierwotnych komórek czerniaka (MM1, MM7, MM9, MM16, MM28) również potwierdziła wyższy poziom białka receptora P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach w porównaniu z każdą z badanych pierwotnych linii czerniaka (rycina 19B). We wszystkich pierwotnych liniach komórkowych czerniaka odnotowano sygnał o masie ok. 75 kDa i zbliżonej intensywności, z wyjątkiem linii MM1, w której poziom białka P2X7 był niższy niż w pozostałych liniach.

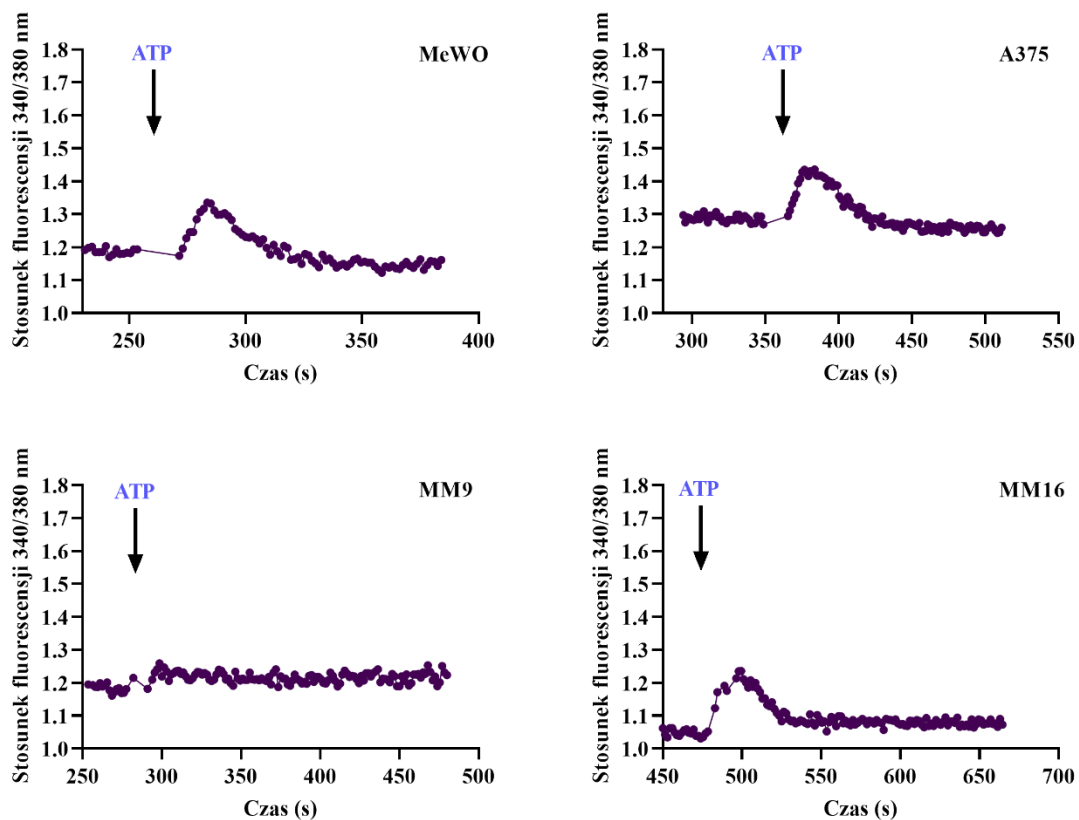
4.10. Analiza funkcjonalności receptora P2X7 w komórkach czerniaka ludzkiego

W celu weryfikacji funkcjonalności receptora P2X7 w komórkach czerniaka przeprowadzono analizę napływu wolnych jonów wapnia do wnętrza komórki w komórkach ustalonych linii komórkowych czerniaka ludzkiego A375 i MeWO, a także w komórkach wyizolowanych z czerniaka ludzkiego, MM9 i MM16 po ich stymulacji z użyciem BzATP. Analiza ta wykazała, że badane linie komórkowe czerniaka, zarówno ustalone jak i pierwotne nie wykazywały aktywności receptora P2X7 w odpowiedzi na jego stymulację z użyciem specyficznego dla P2X7 agonisty. Jak pokazano na rycinie 20, dla żadnej z linii nie odnotowano zwiększonego sygnału fluorescencji barwnika Fura-2 po podaniu BzATP.



Rycina 20 Analiza funkcjonalności receptora P2X7 badana na podstawie napływu jonów wapnia do wnętrza komórki w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego po stymulacji receptora P2X7 z użyciem BzATP. Strzałka w górnej części wykresu wskazuje moment rozpoczęcia stymulacji receptora poprzez dodanie jego agonisty.

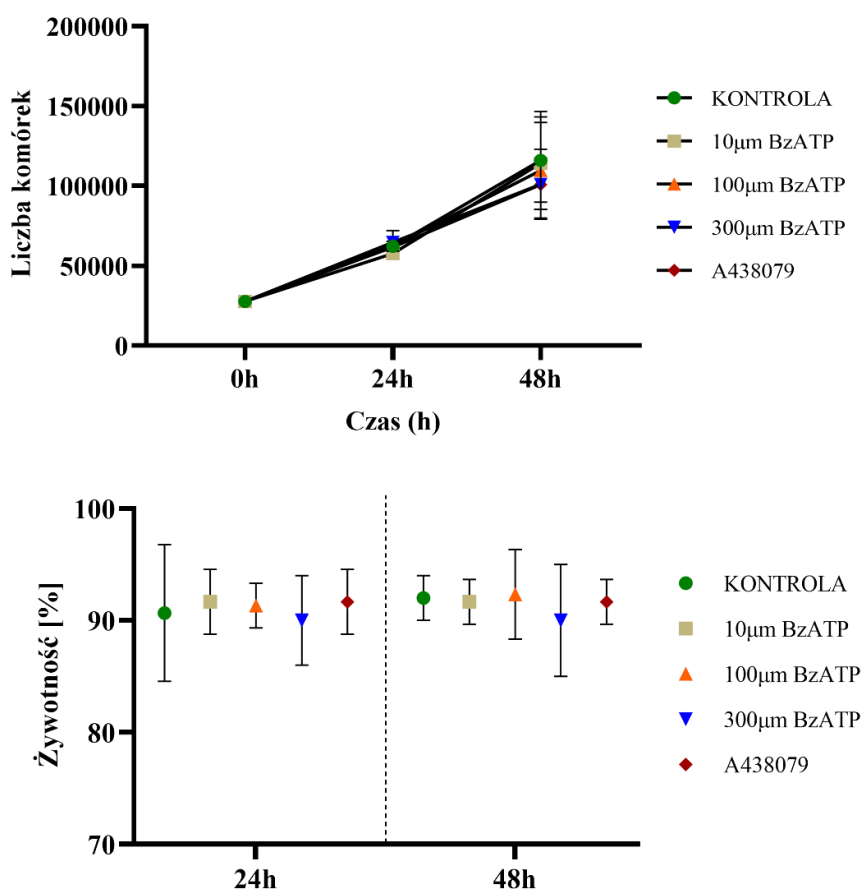
Wykonano również dodatkowe pomiary odpowiedzi wapniowej w komórkach czerniaka z wykorzystaniem naturalnego agonisty- ATP. W badaniu zaobserwowano, że zarówno ustalone linie komórkowe czerniaka A375 i MeWO, jak i pierwotna linia komórkowa MM16 odpowiadały na stymulację komórek z użyciem ATP. Dla tych komórek odnotowano zwiększenie sygnału fluorescencji barwnika Fura-2 po dodaniu ATP, co przedstawiono na rycinie 21. Co więcej, linie A375, MeWO i MM16 charakteryzowały się podobnym poziomem intensywności sygnału fluorescencji badanej w odpowiedzi na podanie ATP. Jak pokazano na rycinie 21, linia komórkowa MM9 nie wykazywała natomiast zmian w sygnale fluorescencji barwnika Fura-2, co świadczy o braku aktywacji receptora w tych komórkach w odpowiedzi na ATP.



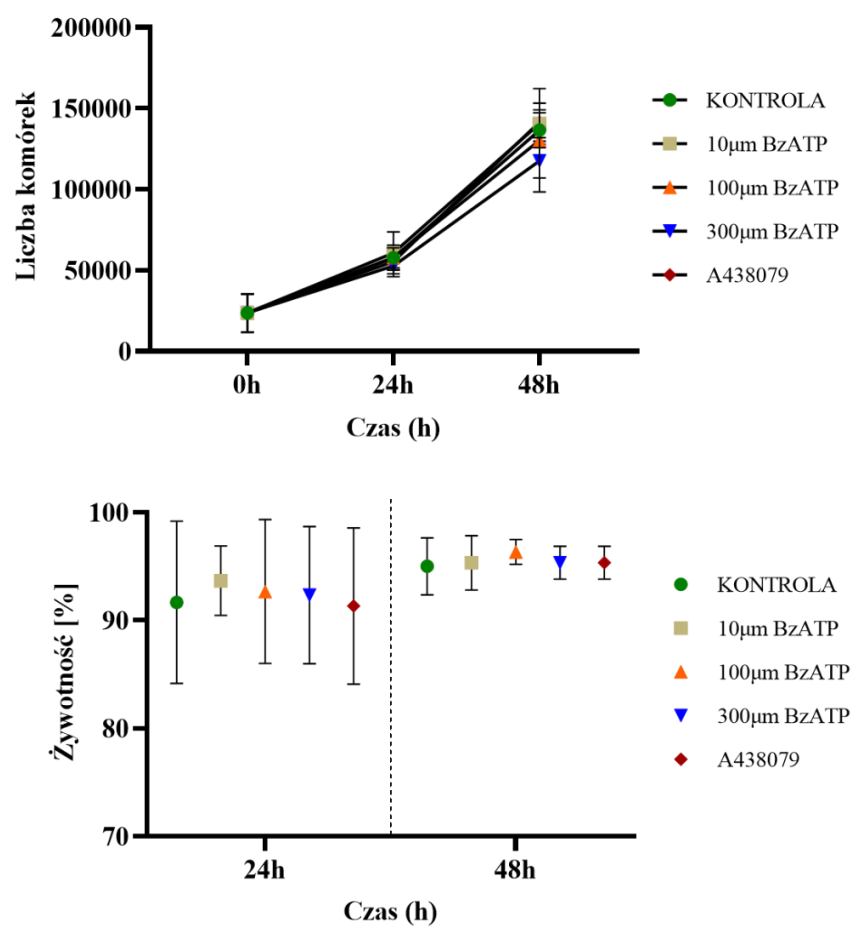
Rycina 21 Analiza funkcjonalności receptora P2X7 w ustalonych liniach komórkowych czerniaka ludzkiego, A375 i MeWO. Aktywność receptora oceniana poprzez zmianę stężenia wolnych jonów wapnia po pobudzeniu receptora P2X7 z użyciem BzATP. Strzałka w górnej części wykresu wskazuje moment rozpoczęcia stymulacji receptora poprzez dodanie jego agonisty (BzATP).

4.11. Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji komórek czerniaka

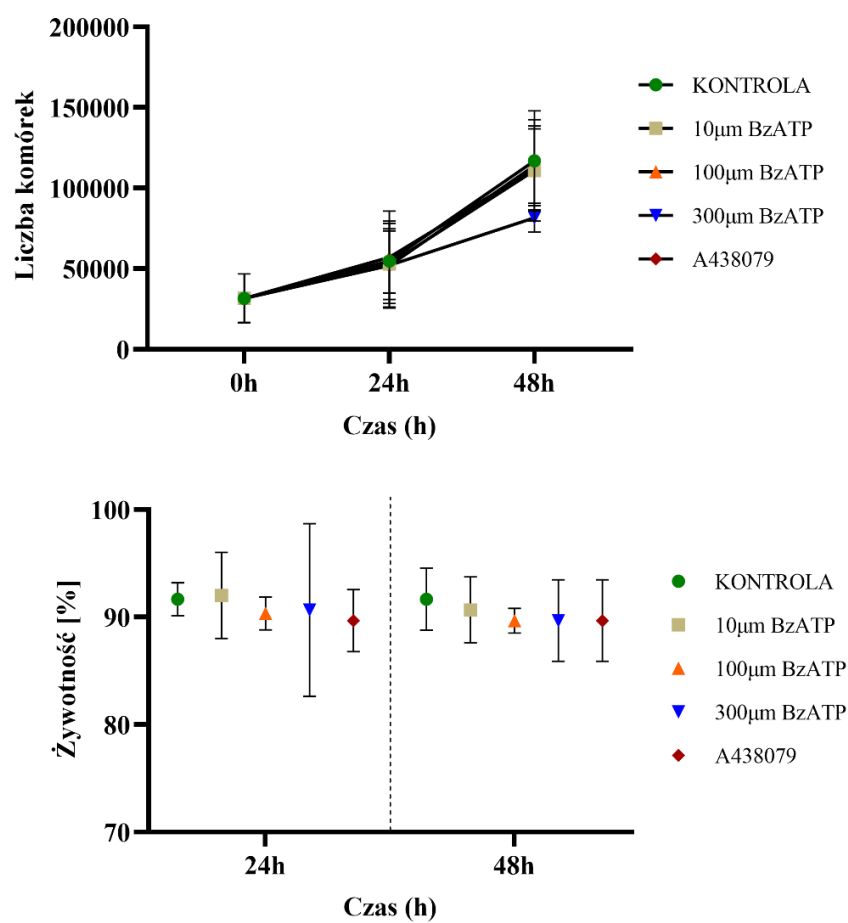
Wpływ pobudzania receptora P2X7 na tempo proliferacji linii komórkowych czerniaka ludzkiego oceniano po 24 i 48 godzinach inkubacji, mierząc przyrost liczby komórek. Dodatkowo, analizowano również wpływ stymulacji receptora na żywotność komórek badanych linii komórkowych. W przypadku wszystkich badanych linii komórkowych (MeWo, MM16 i MM9) ani 24-, ani 48-godzinna inkubacja z BzATP (10 lub 300 μ M) bądź antagonistą A438079 nie powodowała istotnych zmian w liczebności i żywotności komórek w porównaniu z kontrolą. Dane te przedstawiono na rycinach 22, 23 i 24. Po 48 godzinach inkubacji w grupie traktowanej 300 μ M BzATP zaobserwowano jedynie tendencję do obniżonego przyrostu liczby komórek, jednak różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej. Tendencja ta najwyraźniej widoczna jest dla linii MM9.



Rycina 22 Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji i żywotność komórek czerniaka linii MeWO. Wyniki przedstawiono jako przyrost liczby komórek względem wartości wyjściowej. Punkty oznaczają średnie wartości z 3 niezależnych eksperymentów.



Rycina 23 Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji i żywotność komórek czerniaka linii MM16. Wyniki przedstawiono jako przyrost liczby komórek względem wartości wyjściowej. Punkty oznaczają średnie wartości z 3 niezależnych eksperymentów.



Rycina 24. Wpływ stymulacji receptora P2X7 na tempo proliferacji i żywotność komórek czerniaka linii MM9. Wyniki przedstawiono jako przyrost liczby komórek względem wartości wyjściowej. Punkty oznaczają średnie wartości z 3 niezależnych eksperymentów.

5. Dyskusja

Pomimo intensywnych badań prowadzonych nad rolą receptora P2X7 na całym świecie jego funkcja w komórkach skóry nadal pozostaje niejasna. Jedynie niewielka liczba dostępnych prac naukowych skupia się na występowaniu receptora P2X7 i jego znaczeniu w procesach fizjologicznych i patologicznych w skórze. Co więcej, dostępne dane literaturowe bywają sprzeczne, wskazując zarówno na jego działania wspierające procesy patologiczne jak i udział w fizjologicznych funkcjach komórek. Niniejsza praca po raz pierwszy pokazuje porównanie ekspresji receptora P2X7 w komórkach wyizolowanych ze skóry, zwracając jednocześnie uwagę na znacznie wyższą jego ekspresję w melanocytach, zarówno w odniesieniu do innych komórek skóry ludzkiej jak i komórek czerniaka ludzkiego. Obserwacja ta sugeruje, że receptor ten może odgrywać szczególnie istotną rolę właśnie w melanocytach.

Analizę roli receptora w komórkach skóry rozpoczęto od zidentyfikowania jego lokalizacji w skórze ludzkiej. W tym celu wykonano barwienia immunofluorescencyjne które potwierdziły obecność receptora w skórze ludzkiej pobieranej od zdrowych pacjentów, a zwiększony sygnał dla przeciwciała przeciwko receptorowi P2X7 zaobserwowano głównie w naskórku. W jego powierzchniowych warstwach, sygnał ten nakładał się na sygnał pochodzący z barwienia inwolukryny, wykorzystywanej jako marker różnicowania keratynocytów. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których barwienia immunofluorescencyjne oraz immunohistochemiczne, stosowane do określenia lokalizacji receptora P2X7 w zdrowej i zmienionej chorobowo skórze, wykazywały jego ekspresję w naskórku zdrowej skóry człowieka. Ponadto, wyniki wszystkich dostępnych badań wskazują również na podwyższoną ekspresję receptora w patologicznych stanach skóry, sugerując jego udział w patogenezie chorób, m.in. trądziku odwróconego, choroby Haileya-Haileya oraz choroby Dariera [119, 120]. Warto podkreślić, że wcześniejsze badania wskazywały na zwiększoną ekspresję receptora głównie w powierzchniowych warstwach naskórka, sugerując jego udział w procesach różnicowania i apoptozy keratynocytów, które są najliczniej występującym typem komórek w naskórku [121] [94]. W prezentowanej pracy wykazano natomiast obecność receptora P2X7 także w głębszych warstwach naskórka, z wyraźniejszym sygnałem w warstwie podstawnej, a w niewielkim stopniu również w skórze właściwej.

W kolejnym kroku zdecydowano się sprawdzić ekspresję receptora w komórkach skóry i porównać jej poziom pomiędzy poszczególnymi typami komórek. We wszystkich badanych

populacjach- pierwotnych keratynocytach, fibroblastach i melanocytach potwierdzono obecność transkryptu genu *P2X7* oraz jego białka. Wyniki te są spójne z wcześniejszymi obserwacjami opisywanymi w literaturze. Inoue i współpracownicy przedstawili dane dla ludzkich keratynocytów, które potwierdzają ekspresję genów wielu receptorów purynergicznym, w tym również *P2RX7* [122]. Co więcej, obecność *P2X7* w keratynocytach wyizolowanych ze skóry ludzkiej potwierdzona została w pracy Georgiou i wsp. także z wykorzystaniem cytometrii przepływowej [107], a praca ta potwierdziła również funkcjonalność receptora w tych komórkach. Ekspresję genu *P2X7* potwierdzono także w fibroblastach wyizolowanych ze skóry ludzkiej [107], a obecność białka receptora w tych komórkach potwierdziła w swoich badaniach Flores-Muñoz [92]. Z uwagi na rozpowszechnione występowanie fibroblastów w organizmie warto zauważyć, że ekspresję genu *P2X7* zaobserwowano również w fibroblastach pochodzących z innych tkanek, m.in. jelit czy dziąseł [123, 124]. W 2019 roku Lee i wsp. zbadali ekspresję genów różnych receptorów purynergicznym w ludzkich pierwotnych melanocytach i jako pierwsi wykazali obecność receptora *P2X7* w tych komórkach [2]. Obecność tego receptora na poziomie białkowym została następnie potwierdzona w badaniach, w których analizowano rolę jego antagonisty, AZD-9056 w procesie melanogenezy [105].

Istotnym spostrzeżeniem uzyskanym w niniejszej pracy jest natomiast fakt, że zarówno poziom ekspresji mRNA, jak i ilość białka receptora *P2X7* różniły się w zależności od typu komórek. Należy podkreślić, że dotychczas w literaturze nie przedstawiono analogicznego porównania. Jak wykazano, ludzkie pierwotne melanocyty w porównaniu zarówno z fibroblastami jak i keratynocytami charakteryzują się znacznie wyższą względną ekspresją genu receptora *P2X7*. Ponadto, również na poziomie białka to właśnie melanocyty wykazują największy jego poziom w porównaniu do pozostałych typów komórek. Może to zatem świadczyć o istotnej roli tego receptora w melanocytach.

Dotychczasowe publikacje poświęcone temu zagadnieniu koncentrują się głównie na znaczeniu receptora w procesie melanogenezy [2, 105]. Wiadomo, że stężenie ATP w przestrzeni międzykomórkowej w warunkach fizjologicznych jest niskie, natomiast wzrasta w odpowiedzi na uszkodzenia tkanki, śmierć komórkową czy proces zapalny. Z tego względu zewnątrzkomórkowy ATP uznawany jest jako wzorzec molekularny towarzyszący uszkodzeniom (DAMP; *ang. damage-associated molecular pattern*) [125, 126]. Mając na uwadze obserwowaną w niniejszej pracy zwiększoną ekspresję receptora *P2X7*, reagującego właśnie na zewnątrzkomórkowy ATP, można przypuszczać również, że komórki te odgrywają

niezwykle istotną rolę w odpowiedzi na uszkodzenia, które są sygnalizowane poprzez DAMPs. Funkcja ta nie została jednak dotychczas zbadana i nie ma dostępnej wiedzy literaturowej w tym temacie. Ponadto, przeprowadzone barwienie immunofluorescencyjne wykazało obecność receptora P2X7 w błonie komórkowej oraz cytoplazmie keratynocytów, fibroblastów i melanocytów. Zaobserwowano także częściowe nakładanie się sygnału receptora P2X7 z markerem siateczki śródplazmatycznej SERCA-2, co może wskazywać na jego lokalizację również w obrębie siateczki śródplazmatycznej. Tego rodzaju nietypowa lokalizacja receptora, poza błoną komórkową, została wcześniej opisana również w komórkach pochodzących z krążków międzykręgowych, osteoblastach oraz chondrocytach przez Penolazzi i wsp. Autorzy tej pracy sugerują, że taka dystrybucja przestrzenna P2X7R może wskazywać na jego potencjalną rolę w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej lub jako formę rezerwy receptora przed jego translokacją do błony komórkowej [127].

Wobec uzyskanych wyników wskazujących na zwiększoną ekspresję receptora P2X7 w melanocytach to właśnie na tych komórkach przeprowadzono dalsze analizy mające na celu weryfikację funkcjonalności receptora. W tym celu oceniono wpływ pobudzenia receptora syntetycznym agonistą (BzATP) na wewnątrzkomórkowe stężenie wolnych jonów wapnia w pierwotnych ludzkich melanocytach. Przeprowadzone badania wykazały, że podanie BzATP indukowało napływ jonów wapnia do wnętrza komórek, co było odnotowane poprzez zwiększony sygnał fluorescencyjny barwnika Fura-2AM. Uzyskane wyniki zatem jednoznacznie dowodzą, iż receptor P2X7 obecny w melanocytach wyizolowanych ze skóry ludzkiej wykazuje aktywność kanału jonowego, a wynik ten pozostaje zgodny z dostępnymi danymi literaturowymi. Dotychczas jedynie Lee i wsp. opisali badania dotyczące funkcjonalności tego receptora w melanocytach, wykorzystując bezpośredni pomiar stężenia jonów wapnia. Autorzy zastosowali tę samą technikę badawczą opartą na barwniku fluorescencyjnym Fura-2AM, przy czym do stymulacji komórek użyto ATP, a specyficzność odpowiedzi receptora P2X7 potwierdzono za pomocą selektywnego inhibitora A438079 [2].

W kolejnym etapie sprawdzono wpływ aktywacji i inhibicji receptora P2X7 na tempo proliferacji melanocytów oraz ich żywotność. Komórki poddano inkubacji z agonistą receptora, BzATP przez 24 i 48 godzin, po czym mierzono przyrost ich liczby przy użyciu licznika komórek ADAM oraz oceniano ich żywotność. Mając na uwadze, że aktywacja P2X7 może również zachodzić spontanicznie w warunkach hodowli komórkowej, równolegle przeprowadzono również doświadczenia z inhibitorem A438079, w celu określenia efektu blokowania P2X7. Uzyskane wyniki wskazują, że po 24 godzinach inkubacji nie obserwowano

istotnych zmian w proliferacji komórek. Odnotowano jednak, że przedłożona inkubacja wpływa natomiast na spadek tempa proliferacji, który dodatkowo zależny był od dawki BzATP. Najsilniejszy efekt hamujący proliferację wystąpił po podaniu BzATP w stężeniu 300 μ M, najslabszy natomiast przy stężeniu 10 μ M. Choć różnice te nie osiągnęły istotności statystycznej, w wynikach tych zauważalny jest wyraźny trend. W przypadku żywotności komórek, zarówno aktywacja receptora BzATP, jak i jego inhibicja za pomocą A438079 nie powodowały istotnych zmian. Należy podkreślić, że w dostępnej literaturze brak jest jakichkolwiek doniesień dotyczących wpływu aktywacji bądź blokowania funkcji receptora P2X7 na proliferację czy żywotność melanocytów. Większość dostępnych danych literaturowych dotyczy wpływu receptora P2X7 na proliferację komórek nowotworowych, podczas gdy znacznie mniej badań analizuje to zagadnienie w odniesieniu do zdrowych komórek. Co więcej, badania te najczęściej prowadzone są na komórkach wyizolowanych z modeli zwierzęcych, a ich wyniki są bardzo zróżnicowane. Przykładowo, Song i wsp. wykazali, że podanie ATP zwiększa tempo proliferacji pierwotnych szczurzych komórek Schwanna, a efekt ten ulega zahamowaniu po zastosowaniu antagonisty receptora P2X7 (A740003), co wskazuje na jego udział w odpowiedzi komórek na ATP [128]. Odmienny rezultat uzyskali Wang i wsp., obserwując w mysich komórkach lutealnych zmniejszenie tempa proliferacji oraz spadek żywotności po traktowaniu zarówno ATP i BzATP [129].

Zauważalny trend we wpływie aktywacji receptora P2X7 na tempo wzrostu melanocytów spowodował zainteresowanie wpływem aktywacji lub inhibicji receptora na jego własną ekspresję. Przeprowadzone badania wykazały hamujący wpływ BzATP na ekspresję receptora P2X7 w ludzkich pierwotnych melanocytach. Wynik ten może wskazywać na mechanizm ochronny komórek używanych w przypadku zwiększonego stężenia zewnątrzkomórkowego ATP, a więc w przypadku stanu wymagającego sygnalizacji poprzez DAMP. Co ciekawe, użycie antagonisty receptora A438079 miało zupełnie odwrotny, stymulujący wpływ na jego ekspresję. Podobne zjawisko zaobserwowano w modelowej linii makrofagów mysich RAW 264.7, gdzie przedłużona inkubacja komórek z ATP prowadziła do spadku ekspresji receptora P2X7 na powierzchni komórkowej oraz osłabienia jego aktywności. Efekt ten okazał się jednak odwracalny, a po nocnej inkubacji komórek w warunkach bez ATP ekspresja receptora i jego funkcjonalność ulegały ponownemu zwiększeniu [130]. Odmienne wyniki uzyskali Ziberi i wsp., którzy wykazali, że stymulacja receptora P2X7 przy użyciu BzATP prowadzi do zwiększenia jego ekspresji w komórkach macierzystych glejaka wielopostaciowego. Autorzy

odnotowali wzrost poziomu zarówno pełnej izoformy P2X7A, jak i skróconej izoformy P2X7B, pozbawionej zdolności do formowania dużego pora [131].

Dostępne dane naukowe wskazują, że melanocyty, poza swoją podstawową rolą w pigmentacji skóry, mogą również aktywnie uczestniczyć w odpowiedzi odpornościowej. Liczne badania dowodzą, że na ich powierzchni obecne są białka odgrywające istotną rolę w procesach odpornościowych [132]. W tym kontekście wiele doniesień opisuje wpływ różnych cytokin na melanocyty, w tym głównie w odniesieniu do procesu melanogenezy [133, 134]. Co istotne, pobudzone melanocyty same są zdolne do produkcji i sekrecji cząsteczek sygnalizacyjnych, które mogą oddziaływać zarówno na inne komórki naskórka, jak i same melanocyty [135]. Można zatem sądzić, że komórki te odgrywają rolę lokalnego sensora i biorą udział w odpowiedzi odpornościowej. W związku z tym, że ATP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej odgrywa rolę nośnika informacji i uznawany jest jako DAMP postanowiono zweryfikować wpływ aktywacji receptora na ekspresję cytokin prozapalnych w ludzkich pierwotnych melanocytach. W tym celu komórki inkubowano przez 24 godziny z BzATP lub inhibitorem A4382079. W otrzymanych wynikach zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji cytokin prozapalnych (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α), chemokiny IL-8 a także limfotoksyny (LTA) po stymulacji komórek BzATP. Choć w literaturze nie odnotowano bezpośrednio podobnych wyników, uzyskane obserwacje można uznać za zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi melanocytów, które po pobudzeniu różnymi czynnikami wykazywały zwiększoną ekspresję i produkcję cytokin prozapalnych. Ekspresja interleukin IL-1 α , IL-1 β , IL-6 oraz TNF- α w melanocytach została potwierdzona we wcześniejszych badaniach, przy czym poziom tej ekspresji był niższy niż w komórkach czerniaka [136].

Dotychczasowe badania potwierdziły również zwiększone wydzielanie cytokin prozapalnych przez melanocyty pod wpływem różnych czynników. Przykładowo, Silveira i wsp. wykazali, że promieniowanie UV indukuje w melanocytach wydzielanie IL-1 α i TNF- α , które są głównymi cytokinami prozapalnymi produkowanymi we wczesnej odpowiedzi komórkowej na bodźce zapalne. IL-1 α i TNF- α aktywują następnie komórki do produkcji wtórnych cytokin prozapalnych, w tym IL-6 i IL-8 [137, 138]. Znacząca liczba prac skupia się na możliwej roli melanocytów w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne czy wirusowe. Jak wykazano w pracy Tam i wsp. melanocyty wykazują zwiększoną ekspresję szeregu cytokin prozapalnych pod wpływem ich stymulacji lipopolisacharydem, składnika ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych [135]. W innej z prac wykazano, że analog wirusowego dsDNA znacząco zwiększając ekspresję cytokin prozapalnych w melanocytach, w tym IL-6, IL-8, i TNF- α . Rola

opisywanych cytokin prozapalnych w skórze jest niezwykle istotna, TNF α może odgrywać krytyczną rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych takich jak łuszczyca [139]. A badacze sugerują również udział melanocytów w patogenezie łuszczycy poprzez sekrecję prozapalnych cytokin i aktywację keratynocytów [140]. IL-8 natomiast, która bierze udział w ostrej odpowiedzi zapalnej *in vivo* i wykazuje aktywność chemotaktyczną w stosunku do neutrofilów, limfocytów T, fibroblastów, komórek śródbłoka a także melanocytów. Miniati i wsp. zaobserwowali zwiększone wydzielanie IL-8 w odpowiedzi na TNF- α i IL-1 β i zwiększoną ekspresję tej cytokiny u pacjentów z bielactwem [141]. Szereg badań podkreśla znaczący wpływ IL-6 na biologię melanocytów, w tym na ich proliferację i proces melanogenezy [142]. Można wnioskować zatem, że otrzymany w niniejszej pracy wynik sugeruje istotną rolę receptora P2X7 w odpowiedzi odpornościowej w skórze, regulowanej przez melanocyty.

Z uwagi na stwierdzoną wysoką ekspresję oraz funkcjonalność receptora P2X7 w melanocytach, kolejnym krokiem była analiza porównawcza ekspresji tego receptora w melanocytach i komórkach czerniaka. Czerniaki są złośliwymi nowotworami skóry, które rozwijają się z melanocytów, wyspecjalizowanych komórek odpowiedzialnych za pigmentację zlokalizowanych głównie w naskórku. Czerniaki uznawane są za najgroźniejszą postać nowotworu skóry i choć stanowią jedynie około 1% wszystkich przypadków raka skóry, odpowiadają za aż 80% wszystkich zgonów z ich powodu [143]. W przeciwieństwie do wielu innych nowotworów, których zachorowalność w ostatnich latach maleje, częstość występowania czerniaka systematycznie rośnie na całym świecie. W 2020 roku odnotowano 325 000 nowych zachorowań, co oznacza wzrost o 41% w porównaniu z rokiem 2012, kiedy liczba ta wynosiła 230 000 [144]. Dodatkowo, rola receptora P2X7 w nowotworach, choć badana od wielu lat nie została jednoznacznie ustalona, a wyniki opisywane w literaturze są niejednokrotnie rozbieżne.

Przeprowadzona w ramach niniejszej pracy analiza porównawcza wskazuje, że to pierwotne ludzkie melanocyty charakteryzują się wyższą ekspresją receptora w porównaniu do ludzkich komórek czerniaka, zarówno ustalonych jak i pierwotnych linii komórkowych. Na poziomie mRNA ekspresja genu P2X7 jest wyraźnie wyższa w melanocytach wyizolowanych ze zdrowej skóry pięciu pacjentów w porównaniu z) komórkami czerniaka na różnych etapach rozwoju. Do analizy wykorzystano ustalone linie komórkowe czerniaka odpowiadające zarówno fazie poziomego wzrostu (WM35), jak i fazie pionowej wzrostu czerniaka (WM115), a także linie metastatyczne (WM2664, MeWo, A375) oraz pierwotne linie komórkowe wyprowadzonych z

węzłów chłonnych od pacjentów z potwierdzonym przerzutem czerniaka (MM1, MM7, MM9, MM16 i MM28). Zaobserwowano przy tym tendencję do zwiększonej ekspresji genu P2X7 w liniach metastatycznych, spośród których najwyższe wartości wykazywały komórki A375 i WM2664. W przypadku pierwotnych linii wyprowadzonych z węzłów chłonnych stwierdzono zróżnicowaną ekspresję, przy czym dla linii MM9 była ona istotnie niższa w porównaniu z pozostałymi. Zestawienie zgrupowanych wyników względnej ekspresji w melanocytach i komórkach czerniaka jednoznacznie wskazuje wyższy poziom ekspresji genu P2X7 w zdrowych komórkach skóry. Obserwacja ta została potwierdzona również na poziomie białka, w analizie Western blot porównano ludzkie pierwotne melanocyty z metastatycznymi liniami czerniaka (A375 i MeWO) oraz z liniami pierwotnymi czerniaka wyizolowanymi z węzłów chłonnych. Wszystkie analizowane linie czerniaka cechowały się niższą zawartością białka w porównaniu z pierwotnymi ludzkimi melanocytami. Co ciekawe, linia MM9, mimo najniższej względnej ekspresji genu P2X7, wykazywała poziom białka receptora zbliżony do pozostałych linii pierwotnych.

W dostępnej literaturze opisano podobne obserwacje także w przypadku innych nowotworów, wskazujące na obniżoną ekspresję receptora P2X7 w tkankach nowotworowych w porównaniu z odpowiadającymi im tkankami prawidłowymi. Badanie Li i wsp. wykazało zmniejszenie poziomu tego receptora w nowotworach nabłonkowych błony śluzowej oraz szyjki macicy, pęcherza moczowego i piersi. Analiza opierała się na barwieniu immunofluorescencyjnym oraz ocenie względnej ekspresji genu P2X7, przy czym uzyskane wyniki potwierdziły zgodność obu metod – niższy poziom receptora uwidoczniony w barwieniu korelował z mniejszą ekspresją jego genu. Co istotne, obniżoną ekspresję P2X7 stwierdzono również w stanach przednowotworowych, co sugeruje, że utrata tego receptora może stanowić wczesne zdarzenie w procesie nowotworzenia [145]. Z drugiej strony, wykazano również, że jednoczesna podwyższona ekspresja receptorów P2X1 i P2X7 w raku pęcherza moczowego naciekającym mięśniówkę koreluje zarówno z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, jak i z przerzutami odległymi, które zazwyczaj świadczą o wysokim stopniu zaawansowania choroby. Autorzy tej pracy nie wskazują jednak żadnych molekularnych mechanizmów mogących odpowiadać za to zjawisko [146]. Istnieje również szereg doniesień literaturowych wskazujących na podwyższony poziom receptora P2X7 w tkankach nowotworowych. Przykładowo, Qian i wsp. wykazali, że jego ekspresja jest istotnie wyższa w rakach jelita grubego w porównaniu z tkankami prawidłowymi. Co więcej, zaobserwowano, że zwiększona ekspresja receptora P2X7 wiąże się z nasilonym procesem tworzenia przerzutów oraz mniej

korzystnym rokowaniem klinicznym [147]. Autorzy wielu prac skupionych na tej tematyce proponują wykorzystanie receptora P2X7 jako markera diagnostycznego dla nowotworów [148-150]. Wydaje się zatem, że poziom ekspresji receptora P2X7 w nowotworach, zarówno podwyższony, jak i obniżony może być uzależniony od rodzaju nowotworu, poziomu jego rozwoju oraz od tkanki, z której się on wywodzi.

W kolejnym etapie zdecydowano się na weryfikację funkcjonalności receptora P2X7 w komórkach czerniaka. W wybranych liniach komórkowych przeprowadzono analizę napływu jonów wapnia do cytoplazmy pod wpływem stymulacji syntetycznym agonistą receptora, BzATP. Zarówno komórki ustalonych linii komórkowych o charakterze metastatycznym (A375, MeWO), jak i komórki wyizolowane z węzłów chłonnych (MM9, MM16) nie wykazały aktywności receptora w zastosowanym teście. Pomimo potwierdzonej ekspresji receptora, w żadnej z badanych linii nie zaobserwowano zwiększenia sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z sondy FURA-2AM po podaniu BzATP, co wskazuje na brak wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, a tym samym brak aktywności kanału jonowego. Analizy wykonano również z wykorzystaniem naturalnego agonisty receptora, ATP. W tym przypadku, dla trzech z badanych linii komórkowych, MeWO, A375 i MM16 odnotowano zwiększony sygnał fluorescencyjny po podaniu ATP. Efekt ten może wynikać z aktywacji innych receptorów purynergicznym z rodziny P2X. Najczęściej badanym w kontekście nowotworów, poza receptorem P2X7 jest P2X4, a jego aktywność została potwierdzona między innymi w nowotworze prostaty [151] czy nerki, gdzie wykazano nawet jego współdziałanie z P2X7 [152]. Jak wynika z dostępnych źródeł literaturowych również receptory z rodziny P2Y mogą brać udział w odpowiedzi na ATP. Przykładowo, w badaniu Li i wsp. odnotowano wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w linii kostniakomięsaka po zastosowaniu ATP, czego nie zaobserwowano po dodaniu BzATP. Wykonując szereg analiz autorzy przedstawili dowody na to, że efekt ten nie pochodził od receptorów z rodziny P2X a P2Y [153]. Podobne wyniki dla linii komórkowej nabłonka żołądka przedstawiła Hevia i wsp. wskazując na udział receptora P2Y2 [154]. W przedstawionych wynikach jedynie w linii MM9 nie zarejestrowano wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, co wskazuje na brak odpowiedzi na ATP ze strony receptorów purynergicznym, a zatem brak ich aktywności.

Przeprowadzono również analizę wpływu aktywacji i inhibicji receptora na proliferację komórek czerniaka. Pomimo braku jego aktywności, w komórkach MM9 zaobserwowano spadek tempa proliferacji, a także spadek żywotności komórek po 48 godzinnej inkubacji. Uzyskane wyniki pozwalają zatem sądzić, że receptor nie wykazuje aktywności kanału

jonowego w badanych komórkach czerniaka, obserwacje te nie znajdują jednak jednoznacznego potwierdzenia w literaturze. W piśmiennictwie można natomiast znaleźć nieliczne doniesienia potwierdzające aktywność P2X7 w komórkach czerniaka. Przykładowo, Pegoraro i wsp. opisują w swojej pracy wyniki wykazujące aktywność receptora zarówno na poziomie kanału jonowego, jak i pora komórkowego. Należy jednak podkreślić, że badacze wykorzystali do swoich analiz inne niż w użycie w niniejszej pracy linie komórkowe czerniaka, Sk-Mel-28 and Ma-Mel-19 a także w mysią linię komórkową czerniaka, B16-F10. W badaniach tych udowodnili oni ponadto wpływ receptora P2X7 na proliferację i migrację tych komórek, jak również na wydzielanie mikropęcherzyków, ich liczbę oraz zawartość. A zatem sugerując istotną rolę receptora w rozwoju i progresji czerniaka [155].

We wcześniejszych badaniach White i wsp. wykazali, że podanie BzATP wywołuje tworzenie pora komórkowego i prowadzi do apoptozy w komórkach czerniaka [156]. Niemniej jednak, istnieją również doniesienia naukowe wykazujące brak aktywności receptora P2X7 w komórkach, wykazujących jego ekspresję. W pracy Zhang i wsp., trzy spośród ośmiu przebadanych linii komórek hematopoetycznych z potwierdzoną ekspresją receptora P2X7 nie wykazywały jego funkcjonalności w analizie napływu jonów wapnia po stymulacji komórek agonistą receptora [157]. Jedną z badanych linii komórkowych - J6-1, będącą linią białaczki szpikowej została przedmiotem dalszych badań. Badacze w kolejnej pracy wykazali, że komórki te pomimo potwierdzonego braku aktywności receptora P2X7 reagowały na stymulację zarówno ATP i BzATP. Odnotowano spadek ich żywotność po inkubacji z agonistą receptora, a ponadto wykazano, że inkubacja indukowała również apoptozę [158]. Autorzy zaproponowali również szereg możliwych czynników odpowiadających za brak aktywności receptora w tych komórkach, pomimo jego wykrywalnej ekspresji. Jednym z wyjątkowo interesujących spostrzeżeń jest zwiększona aktywność ektonukleotydyazy CD39 na powierzchni komórek, które nie wykazywały aktywności kanału jonowego po pobudzeniu receptora P2X7. CD39 odpowiada za hydrolizę ATP do adenozyiny, a zatem przyczynia się do zmniejszania dostępności ATP dla receptora P2X7. Badacze udowodnili, że wykorzystanie inhibitora CD39 przywróciło aktywność kanału jonowego, która była obserwowana po pobudzeniu P2X7 zarówno ATP jak i BzATP, tym samym udział tego mechanizmu w zahamowaniu aktywności receptora w tych komórkach [159]. Rola CD39 w całkowitym hamowaniu lub zmniejszaniu aktywności receptora P2X7 wydaje się zatem niezwykle interesująca, zwłaszcza w kontekście nowotworów, gdzie mechanizm ten może odgrywać rolę ochronną dla komórek nowotworowych. Istotne jest również, że choć BzATP uznawany jest za

znacznie stabilniejszy analog ATP badania przeprowadzone przez Kukley i wsp. dostarczają dowodów, iż może on ulegać hydrolizie pod wpływem ektonukleotydaz. Prowadzi to autorów do wniosku, że efekty BzATP obserwowane we włóknach nerwowych w obszarze hipokampa, wcześniej przypisywane aktywacji receptora P2X7 mogą w rzeczywistości zależeć od receptorów purynergicznym z rodziny P1, aktywowanych przez adenozyne powstającą w wyniku jego hydrolizy [160]. Co ciekawe, w piśmiennictwie można znaleźć również doniesienia odnoszące się do wpływu metaloproteinazy MMP-2 na hamowanie aktywności receptora P2X7. Young i wsp. opisali bowiem mechanizm pętli sprzężenia zwrotnego, w którym aktywacja receptora P2X7 pod wpływem zwiększonego stężenia ATP prowadzi do uwalniania aktywnej MMP-2, która z kolei powoduje proteolityczne cięcie receptora, a zatem hamuje jego aktywność [161].

Co ważne, w przypadku badanych w niniejszej pracy linii komórkowych, tylko dla MM9 nie obserwowano aktywności kanału jonowego po pobudzeniu zarówno BzATP jak i ATP. Pozostałe linie wykazywały niewielką odpowiedź po zastosowaniu ATP. Można więc przypuszczać, że efekt ten mógł zostać spowodowany kombinacją wielu czynników. Rozbieżność pomiędzy otrzymanymi wynikami a wcześniejszymi badaniami może wynikać przede wszystkim ze zmniejszonego poziomu ekspresji receptora w badanych komórkach czerniaka. Ponieważ funkcjonalność receptora mierzona napływem jonów wapnia do komórki jest wypadkową odpowiedzi wszystkich receptorów znajdujących się na powierzchni komórki można wnioskować, że niższa ekspresja receptora może wiązać się z niższą jego aktywnością, nawet poniżej poziomu wykrywalności wykorzystanej metody.

Dodatkowo, potwierdzone zostało występowanie wielu alternatywnych form składania genu P2X7, a powstałe z nich białka charakteryzują się różną funkcjonalnością. Izoforma P2X7J, której występowanie opisano w zdrowych i nowotworowych komórkach pęcherza moczowego, pozbawiona jest fragmentu domeny zewnątrzkomórkowej, jednej z domen transbłonowych i końca karboksylowego, co skutkuje brakiem aktywności receptora. Ponadto, wykazano, że w połączeniu z izoformą P2X7A ma on dominujący negatywny efekt i zmniejsza aktywność receptora [57]. W genie *P2RX7* zidentyfikowano również liczne polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP), w tym warianty powodujące utratę funkcji receptora, które łączono z występowaniem wielu chorób, w tym nowotworów [162]. W doniesieniach literaturowych, można również odnaleźć prace wskazujące istotną rolę modyfikacji potranslacyjnych, które mogą wpływać zarówno na ekspresję P2X7, jego lokalizację w komórce czy aktywność. Grupa badawcza Gannorda wykazała, że palmitoilacja końca

karboksylowego P2X7R odgrywa kluczową rolę na kilku etapach szlaku biosyntezy receptora. Umożliwia ona prawidłowe dojrzewanie P2X7 oraz prawidłowy transport wewnątrzkomórkowy i wnikanie do błony plazmatycznej. Jest ona również niezbędna do dynamicznego rozmieszczenia P2X7R w mikrodomenach błony plazmatycznej, potencjalnie promując jego interakcję z partnerami sygnałowymi [65]. Zatem, jak opisano powyżej, istnieje wiele czynników mogących przyczyniać się do zmniejszenia aktywacji receptora w komórkach. Dlatego też, przyszłe badania powinny koncentrować się na ich wyjaśnieniu.

6. Podsumowanie wyników i wnioski

1. Porównanie ekspresji receptora P2X7 w komórkach skóry wykazało, że ekspresja ta była znacząco wyższa w pierwotnych melanocytach w porównaniu do keratynocytów i fibroblastów.
2. Względnie wysoka ekspresja receptora P2X7 w melanocytach może świadczyć o jego znaczącej roli w fizjologii melanocytów.
3. Receptor P2X7 obecny na powierzchni melanocytów jest funkcjonalny, co w wyniku jego stymulacji przejawia się aktywnością kanału wapniowego. Ponadto, specyficzna stymulacja P2X7 w melanocytach wpływa na ekspresję niektórych cytokin prozapalnych oraz reguluje zwrotnie jego własną ekspresję.
4. Wysokie stężenia BzATP, specyficznego liganda P2X7 wpływają hamująco na proliferację melanocytów, specyficzność tego efektu wymaga jednak potwierdzenia w dalszych badaniach.
5. Porównanie ekspresji P2X7 w pierwotnych liniach melanocytów i komórek czerniaka wykazało, że komórki czerniaka charakteryzowały się znacząco niższym poziomem ekspresji tego receptora.
6. Zmniejszona ekspresja receptora P2X7 w komórkach czerniaka była związana jego z znacznie słabszą reaktywnością w odpowiedzi na stymulację BzATP.
7. Mechanizm obniżonej ekspresji receptora P2X7 w komórkach czerniaka wymaga wyjaśnienia, można jednak przypuszczać, że zjawisko to może mieć znaczenie w procesie transformacji nowotworowej melanocytów.

Referencje

1. Sawicki, W.M.J., *Histologia*. PZWL, 2012.
2. Lee, E.J., et al., *Critical Role of ATP-P2X7 Axis in UV-Induced Melanogenesis*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(7): p. 1554-1563.e6.
3. Yousef, H., M. Alhajj, and S. Sharma, *Anatomy, skin (integument), epidermis*. 2017.
4. Gilaberte, Y., et al., *Anatomy and Function of the Skin*, in *Nanoscience in dermatology*. 2016, Elsevier. p. 1-14.
5. Brenner, M. and V.J. Hearing, *The protective role of melanin against UV damage in human skin*. Photochemistry and photobiology, 2008. **84**(3): p. 539-549.
6. Rube, C.E., et al., *Radiation dermatitis: radiation-induced effects on the structural and immunological barrier function of the epidermis*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(6): p. 3320.
7. Mine, S., et al., *Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging*. PloS one, 2008. **3**(12): p. e4066.
8. Smith, M.M. and J. Melrose, *Proteoglycans in normal and healing skin*. Advances in wound care, 2015. **4**(3): p. 152-173.
9. Meigel, W.N., S. Gay, and L. Weber, *Dermal architecture and collagen type distribution*. Archives of Dermatological Research, 1977. **259**(1): p. 1-10.
10. Marcos-Garcés, V., et al., *Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing—a morphometric and comparative study*. Journal of anatomy, 2014. **225**(1): p. 98-108.
11. Sorrell, J.M. and A.I. Caplan, *Fibroblasts—a diverse population at the center of it all*. International review of cell and molecular biology, 2009. **276**: p. 161-214.
12. Janson, D.G., et al., *Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts*. Journal of investigative dermatology, 2012. **132**(11): p. 2565-2572.
13. Driskell, R.R., et al., *Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair*. Nature, 2013. **504**(7479): p. 277-281.
14. Brüggen, M.C. and G. Stingl, *Subcutaneous white adipose tissue: The deepest layer of the cutaneous immune barrier*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2020. **18**(11): p. 1225-1227.
15. Khakh, B.S., & Burnstock, G. , *The double life of ATP*. Scientific American, 2009. **301**(6): p. 84.
16. Zimmermann, H., *Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature*. Drug Development Research, 2001. **52**(1-2): p. 44-56.
17. Burnstock, G., *Purinergic Nerves*. 1972.
18. Burnstock, G., *Purinergic receptors*. Journal of theoretical biology, 1976. **62**(2): p. 491-503.
19. Burnstock, G., & Kennedy, C. , *Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?* General Pharmacology: The Vascular System, 1985. **16**(5): p. 433-440.
20. Burnstock, G. and A. Verkhratsky, *Receptors for purines and pyrimidines*, in *Purinergic signalling and the nervous system*. 2012, Springer. p. 119-244.
21. Thompson, R.J., et al., *Purinergic receptors in the airways: potential therapeutic targets for asthma?* Frontiers in allergy, 2021. **2**: p. 677677.
22. Poulsen, S.A., & Quinn, R. J, *Adenosine receptors new: opportunities for future drugs*. Bioorganic & medicinal chemistry, , 1998. **6**: p. 619-641.

23. Sheth, S., et al., *Adenosine receptors: expression, function and regulation*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(2): p. 2024-2052.
24. Borea, P.A., et al., *Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art*. Physiol Rev, 2018. **98**(3): p. 1591-1625.
25. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacological reviews, 2001. **53**(4): p. 527-552.
26. von Kugelgen, I., *Pharmacology of P2Y receptors*. Brain Res Bull, 2019. **151**: p. 12-24.
27. Erb, L., et al., *Site-directed Mutagenesis of P2U Purinoceptors: POSITIVELY CHARGED AMINO ACIDS IN TRANSMEMBRANE HELICES 6 AND 7 AFFECT AGONIST POTENCY AND SPECIFICITY (*)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(9): p. 4185-4188.
28. Erb, L. and G.A. Weisman, *Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways*. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal, 2012. **1**(6): p. 789-803.
29. Erb, L., et al., *P2 receptors: intracellular signaling*. Pflügers Archiv, 2006. **452**(5): p. 552-562.
30. Burnstock, G., & Knight, G. E. , *Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems*. . Int Rev Cytol 2004. **240**(1): p. 31-304.
31. Illes, P., et al., *Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30*. British Journal of Pharmacology, 2021. **178**(3): p. 489-514.
32. Torres, G.E., Egan, T. M., & Voigt, M. M., *Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits: specificities exist with regard to possible partners*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(10): p. 6653-6659.
33. Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A., & Buell, G. , *Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels*. Journal of Neuroscience, 1996. **16**(8): p. 2495-2507.
34. Heymann, G., et al., *Inter- and intrasubunit interactions between transmembrane helices in the open state of P2X receptor channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(42): p. E4045-54.
35. Surprenant, A. and R.A. North, *Signaling at purinergic P2X receptors*. Annual review of physiology, 2009. **71**(1): p. 333-359.
36. Smart, M.L., et al., *P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(10): p. 8853-8860.
37. Rettinger, J. and G. Schmalzing, *Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations*. The Journal of general physiology, 2003. **121**(5): p. 451-461.
38. Khakh, B.S. and R.A. North, *Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS*. Neuron, 2012. **76**(1): p. 51-69.
39. Duan, S. and J.T. Neary, *P2X7 receptors: properties and relevance to CNS function*. Glia, 2006. **54**(7): p. 738-746.
40. Gordon, J.L., *"Extracellular ATP: effects, sources and fate*. Biochemical Journal, 1986.
41. Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G., *The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)*. Science, 1996.
42. Pelegrin, P. and A. Surprenant, *Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor*. Embo j, 2006. **25**(21): p. 5071-82.

43. Di Virgilio, F., G. Schmalzing, and F. Markwardt, *The Elusive P2X7 Macropore*. Trends Cell Biol, 2018. **28**(5): p. 392-404.
44. Martínez-Cuesta, M., et al., *Structural and Functional Basis for Understanding the Biological Significance of P2X7 Receptor*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(22).
45. Buell, G.N., et al., *Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor*. Recept Channels, 1998. **5**(6): p. 347-54.
46. Dubyak, G.R., *P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells*. Cell Microbiol, 2012. **14**(11): p. 1697-706.
47. Hou, Z. and J. Cao, *Comparative study of the P2X gene family in animals and plants*. Purinergic Signal, 2016. **12**(2): p. 269-81.
48. Sluyter, R., *The P2X7 Receptor*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1051**: p. 17-53.
49. Chessell, I.P., et al., *Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor*. FEBS Lett, 1998. **439**(1-2): p. 26-30.
50. Benzaquen, J., et al., *Alternative splicing of P2RX7 pre-messenger RNA in health and diseases: Myth or reality?* Biomed J, 2019. **42**(3): p. 141-154.
51. Skarratt, K.K., et al., *A P2RX7 single nucleotide polymorphism haplotype promotes exon 7 and 8 skipping and disrupts receptor function*. Faseb j, 2020. **34**(3): p. 3884-3901.
52. Andrejew, R., et al., *The P2X7 receptor: central hub of brain diseases*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2020. **13**: p. 124.
53. De Salis, S.K., et al., *Alternatively spliced isoforms of the P2X7 receptor: structure, function and disease associations*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(15): p. 8174.
54. Adinolfi, E., et al., *Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor*. Faseb j, 2010. **24**(9): p. 3393-404.
55. Cheewatrakoolpong, B., et al., *Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(1): p. 17-27.
56. Skarratt, K.K., et al., *A 5' intronic splice site polymorphism leads to a null allele of the P2X7 gene in 1-2% of the Caucasian population*. FEBS Lett, 2005. **579**(12): p. 2675-8.
57. Feng, Y.H., et al., *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. **281**(25): p. 17228-17237.
58. Gilbert, S.M., et al., *A phase I clinical trial demonstrates that nfP2X(7) -targeted antibodies provide a novel, safe and tolerable topical therapy for basal cell carcinoma*. Br J Dermatol, 2017. **177**(1): p. 117-124.
59. Liang, X., et al., *Quantifying Ca²⁺ current and permeability in ATP-gated P2X7 receptors*. J Biol Chem, 2015. **290**(12): p. 7930-42.
60. Amstrup, J. and I. Novak, *P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 51-61.
61. Wickert, L.E., et al., *The C-terminus of human nucleotide receptor P2X7 is critical for receptor oligomerization and N-linked glycosylation*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63789.
62. Kim, M., et al., *Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex*. Embo j, 2001. **20**(22): p. 6347-58.
63. Kopp, R., et al., *P2X7 Interactions and Signaling - Making Head or Tail of It*. Front Mol Neurosci, 2019. **12**: p. 183.
64. Costa-Junior, H.M., F. Sarmento Vieira, and R. Coutinho-Silva, *C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting*. Purinergic Signal, 2011. **7**(1): p. 7-19.

65. Gonnord, P., et al., *Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts*. *Faseb j*, 2009. **23**(3): p. 795-805.
66. McCarthy, A.E., C. Yoshioka, and S.E. Mansoor, *Full-Length P2X(7) Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization*. *Cell*, 2019. **179**(3): p. 659-670.e13.
67. Denlinger, L.C., et al., *Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 2001. **167**(4): p. 1871-6.
68. Leiva-Salcedo, E., et al., *Lipopolysaccharide inhibits the channel activity of the P2X7 receptor*. *Mediators Inflamm*, 2011. **2011**: p. 152625.
69. Karasawa, A. and T. Kawate, *Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor*. *Elife*, 2016. **5**.
70. Bartlett, R., L. Stokes, and R. Sluyter, *The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease*. *Pharmacol Rev*, 2014. **66**(3): p. 638-75.
71. Sanz, J.M., et al., *Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression*. *J Immunol*, 2009. **182**(7): p. 4378-85.
72. Niemi, K., et al., *Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway*. *J Immunol*, 2011. **186**(11): p. 6119-28.
73. Ferrari, D., et al., *The antibiotic polymyxin B modulates P2X7 receptor function*. *J Immunol*, 2004. **173**(7): p. 4652-60.
74. Elssner, A., et al., *A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release*. *J Immunol*, 2004. **172**(8): p. 4987-94.
75. Tomasinsig, L., et al., *The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(45): p. 30471-81.
76. Yang, D., et al., *Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock*. *Immunity*, 2015. **43**(5): p. 923-32.
77. Dunn, P.M. and A.G. Blakeley, *Suramin: a reversible P2-purinoreceptor antagonist in the mouse vas deferens*. *Br J Pharmacol*, 1988. **93**(2): p. 243-5.
78. Lambrecht, G., et al., *PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoreceptor-mediated responses*. *Eur J Pharmacol*, 1992. **217**(2-3): p. 217-9.
79. Jiang, L.H., et al., *Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors*. *Mol Pharmacol*, 2000. **58**(1): p. 82-8.
80. Qiu, F. and G. Dahl, *A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(2): p. C250-5.
81. Murgia, M., et al., *Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(11): p. 8199-203.
82. Evans, R.J., et al., *Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoreceptors)*. *Mol Pharmacol*, 1995. **48**(2): p. 178-83.
83. Adinolfi, E., et al., *Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth*. *Cancer Res*, 2012. **72**(12): p. 2957-69.
84. Honore, P., et al., *The antihyperalgesic activity of a selective P2X7 receptor antagonist, A-839977, is lost in IL-1alpha knockout mice*. *Behav Brain Res*, 2009. **204**(1): p. 77-81.
85. Kasuya, G., et al., *Structural Insights into Divalent Cation Modulations of ATP-Gated P2X Receptor Channels*. *Cell Rep*, 2016. **14**(4): p. 932-944.

86. Robinson, L.E., et al., *Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization*. J Biol Chem, 2014. **289**(46): p. 31983-31994.
87. Al-Aqtash, R. and D.M. Collier, *Ionotropic purinergic receptor 7 (P2X7) channel structure and pharmacology provides insight regarding non-nucleotide agonism*. Channels (Austin), 2024. **18**(1): p. 2355150.
88. Driskell, R.R. and F.M. Watt, *Understanding fibroblast heterogeneity in the skin*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(2): p. 92-9.
89. Solini, A., et al., *Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 3): p. 297-305.
90. Solini, A., et al., *High glucose modulates P2X7 receptor-mediated function in human primary fibroblasts*. Diabetologia, 2000. **43**(10): p. 1248-56.
91. Gentile, D., et al., *Searching Novel Therapeutic Targets for Scleroderma: P2X7-Receptor Is Up-regulated and Promotes a Fibrogenic Phenotype in Systemic Sclerosis Fibroblasts*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 638.
92. Flores-Muñoz, C., et al., *Restraint of Human Skin Fibroblast Motility, Migration, and Cell Surface Actin Dynamics, by Pannexin 1 and P2X7 Receptor Signaling*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(3).
93. Komine, M., Meijuan, J., Kimura-Sashikawa, M., Hossain, R. M., Ansary, T. M., Oshio, T., & Ohtsuki, M., *Keratinocytes in Skin Disorders: The Importance of Keratinocytes as a Barrier*. In *Keratinocyte Biology-Structure and Function in the Epidermis*. IntechOpen, 2022.
94. Greig, A.V., et al., *Purinergic receptors are part of a signaling system for keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis in human fetal epidermis*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(5): p. 1145-9.
95. Fu, W., et al., *Activation of P2X(7)-mediated apoptosis Inhibits DMBA/TPA-induced formation of skin papillomas and cancer in mice*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 114.
96. Pastore, S., et al., *Stimulation of purinergic receptors modulates chemokine expression in human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 660-7.
97. Ikutama, R., et al., *Cathelicidin LL-37 Activates Human Keratinocyte Autophagy through the P2X₇, Mechanistic Target of Rapamycin, and MAPK Pathways*. J Invest Dermatol, 2023. **143**(5): p. 751-761.e7.
98. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1717-21.
99. Comune, M., et al., *Antimicrobial peptide-gold nanoscale therapeutic formulation with high skin regenerative potential*. J Control Release, 2017. **262**: p. 58-71.
100. Pfalzgraff, A., et al., *Antimicrobial endotoxin-neutralizing peptides promote keratinocyte migration via P2X7 receptor activation and accelerate wound healing in vivo*. Br J Pharmacol, 2018. **175**(17): p. 3581-3593.
101. Ghazi, K., et al., *Hyaluronan fragments improve wound healing on in vitro cutaneous model through P2X7 purinoreceptor basal activation: role of molecular weight*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48351.
102. Kawano, A., et al., *Autocrine Regulation of UVA-Induced IL-6 Production via Release of ATP and Activation of P2Y Receptors*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0127919.
103. Ahn, Y., et al., *ATP-P2X7-Induced Inflammasome Activation Contributes to Melanocyte Death and CD8*. J Invest Dermatol, 2020. **140**(9): p. 1794-1804.e4.
104. Plonka, P.M., et al., *What are melanocytes really doing all day long...? Exp Dermatol*, 2009. **18**(9): p. 799-819.

105. Kim, J.Y., et al., *AZD-9056, a P2X7 receptor inhibitor, suppresses ATP-induced melanogenesis*. J Dermatol Sci, 2020. **100**(3): p. 227-229.
106. Di Virgilio, F., et al., *The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation*. Immunity, 2017. **47**(1): p. 15-31.
107. Georgiou, J.G., et al., *Human epidermal and monocyte-derived langerhans cells express functional P2X receptors*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(3): p. 482-90.
108. Tran, J.N., et al., *Murine epidermal Langerhans cells and keratinocytes express functional P2X7 receptors*. Exp Dermatol, 2010. **19**(8): p. e151-7.
109. Mutini, C., et al., *Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 1958-65.
110. Killeen, M.E., et al., *Signaling through purinergic receptors for ATP induces human cutaneous innate and adaptive Th17 responses: implications in the pathogenesis of psoriasis*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 4324-36.
111. Geraghty N., W.D., Adhikary S., Sluyter R. , *P2X7 receptor in skin biology and diseases*. World Journal of Dermatology, 2016.
112. Barberà-Cremades, M., et al., *P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1 β release*. Faseb j, 2012. **26**(7): p. 2951-62.
113. Pfeiffer, Z.A., et al., *Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(10): p. 1506-16.
114. Lees, M.P., et al., *P2X7 receptor-mediated killing of an intracellular parasite, Toxoplasma gondii, by human and murine macrophages*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7040-6.
115. Sluyter Ronald, W.J.S., *P2X7 receptor activation induces CD62L shedding from human CD4+ and CD8+ T cells*. Inflammation and Cell Signaling, 2014.
116. Grailer, J.J., M. Kodera, and D.A. Steeber, *L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation*. J Dermatol Sci, 2009. **56**(3): p. 141-7.
117. Kurashima, Y., et al., *The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis*. Immunity, 2014. **40**(4): p. 530-41.
118. Ścieżyńska, A., et al., *A Novel and Effective Method for Human Primary Skin Melanocytes and Metastatic Melanoma Cell Isolation*. Cancers (Basel), 2021. **13**(24).
119. Manfredini, M., et al., *The P2X7 Receptor Is Overexpressed in the Lesional Skin of Subjects Affected by Hidradenitis Suppurativa: A Preliminary Study*. Dermatology, 2021. **237**(1): p. 111-118.
120. Leinonen, P.T., et al., *Reevaluation of the normal epidermal calcium gradient, and analysis of calcium levels and ATP receptors in Hailey-Hailey and Darier epidermis*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(6): p. 1379-87.
121. Metcalfe, M.J., D.M. Baker, and G. Burnstock, *Purinoreceptor expression on keratinocytes reflects their function on the epidermis during chronic venous insufficiency*. Arch Dermatol Res, 2006. **298**(6): p. 301-7.
122. Inoue, K., J. Hosoi, and M. Denda, *Extracellular ATP has stimulatory effects on the expression and release of IL-6 via purinergic receptors in normal human epidermal keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(2): p. 362-71.
123. Lis-López, L., et al., *P2X7 Receptor Regulates Collagen Expression in Human Intestinal Fibroblasts: Relevance in Intestinal Fibrosis*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(16).
124. Montreekachon, P., et al., *Involvement of P2X(7) purinergic receptor and MEK1/2 in interleukin-8 up-regulation by LL-37 in human gingival fibroblasts*. J Periodontal Res, 2011. **46**(3): p. 327-37.
125. Vénéreau, E., C. Ceriotti, and M.E. Bianchi, *DAMPs from Cell Death to New Life*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 422.

126. Murao, A., et al., *Release mechanisms of major DAMPs*. Apoptosis, 2021. **26**(3-4): p. 152-162.
127. Penolazzi, L., et al., *Unorthodox localization of P2X7 receptor in subcellular compartments of skeletal system cells*. Front Cell Dev Biol, 2023. **11**: p. 1180774.
128. Song, X.M., et al., *Up-regulation of P2X7 receptors mediating proliferation of Schwann cells after sciatic nerve injury*. Purinergic Signal, 2015. **11**(2): p. 203-13.
129. Wang, J., et al., *Activation of P2X7 receptors decreases the proliferation of murine luteal cells*. Reprod Fertil Dev, 2015. **27**(8): p. 1262-71.
130. Hiken, J.F. and T.H. Steinberg, *ATP downregulates P2X7 and inhibits osteoclast formation in RAW cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(2): p. C403-12.
131. Ziberi, S., et al., *Upregulation of Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and P2X7 Receptors Is Associated to Increased Invasiveness Caused by P2X7 Receptor Stimulation in Human Glioblastoma Stem Cells*. Cells, 2019. **9**(1).
132. Lu, Y., et al., *Melanocytes are potential immunocompetent cells: evidence from recognition of immunological characteristics of cultured human melanocytes*. Pigment Cell Res, 2002. **15**(6): p. 454-60.
133. Fu, C., et al., *Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review)*. Mol Med Rep, 2020. **21**(3): p. 1421-1430.
134. Martins, C., et al., *Vitiligo Skin T Cells Are Prone to Produce Type 1 and Type 2 Cytokines to Induce Melanocyte Dysfunction and Epidermal Inflammatory Response Through Jak Signaling*. J Invest Dermatol, 2022. **142**(4): p. 1194-1205.e7.
135. Tam, I., A. Dzierżęga-Lęcznar, and K. Stępień, *Differential expression of inflammatory cytokines and chemokines in lipopolysaccharide-stimulated melanocytes from lightly and darkly pigmented skin*. Exp Dermatol, 2019. **28**(5): p. 551-560.
136. Krüger-Krasagakes, S., et al., *Production of cytokines by human melanoma cells and melanocytes*. Recent Results Cancer Res, 1995. **139**: p. 155-68.
137. Silveira, J.P., et al., *Photoprotective and antioxidant effects of Rhubarb: inhibitory action on tyrosinase and tyrosine kinase activities and TNF- α , IL-1 α and α -MSH production in human melanocytes*. BMC Complement Altern Med, 2013. **13**: p. 49.
138. Nedoszytko, B., et al., *Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis*. Postepy Dermatol Alergol, 2014. **31**(2): p. 84-91.
139. Guo, J., et al., *Signaling pathways and targeted therapies for psoriasis*. Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 437.
140. Brajac, I., et al., *Melanocyte as a possible key cell in the pathogenesis of psoriasis vulgaris*. Med Hypotheses, 2009. **73**(2): p. 254-6.
141. Miniati, A., et al., *Stimulated human melanocytes express and release interleukin-8, which is inhibited by luteolin: relevance to early vitiligo*. Clin Exp Dermatol, 2014. **39**(1): p. 54-7.
142. Singh, M., et al., *Investigation of the Role of Interleukin 6 in Vitiligo Pathogenesis*. Immunol Invest, 2022. **51**(1): p. 120-137.
143. Saginala, K., et al., *Epidemiology of Melanoma*. Med Sci (Basel), 2021. **9**(4).
144. Arnold, M., et al., *Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040*. JAMA Dermatol, 2022. **158**(5): p. 495-503.
145. Li, X., et al., *P2X(7) receptor expression is decreased in epithelial cancer cells of ectodermal, uro-genital sinus, and distal paramesonephric duct origin*. Purinergic Signal, 2009. **5**(3): p. 351-68.
146. Ledderose, S., et al., *P2X1 and P2X7 Receptor Overexpression Is a Negative Predictor of Survival in Muscle-Invasive Bladder Cancer*. Cancers (Basel), 2023. **15**(8).

147. Qian, F., et al., *High expression of P2X7R is an independent postoperative indicator of poor prognosis in colorectal cancer*. Hum Pathol, 2017. **64**: p. 61-68.
148. Solini, A., et al., *Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease?* Endocrinology, 2008. **149**(1): p. 389-96.
149. Lili, W., et al., *P2RX7 functions as a putative biomarker of gastric cancer and contributes to worse prognosis*. Exp Biol Med (Maywood), 2019. **244**(9): p. 734-742.
150. Qiao, C., et al., *ATP-gated P2X7 receptor as a potential target for prostate cancer*. Hum Cell, 2022. **35**(5): p. 1346-1354.
151. He, J., et al., *Inhibiting the P2X4 Receptor Suppresses Prostate Cancer Growth In Vitro and In Vivo, Suggesting a Potential Clinical Target*. Cells, 2020. **9**(11).
152. Rupert, C., et al., *Therapeutic targeting of P2X4 receptor and mitochondrial metabolism in clear cell renal carcinoma models*. J Exp Clin Cancer Res, 2023. **42**(1): p. 134.
153. Li, D.L., et al., *Pharmacological properties of ATP-sensitive purinergic receptors expressed in human G292 osteoblastic cells*. Eur J Pharmacol, 2009. **617**(1-3): p. 12-6.
154. Hevia, M.J., et al., *Differential Effects of Purinergic Signaling in Gastric Cancer-Derived Cells Through P2Y and P2X Receptors*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 612.
155. Pegoraro, A., et al., *P2X7 promotes metastatic spreading and triggers release of miRNA-containing exosomes and microvesicles from melanoma cells*. Cell Death Dis, 2021. **12**(12): p. 1088.
156. White, N., P.E. Butler, and G. Burnstock, *Human melanomas express functional P2 X(7) receptors*. Cell Tissue Res, 2005. **321**(3): p. 411-8.
157. Zhang, X.J., et al., *Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients*. Leuk Res, 2004. **28**(12): p. 1313-22.
158. Zhang, X., et al., *The role of P2X7 receptor in ATP-mediated human leukemia cell death: calcium influx-independent*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009. **41**(5): p. 362-9.
159. Nie, K., et al., *CD 39-associated high ATPase activity contribute to the loss of P 2 X 7-mediated calcium response in LCL cells*. Leuk Res, 2005. **29**(11): p. 1325-33.
160. Kukley, M., et al., *Ecto-nucleotidases and nucleoside transporters mediate activation of adenosine receptors on hippocampal mossy fibers by P2X7 receptor agonist 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP*. J Neurosci, 2004. **24**(32): p. 7128-39.
161. Young, C.N.J., et al., *Sustained activation of P2X7 induces MMP-2-evoked cleavage and functional purinoceptor inhibition*. J Mol Cell Biol, 2018. **10**(3): p. 229-242.
162. Pegoraro, A., et al., *P2X7 Variants in Pathophysiology*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(12).

Opinie Komisji Bioetycznej



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/³⁴...../2022

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
w dniu 14 marca 2022 r. po zapoznaniu się z wnioskiem

Dr hab. n.med. Ryszard Galus
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii,
ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt. „Badanie histopatologiczne, biochemiczne, molekularne i genetyczne w analizie możliwości terapeutycznych w chorobach nowotworowych skóry”

- Badanie może być prowadzone wyłącznie w okresie obowiązywania polisy ubezpieczeniowej.

wyraża następującą opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*

Uwagi Komisji – *verte*

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.
Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej


Prof. dr.hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz

*niepotrzebne skreślić

Komisja wyraża pozytywną opinię w sprawie przeprowadzenia wnioskowanych badań- na warunkach określonych we wniosku oraz dodatkowo zastrzegając:

1/ obowiązek przedstawienia Komisji:

- wszystkich zmian w protokole mających wpływ na przebieg oraz ocenę badania,
- wszystkich przypadków zdarzeń niepożądanych,
- zawiadomienia o przyczynach przedwczesnego zakończenia badania,
- sprawozdania w toku przeprowadzonych badań-za sześć miesięcy,
- raportu końcowego.

**strona podpisowa do uchwały Komisji Bioetycznej przy Warszawskim
Uniwersytecie Medycznym nr KB/.....³⁴..... z dnia 14 marca 2022r.**

1. Prof. dr hab. n.med. Magdalena Kuźma –Kozakiewicz

.....

2. Dr hab. n. med. Tomasz Grzela

.....

3. Dr hab. n. med. Andrea Horvath-Stolarczyk

.....

4. Dr hab. n. med. Urszula Ambroziak

.....

5. Dr hab. n.med. Maciej Siński

.....

6. Dr hab. n. farm. Sylwia Flis

.....

7. Prof. dr hab.n.med Tomasz Jakimowicz

.....

8. Dr n. med. Leszek Kraj

.....

9. Mec. Danuta Lewandowska

.....

10. Dr n .farm. Agata Maciejczyk

.....

11. Dr hab. n.med. Barbara Grzechocińska

.....

12. Dr n. med. Artur Hącia OP

.....

13. Mgr Anna Jasińska

.....



CENTRUM MEDYCZNE KSZTAŁCENIA PODYPLOMOWEGO
ul. Marymoncka 99/103, 01 - 813 Warszawa

KOMISJA BIOETYCZNA

Tel.: + (48) 22 56 01 066

www.cmkp.edu.pl

komisja.bioetyczna@cmkp.edu.pl

Załącznik nr 1

15 CZE. 2020

do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 87/PB/2020 z dnia

Komisja Bioetyczna przy Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego powołana przez Dyrektora Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego Zarządzeniem nr 116/2018 z dnia 10.09.2018 r. zapoznała się z wnioskiem o wyrażenie opinii o projekcie eksperymentu medycznego/badania klinicznego:

pt.: „Badania histologiczne, biochemiczne, molekularne i genetyczne komórek izolowanych z tkanek usuniętych podczas zabiegu chirurgicznego, w hodowli in vitro”

zgłoszonym przez badacza:

dr n. med. Natalię Krześniak

miejsce przeprowadzenia badania:

- Klinika Chirurgii Plastycznej CMKP

Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Im. prof. dr Witolda Orłowskiego CMKP
ul. Czerniakowska 231, 00-416 Warszawa

- Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Warszawski Uniwersytet Medyczny

oraz następującymi dokumentami:

1. Pismo przewodnie do Komisji Bioetycznej z dnia 03.06.2020r. podpisane przez prof. dr hab. n. med. Bartłomieja Noszczyka, Kierownika Kliniki Chirurgii Plastycznej CMKP oraz dr n. med. Natalię Krześniak, Głównego Badacza ;
2. Kwestionariusz: Etyczne aspekty klinicznych badań naukowych;
3. Protokół badania;
4. Informacja dla pacjentów;
5. Świadoma zgoda pacjenta;
6. Świadoma zgoda pacjenta na badania genetyczne;
7. Oświadczenie o współpracy naukowej podpisane 29.04.2020r. przez prof. dr hab. n. med. Jacka Malejczyka, Kierownika Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz prof. dr hab. n. med. Bartłomieja Noszczyka, Kierownika Kliniki Chirurgii Plastycznej CMKP;
8. CV naukowe – dr n. med. Natalia Krześniak;
9. CV naukowe – dr n. med. Aneta Ścieżyńska.

Data

18.10.2020

PRZEWODNICZĄCA KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego

prof. dr hab. n. med. Ewa Marciniowska-Suchowierska

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego
Komisja Bioetyczna CMKP - 15 czerwca 2020r.

informujemy, że posiedzenie Komisji Bioetycznej CMKP w dniu 15 czerwca 2020r. odbywało się przy wykorzystaniu środków komunikacji na odległość, zgodnie z Zarządzeniem Nr 47/2020 Dyrektora Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego z dnia 31 marca 2020r. w sprawie zmiany Zarządzenia Nr 123/13 z dnia 8 listopada 2013r. w sprawie wprowadzenia Regulaminu działania Komisji Bioetycznej przy Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

Protokół z posiedzenia

Komisja Bioetyczna w składzie:

1. prof. dr hab. n. med. Ewa Marcinowska-Suchowierska - Przewodnicząca
2. ks. prof. dr hab. Jan Krokos
3. prof. dr hab. n. med. Bogusława Baranowska
4. dr n. med. Małgorzata Bińkowska
5. dr n. med. Tomasz Bużański
6. prof. dr hab. n. med. Urszula Fiszer
7. lek. Piotr Hartmann
8. lek. Mirosław Klukowski
9. dr hab. n. med. Bohdan Pytkowski
10. dr n. med. Krzysztof Witkowski
11. dr n. hum. Ewa Kujawa
12. mec. Dorota Sołtysiak-Skórczyńska
13. pielęgniarka Danuta Sowa
14. mgr Alicja Suchecka
15. dr Bogdan Wojtyniak, prof. NIZP-PZH

„Badania histologiczne, biochemiczne, molekularne i genetyczne komórek izolowanych z tkanek usuniętych podczas zabiegu chirurgicznego, w hodowli in vitro”.

Klinika Chirurgii Plastycznej CMKP

Kierownik Kliniki prof. Bartłomiej Noszczyk

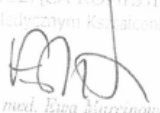
Badacz dr n. med. Natalia Krześniak

Wyniki tajnego głosowania: ZA (15), PRZECIW (0), WSTRZYMUJĘ SIĘ (0), BRAK GŁOSU (0), NIEOBECNY (0)

Komisja Bioetyczna wyraziła pozytywną opinię o rozpoczęciu ww. badania.

Podjęło uchwałę nr 87/PB/2020 z 15 czerwca 2020r.

KOMISJA BIOETYCZNA
przy Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego
01-813 VA / mowa ul. Moniuszka 99/100
tel. 022 25 12 714 fax 022 55 63 715
e-mail: cmkp@cmkp.pl

PRZEWODNICZĄCA KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego

prof. dr hab. n. med. Ewa Marcinowska-Suchowierska

**SKŁAD KOMISJI BIOETYCZNEJ
PRZY CENTRUM MEDYCZNYM KSZTAŁCENIA PODYPLOMOWEGO
Kadencja 2018 – 2021**

1. prof. dr hab. n. med. Ewa Marcinowska-Suchowierska - choroby wewnętrzne
Przewodnicząca Komisji Bioetycznej
2. ks. prof. dr hab. Jan Krokos - duchowny
Zastępca Przewodniczącej Komisji Bioetycznej
3. prof. dr hab. n. med. Bogusława Baranowska - neuroendokrynolog
4. dr n. med. Małgorzata Bińkowska - ginekolog-położnik,
endokrynolog
5. dr n. med. Tomasz Bużański - urolog
6. prof. dr hab. n. med. Urszula Fiszer - neurolog
7. lek. Piotr Hartmann - pediatra
8. lek. Mirosław Klukowski - chirurg ogólny
Przedstawiciel Okręgowej Rady Lekarskiej w Warszawie
9. dr hab. n. med. Bohdan Pytkowski - choroby wewnętrzne
10. dr n. med. Krzysztof Witkowski - chirurg naczyniowy
11. dr Bogdan Wojtyniak prof. NIZP-PZH - biostatystyk, epidemiolog
12. dr n. hum. Ewa Kujawa - filozof
13. mec. Dorota Sołtysiak-Skórczyńska - prawnik
14. p. Danuta Sowa - pielęgniarka
15. mgr Alicja Suchecka - farmaceuta