

mgr Kamila Bujko

Rola receptorów P2X w procesach zasiedlania szpiku kostnego oraz farmakologicznej mobilizacji komórek macierzystych.

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

Promotor: prof. dr hab. Magdalena Kucia

Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Stem Cell Institute, James Graham Brown Cancer Center,
University of Louisville



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Słowa kluczowe: sygnałowanie purynergiczne, ATP, eksperymentalna hematologia, krwiotwórcze komórki macierzyste, farmakologiczna mobilizacja, procesy wszczepiania, nisza szpikowa

Key words: purinergic signaling, ATP, experimental hematology, hematopoietic stem cells, pharmacological mobilization, homing, bone marrow niche

Praca współfinansowana z projektu NCN: OPUS nr. UMO-2018/29/B/NZ4/01470.

Lista wybranych publikacji i doniesień, w których wykorzystano wyniki niniejszej rozprawy.

Prace oryginalne i przeglądowe:

1. **Bujko K**, Adamiak M, Iłowska N, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. *A novel evidence that the P2X1 purinergic receptor – Nlrp3 inflammasome axis orchestrates optimal trafficking of hematopoietic stem progenitors cells (HSPCs)*. Folia Histochem Cytobiol. 2022; 60(3):280-290. doi: 10.5603/FHC.a2022.0027.
2. Adamiak M*, **Bujko K***, Thapa A, Pensato V, Brzeźniakiewicz-Janus K, Ratajczak J, Davies DL, Ulrich H, Kucia M, Ratajczak MZ. *The P2X4 purinergic receptor has emerged as a potent regulator of hematopoietic stem/progenitor cell mobilization and homing-a novel view of P2X4 and P2X7 receptor interaction in orchestrating stem cell trafficking*. Leukemia. 2022; 36(1):248-256. doi: 10.1038/s41375-021-01352-9. *contributed equally
3. Ratajczak MZ, Adamiak M, **Bujko K**, Thapa A, Pensato V, Kucia M, Ratajczak J, Ulrich H. *Innate immunity orchestrates the mobilization and homing of hematopoietic stem/progenitor cells by engaging purinergic signaling-an update*. Purinergic Signal. 2020; 16(2):153-166. doi: 10.1007/s11302-020-09698-y.
4. Adamiak M, **Bujko K**, Cymer M, Plonka M, Glaser T, Kucia M, Ratajczak J, Ulrich H, Abdel-Latif A, Ratajczak MZ. *Novel evidence that extracellular nucleotides and purinergic signaling induce innate immunity-mediated mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells*. Leukemia. 2019; 32(9):1920-1931. doi: 10.1038/s41375-018-0122-0.

Wybrane doniesienia konferencyjne:

1. 64th ASH Annual Meeting and Exposition, December 10-13 2022, New Orleans, USA; *Novel Evidence That the P2X1 Purinergic Receptor – Nlrp3 Inflammasome Axis Orchestrates Optimal Trafficking of Hematopoietic Stem Progenitors Cells (HSPCs)*. **Bujko K**, Adamiak M, Chumak V, Kucia M, Ratajczak MZ.
2. 30 th Congress of the Polish Society of Haematology and Transfusion Medicine, September 8th-10 th 2022, Bydgoszcz, Poland; *The P2X4 purinergic receptor as a potent regulator of hematopoietic stem/ /progenitor cell mobilization and homing*. Adamiak M, **Bujko K**, Brzeźniakiewicz-Janus K, Kucia M, Ratajczak MZ.
3. 62nd ASH Annual Meeting and Exposition, virtual event; *A Novel Underappreciated Role for the Extracellular Adenosine Triphosphate (ATP)-P2X4 Purinergic Receptor Axis in the Homing and Engraftment of HSPCs*. Adamiak M, Thapa A, **Bujko K**, Pensato V, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ.
4. 61st ASH Annual Meeting and Exposition, December 2019, Orlando, USA; *Novel Evidence That Extracellular Adenosine Triphosphate (ATP), As a Purinergic Signaling Mediator, Activates Mobilization By Engaging a P2X4 Ligand-Gated Cation Channel Receptor Expressed on the Surface of Hematopoietic and Innate Immunity Cells*. **Bujko K**, Adamiak M, Thapa A, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ.

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów	9
2. Streszczenie	13
3. Summary	15
4. Wstęp	17
4.1. Krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM).....	17
4.1.1. Retencja KKM w niszy szpikowej	20
4.1.2. Proces migracji KKM.....	22
4.1.3. Farmakologiczna mobilizacja KKM	24
4.1.4. Proces zasiedlania szpiku przez KKM po przeszczepie	27
4.2. Sygnałowanie purynergiczne.....	28
4.2.1. Zewnątrzkomórkowe nukleotydy i nukleozydy purynowe ze szczególnym uwzględnieniem roli ATP i adenozyiny	29
4.2.2. Receptory nukleotydowe.....	32
4.3. Rola sygnałowania purynergicznego w układzie krwionośnym i procesie krwiotworzenia	35
4.3.1. Rola sygnałowania purynergicznego w różnicowaniu KKM.....	36
4.3.2. Rola sygnałowania purynergicznego w procesie proliferacji KKM	37
4.3.3. Rola sygnałowania purynergicznego w procesie migracji KKM.....	39
4.3.4. Rola sygnałowania purynergicznego podczas farmakologicznej mobilizacji KKM.....	41
4.3.5. Rola sygnałowania purynergicznego w procesie wszczepiania się KKM oraz poprzezzeczepowej odnowie hematologicznej.....	43
5. Cel pracy	46
6. Materiały i metody	47
6.1. Zwierzęta doświadczalne.....	47
6.2. Wykorzystywane związki chemiczne oraz inhibitory	47
6.3. Farmakologiczna mobilizacja z wykorzystaniem G-CSF	48
6.4. Farmakologiczna mobilizacja z wykorzystaniem AMD3100	49
6.5. Ocena efektywności procesu mobilizacji	49
6.6. Analiza cytometryczna – oznaczanie komórek SKL.....	49
6.7. Test potencjału klonogenego progenitorów szeregu CFU-GM.....	50
6.8. Ocena wydajności procesu wszczepiania się KKM do niszy szpikowej	50
6.9. Ocena wydajności procesu zasiedlania niszy szpikowej przez KKM.....	51
6.10. Ocena skuteczności procesu odnowy układu krwiotwórczego	52
6.11. Test chemotaktyczny	52
6.12. Analiza procesu migracji KKM.....	53

6.13. Test adhezji	53
6.14. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym - Real-time PCR	53
6.15. Izolacja mysich oraz ludzkich KKM	55
6.16. Test aktywacji inflamasomu Nlrp3	56
6.17. Analiza statystyczna.....	56
7. Wyniki	57
7.1. Ocena ekspresji receptorów P2X na mysich i ludzkich KKM.....	57
7.2. Ocena roli receptora P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM i odnowie hematologicznej po przeszczepie.....	58
7.2.1. Określenie roli receptora P2X4 w procesie migracji KKM	58
7.2.2. Określenie roli receptora P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM.....	61
7.2.3. Określenie roli receptora P2X4 w procesie wszczepiania i zasiedlania niszy szpikowej oraz odnowie hematologicznej po przeszczepieniu KKM	66
7.3. Ocena roli receptora P2X1 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM i odnowie hematologicznej po przeszczepie	74
7.3.1. Określenie roli receptora P2X1 w procesie migracji i adhezji KKM	74
7.3.2. Określenie roli receptora P2X1 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM.....	76
7.3.3. Określenie roli receptora P2X1 w procesie wszczepiania i zasiedlania niszy szpikowej oraz odnowie hematologicznej po przeszczepieniu KKM	79
7.3.4. Określenie roli receptora P2X1 w procesie aktywacji kompleksu inflamasomu Nlrp3	87
8. Dyskusja	88
8.1. Nowe spojrzenie na cząsteczkę ATP – znaczenie sygnałowania purynergicznego	88
8.2. Rola sygnałowania purynergicznego w regulacji komórek krwi i KKM	89
8.3. Profil ekspresji receptorów P2X na KKM	91
8.4. Uzasadnienie wyboru receptora P2X1 oraz P2X4 do badań określających ich rolę w procesach biologii KKM	92
8.5. Rola receptorów P2X1 oraz P2X4 w procesie migracji komórek względem czynników chemotaktycznych.....	93
8.6. Znaczenie receptorów P2X1 oraz P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji	94
8.7. Rola receptorów P2X1 oraz P2X4 w procesie wszczepiania i zasiedlania niszy szpikowej przez KKM oraz odnowie hematologicznej po przeszczepie.....	99
9. Podsumowanie	103
10. Wnioski	105
11. Piśmiennictwo	106

Spis rycin i tabel

Rycina 1. Uproszczony schemat procesu krwiotworzenia	18
Rycina 2. Krwiotwórcze komórki macierzyste w niszy szpikowej	22
Rycina 3. Proces mobilizacji i wszczepienia się KKM w niszy szpikowej	26
Rycina 4. Uproszczony schemat sygnalizacji purynergicznej	30
Rycina 5. Rodzaje receptorów purynergicznych oraz ich agoniści	34
Rycina 6. Rola sygnałowania purynergicznego w procesie migracji KKM	40
Rycina 7. Schemat oddziaływania sygnałowania purynergicznego, kompleksu inflamasomu Nlrp3 oraz kaskady układu dopełniacza w procesie mobilizacji KKM.....	42
Rycina 8. Poziom ekspresji receptorów P2X na ludzkich oraz mysich KKM	57
Rycina 9. Wpływ receptora P2X4 na migrację mysich komórek jednojądrzastych szpiku kostnego względem czynników chemotaktycznych	59
Rycina 10. Wpływ receptora P2X4 na aktywność migracyjną jednojądrzastych komórek izolowanych ze szpiku kostnego	60
Rycina 11. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na indukowaną poprzez G-CSF farmakologiczną mobilizację KKM.....	62
Rycina 12. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na farmakologiczną mobilizację indukowaną AMD3100	63
Rycina 13. Wpływ zahamowania ekspresji receptorów P2X7 i P2X4 na indukowaną poprzez G-CSF mobilizację KKM	64
Rycina 14. Wpływ zahamowania ekspresji receptorów P2X7 i P2X4 na farmakologiczną mobilizację KKM indukowaną AMD3100.....	65
Rycina 15. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 u myszy typu WT na proces wszczepiania się KKM	67
Rycina 16. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 u myszy WT na proces zasiedlenia KKM w niszy szpikowej	68
Rycina 17. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na KKM na proces ich wszczepiania się do szpiku myszy WT	69
Rycina 18. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na KKM na wydajność zasiedlania niszy szpikowej myszy WT	70
Rycina 19. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 u myszy WT na proces odnowy hematologicznej po przeszczepie KKM	72

Rycina 20. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na KKM na proces odnowy hematologicznej u myszy WT	73
Rycina 21. Wpływ receptora P2X1 na migrację mysich komórek szpiku względem czynników chemotaktycznych.....	75
Rycina 22. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na adhezję mysich komórek szpiku	76
Rycina 23. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na indukowaną poprzez G-CSF mobilizację KKM	77
Rycina 24. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na mobilizację KKM indukowaną czynnikiem AMD3100	78
Rycina 25. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 u myszy WT na proces wszczepiania się KKM do szpiku kostnego	80
Rycina 26. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 u myszy WT na proces zasiedlania niszy szpikowej przez KKM	81
Rycina 27. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na KKM na proces wszczepiania u myszy WT	82
Rycina 28. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na KKM na proces zasiedlania niszy szpikowej u myszy WT	83
Rycina 29. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 u myszy WT na proces odnowy hematologicznej po przeszczepie KKM	85
Rycina 30. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na KKM na proces odnowy hematologicznej u myszy WT	86
Rycina 31. Rola receptora P2X1 w aktywacji kompleksu inflamasomu Nlrp3 w KKM.....	87
Tabela 1. Schemat stosowania inhibitorów receptorów P2X1, P2X4, P2X7 w badaniach <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	48
Tabela 2. Startery wykorzystywane w reakcjach Real-time PCR	54

1. Wykaz stosowanych skrótów

5'-NT-aza - ekto-5'-nukloetydaza (ang. *ecto-5'-nucleotidase*), inaczej CD73

Ado – adenozyne (ang. *adenosine*)

ADP – adenozyne-5'-difosforan (ang. *adenosine-5'-diphosphate*)

AMD3100 - plerixafor, niskocząsteczkowy antagonist CXC4

AML - ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia*)

AMP - adenozyne-5'-monofosforan, (ang. *adenosine-5'-monophosphate*)

Ang-1 – angiotpoetyna 1 (ang. *angiopoietin 1*)

APC - allofikocyjanina (ang. *allophycocyanin*)

ATP - adenozyne-5'-trifosforan (ang. *adenosine-5'-triphosphate*)

ASC – białko adaptorowe ASC (ang. *apoptosis-associated speck-like protein*)

BDNF - neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*)

BM-MSC – mezenchymalne komórki niszy szpikowej (ang. *bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*)

BSA – albumina surowicy bydłej (ang. *bovine serum albumine*)

c-Kit - receptor czynnika wzrostu komórek macierzystych (ang. *tyrosine-protein kinase KIT*)

C1P - ceramido-1-fosforan (ang. *ceramide-1-phosphate*)

C3a – składowa dopełniacza C3a, anafilatoksyna (ang. *complement component 3a*)

C5a – składowa dopełniacza C5a, anafilatoksyna (ang. *complement component 5a*)

CD39 – pirofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydów, inaczej NPP-aza

CD44 - przezłonowy receptor kwasu hialuronowego

CD62E – e-selektyna

CD73 – ekto-5'-nukloetydaza, inaczej 5'-NT-aza

CD106 - białko adhezyjne komórek naczyńniczych-1, inaczej VCAM-1

CFU-GM - jednostka tworząca kolonie szeregu granulocytarno – makrofagowego (ang. *colony-forming units-granulocyte-macrophage*)

CFU-S - jednostka tworząca kolonie śledzionowe (ang. *spleen colony forming unit*)

CLL - przewlekła białaczka limfocytowa (ang. *chronic lymphocytic leukemia*)

CLP - wspólna komórka progenitorowa linii limfoidalnej (ang. *common lymphoid progenitor*)

CMP – wspólna komórka progenitorowa linii granulocytarnej i mieloidalnej (ang. *common myeloid progenitor*)

CXCL12 – chemokina motywu CXCL12 (ang. *C-X-C motif chemokine 12*), inaczej SDF-1

CXCR4 - receptor chemokinowy CXC typu 4, (ang. *C-X-C chemokine receptor type 4*)

DAMP – cząsteczka związana ze stanem zagrożenia komórkowego (ang. *danger-associated molecular pattern*)

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

EGFR - receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)

EPO - erytropoetyna (ang. *erythropoietin*)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

FITC - izotiocyanin fluoresceiny (ang. *fluorescein isothiocyanate*)

FLT-3 – ligand kinazy tyrozynowej 3 (ang. *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*)

G-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*)

GCSFR - receptor czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor receptor*)

GvDH – choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (ang. *graft versus host disease*)

HLA – ludzkie antygeny leukocytarne zgodności tkankowej (ang. *human leukocyte antigen*)

HMGB-1 - białka o dużej ruchliwości elektroforetycznej 1 (ang. *high mobility group box 1*)

HO-1 – hemooksygenaza 1 (ang. *heme oxygenase 1*)

HSC - krwiotwórcza komórka macierzysta (ang. *hematopoietic stem cell*)

IL-3 – interleukina 3 (ang. *interleukin 3*)

IL-2 – interleukina 2 (ang. *interleukin 2*)

IFN- γ – interferon gamma (ang. *interferon gamma*)

KA – katecholamina (ang. *catecholamine*)

KM – komórka macierzysta (ang. *stem cell*)

KKM – krwiotwórcza komórka macierzysta (ang. *hematopoietic stem cell*)

MAPK - kinazy aktywowane mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases*)

MBL - białko wiążące mannozę (ang. *mannose binding lectin*)

MEP – komórka progenitorowa linii megakariocytów i erytrocytów (ang. *megakaryocyte/erythrocyte progenitors*)

MKC – komórki jednojądrzaste, monokariocyty (ang. *mononuclear cells*)

MMP – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinase*)

MPL – receptor trombopoetyny (ang. *myeloproliferative leukemia virus, thrombopoietin receptor*)

MSC - mezenchymalna komórka stromy (ang. *mesenchymal stromal cell*)

NPP-aza - pirofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydów (ang. *nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*), inaczej CD39

NTPDaza – fosfohydrolaza di- i trifosfonukleozydów (ang. *nucleoside triphosphate-diphosphohydrolase*)

PAMPs - wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen-associated molecular patterns*)

PAR1 - receptor aktywowany przez proteazę 1 (ang. *protease activated receptor 1*)

PB – krew obwodowa (ang. *peripheral blood*)

PBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. *phosphate-buffered saline*)

PE – fikoerytryna (ang. *phycoerythrin*)

PE-Cy7 - fikoerytryna-cyjanina 7 (ang. *phycoerythrin-cyanine 7*)

PLT – płytki krwi (ang. *platelets*)

PRR - receptor rozpoznający wzorce (ang. *pattern recognition receptor*)

RLU – umowna jednostka świetlna (ang. *relative light unit*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygene species*)

S100A9 – białko wiążące wapń (ang. *S100 calcium-binding protein A9*)

S1P - sfingozyno-1-fosforan (ang. *sphingosine-1-phosphate*)

S1PR – receptor sfingozyno-1-fosforanu (ang. *sphingosine-1-phosphate receptor*)

SCF - czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*)

SCGF – czynnik wzrostu komórek macierzystych (ang. *stem cell growth factor*)

SDF-1 - czynnik pochodzenia stromalnego 1 (ang. *stromal cell-derived factor 1*), inaczej CXCL12

SKL – komórki o fenotypie Sca-1⁺c-Kit⁺ Lin⁻

Tie-2 - receptor o aktywności kinazy tyrozynowej 2 (ang. *TEK tyrosine*)

TIMP – tkankowy inhibitor metaloproteinaz (ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*)

TPO - trombopoetyna (ang. *thrombopoietin*)

UDP - urydyno-5'-difosforan (ang. *uridine-5'-diphosphate*)

UDP-glukoza – urydyno-5'-difosfoglukoza (ang. *uridine-5'-diphosphate-glucose*)

UTP - urydyno-5'-trifosforan (ang. *uridine-5'-triphosphate*)

VCAM-1 lub CD106, białko adhezyjne komórek naczyńniowych-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule-1*)

VLA-4 - bardzo późny antygen-4 (ang. *very late antigen-4*), inaczej integryną $\alpha_4\beta_1$

WBC – białe krwinki (ang. *white blood cells*)

WT – szczep myszy typu dzikiego (ang. *wild type*), inaczej C57BL/6J

2. Streszczenie

Sygnalowanie purynergiczne uważane jest za jeden z najstarszych systemów sygnalizacji w organizmie. Jest to pozakomórkowy szlak, w którym elementami pośredniczącymi w przekazywaniu sygnału są zewnątrzkomórkowe nukleotydy, w tym adenozyno-5'-trifosforan (ATP, ang. *adenosine-5'-triphosphate*). W związku z ugruntowaną rolą ATP jako nośnika energii metabolicznej, teoria o jego zaangażowaniu w przekaźnictwo sygnału zewnątrzkomórkowego została sceptycznie przyjęta. Aktualnie dwójaka rola ATP jest powszechnie akceptowana, co skutkuje skupieniem uwagi na roli sygnalowania purynergicznego w różnych stanach fizjologicznych oraz patologicznych w organizmie. Szczególną rolę sygnalowaniu purynergicznemu przypisuje się w regulacji układu nerwowego i krwionośnego oraz w rozwoju chorób nowotworowych i odpowiedzi immunologicznej. Znaczenie sygnalowania purynergicznego w procesach krwiotwórczych jest znane dla komórek w pełni zróżnicowanych, natomiast jego rola w regulacji krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) nie jest do końca zbadana. W aspekcie badań nad procesami towarzyszącymi terapii z wykorzystaniem KKM wykazano, iż ATP jest ważnym regulatorem procesu mobilizacji, wszczepiania się oraz odnowy hematologicznej. Dodatkowo wykazano, iż receptor P2X7 jest mediatorem działania ATP.

Celem niniejszej pracy było zbadanie potencjalnego znaczenia wybranych receptorów P2X w wyżej wymienionych procesach, towarzyszącym terapii z wykorzystaniem KKM. Profilowanie ekspresji receptorów purynergicznych na mysich oraz ludzkich KKM wykazało, iż receptory P2X1, P2X4 oraz P2X7 charakteryzują się wyższą ekspresją na KKM w porównaniu do komórek jednojądrzastych szpiku lub krwi pępowinowej. Rola receptora P2X7 została potwierdzona we wcześniejszych badaniach, dlatego w prezentowanej rozprawie określano znaczenie receptorów P2X1 oraz P2X4. Przeprowadzając szereg eksperymentów, oceniających rolę wybranych receptorów w procesach towarzyszących terapiom wykorzystującym KKM, zastosowano komercyjnie dostępne inhibitory receptorów oraz unikalne modele zwierzęce.

Uzyskane wyniki potwierdziły znaczenie receptorów P2X1 i P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji wykorzystującej rutynowo stosowane czynniki - G-CSF oraz AMD3100. Wykazano, iż zablokowanie prawidłowej funkcji receptorów powodowało znaczące upośledzenie tego procesu. Wyniki uzyskiwane podczas eksperymentów określających wydajność wszczepienia się KKM oraz zasiedlania niszy szpikowej również

wykazały, iż poprawne funkcjonowanie receptora P2X1 i P2X4 jest niezbędne dla uzyskania prawidłowego wszczepienia. Dodatkowo udowodniono, iż obniżenie wydajności procesu wszczepienia i zasiedlenia niszy szpikowej, prowadzi do wydłużenia czasu potrzebnego do odtworzenia krwiotworzenia po przeszczepie. Dowiedziano również, iż ekspresja receptorów P2X na KKM wpływa na aktywację inflamasomu Nlrp3, który jest kompleksem łączącym sygnałowanie purynergiczne oraz kaskadę układu dopełniacza. Prawidłowe działanie wymienionych układów jest zatem niezbędne dla optymalnego procesu farmakologicznej mobilizacji oraz poprzyszczepowych mechanizmów warunkujących odtworzenie procesu krwiotworzenia.

Podsumowując, wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy znacząco zwiększają poziom wiedzy o roli sygnałowania purynergicznego w regulacji migracji KKM oraz ich retencji w niszy szpikowej. Wykazanie znaczenia receptorów P2X1 oraz P2X4 może zostać wykorzystane do optymalizacji protokołów klinicznych, dla pacjentów poddawanych mobilizacji, gdzie wytypowanie mutacji w genach kodujących receptory purynergiczne będzie wskazówką do zastosowania niestandardowych procedur mobilizujących KKM.

3. Summary - The role of P2X receptors in the process of bone marrow engraftment and pharmacological mobilization of stem cells.

Purinergic signaling is considered to be an evolutionarily ancient signaling mechanism in the organism. It is a form of extracellular signaling mediated by nucleotides and nucleosides, including, most importantly, ATP. Because of ATP's established role as an intracellular energy source, the concept of purinergic signaling was initially met with strong opposition. Currently, purinergic signaling is widely accepted, and a number of studies have indicated its role in modulating homeostasis and pathological processes in the body. Purinergic signaling is a critical regulator of the nervous and cardiac system and also plays an important role in the immune response and pathogenesis of cancer.

The involvement of purinergic signaling in maintaining normal and stress-induced hematopoiesis needs reappraisal as its role is only well established for fully differentiated cells. There is a growing understanding of the role of purinergic signaling in controlling hematopoietic stem cells (HSC) used in transplantations therapies; recent evidence indicates that ATP is a vital regulator of the process of pharmacological mobilization of HSC and subsequent proper homing and engraftment of these cells into the bone marrow after hematopoietic transplantation. The engagement of the well-described purinergic receptor, P2X7, was also established.

This study aimed to explore the involvement of purinergic receptors other than P2X7 in HSC trafficking. First, the expression of all purinergic receptors on HSC of human and murine origin was evaluated. The results indicated that P2X1, P2X4, and P2X7 receptors are characterized by elevated expression on HSC when compared with mononuclear cells. Therefore, P2X1 and P2X4 receptors were selected for further studies. With the use of available experimental animal models and specific inhibitors, the role of P2X1 and P2X4 receptors in the processes determining the optimal use of HSC in hematopoietic transplantation was evaluated. Obtained results confirmed the role of the chosen receptors in pharmacological mobilization with the use of routinely utilized agents, G-CSF and AMD3100, where the inhibition of either P2X1 or P2X4 expression resulted in the defective mobilization of HSC. Subsequently, the impact of purinergic receptors in the process of proper HSC seeding after the transplantation was evaluated. The study demonstrated that functional P2X1 and P2X4 receptors are required for optimal efficiency of the homing and engraftment processes.

The observed defective homing and engraftment also led to the prolonged time needed for complete hematological reconstitution. Finally, the obtained results indicated that ATP activates the Nlrp3 inflammasome in a P2X1 and P2X4 receptor-dependent manner, coupling purinergic signaling with innate immunity. Already published data have proven the importance of the Nlrp3 inflammasome and complement cascade, explaining their role in the trafficking of HSC.

In conclusion, obtained results shed more light on the role of purinergic signaling in the egress of HSC from the bone marrow into peripheral blood in the mobilization process and in the proper homing and engraftment of HSC into the bone marrow after transplantation. Both processes are crucial for clinical outcomes in therapies for various hematological conditions. Therefore, presented results could be utilized in unconventional clinical protocols for additional screening of patients and donors or to introduce modified protocols to ensure proper mobilization or seeding of transplanted cells.

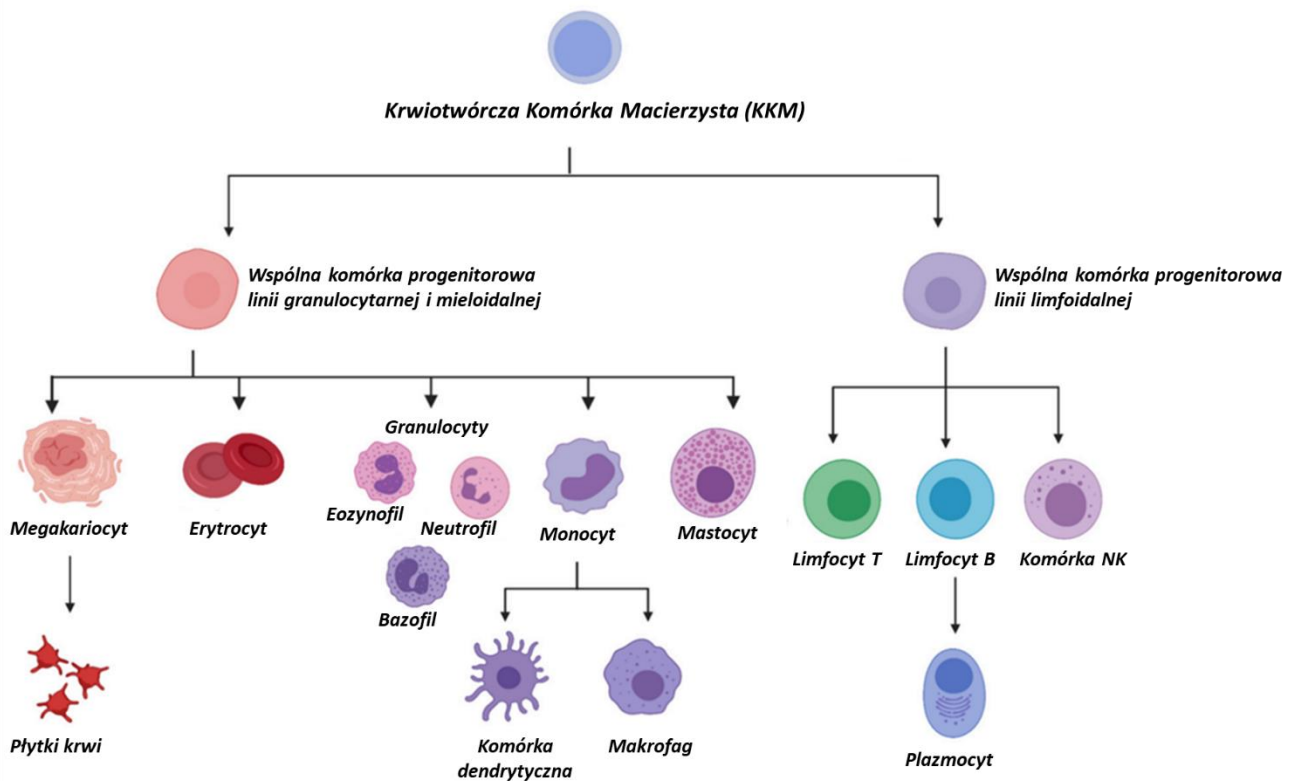
4. Wstęp

4.1. Krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM)

Krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) należą do rodzaju tkankowo ukierunkowanych, somatycznych komórek macierzystych (KM) [1]. Posiadają one cechy komórek multipotencjalnych, tj. mających możliwość różnicowania się do różnego rodzaju elementów morfotycznych krwi, zarówno linii limfoidalnej (limfocyty T i B oraz komórki naturalnej cytotoksyczności) jak i mieloidalnej (erytrocyty, komórki tuczne, monocyty, granulocyty oraz megakariocyty) (**Rycina 1**) [2,3].

Definicja KM zakłada jej zdolność do podziałów i ewentualnego różnicowania w różne typy komórek [4,5]. Asymetryczne podziały KM pozwalają na uzyskanie komórki zróżnicowanej oraz identycznej KM, co zapewnia ich samoodnowę i zachowania puli komórek, niezbędnej dla prawidłowego funkcjonowania i wzrostu organizmu. KM może również dzielić się symetrycznie, gdzie podczas podziału powstaną dwie KM lub dwie komórki częściowo zróżnicowane [6,7]. KKM wykazują wyżej wymienione cechy KM. Stan spoczynku, podziały lub różnicowanie KKM podlegają regulacji poprzez oddziaływania z cząsteczkami adhezyjnymi, działanie cytokin i chemokin oraz czynników transkrypcyjnych i metabolicznych, w miejscu ich lokalizacji, czyli niszy szpikowej [8-14].

Prawidłowe funkcjonowanie układu krwiotwórczego w ciągu całego życia osobniczego, możliwe jest dzięki wydajnej produkcji ogromnej ilości komórek krwi. Asymetrycznie dzieląca się KKM odtwarza jedną komórkę KKM, zachowując pulę komórek, natomiast druga komórka różnicuje się w kierunku krwiotwórczej komórki ukierunkowanej. Powstająca komórka progenitorowa, posiadająca ograniczoną zdolność do samoodnowy, może natomiast proliferować tworząc klony komórek potomnych (według schematu z **Ryciny 1**) [15-18]. Potencjał proliferacyjny komórek progenitorowych jest bardzo duży. Według danych, w każdej sekundzie, organizm ludzki produkuje średnio 2 miliony komórek krwi. Tak duże zapotrzebowanie wiąże się z stosunkowo krótkim okresem życia poszczególnych elementów krwi, dla przykładu erytrocyty żyją około 120 dni, natomiast płytki krwi jedynie około tygodnia [19].



Rycina 1. Uproszczony schemat procesu krwiotworzenia. Krwiotwórcza komórka macierzysta (KKM), wchodząc na drogę dojrzewania może zróżnicować się w kierunku wspólnej komórki progenitorowej linii granulocytarnej i mieloidalnej (CMP, ang. *common myeloid progenitor*) lub wspólnej komórki progenitorowej linii limfoidalnej (CLP, ang. *common lymphoid progenitor*). Komórka CMP, pod wpływem działania czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) różnicuje się w kierunku granulocytów i monocytów, pod wpływem erytropoetyny (EPO, ang. *erythropoietin*) w kierunku erytrocytów, pod wpływem trombopoetyny (TPO, ang. *thrombopoietin*) w kierunku megakariocytów. Komórka CLP pod wpływem m.in. ligandu kinazy tyrozynowej 3 (FLT-3, ang. *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*) różnicuje się w kierunku limfocytów T i B. Zmodyfikowano na podstawie [2].

Dzięki wspomnianym właściwościom proliferacyjnym powstających z KKM progenitorowych komórek, obliczono, iż każda z KKM dzieli się jedynie raz na 3 lata. Po podziale symetrycznym KKM opuszcza niszę szpikową, w celu utrzymania stałej ilości KKM w szpiku kostnym. Zachowywana jest swoista równowaga pomiędzy ilością komórek w szpiku kostnym i liczbą krążących w łożysku naczyniowym [19-21]. Migracja KKM jest bardzo złożonym procesem i zostanie szerzej opisana w późniejszych rozdziałach.

KKM jest najlepiej poznanym rodzajem KM. Populacja KKM jest dobrze zdefiniowana pod względem morfologicznym, immunohistochemicznym oraz czynnościowym. KKM cechuje bardzo wąski obręb cytoplazmy i silnie skondensowana chromatyna w jądrze. Pod

względem wielkości podobne są do małych limfocytów [22,23]. Identyfikacja i izolacja, np. z krwi pępowinowej zachodzi z wykorzystaniem markerów powierzchniowych. Fenotyp KKM zdefiniowany jest na podstawie obecności lub braku ekspresji antygenów, m. in.: CD34, c-Kit R (CD117), Thy-1, CD45, CD38, CD7T, HLA-DR, CXCR4 (CD184), AC133 (CD133), CD45RA^{Low}, Lin [24-26]. W analizach prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, jako ludzkie KKM definiowano komórki Lin⁻CD45⁺CD34⁺, jako mysie KKM komórki o fenotypie Sca1⁺c-Kit⁺Lin⁻ lub Sca1⁺CD45⁺ Lin⁻.

KKM są obecnie najczęściej wykorzystywanym rodzajem KM w standardowych procedurach leczniczych. Stosuje się je przede wszystkim w transplantologii hematologicznej, do leczenia chorób pierwotnych lub wtórnych niewydolności szpiku kostnego [27,28]. Do chorób, w przebiegu których najczęściej stosuje się przeszczepianie KKM należą białaczki, m.in. ostra białaczka limfatyczna oraz ostra białaczka szpikowa [29-31]. W klinice, wyróżnia się kilka rodzajów przeszczepów w zależności od źródła KKM, gdzie wybór konkretnej metody zależy od dostępności zgodnego materiału oraz od typu choroby. Dla przykładu, w zespołach mielodysplastycznych zalecane są przeszczepy allogeniczne, gdzie KKM pobierane są od dawców dopasowanych pod względem antygenów zgodności tkankowej (HLA, ang. *human leukocyte antigen*) [32,33], natomiast przeszczepy autologiczne, wykorzystujące własne KKM, wskazane są w przypadku chłoniaków oraz opcjonalnie w leczeniu wybranych nowotworów litych. W uproszczeniu, procedura przeszczepu polega na dożylnym podaniu preparatu komórkowego pacjentowi. Przeszczepione KKM zasiedlają niszę szpikową i rozpoczynają proces odtwarzania hematopoezy [34-36]. W niniejszej pracy wykorzystywano dostępne modele zwierzęce do badania dynamiki tego procesu, co zostało opisane w kolejnych rozdziałach.

Głównym źródłem KKM dla przeszczepów jest krew obwodowa, gdzie KKM izolowane są z wykorzystaniem procedury leukoforezy [37,38]. Spoczynkowa ilość KKM we krwi jest jednak niewielka i aby pobrać wymagane do przeszczepu ilości, należy poddać dawcę stymulacji zwanej farmakologiczną mobilizacją [38]. Proces mobilizacji opisano w dalszych rozdziałach. Kolejnym źródłem pozyskiwania KKM do przeszczepu jest szpik kostny. KKM izolowane są z jam szpikowych obu kości biodrowych, dążąc do pobrania 10-15 ml zawiesiny na 1 kg masy ciała dawcy. Materiał szpikowy wykorzystywany jest głównie do przeszczepów allogenicznych [39,40]. W zależności od stopnia pokrewieństwa dawcy i biorcy, minimalna ilość przyczepianych komórek różni się. Według norm, w przypadku przeszczepu allogenicznego, gdzie dawcą jest zgodne w zakresie HLA rodzeństwo, ilość podawanych komórek CD34⁺ wynosi najmniej 2 x 10⁶ komórek na 1 kg masy ciała biorcy, a w przypadku

osób niespokrewnionych jest to już przynajmniej $3 \times 10^6/\text{kg}$ masy ciała [41-43]. Porównując przeszczepy KKM izolowanych z krwi obwodowej oraz szpiku należy zauważyć, iż odnowę hematologiczną uzyskuje się szybciej, gdy źródłem KKM jest krew obwodowa, jednak w przypadku przeszczepienia komórek szpikowych istnieje mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GvHD, ang. *graft-versus-host disease*), która w zależności od stopnia nasilenia może doprowadzić do odrzucenia przeszczepu. Podczas GvHD, komórki z przeszczepionego materiału (limfocyty T) atakują komórki i narządy biorcy, w szczególności jego wątrobę, układ pokarmowy oraz skórę [44-46].

Źródłem KKM do przeszczepu może być również krew pępowinowa. Pobrana w czasie porodu krew, w objętości 100-150 ml, deponowana jest w bankach komórek macierzystych, gdzie po przetworzeniu w warunkach laboratoryjnych i zamrożeniu, magazynowana jest do czasu ewentualnego przeszczepu. Cechami charakterystycznymi przeszczepów z wykorzystaniem komórek pochodzących z krwi pępowinowej jest krótki czas potrzebny na pozyskanie materiału oraz zwiększona tolerancja względem różnic w ekspresji antygenów w układzie HLA. Do wad tego rodzaju przeszczepów należy przede wszystkim stosunkowo niska komórkowość pobranego materiału, wystarczająca jedynie na leczenie dzieci oraz dłuższy czas wszczepiania się komórek i rozpoczęcia odnowy układu krwiotwórczego [47-50].

4.1.1. Retencja KKM w niszy szpikowej

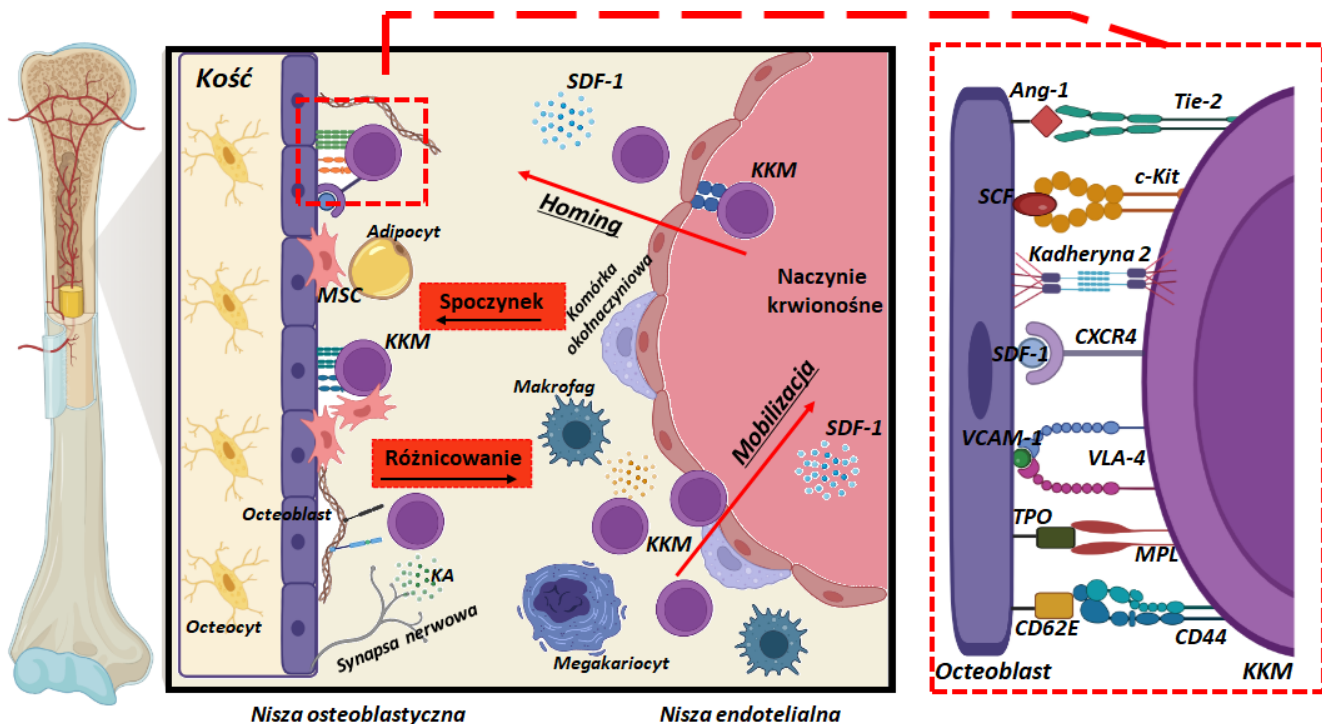
KKM w szpiku kostnym zlokalizowane są w tak zwanej niszy szpikowej. Komórki budujące nisze, znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie KKM, wpływając na przekazywanie sygnałów oraz przede wszystkim regulując stan funkcjonalny KKM, utrzymują równowagę pomiędzy stanem spoczynku a procesami proliferacji i różnicowania się komórek. W zależności od stanu funkcjonalnego, KKM lokalizują się w różnych obszarach niszy [51,52].

Pod względem anatomicznym wyróżnia się dwa rodzaje niszy: osteoblastyczną oraz endotelialną. Nisza osteoblastyczna zlokalizowana jest przy okostnej w wewnętrznej części jamy szpikowej. Nisza zbudowana jest głównie z komórek pochodzenia mezenchymalnego, takich jak fibroblasty i adipocyty oraz komórek linii hematopoetycznej, makrofagów i osteoblastów. Niszę cechuje również obecność substancji pozakomórkowych, takich jak kolagen czy osteopontyna. Ważnym elementem niszy osteoblastycznej są wydzielane przez komórki cytokiny. W obszarze niszy osteoblastycznej zlokalizowane są głównie KKM będące

w stanie spoczynku, stanowiące około 16% wszystkim krwiotwórczych komórek szpiku. Ochrona KKM przed warunkami i czynnikami stresowymi w niszy osteoblastycznej oraz kontrola stanu ich spoczynku, jest podstawowym mechanizmem warunkującym podtrzymanie hematopoezy w cyklu całego życia organizmu [53,54].

Nisza endotelialna czyli naczyńowa, zlokalizowana jest w pobliżu śródbłonna naczyń włosowatych w szpiku. Zbudowana jest z sinusoidalnych struktur tworzących barierę krewszpik. W anatomii niszy naczyniowej charakterystyczne jest występowanie licznych cząsteczek adhezyjnych, przede wszystkim białka adhezyjnego komórek naczyniowych 1 (VCAM-1, ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) oraz selektyny [14]. W niszy naczyniowej zlokalizowane są komórki o większym stopniu zróżnicowania, stanowiące około 80% wszystkich KKM w szpiku kostnym. Uważa się, że są to komórki w stanie aktywnym, ulegające różnicowaniu i gotowe do wyjścia z niszy szpikowej, skąd ich lokalizacja w pobliżu naczyń krwionośnych [55].

Utrzymywanie KKM w szpiku kostnym warunkowane jest interakcją występującego na powierzchni KKM bardzo późnego antygenu-4 (VLA-4, ang. *very late antigene-4*) inaczej nazywanym $\alpha 4\beta 1$ -integryną z VCAM-1 na komórkach niszy szpikowej oraz oddziaływaniu receptora chemokinowego CXC typu 4 (CXCR4, ang. *C-X-C chemokine receptor type 4*) z czynnikiem pochodzenia stromalnego 1 (SDF-1, ang. *stromal cell-derived factor 1*) inaczej nazywanym chemokiną motywu CXCL12 [56,57]. Wymienione połączenia są kluczowe dla utrzymania KKM w niszy szpikowej. Dodatkowo, na retencję KKM wpływa również oddziaływanie osteoblastów i osteoklastów z KKM z wykorzystaniem interakcji cząsteczek adhezyjnych, integryn i kadheryn oraz ilość i rodzaj cytokin występujących w niszy m.in czynnika wzrostu dla kolonii granulocytów (G-CSF, ang. *granulocyte colony-stimulating factor*) oraz czynnika komórek macierzystych (SCF, ang. *stem cell factor*) [58]. Na utrzymywanie KKM lub ich uwalnianie z niszy szpikowej do krwi obwodowej wpływa również stosunek metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*) do tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs, ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) [59]. Schematyczny obraz niszy szpikowej oraz występujących w niej połączeń i oddziaływań przedstawiono na **Rycinie 2**.



Rycina 2. Krwiotwórcze komórki macierzyste w niszy szpikowej. Retencja KKM w niszy szpikowej jest dynamicznym procesem utrzymującym balans pomiędzy różnicowaniem a odnową komórek. Komórki w stanie spoczynku, zlokalizowane w niszy osteoblastycznej utrzymywane są w niszy dzięki licznym połączeniom (prawy panel). Komórki różnicujące się oraz aktywowane do wyjścia ze szpiku w procesie mobilizacji lokalizują się w niszy endotelialnej. MSC - mezenchymalne komórki stromy, KA - katecholamina, Ang-1 – angiopoetyna 1, Tie-2 - receptor o aktywności kinazy tyrozynowej 2, SCF - czynnik komórek macierzystych, c-Kit - receptor czynnika wzrostu komórek macierzystych, SDF-1 - czynnik pochodzenia stromalnego 1, CXCR4 – receptor chemokinowy CXC typu 4, VCAM-1 - białko adhezyjne komórek naczyniowych 1, VLA-4 – bardzo późny antygen-4, $\alpha 4\beta 1$ -integryna, TPO - trombopoetyna, MPL – receptor trombopoetyny, CD62E – e-selektyna, CD44 - przezłonowy receptor kwasu hialuronowego. Wykonano w programie BioRender na podstawie [69 i 70].

4.1.2. Proces migracji KKM

KKM wykazują zdolność do migracji. Po podziale w szpiku, KKM opuszcza nisze i przemieszcza się do obiegu naczyniowego w celu utrzymania homeostazy układu krwiotwórczego. Migracja KKM podlega również regulacji tzw. rytmu dobowego (największa ilość KKM w krwi obwodowej występuje we wczesnych godzinach porannych) [60,61] w procesach opisanych jako „patrolowanie” organizmu [62] oraz stanach zapalnych i w czasie odpowiedzi immunologicznej [63-65]. Wykazano również, iż wysoka aktywność fizyczna indukuje migrację KKM w organizmie [66,67]. W związku z powyższym, KKM nazywane są

„niestrudżonymi podróżnikami”, a ich procesy migracji są kontrolowane i koordynowane przez wiele czynników, między innymi przez cząsteczki adhezyjne, sygnalizację międzykomórkową, cytoszkielet oraz elementy niszy szpikowej. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że w zależności od pory dnia, od 100 do 400 KKM znajduje się w krwioobiegu [68]. Dodatkowo, rekrutacja KKM do krwi obwodowej może być sztucznie wyzwalana poprzez zastosowanie cytokin i leków podczas tzw. farmakologicznej mobilizacji.

Utrzymywanie KKM w niszy szpikowej, ich wyjście do krwioobiegu i powrót do szpiku kostnego jest procesem aktywnym, zależnym od stężenia czynników chemotaktycznych oraz powyżej opisanej interakcji molekuł adhezyjnych i ich ligandów. Wyjście KKM ze szpiku kostnego następuje zatem w rezultacie:

- działania enzymów proteolitycznych uwalnianych przez komórki linii mieloidalnej mikrośrodowiska szpiku, powodujących osłabienie połączenia KKM z komórkami niszy, tj. interakcji receptora CXCR4 z SDF-1 oraz integryny VLA-4 z białkiem adhezyjnym VCAM-1. Do enzymów uczestniczących w trawieniu połączeń międzykomórkowych należą m.in. katepsyna G i elastaza oraz enzymy z grupy metaloproteinaz [71,72].
- zmniejszenia aktywności osteoblastów, skutkującym obniżeniem ekspresji SDF-1 [71,72].
- aktywności neurotransmiterów uwalnianych z synaps nerwowych, przede wszystkim katecholamin, oddziałujących z receptorami beta-3 adrenergicznymi na KKM. Procesowi temu towarzyszy obniżenie stężenia SDF-1 w niszy. Dodatkowo powstające środowisko stresu aktywuje osteoklasty i nasila wydzielanie enzymów proteolitycznych [72].
- aktywacji kaskady układu dopełniacza, prowadzącej do wydzielania elementów pobudzających migrację KKM ze szpiku do krwioobiegu. Wykazano, iż fragmenty C5a wpływają na osłabienie oddziaływań osi CXCR4/SDF-1 i VLA-4/VCAM-1 poprzez aktywację wydzielania enzymów proteolitycznych przez komórki niszy szpikowej. Cząsteczka C5a, wiążąc się ze swoim receptorem, tj. C5aR na granulocytach prowadzi do ich aktywacji, czego skutkiem jest ich wyjście ze szpiku i “torowanie” drogi dla KKM [73-75].
- sygnalizacji purynergiczej [76], której schemat działania opisano w dalszych rozdziałach.

Złożoność mechanizmów regulujących migrację KKM ze szpiku kostnego do krwi obwodowej wykracza poza ramy prezentowanej rozprawy. W pracy, szczególną uwagę zwrócono na tzw. model sterylnego zapalenia i kaskady następujących po sobie zdarzeń, które zdają się kompleksowo tłumaczyć i łączyć ze sobą kilka mechanizmów prowadzących do mobilizacji KKM do krwioobiegu. Schemat ten opisano w kolejnym rozdziale dotyczącym roli sygnałowania purynergicznego w procesie mobilizacji.

4.1.3. Farmakologiczna mobilizacja KKM

Autologiczne i allogeniczne przeszczepy KKM są powszechnie wykorzystywane w leczeniu chorób układu krwiotwórczego i chłonnego. Jak wspomniano we wcześniejszych rozdziałach, preferowanym źródłem KKM do przeszczepu są komórki izolowane z mobilizowanej farmakologicznie krwi obwodowej. Korzyści wynikające z zastosowania procedury mobilizacji i izolacji KKM z krwi obwodowej, w porównaniu do bezpośredniej aspiracji KKM ze szpiku kostnego wiążą się, począwszy od większego komfortu prowadzonej procedury i jej bezpieczeństwa, poprzez szybszą odnowę hematologiczną po przeszczepie, do zwiększenia szans biorcy na przyjęcie przeszczepu przy jednoczesnym zmniejszeniu ilości poprzszczepowych powikłań [37,38].

Skuteczność przeszczepu zależy od wielu czynników, często o charakterze osobniczym, jednak kluczowym elementem jest liczba przeszczepianych komórek wykazujących ekspresję antygeny CD34. Przyjmuje się, że minimalna ilość wynosi 2×10^6 komórek/kg masy ciała biorcy, za optymalne wartości zaś uważa się $4-5 \times 10^6$ komórek CD34⁺ na kilogram masy ciała biorcy [41-43]. Niestety część pacjentów kwalifikowanych do autologicznych przeszczepów, oraz dawców w przeszczepach allogenicznych, charakteryzuje się obniżoną wydajnością procesu standardowo stosowanych protokołów mobilizacji, co skutkuje pozyskaniem zbyt małej ilości KKM [77].

Standardowe protokoły farmakologicznej mobilizacji zakładają wykorzystanie czynnika G-CSF (leki np. Neupogen lub Filgrastym) oraz małowcząsteczkowego antagonisty receptora CXCR4, AMD3100 (inna nazwa – Pleryksafor, preparaty np. Mozobil) [78,79]. Dodatkowo mogą być stosowane inne substancje (osobno lub w skojarzeniu), np. niektóre cytostatyki, niesteroidowe leki przeciwzapalne, białko onkogenu β , trombopoetyna oraz parathormon [80,81].

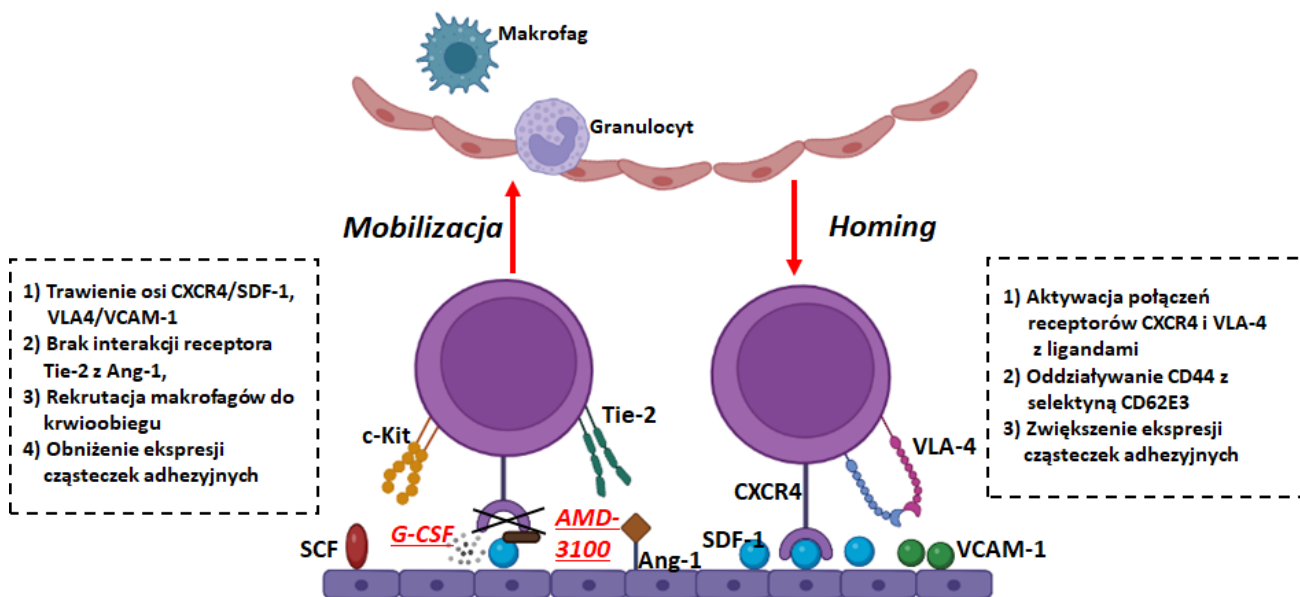
Zastosowanie środka mobilizującego inicjuje i zwiększa procesy proliferacji i migracji KKM zachodzące w warunkach stanu zapalnego lub innego rodzaju stresu. Badania na grupie pacjentów z nowotworami układu krwionośnego wykazały, iż ciągle podawanie preparatu zawierającego G-CSF przez okres 4 dni powodowało nawet 100-krotne zwiększenie ilości krążących we krwi obwodowej KKM [82]. Zakończona próba kliniczna wykazała również, że G-CSF jest środkiem bezpiecznym, wykazującym niską toksyczność z umiarkowanymi skutkami ubocznymi podawania [83]. Badania przyczyniły się do określenia dotychczas stosowanego schematu mobilizacji, który zakłada najczęściej dzienne podskórne podawanie preparatu w dawce 5-10 µg/kg masy ciała w okresie co najmniej 4 dni przed planowaną pierwszą leukoforezą oraz kontynuowanie podawania preparatu do czasu ostatniej izolacji komórek. Podawanie G-CSF w pierwszych dniach powoduje wzrost ilości krwinek białych (WBC, ang. *white blood cells*), natomiast maksymalne stężenie KKM wypada na 5-6 dobę od pierwszego podania G-CSF [84,85].

Działanie G-CSF polega prawdopodobnie na indukowaniu zmian w obrębie osteoblastów i makrofagów w niszy osteoblastycznej. Zachodzące w mikrośrodowisku zmiany skutkują uwolnieniem enzymów proteolitycznych trawiących połączenia KKM z niszą (oddziaływania CXCR4/SDF-1 i VLA-4/VCAM-1) oraz obniżeniem ekspresji samej cząsteczki SDF-1 [86,87]. Dodatkowym skutkiem odłączania KKM od komórek niszy jest modyfikacja procesu regulacji stanu spoczynku KKM. Brak interakcji receptora Tie-2 na KKM z angiopoetyną komórek niszy indukuje uwolnienie KKM ze stanu fizjologicznego spoczynku i aktywację ich proliferacji. W efekcie zachodzących zmian, następuje przemieszczenie KKM z niszy osteoblastycznej do niszy endotelialnej [88]. Następnie, w wyniku aktywacji układu dopełniacza, w pobliże naczyń krwionośnych rekrutowane są granulocyty, które opuszczając środowisko szpiku torują drogę wyjścia KKM. Dodatkowo, końcowe elementy aktywacji kaskady układu dopełniacza powodują wzrost stężenia bioaktywnego lipidu, sfingozyno-1-fosforanu (S1P, ang. *sphingosine 1-phosphate*) w krwi obwodowej [89]. S1P uwalniany z erytrocytów jest silnym czynnikiem chemotaktycznym wobec KKM [90]. Kolejnym procesem warunkującym wyjście KKM ze szpiku, związanym z podaniem G-CSF, jest usunięcie makrofagów z nisz szpikowych. Makrofagi posiadają receptor dla G-CSF, a ich rekrutacja do krwioobiegu na zasadzie chemotaksji skutkuje zmniejszeniem wydzielania chemokin oraz ekspresji cząsteczki adhezyjnej VCAM-1 w niszy szpikowej i w konsekwencji nasilenie procesu mobilizacji (**Rycina 3**) [72].

Kolejnym powszechnie wykorzystywanym środkiem podczas farmakologicznej mobilizacji jest AMD3100 (plerixafor). Jest on swoistym antagonistą receptora CXCR4,

którego działanie powoduje zaburzenie oddziaływań pomiędzy receptorem CXCR4 na KKM i SDF-1 w niszy szpikowej i w konsekwencji uwolnienie KKM do krwioobiegu [91,92]. Badania nad skutecznością i bezpieczeństwem stosowania AMD3100 wykazały, iż czynnik ten może powodować nawet 12-krotny wzrost ilości komórek CD34⁺ w krwioobiegu już po 4-6 godzinach od podania u zdrowych pacjentów oraz około 6-krotny wzrost dla pacjentów z nowotworami układu chłonnego [93]. Badania z udziałem zdrowych pacjentów wykazały, że podanie pojedynczej dawki AMD3100 skutkuje mobilizacją podobnej ilości komórek CD34⁺, co 5-dniowe stosowanie G-CSF. Dodatkowo wykazano, iż zastosowanie pojedynczej dawki AMD3100 w skojarzeniu z cyklem 5-krotnego podania G-CSF skutkowało blisko 4-krotnym zwiększeniem stopnia mobilizacji w stosunku do mobilizacji samym czynnikiem G-CSF [94].

Jak wspomniano, dużym problemem w postępowaniach klinicznych jest fakt, iż część pacjentów i dawców charakteryzuje obniżona wydajność mobilizacji, która może prowadzić do pozyskania niedostatecznej ilości komórek CD34⁺ wymaganych do przeszczepu. Dlatego pełne poznanie mechanizmów wpływających na proces mobilizacji ma kluczowe znaczenie dla optymalizacji protokołów mobilizacji i przeszczepiania KKM.



Rycina 3. Proces mobilizacji i wszczepienia się KKM w niszy szpikowej. Ang-1 – angiopoetyna 1, Tie-2 - receptor o aktywności kinazy tyrozynowej 2, SCF - czynnik komórek macierzystych, c-Kit - receptor czynnika wzrostu komórek macierzystych, SDF-1 - czynnik pochodzenia stromalnego 1, CXCR4 – receptor chemokinowy CXC typu 4, VCAM-1 - białko adhezyjne komórek naczyńnicowych-1, VLA-4 – bardzo późny antygen 4, α4β1-integryna. Wykonano w programie BioRender na podstawie [72].

4.1.4. Proces zasiedlania szpiku przez KKM po przeszczepie

Przeszczepienie KKM polega na dożylnym podaniu pobranego wcześniej preparatu zawierającego wymagane ilości komórek CD34⁺. Przeszczepiane komórki, w celu przywrócenia aktywności krwiotwórczej i trwałej odbudowy hematologicznej, muszą zasiedlić się w szpiku w procesie wszczepienia. Ważnym elementem, wpływającym na przygotowanie szpiku do przeszczepu, jest jego mieloablacja za pomocą radiochemioterapii w celu zniszczenia komórek odpowiedzialnych za patologiczny proces krwiotworzenia [95]. Proces terapii mieloablacyjnej prowadzi również do indukcji tzw. sterylnego zapalenia, które aktywuje m. in. kaskadę układu dopełniacza, którego aktywność niezbędna jest do prawidłowego wszczepienia się KKM do niszy szpikowej [96].

W procesie przeszczepiania KKM można wyróżnić dwa zasadnicze etapy, mianowicie wszczepianie do szpiku (ang. *homing*) a następnie zasiedlenie niszy szpikowej (ang. *engraftment*) [97].

Proces wszczepienia rozpoczyna się gdy KKM ulegają adhezji do komórek naczyń włosowatych szpiku. Następnie komórki migrują przez warstwy śródbłónka, docierając do niszy szpikowej. Etap ten jest stosunkowo szybki, następuje do kilku godzin po podaniu preparatu komórkowego. Wydajność tego etapu zależy od prawidłowej adhezji KKM do komórek śródbłónka oraz od prawidłowej ekspresji molekuly adhezyjnej CD44 i jej interakcji z śródbłónkową selektyną CD62E [98]. W kolejnym etapie kluczową rolę odgrywa oddziaływanie antygeny VLA-4 na KKM z VCAM-1 [99]. W zasiedlaniu szpiku ważną rolę pełni sygnalizacja komórkowa, w szczególności aktywność kinazy proteinowej PKB/Akt, która moduluje właściwości adhezyjne i migracyjne [100]. Po etapie migracji KKM przez warstwy śródbłónka na proces zasiedlania w niszy szpikowej, wpływa prawidłowe oddziaływanie pomiędzy CXCR4 i SDF-1 [101]. Oś ta odgrywa również ważną rolę w kolejnym etapie procesu, czyli w zakotwiczeniu komórek w niszy szpikowej. Oprócz oddziaływania CXCR4/SDF-1, zakotwiczenie w niszy osteoblastycznej zależy od stopnia wiązania fibronektyny przez molekuly adhezyjne z grupy integryn oraz od obecności receptorów dla jonów wapnia, umożliwiających związanie KKM na powierzchni okostnej [71,72,102,103].

Poznanie i zrozumienie mechanizmów, wpływających na wydajność procesu mobilizacji KKM oraz na procesy wszczepienia i zasiedlania KKM w niszy szpikowej po przeszczepie, ma kluczowe znaczenia dla wydajności prowadzonych terapii. Część pacjentów oraz dawców poddawanych standardowym protokołom leczenia nie mobilizuje wystarczającej

ilości KKM. Wykazano również pewne zależności warunkujące upośledzenie procesu wszczepienia się i zasiedlania niszy szpikowych, których konsekwencją może być np. przedłużający się okres pancytopenii spowodowany wydłużającym się okresem odtworzenia układu krwiotwórczego. W związku z powyższym, kluczowe jest opracowanie efektywnych metod uzyskiwania wystarczających ilości KKM do przeszczepienia oraz metod ich ewentualnego przygotowania przed przeszczepem, determinującego wydajniejszy proces zasiedlania szpiku i odnowy hematologicznej.

4.2. Sygnałowanie purynergiczne

Sygnałowanie purynergiczne, nazywane również nukleotydom, uważane jest za jeden z najstarszych systemów sygnalizacji w organizmie. Jest to pozakomórkowy szlak sygnalizacji, na który składa się kilka elementów, gdzie jako najważniejsze należy wymienić nukleotydy purynowe i nukleozydy, grupy receptorów dla tych cząsteczek oraz enzymy uczestniczące w ich metabolizmie [104]. Rolą sygnałowania nukleotydom w organizmie jest regulacja procesów fizjologicznych, w szczególności funkcjonowania układu nerwowego i krwionośnego oraz regulacja proliferacji i śmierci komórkowej [105-108]. Sygnałowanie nukleotydom odgrywa również bardzo ważną rolę w stanach patologicznych organizmu, modulując odpowiedź immunologiczną [109-111]. Szczególną rolę przypisuje się w regulacji schorzeń układu nerwowego i krwionośnego oraz w rozwoju chorób nowotworowych i autoimmunologicznych [112-116].

Sygnałowanie purynergiczne uważane jest za pierwotną formę komunikacji pozakomórkowej, jednak hipoteza o kluczowej jego roli, została potwierdzona stosunkowo niedawno. W 1972 roku, Geofry Burnstock, prowadząc badania nad działaniem zewnątrzkomórkowego ATP wykazał, iż nukleotyd ten działa jako neurotransmitter powodując kurczenie jelit i pęcherza moczowego świnki morskiej [117]. Burnstock, kontynuując w kolejnych latach badania nad działaniem ATP, zidentyfikował receptory uczestniczące w ATP zależnej odpowiedzi komórkowej i nazwał je receptorami purynergicznymi [118]. Ekspresję tych receptorów potwierdzono m.in. na błonach komórek ośrodkowego oraz obwodowego układu nerwowego, na błonie komórek nabłonkowych mięśni gładkich w naczyniach krwionośnych, na komórkach układu krwionośnego oraz komórkach krwiotwórczych [119,120]. Dalsze badania doprowadziły do zdefiniowania dwóch grup receptorów, które zostaną opisane w kolejnych rozdziałach.

4.2.1. Zewnątrzkomórkowe nukleotydy i nukleozydy purynowe ze szczególnym uwzględnieniem roli ATP i adenozyiny

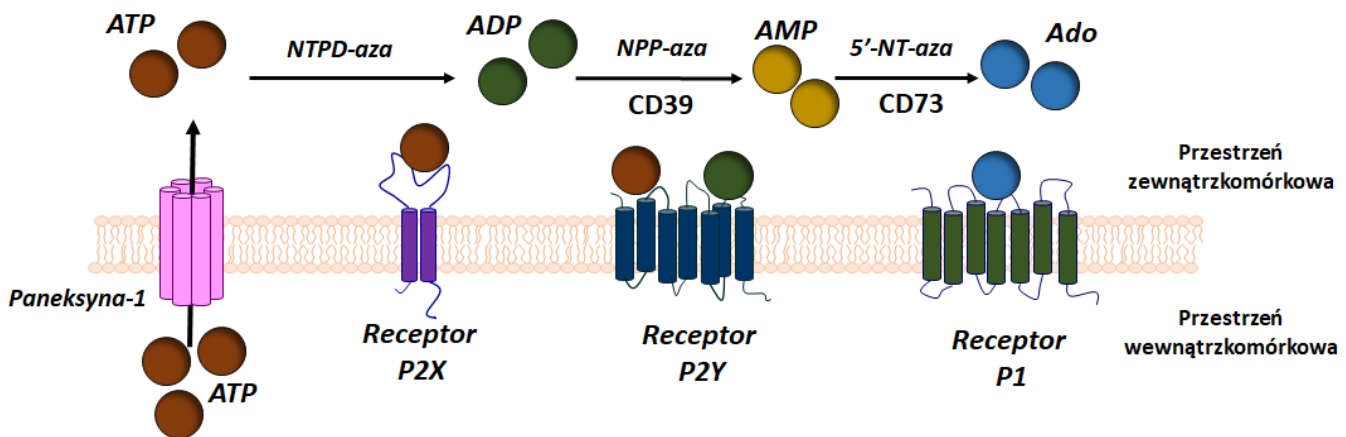
Od momentu identyfikacji, cząsteczka ATP, ze względu na obecność wysokoenergetycznych wiązań, była uznawana głównie za nośnik energii metabolicznej. Wykazano, iż ATP w komórkach zwierząt i roślin, stanowi magazyn energii wytwarzanej w czasie procesu fotosyntezy lub trawienia pokarmów, której uwalnianie następuje w zależności od zapotrzebowania energetycznego oraz typów reakcji zachodzących w komórkach. Energia uwalniana w procesie hydrolizy ATP utylizowana jest przez komórkę na potrzeby przeprowadzania procesów takich jak m.in. aktywny transport transbłonowy, ruchy komórkowe, praca mięśni, przewodzenie impulsów oraz reakcje syntezy oraz degradacji cząsteczek [121-124].

W związku z ugruntowaną pozycją ATP jako nośnika energii, głoszona przez Burnstocka teoria nerwów purynergicznych i udziału zewnątrzkomórkowego ATP w przekazywaniu zewnątrzkomórkowego sygnału, początkowo została przyjęta sceptycznie. Po publikacji szeregu odkryć, potwierdzających udział zewnątrzkomórkowego ATP w przekazywaniu sygnału oraz zidentyfikowaniu receptorów purynergicznych, sytuacja ta uległa zmianie. Dwojaka rola ATP została powszechnie zaakceptowana, a prowadzone od tej pory badania, m.in. nad rolą w procesie nowotworzenia i układzie immunologicznym zainicjowały produkcję leków nowej generacji, modulujących działanie receptorów ATP zależnych [125].

ATP w organizmie uwalniany jest przez komórki, m.in. w związku z ich uszkodzeniem [126]. Natomiast głównym źródłem ATP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej są komórki uwalniające ten nukleotyd w sposób konstytutywny, z wykorzystaniem kanałów jonowych lub w wyniku egzocytozy pęcherzyków wydzielniczych. Wydzielanie ATP poprzez kanały jonowe charakterystyczne jest dla komórek niepobudliwych, natomiast komórki pobudliwe wydzielają ATP do cytoplazmy, głównie na drodze egzocytarnej. Stężenie zewnątrzkomórkowego ATP, oraz innych nukleotydów zależne jest zarówno od tempa ich wydzielania z komórki, jak i działania enzymów hydrolizujących [127-131]. Drogę rozkładu cząsteczek nukleotydów przedstawiono na **Rycinie 4**.

ATP przekształcany jest do adenozyno-5'-difosforanu (ADP, ang. *adenosine-5'-diphosphate*) poprzez działanie fosfohydrolazy di- i trifosfonukleozydów (NTPD-aza). Następnie, za pomocą pirofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydów (NPP-aza lub CD39), ADP hydrolizowany jest do adenozyno-5'-monofosforanu (AMP, ang. *adenosine-5'-monophosphate*), który następnie przekształcany jest do adenozyiny (Ado, ang. *adenosine*)

poprzez ekto-5'-nukleotydazę (5'-NT-aza lub CD73) [132,133]. Ado może aktywować receptory purynergiczne P1 lub podlegać dalszym przemianom do inozyny i hipoksantyny bądź być transportowana ponownie do wnętrza komórki [134,135]. Przekształcenia te są kluczowe w procesie regulacji odpowiedzi immunologicznej, ponieważ od stosunku stężenia ATP i Ado zależy czy odpowiedź będzie miała charakter przeciwwzapalny czy prozapalny [136].



Rycina 4. Uproszczony schemat sygnalizacji purynergicznej. ATP transportowane na zewnątrz komórki, poprzez kanał paneksyny 1, aktywuje receptory P2X oraz P2Y. ATP rozkłada się poprzez NTPD-azę do ADP, które może aktywować receptory P2Y oraz być hydrolizowane do AMP poprzez NPP-azę. AMP ulega hydrolizie do Ado poprzez działanie enzymu 5'-NT-azy. Ado aktywuje receptory P1. ATP – adenozy-no-5'-trifosforan, ADP – adenozy-no-5'-difosforan, AMP – adenozy-no-5'-monofosforan, Ado – adenozy-na, NTPD-aza – fosfohydrolaza di- i trifosfonukleozydów, NPP-aza – pirofosfataza/fosfodiesteraza nukleoty-dów, 5'-NT-aza – ekto-5'-nukleoty-daza. Wykonano na podstawie [132].

Powstające cząsteczki nukleoty-dowe i nukleozy-dowe łączą się ze specyficznymi dla ich rodzaju receptorami purynergicznymi. Receptory te, znajdujące się w błonie zewnątrzkomórkowej, zostały opisane w 1976 roku przez Burnstocka. Ich dalsza charakterystyka, na podstawie budowy oraz rodzaju przyłączanego ligandu, doprowadziła do wydzielenia dwóch głównych grup [137,138], które zostaną omówione w kolejnym rozdziale. Liczne badania wykazały, iż lokalizacja receptorów w błonie zewnątrzkomórkowej jest ściśle powiązana z lokalizacją enzymów hydrolizujących. Zatem aktywność poszczególnych ekto-enzymów wpływa na ilość dostępnych dla poszczególnych receptorów ligandów, determinując ich aktywność. Przeprowadzane badania dowiodły również istnienie odwrotnej zależności, tj. wpływie aktywacji receptorów na działanie enzymów hydrolizujących ich ligandy [139,140].

Jak wspomniano, układ purynergiczny, a w szczególności jego dwie najważniejsze cząsteczki aktywujące, czyli zewnątrzkomórkowy ATP i Ado, odgrywają znaczącą rolę w regulacji działania układu immunologicznego, nerwowego, sercowo-naczyniowego oraz krwionośnego. Podczas gdy uwalnianie nukleotydów w normalnych warunkach fizjologicznych zachodzi w sposób konstytutywny, w stanach zapalnych następuje zwiększenie wydzielania ATP, który pełni funkcję cząsteczki związanej ze stanem zagrożenia komórkowego (DAMP, ang. *danger-associated molecular pattern*) aktywującej procesy zapalne [116,141]. Rozkład ATP i powstawanie przeciwstawnie działającej Ado moduluje odpowiedź immunologiczną, eliminując stan zagrożenia bez uszkodzenia tkanek organizmu. Zatem od stosunku ATP i Ado, zależy działanie układu purynergicznego który, w zależności od sytuacji może pełnić funkcję immunostymulującą, regulującą bądź supresyjną [142]. Rola układu purynergicznego w regulacji układu krwionośnego oraz w procesie krwiotworzenia zostanie omówiona w późniejszych podrozdziałach.

Stymulacja procesów zapalnych przez ATP odbywa się poprzez aktywację receptorów purynergicznych, uczestniczących m.in. procesie w dojrzewania i wydzielania interleukiny 1 β , będącej kluczową cytokiną prozapalną. Badania wykazały, że sygnałowanie purynergiczne zaangażowane jest w modulowanie odpowiedzi immunologicznej, poprzez regulowanie aktywności inflamasomu Nlrp3 oraz układu dopełniacza (ang. *complement system*) [143,144].

Inflamasom Nlrp3 jest cytozolowym kompleksem wielobiałkowym. Zbudowany jest on z białka Nlrp3, pełniącego rolę receptora rozpoznającego wzorce (PRR, ang. *pattern recognition receptor*), który może być aktywowany bezpośrednio przez mikroorganizmy lub przez cząsteczki DAMP. Kolejną składową inflamasomu jest białko adaptorowe ASC (ang. *apoptosis-associated speck-like protein*), przyłączane w kompleks po aktywacji receptora Nlrp3, którego działanie polega na aktywacji prokaspazy-1. Aktywna forma, kaspaza-1 wpływa natomiast na proces przekształcania prozapalnych interleukin 1 β i 18 (IL-1 β , IL-18) z form nieaktywnych (pro-IL-1 β , pro-IL-18), w formy aktywne oraz inicjuje śmierć komórki w procesie pyroptozy. Aktywne wydzielanie interleukin w wyniku aktywacji kompleksu inflamasomu Nlrp3, wzmacnia reakcje odpornościowe w organizmie [145]. Dodatkowo, aktywacja inflamasomu Nlrp3 prowadzi do wydzielania ATP oraz innych alarmin (HMGB1, ang. *high-mobility group box 1* oraz S100A9, ang. *S100 calcium-binding protein A9*), które mogą aktywować kaskadę układu dopełniacza, dodatkowo nasilając stopień odpowiedzi immunologicznej [146-149].

Układ dopełniacza, poprzez wykrywanie obecności wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP, ang. *pathogen-associated molecular patterns*) jak i

cząsteczek DAMP, jest ważnym elementem nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Aktywacja kaskady układu dopełniacza prowadzi do szeregu zjawisk, m.in. do lizy komórek bakteryjnych lub uszkodzenia komórek własnych organizmu oraz do wzmacniania („dopełniania”) działania układu odpornościowego [150-152].

Do tej pory największy udział w procesach zapalnych przypisywało się receptorowi P2X7, dawniej nazywanemu w związku ze swoją potwierdzoną rolą, receptorem śmierci komórki. Za jeden z najistotniejszych skutków odpowiedzi immunologicznej z udziałem ATP uważało się występowanie lokalnej hipoksji (jednocześnie jest to stan stymulujący wydzielanie Ado) [153,154]. Aktualnie prowadzone badania wykazały, iż również receptory P2X1 i P2X4 mogą aktywować inflamasom Nlrp3 i pośredniczyć w ten sposób w odpowiedzi immunologicznej [155,156].

Ado natomiast zapobiega uszkodzeniu tkanek organizmu aktywując cztery znane mechanizmy, tj. wzrost stosunku podaży tlenu do jego popytu, działanie przeciwzapalne, utrzymywanie organizmu w stanie gotowości immunologicznej oraz pobudzanie angiogenezy. Działanie Ado polega m.in. na zmniejszeniu wydzielania cytokin, syntezy TNF- α oraz MPP [157-160].

4.2.2. Receptory nukleotydowe

W 1976 roku, Burnstock opisał receptory białkowe, znajdujące się po zewnętrznej stronie błony komórkowej, których agonistami są nukleotydy i nukleozydy i zdefiniował je jako receptory purynergiczne. Do tej pory sklonowano 19 receptorów, wśród których wyróżnia się dwie główne grupy, tj. receptory P1 oraz receptory P2 (**Rycina 5**).

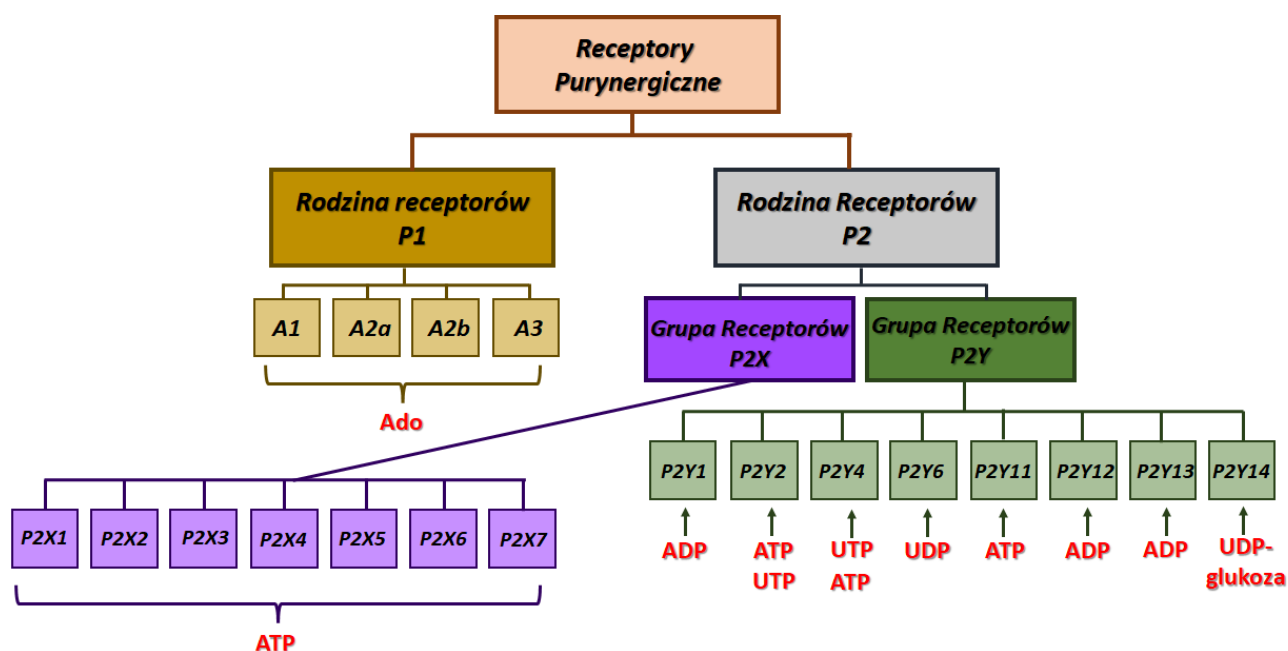
Rodzinę receptorów P2 dzieli się na dwie grupy, grupę P2X oraz P2Y. Podziału dokonano m.in. na podstawie różnic w czasie działania oraz odległości, w zasięgu których receptory mogą przekazywać sygnał. Receptory P2X cechuje szybkie przewodzenie sygnału na stosunkowo krótkie odległości, a przede wszystkim od receptorów P2Y odróżnia je wysokie powinowactwo do ATP, wyrażane w stężeniach mikro molarnych (mili molarnych w przypadku receptora P2X7), oraz czas działania wynoszący kilka milisekund [161]. Receptory P2Y ulegają aktywacji pod wpływem kilku molowego stężenia ATP, a czas przenoszenia sygnału jest dłuższy niż w przypadku receptorów P2X [162].

Grupę P2X tworzą jonotropowe receptory homo- lub heterooligomeryczne. Receptory te zbudowane są zazwyczaj z trzech podjednostek, gdzie każda podjednostka składa się z dwóch domen transbłonowych, długiej zewnątrzkomórkowej pętli łączącej domeny oraz końców C- i N- białka po stronie wewnątrzkomórkowej [163,164]. Do tej pory sklonowano 7 receptorów (P2X1-P2X7), których ekspresję potwierdzono m.in. na komórkach układu nerwowego, mięśni gładkich oraz komórkach zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną. Obecność funkcjonalnych receptorów P2X została również wykazana na komórkach krwiotwórczych oraz komórkach krwi [165].

Jak wspomiano, aktywacja receptorów P2X zachodzi pod wpływem działania zewnątrzkomórkowego ATP (**Rycina 5**). Konsekwencją przyłączenia cząsteczki ATP do receptora purynergicznego jest przemieszczenie się kationów Ca^{2+} , Na^{+} (ze środowiska zewnątrzkomórkowego do cytoplazmy) i K^{+} (na zewnątrz komórki) przez błonę komórkową zgodnie z gradientem elektrochemicznym [166]. Długotrwałe działanie wysokich stężeń zewnątrzkomórkowego ATP może również powodować nieselektywne zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej dla cząsteczek o masie mniejszej niż 900Da, na skutek przekształcania się receptora P2X7 w transbłonowy por. Mechanizm ten jest ważnym elementem układu odpornościowego, gdzie powstające transbłonowe pory umożliwiają zwiększone uwalnianie cytokin prozapalnych [167].

Metabotropowe receptory P2Y zbudowane są z siedmiu transbłonowych domen połączonych za pomocą sześciu pętli. Po stronie zewnątrzkomórkowej znajduje się N- koniec białka ulegający glikolizacji natomiast C- koniec, ulegający fosforylacji, znajduje się po stronie cytoplazmatycznej. Białko G znajduje się po stronie wewnątrzkomórkowej, w obrębie trzeciej pętli [168]. Do tej pory sklonowano 9 receptorów P2Y, mianowicie P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 oraz P2Y11-P2Y14, gdzie homologia pomiędzy poszczególnymi receptorami wynosi 21-57% [169]. Receptory aktywowane są przez ATP oraz m.in. przez ADP, nukleotydy urydynowe (urydino-5'-trifosforan, UTP i urydino-5'-difosforan, UDP) oraz nukleozydo difosfopochodne cukrów (urydino-5'-difosfoglukoza, UDP-glukoza i urydino-5'-difosfogalaktoza, UDP-galaktoza) (**Rycina 5**). Na podstawie zróżnicowanego powinowactwa można wyróżnić następujące podgrupy: aktywowane przez ATP (P2Y11), aktywowane przez ADP (P2Y1, P2Y12, P2Y13), aktywowane przez UTP (P2Y2, P2Y4), aktywowane przez UDP (P2Y6) oraz aktywowane przez UDP-glukozę i UDP-galaktozę (P2Y14) [170]. Receptory te mogą tworzyć homo- lub heterodimery, czemu towarzyszy obniżenie powinowactwa do cząsteczek aktywujących. Związanie aktywatora z receptorem po stronie zewnątrzkomórkowej indukuje zmiany konformacyjne (utworzenie kieszeni), umożliwiające oddziaływanie nukleotydów z

cytozolowymi białkami G i przewodzenie sygnału nerwowego [169]. Przekaznikami sygnału dla receptorów P2Y jest nie tylko białko G, ale i m.in. kanały wapniowe i potasowe, fosfolipaza C β (P2Y1, P2Y2, P2Y6 i P2Y11), cyklaza adenylanowa (P2Y11), kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinase*) oraz kinazy Rho (P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12, P2Y13) [171-173]. Receptory P2Y ulegają ekspresji na większości tkanek i komórek organizmu ludzkiego [174].



Rycina 5. Rodzaje receptorów purynergicznycch oraz ich agoniści. Ado – adenozyina, ATP – adenozyino-5'-trifosforan, ADP - adenozyino-5'-difosforan - UTP - urydino-5'-trifosforan, UDP - urydino-5'-difosforan, UDP-glukoza – urydino-5'-difosfoglukoza. Zmodyfikowano na podstawie [120,161].

Rodzina receptorów P1 składa się z czterech podtypów, mianowicie receptorów A1, A2a, A2b oraz A3, o maksymalnej homologii wynoszącej 50%. Wszystkie spośród wymienionych receptorów P1 aktywowane są przez Ado. Budowa receptorów klasyfikuje je jako receptory metabotropowe sprzężone z białkiem G. Działanie receptorów A1 i A3, sprzężonych z podjednostkami Gi i Gq, hamuje aktywność cykazy adenylanowej, czemu towarzyszy spadek wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, jednocześnie stymulując fosfolipazę C. Receptor A1 może być również związany z podjednostką Go której aktywacja

powoduje wypływ jonów K^+ i hiperpolaryzację błony komórkowej, a w konsekwencji otwarcie kanału wapniowego. Receptory A2a i A2b sprzężone są z podjednostką G_s , gdzie przyłączenie Ado do receptorów stymuluje cyklazę adenylanową i wzrost poziomu cAMP [175-177].

Fizjologiczne, zewnątrzkomórkowe stężenie Ado (30-200 nM) aktywuje receptory A1, A2a oraz A3, wykazujące wysokie powinowactwo. Podwyższone stężenie Ado, będące wtórnym następstwem podwyższonego stężenia zewnątrzkomórkowego ATP oraz działania enzymów hydrolizujących, występujące w stanach patologicznych, np. podczas stanów zapalnych, aktywuje działanie receptora A2b [178-180]. Receptory adenozynowe zlokalizowane są w szczególności na komórkach układu sercowo-naczyniowego, moczowego, płciowego, oddechowego, nerwowego i immunologicznego [181].

4.3. Rola sygnalowania purynergicznego w układzie krwionośnym i procesie krwiotworzenia

Sygnalowanie purynergiczne oddziałuje na układ krwionośny, zarówno na poziomie tkanek i narządów, jak i elementów morfotycznych krwi w każdym stadium zróżnicowania. Zaangażowane jest m.in. w kontrolę mechanizmu skurczu i rozkurczu naczyń krwionośnych poprzez wydzielanie ATP wraz z noradrenaliną we współczulnym układzie nerwowym. Wydzielane z zakończeń nerwowych ATP, aktywuje głównie receptory P2X1 i P2Y2 na mięśniówce gładkiej naczyń krwionośnych [106]. W sytuacjach patologicznych, np. w warunkach niedotlenienia, ATP może być również uwalniane z komórek śródbłonna, gdzie wykazano jego aktywujące działanie na receptory P2Y [182]. Zainicjowana kaskada sygnału doprowadza do miejscowego uwalniania tlenu azotu (II) o działaniu rozkurczającym. Efekt ten może być również uzyskiwany poprzez przekształcanie ATP do Ado i aktywację receptorów P1 [106]. ATP i Ado w układzie krwionośnym mogą wpływać również na proliferację komórek naczyń krwionośnych, gdzie ich zwiększona ilość i aktywacja receptorów P2Y i P1 może doprowadzać do nadmiernego namnażania i powstawania zwężeń w naczyniach [183].

Należy również nadmienić, iż sygnalowanie purynergiczne odgrywa ważną rolę w tamowaniu krwawienia. Komórki, które uległy uszkodzeniu, uwalniają ATP aktywujący głównie receptor P2X1 na płytkach krwi, doprowadzając do ich agregacji w miejscu urazu. Na płytkach krwi ekspresji ulega również receptor P2Y1, który aktywowany jest przez ADP.

Udział sygnalowania purynergicznego w tworzeniu skrzepów jest bezsporny a jego hamowanie zostało wykorzystane jako podstawa działania kilku leków przeciwzakrzepowych [184-186].

Badania wykazały również, iż ATP pełni rolę czynnika chemotaktycznego dla komórek krwi. Monocyty i makrofagi migrują do miejsc rozpadu komórek uwalniających ATP, natomiast neutrofile, wykorzystują autokrynnne wydzielanie ATP i aktywację receptora P2X1 w celu wzmacniania sygnału dla migracji [187-189].

Rola nukleotydów jako regulatorów procesów krwiotwórczych jest znana dla komórek w pełni zróżnicowanych, natomiast danych dotyczących ich wpływu na komórki macierzyste/progenitorowe układu krwiotwórczego i proces hematopoezy jest stosunkowo niewiele. Krwiotworzenie, definiowane jako proces wytwarzania i różnicowania się elementów morfotycznych krwi jest kluczowym elementem zapewniającym homeostazę organizmu. Proces hematopoezy regulowany jest zatem poprzez czynniki wpływające na stan spoczynku KKM, ich samoodnowę, różnicowanie, proliferację, migrację, a także śmierć komórkową. Wszystkie te procesy, jak już wspomniano we wcześniejszych rozdziałach, zależne są przede wszystkim od działania cytokin, jak i również zewnątrzkomórkowego ATP. Opublikowane wyniki prowadzonych dotychczas badań wykazały, iż zewnątrzkomórkowe ATP oraz sygnalowanie purynergiczne może uczestniczyć m.in w regulacji proliferacji, różnicowania i migracji KKM oraz ich mobilizacji oraz wszczepiania się do szpiku kostnego. Dane literaturowe, jak i wyniki własnych badań potwierdzają, iż KKM wykazują ekspresję receptorów P2 jak również, iż komórki niszy szpikowej odpowiadające za utrzymanie KKM w szpiku, również cechują się wysoką ekspresją receptorów purynergicznych oraz kanałów uwalniających ATP.

4.3.1. Rola sygnalowania purynergicznego w różnicowaniu KKM

Proces różnicowania KKM polega na ich przekształcaniu w komórki bardziej dojrzałe funkcjonalnie tj. w komórki linii mieloidalnej i limfoidalnej, które w kolejnych etapach różnicowania wytworzą wszystkie elementy morfotyczne krwi. Lemoli i współpracownicy wykazali, iż zewnątrzkomórkowe ATP, w niskich stężeniach, oddziałuje na KKM poprzez wzmacnianie stymulującego działania cytokin. Wykazano również, iż różnicowanie komórek w kierunku linii mieloidalnej jest wynikiem, związanego z działaniem zewnątrzkomórkowego

ATP, wypływu jonów Ca^{2+} [190]. Doświadczenia, badające wpływ zewnątrzkomórkowych nukleotydów na różnicowanie KKM, były również prowadzone przez zespół Profesora Paredes-Gamero [191]. Wykazano, iż zewnątrzkomórkowe ATP wpływa na obniżenie ilości KKM oraz progenitorów granulocytów i monocytów (GMP, ang. *granulocyte and monocyte progenitor*), ale nie komórek linii megakariocytów i erytrocytów (MEP, ang. *megakaryocyte/erythrocyte progenitors*). Dodatkowo przeprowadzone doświadczenia z użyciem modeli zwierzęcych potwierdziły, iż ATP wpływa na zmniejszenie ilości komórek GMP, jednocześnie wykazując zwiększoną ilość komórek $\text{Gr-1}^+\text{Mac-1}^+$. Bezpośredni udział sygnalowania purynergicznego w opisanych modelach, został potwierdzony w doświadczeniach z wykorzystaniem inhibitorów receptorów P2 [191].

O zaangażowaniu sygnalowania purynergicznego w proces różnicowania KKM może również świadczyć fakt, iż prymitywne, c-Kit pozytywne mysie komórki, charakteryzuje dużo wyższa aktywność enzymów hydrolizujących ATP, czyli CD39 i CD73. Zatem wyniki prowadzonych doświadczeń jednoznacznie wskazują, iż ATP zmniejsza ilość KKM, powodując ich różnicowanie. Próby określenia ewentualnego zaangażowania zewnątrzkomórkowej Ado w ten proces kolejny raz udowodniły jej przeciwstawne do ATP działanie [192]. Modyfikowane genetycznie myszy, u których konstytutywnej ekspresji na komórkach w niszy szpikowej, ulegała endonukleotydaza CD39 charakteryzowały się zwiększoną ilością KKM w stanie spoczynku. Zaobserwowano zwiększoną ilość zewnątrzkomórkowej Ado chroniącej komórki przed stresem oksydacyjnym. Jednocześnie delecja enzymu CD73 związana była ze zwiększonym uwalnianiem reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygene spececies*) oraz wyjściem KKM ze stanu spoczynku [193]. Zatem ATP-zależny proces różnicowania KKM regulowany jest przez aktywność enzymów CD39 i CD73, degradujących zewnątrzkomórkowe ATP do Ado, utrzymującej KKM w stanie spoczynku.

4.3.2. Rola sygnalowania purynergicznego w procesie proliferacji KKM

KKM ulegają proliferacji w procesie samoodnowy lub w procesie doprowadzającym do liniowego różnicowania. Zjawisko to, na poziomie molekularnym, regulowane jest przez czynniki transkrypcyjne Wnt i Notch, których zadaniem jest utrzymanie korzystnych proporcji pomiędzy ilością KKM w stanie spoczynku, samoodnawiających się i różnicujących w komórki

dojrzałe funkcjonalnie [194]. KKM, znajdujące się w niszy szpikowej, chronione są przed niekontrolowaną proliferacją a także przed działaniem czynników stresujących obniżających ich potencjał proliferacyjny. Do głównych czynników regulujących odpowiedni balans wyżej wymienionych procesów należą cytokiny, czynnik wzrostu komórek macierzystych (SCGF, ang. *stem cell growth factor*,) oraz trombopoetyna (TPO, ang. *thrombopoietin*) [195-196]. Stymulatorami procesu proliferacji KKM są czynniki stresowe jak np. nagła utrata krwi [197]. W odpowiedzi na działanie wymienionych czynników dochodzi do zwiększenia stężenia cytokin stymulujących proliferację KKM, czyli głównie erytropoetyny (EPO, ang. *erythropoietin*), czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), czynnika komórek macierzystych (SCF, ang. *stem cell factor*) oraz interleukiny 3 (IL-3, ang. *interleukin-3*) [198]. Wpływ na poziom opisanych czynników ma również zwiększony poziom tlenu komórkowego oraz zmiany stężenia jonów Ca^{2+} [199]. Sygnałowanie purynergiczne może być zaangażowane w proces kontroli proliferacji KKM właśnie poprzez zwiększanie cytozolowego stężenia jonów Ca^{2+} , będącego wynikiem aktywacji receptorów P2X. Kolejnym mechanizmem regulującym podziały KKM, zależnym od działania układu purynergicznego, jest aktywacja kaskady układu dopełniacza i kompleksu inflamasyonu Nlrp3, szczególnie w warunkach stresowych [200].

Eksperymenty przeprowadzone przez zespół Profesora Lemoliego dowiodły, iż zewnątrzkomórkowe nukleotydy, a w szczególności ATP i UTP, wykazują wpływ na proliferację KKM poprzez działanie synergistyczne z cytokinami. Szereg doświadczeń wykazał, że niskie stężenia, zarówno ATP, jak i UTP zwiększają efekt cytokin (SCF, EPO, GM-CSF i IL-3), czego rezultatem jest kilkukrotny wzrost ilości tworzonych kolonii progenitorowych dla szeregu CFU-GM i BFU-E. Jednocześnie badacze wykazali, iż zwiększone stężenie nukleotydów wywołuje odwrotny efekt. Ciekawym spostrzeżeniem było, iż zastosowanie samego ATP czy UTP nie wpływa na zwiększenie ilości tworzenia kolonii oraz, że stosując nukleotyd można obniżyć stężenie cytokin 5 krotnie, by wciąż otrzymać taką samą ilość kolonii progenitorowym, jak stosując pełną dawkę cytokin. Autorzy przeprowadzili również doświadczenia wykorzystujące specyficzne inhibitory ATP celem potwierdzenia bezpośredniego wpływu nukleotydu na proces proliferacji [190].

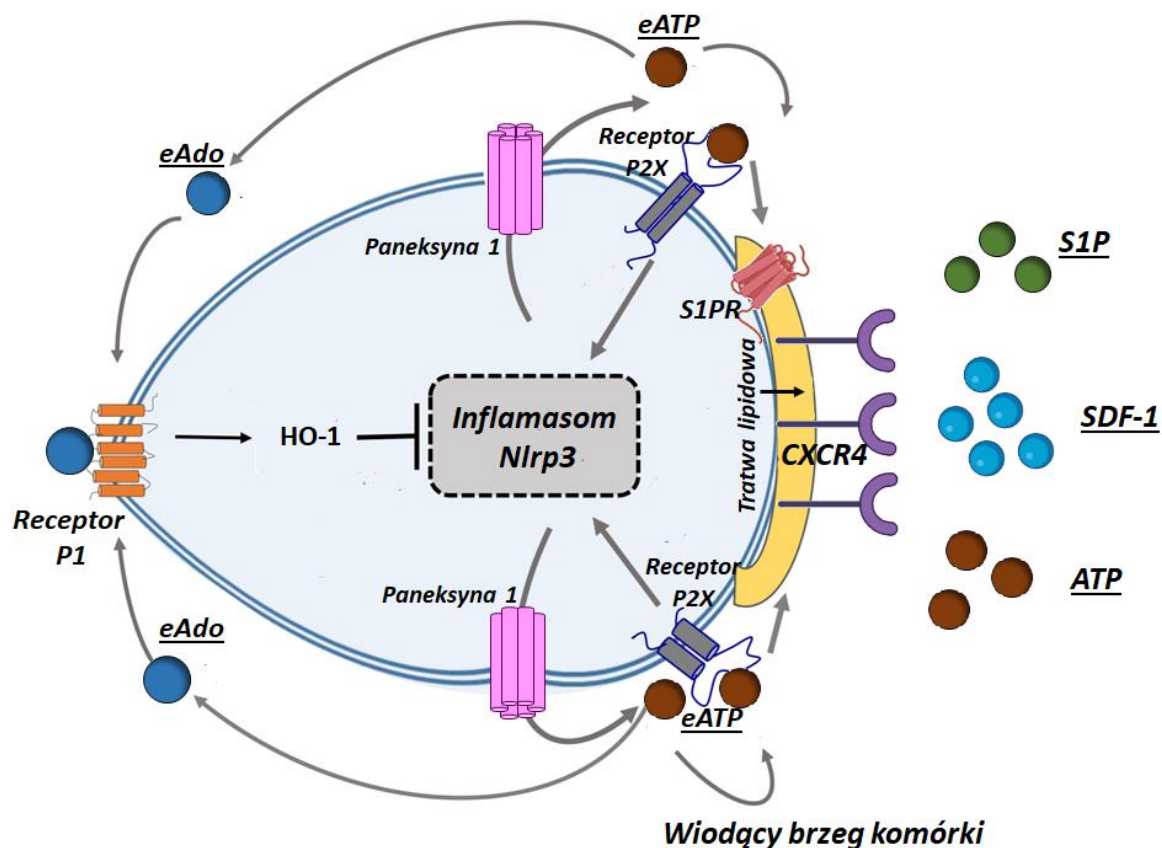
Wyniki badań zespołu Profesor Ferreiry potwierdziły, iż stymulacja KKM za pomocą ATP, ADP i UTP powoduje zwiększenie poziomu Ca^{2+} w cytozolu, czemu towarzyszy zwiększenie proliferacji komórek z jednoczesnym zmniejszeniem odsetku komórek prymitywnych. Wyniki badań wskazują, iż umiarkowana stymulacja komórek, której towarzyszy niewielki wzrost stężenia jonów Ca^{2+} , wywołuje efekt indukujący proliferację z

jednocześnie zachodzącym procesem samoodnowy KKM, podczas gdy silna stymulacja receptorów i wynikające z niej wysokie stężenie jonów Ca^{2+} wywołuje różnicowanie KKM w kierunku linii makrofagów bez jednoczesnego zachowania stałej puli KKM, wyczerpując ich potencjał proliferacyjny [202].

4.3.3. Rola sygnalowania purynergicznego w procesie migracji KKM

Proces migracji KKM został szczegółowo omówiony we wcześniejszych rozdziałach. Dla przypomnienia, uwalnianie KKM ze szpiku kostnego do krwi obwodowej odbywa się po podziale KKM w niszy szpikowej, w rytmie dobowym w ramach nadzoru immunologicznego, w czasie odpowiedzi immunologicznej, a także podczas wysiłku fizycznego [60-67]. Proces uwalniania KKM ze szpiku kontrolowany jest przez wiele czynników, m.in. cząsteczki adhezyjne na KKM, molekuly sygnalizacyjne oraz składniki niszy szpikowej. Proces migracji, utrzymywania KKM w szpiku oraz zasiedlania szpiku zależy od gradientu chemotaktycznego czynników pomiędzy szpikiem a krwią obwodową. Kluczowym czynnikiem chemotaktycznym dla KKM jest SDF-1. Badania nad procesem mobilizacji wykazały, iż również gradient S1P oraz ATP pełni ważną rolę w procesie migracji KKM oraz, iż elementy kaskady dopełniacza (desargC5a i C5a) uwalniane podczas odpowiedzi immunologicznej wpływają na rekrutację KKM ze szpiku do krwi [89].

Podobnie jak w przypadku stymulowania proliferacji przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy, badania nad procesem migracji wykazały, iż działają one synergistycznie z czynnikiem chemotaktycznym SDF-1 [203]. Schematyczny obraz migrującej komórki oraz mechanizmy wpływające na ten proces przedstawiono na **Rycinie 6**.



Rycina 6. Rola sygnalowania purynergicznego w procesie migracji KKM. ATP stymuluje tworzenie tratw lipidowych (ang. *lipid rafts*) czemu towarzyszy zmiana kształtu komórki. W tratwach lipidowych ulegają zwiększonej ekspresji receptory dla czynników chemotaktycznych. Dodatkową stymulacją procesu migracji jest aktywacja inflamasomu Nlrp3 i autokrynne wydzielanie ATP. Proces migracji może być hamowany poprzez działanie enzymów hydrolizujących ATP do Ado, która poprzez aktywację receptorów P1 wpływa na zwiększenie ekspresji HO-1, która jest inhibitorem inflamasomu Nlrp3. eAdo – zewnątrzkomórkowa adenozyzna, eATP – zewnątrzkomórkowy adenozyno-5'-trifosforan, HO-1 – hemoeksygenaza 1, S1PR – receptor sfingozyno-1-fosforanu, S1P - sfingozyno-1-fosforan, SDF-1 - czynnik pochodzenia stromalnego 1, CXCR4 – receptor chemokinowy CXC typu 4. *Na podstawie [207].*

Migrująca komórka zmienia swój kształt ulegając wydłużeniu. Pod wpływem działania czynników chemotaktycznych następuje reorganizacja błony komórkowej oraz architektury cytoszkieletu. Receptory czynników chemotaktycznych, CXCR4 oraz S1PR, zostają wbudowane w tworzące się na przodzie komórki, tzw. tratwy lipidowe [204]. Liczne badania wykazały, iż tworzenie tratw lipidowych jest niezbędnym mechanizmem umożliwiającym migrację komórek [205,206] oraz, iż ATP jest silnym stymulatorem ich tworzenia. Eksperymenty przeprowadzone przez zespół Profesora Ratajczaka potwierdziły, iż w

przypadku nawigacji KKM do szpiku kostnego po przeszczepie, ATP wydzielany z niszy szpikowej biorcy, poddanego wcześniejszej terapii mieloablacyjnej, promuje tworzenie tratw lipidowych. Następnie, proces migracji jest dodatkowo stymulowany poprzez autokryne wydzielanie ATP poprzez łączenie z receptorami P2X i aktywację kompleksu inflamasomu Nlrp3 [136]. Proces ten może być natomiast negatywnie regulowany przez aktywność receptorów purynergicznych P1, których ekspresję potwierdzono na przeciwstawnym biegunie migrującej komórki. Receptory te, łącząc się z Ado, powstającą w wyniku działalności enzymów hydrolizujących ATP, hamują aktywność inflamasomu Nlrp3 [207].

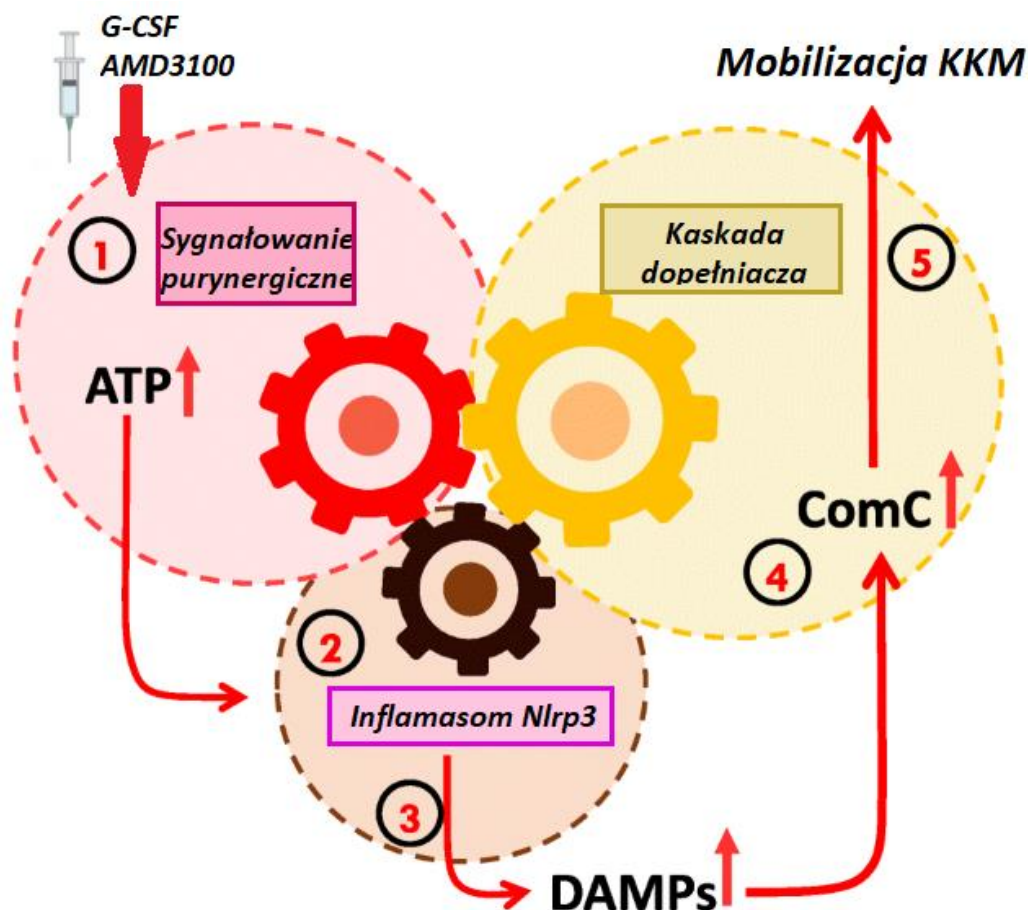
Sygnalowanie purynergiczne może również pośrednio wpływać na migrację KKM poprzez oddziaływanie na komórki niszy szpikowej. W badaniach udowodniono, iż komórki mezenchymalne niszy szpikowej (BM-MSCs, ang. *bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*) poddane działaniu ATP, odpowiadają zwiększoną produkcją cytokin prozapalnych, np. interleukiny 2 (IL-2, ang. *interleukin-2*) oraz interferonu gamma (IFN- γ) o właściwościach chemotaktycznych dla KKM [208].

4.3.4. Rola sygnalowania purynergicznego podczas farmakologicznej mobilizacji KKM

Proces farmakologicznej mobilizacji wykorzystywany jest w celu pozyskania odpowiedniej ilości KKM do przeszczepu krwiotwórczego. Procesowi mobilizacji, który polega na migracji KKM ze szpiku kostnego do krwi obwodowej, poświęcono wiele uwagi. Prowadzone w ostatnim czasie kompleksowe badania nad procesem mobilizacji i czynnikami regulującymi, wykazały, iż optymalny proces mobilizacji zależy od prawidłowego funkcjonowania trzech, wzajemnie działających układów, tj. kaskady układu dopełniacza, kompleksu inflamasomu Nlrp3 i sygnalowania purynergicznego [144]. Zależność została zobrazowana i opisana na **Rycinie 7**.

Wykazano, iż ATP indukuje proces mobilizacji KKM, poprzez aktywację inflamasomu Nlrp3 oraz stymulowanie kaskady układu dopełniacza, prowadzącej do uwolnienia anafilatoksyn C3a i C5a, w wyniku czego dochodzi do wystąpienia pozytywnego sprzężenia zwrotnego, podtrzymującego stan sterylnego zapalenia w mikrośrodowisku niszy szpikowej. Częsteczki DAMP, wydzielane przez aktywowany inflamasom Nlrp3 mogą stymulować układ

dopełniacza, a w konsekwencji prowadzić do uwolnienia aktywnych fragmentów C5 (C5a), istotnych w procesie wyjścia KKM ze szpiku kostnego [209].



Rycina 7. Schemat oddziaływania sygnalizacji purynergicznej, kompleksu inflamasomu Nlrp3 oraz kaskady układu dopełniacza w procesie mobilizacji KKM. 1) Podanie czynnika mobilizującego zapoczątkowuje uwalnianie ATP z aktywowanych komórek odporności wrodzonej i KKM. 2) Zewnątrzkomórkowy ATP poprzez wiązanie ze swoimi receptorami, szczególnie z receptorem P2X7 aktywuje inflamasom Nlrp3. 3) Aktywacja inflamasomu skutkuje wyrzutem alarmin, struktur molekularnych związanych z zagrożeniem (DAMP). Alarminy, m.in białka o dużej ruchliwości elektroforetycznej 1 (HMGB-1) 4) które inicjują kaskadę dopełniacza (ComC). 5) Aktywacja kaskady dopełniacza skutkuje wyrzutem fragmentów białkowych (C5a i desargC5a) indukujących proteolityczne środowisko i rozerwanie wiązań pomiędzy białkami utrzymującymi KKM w niszy jak i również prowadzi do rekrutacji m.in. granulocytów promujących migrację KKM ze szpiku do krwi obwodowej. Wykonano na podstawie [144].

Wyniki badań zespołu Profesora Ratajczaka wykazały, iż stymulacja komórek farmakologicznymi środkami mobilizującym, takimi jak G-CSF i AMD3100 powoduje wydzielanie ATP oraz innych cząsteczek DAMP przez granulocyty i monocyty oraz ich udział

w aktywacji kaskady układu dopełniacza [210]. Dane literaturowe wskazują, iż uwalnianie ATP z komórek, zachodzi z wykorzystaniem kanałów błonowych tworzonych przez m.in. paneksyny [211]. Zespół potwierdził ekspresję paneksyny 1 w komórkach biorących udział w procesie mobilizacji KKM oraz wykazał, iż stymulowane środkami mobilizującymi wydzielanie ATP, odbywa się z wykorzystaniem właśnie tego białka. Wykazano również, iż egozgenne ATP, podawane wraz ze standardowym środkiem mobilizującym znacząco zwiększa poziom mobilizacji KKM do krwi obwodowej [209]. Dane literaturowe wskazują, iż działanie ATP na aktywację inflamasomu Nlrp3 zachodzi w wyniku przyłączenia do receptora P2X7 i jego aktywacji [212]. Udział P2X7 w tym procesie został potwierdzony z wykorzystaniem modelu zwierzęcego z defektem ekspresji receptora P2X7. Poddanie myszy standardowym protokołom mobilizującym, wykorzystującym G-CSF lub AMD3100 wykazało, iż stopień mobilizacji KKM był obniżony w stosunku do myszy typu dzikiego posiadających funkcjonalny receptor P2X7. Analogiczne badania wykazały przeciwstawne działanie Ado i receptorów P1 w procesie mobilizacji KKM [210].

W kolejnych badaniach potwierdzono, iż w czasie farmakologicznej mobilizacji środkami G-CSF i AMD3100, aktywacja i udział inflamasomu Nlrp3 jest ATP zależny, co dowodzi, że sygnałowanie purynergiczne odgrywa ważną rolę w początkowym etapie mobilizacji, kiedy uwalniany ATP aktywuje kompleks inflamasomu Nlrp3 w komórkach wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, m.in granulocytach i monocytach [146].

Znaczenie receptora P2X7 w efektywnej mobilizacji zostało również potwierdzone w badaniach klinicznych. Ośrodek w Melbourne w Australii, zbadał ekspresję receptora P2X7 oraz jego polimorfizm u allogenicznych dawców KKM poddawanych protokołowi mobilizacji z wykorzystaniem G-CSF. Korelacja ilości mobilizowanych KKM z ekspresją receptora P2X7 wykazała, że ekspresja P2X7 wpływa na wydajność mobilizacji dawców allo-KKM [213].

4.3.5. Rola sygnałowania purynergicznego w procesie wszczepiania się KKM oraz poprzyszczepowej odnowie hematologicznej

Wszczepianie się KKM do szpiku jest zjawiskiem odwrotnym do procesu mobilizacji. Jak wspomniano, dożylnie podanie preparatu komórkowego poprzedzone jest terapią mieloablacyjną, mającą na celu zniszczenie wszystkich komórek w niszach szpikowych biorcy. Proces mieloablacji prowadzi również do indukcji tzw. sterylnego zapalenia szpiku.

Sygnalowanie purynergiczne jest ważnym elementem w procesie sterylnego zapalenia w związku z czym przeprowadzane przez różne grupy eksperymenty, wykazały jego ważną rolę w procesie wszczepiania i zasiedlania szpiku przez KKM po przeszczepie.

Po dożylnym podaniu preparatu, komórki nakierowywane są do szpiku zgodnie z gradientem stężeń czynników chemotaktycznych. Jak wspomniano, powszechnie znanymi chemoatraktantami dla KKM są SDF-1, S1P oraz ATP [89]. Rola SDF-1 i S1P w procesie wszczepiania KKM była przedmiotem licznych badań, które wykazały m.in, że KKM wciąż migrują, gdy zaburzone są osie oddziaływania SDF-1 i S1P z ich receptorami [214]. Skłoniło to badaczy to rozważenia roli ATP w tym procesie i jak wykazano, ATP może promować proces migracji KKM do szpiku. Badania udowodniły, iż zablokowanie kanału paneksyny-1, którym ATP transportowany jest na zewnątrz komórki, u myszy poddanych mieloablacji przed przeszczepieniem KKM, powodowało obniżenie efektywności wszczepiania i zasiedlania szpiku przez przeszczepiane komórki [215].

Jak wspomniano, terapia mieloablacyjna powoduje wzrost stężenia czynników chemotaktycznych w mikrośrodku szpiku kostnego, stymulujących proces migracji KKM do niszy szpikowej. Proces mieloablacji prowadzi do powstania stanu tzw. sterylnego zapalenia i aktywacji kaskady dopełniacza. Wydzielane aktywne cząsteczki C3a uwrażliwiają wędrujące KKM na SDF-1, natomiast wydzielana anafilatoksyna C5a wpływa na zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych komórek endotelialnych w szpiku kostnym [216]. Udowodniono również, iż na proces wszczepiania się i zasiedlania nisz szpikowych przez KKM, ma prawidłowe funkcjonowanie układu purynergicznego w przeszczepianych komórkach. Prowadzone badania wykazały, iż ekspresja receptorów P2X warunkuje prawidłową migrację KKM względem ich ligandu, czyli ATP. Wykazano, iż komórki myszy z defektem receptora P2X7 charakteryzowała upośledzona migracja względem głównych czynników chemotaktycznych oraz, iż zastosowanie specyficznego inhibitora receptora P2X7 powodował zmniejszenie wydajności procesu wszczepiania i zasiedlania szpiku, zarówno jeśli ekspresja receptora ulegała zmniejszeniu na przeszczepianych komórkach oraz w przypadku zastosowania inhibitora u myszy otrzymujących prawidłowe komórki [217].

Jak wiadomo, ATP po połączeniu z odpowiednim receptorem P2X powoduje aktywację kompleksu inflamasomu Nlrp3, którego prawidłowe działanie również zostało udowodnione jako niezbędne dla optymalnego procesu migracji i wszczepiania KKM. Prowadzone badania wykazały również negatywną regulację aktywacji inflamasomu Nlrp3 przez Ado. Udowodniono m.in, iż zwiększone stężenie Ado wpływa na wzrost stężenia HO-1 będącej inhibitorem inflamasomu Nlrp3 [218].

W związku z powyższym prawidłowe działanie osi sygnałowanie purynergiczne-kompleks inflamasomu Nlrp3-kaskada układu dopełniacza jest niezbędna w procesie migracji KKM do szpiku i ich wszczepienia się. Oś działania i wspólne zależności zostały opisane na **Rycinach 6 i 7**.

5. *Cel pracy*

Biorąc pod uwagę wyniki dotychczas przeprowadzonych badań określających rolę ATP w układzie krwionośnym i procesie krwiotworzenia oraz udziału sygnalowania purynergicznego, a przede wszystkim wykazaną rolę receptora P2X7 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM, zasiedlania szpiku oraz rekonstrukcji hematologicznej po przeszczepie, celem pracy było:

- Ocenienie poziomu ekspresji pozostałych receptorów purynergicznym na ludzkich oraz mysich KKM.

Po wstępnej analizie profilu ekspresji receptorów P2X, na podstawie uzyskanych wyników oraz z uwagi, iż receptor P2X1 wykazuje największą wrażliwość na zewnątrzkomórkowy ATP a receptor P2X4 charakteryzuje największa homologia z receptorem P2X7, celem niniejszej rozprawy było również:

- Ocenienie roli receptorów purynergicznym P2X1 oraz P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM z wykorzystaniem dostępnych modeli zwierzęcych,
- Ocenienie roli receptorów purynergicznym P2X1 oraz P2X4 w procesie zasiedlania szpiku oraz rekonstrukcji hematologicznej po przeszczepie z wykorzystaniem dostępnych modeli zwierzęcych,
- Określenie możliwych mechanizmów efektorowych zależnych od prawidłowego działania układu purynergicznego.

6. Materiały i metody

6.1. Zwierzęta doświadczalne

Eksperymenty z udziałem zwierząt zostały przeprowadzone w Instytucie Komórki Macierzystej na Stanowym Uniwersytecie w Louisville w Stanach Zjednoczonych (Stem Cell Institute, University of Louisville) oraz w Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W doświadczeniach użyto myszy typu dzikiego (WT, ang. *wild type*) (C57BL/6) oraz szczepu z rekombinacją homologiczną receptora P2X7 (P2X7 KO) (B6.129P2-P2rx7^{tm1Gab}) zakupionych w Laboratorium Jacksona (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) i rozmnażanych w dedykowanych dla jednostek naukowych zwierzętarniach. W eksperymentach wykorzystywano również szczep z rekombinacją homologiczną receptora P2X4 (P2X4 KO), który otrzymano dzięki uprzejmości Profesora Daryla L. Davisa z Uniwersytetu Południowej Kalifornii (University of Southern California, Los Angeles, USA).

Doświadczenia przeprowadzane były na myszach 6-8 tygodniowych. Myszy, pod stałym nadzorem zootechniczno-weterynaryjnym, hodowano w 12 godzinnym cyklu świetlnym, z zapewnionym stałym dostępem do wody i paszy. Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone zgodnie z obowiązującymi normami i zatwierdzone przez odpowiednie komisje (Zgoda Komisji *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) dla prac wykonywanych na Instytucie Komórki Macierzystej na Stanowym Uniwersytecie w Louisville: IACUC 19617; zgoda *II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie*: WAW2/124/2019, WAW2/125/2019).

6.2. Wykorzystywane związki chemiczne oraz inhibitory

W doświadczeniach wykorzystywano trzy specyficzne inhibitory wybranych receptorów P2X. Standardowy protokół użycia wyglądał następująco: inhibitor receptora P2X1 – NF 449 (Tocris, Bristol, UK) - substancję rozpuszczono w DMSO, roztwory robocze w PBS, w eksperymentach *in vitro* stosowano w stężeniu 10 μ M, w procesie mobilizacji myszy otrzymały łącznie 4 dawki inhibitora (10 mg/kg/dawka, dootrzewnowo), w eksperymentach określających wydajność wszczepiania się KKM – 5 dawek, zasiedlania niszy szpikowej – 8 dawek, w przypadku oceny odnowy hematologicznej, łącznie 10 dawek; inhibitor receptora P2X4 – PSB

12054 (Aobious, Gloucester, USA) – substancję rozpuszczono w DMSO, roztwory robocze w PBS, w eksperymentach *in vitro* stosowano w stężeniu 10 μ M, w doświadczeniach *in vivo* podawano 3 mg/kg masy ciała, dootrzewnowo, w takim samym schemacie jak inhibitor NF 449; inhibitor receptora P2X7 - A438079 (Tocris, Bristol, UK) – substancję rozpuszczono w DMSO, roztwory robocze w PBS, w eksperymentach *in vitro* stosowano 10 μ M, *in vivo* 8 mg/kg masy ciała, dootrzewnowo, schemat jak wyżej. Schematy stosowania poszczególnych inhibitorów przedstawiono w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Schemat stosowania inhibitorów receptorów P2X1, P2X4, P2X7 w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

Rodzaj eksperymentu		Rodzaj inhibitora					
		P2X1 – NF 449		P2X4 – PSB 12054		P2X7 - A438079	
		Ilość dawek	Wielkość dawki/ stężenie	Ilość dawek	Wielkość dawki/ stężenie	Ilość dawek/ stężenie	Wielkość dawki/ stężenie
Eksperymenty <i>in vitro</i>		1	10 μ M	1	10 μ M	1	10 μ M
Farmakologiczna mobilizacja	G-CSF	4	10 mg/kg	4	3 mg/kg	4	8mg/kg
	AMD3100	4	10 mg/kg	4	3 mg/kg	4	8mg/kg
Wszczepianie się KKM		5	10 mg/kg	5	3 mg/kg	5	8mg/kg
Zasiedlanie niszy szpikowej		8	10 mg/kg	8	3 mg/kg	8	8mg/kg
Odnowa hematologiczna		10	10 mg/kg	10	3 mg/kg	10	8mg/kg

6.3. Farmakologiczna mobilizacja z wykorzystaniem G-CSF

W procesie mobilizacji KKM wykorzystywano rekombinowany metionylowany ludzki czynnik pobudzający tworzenie kolonii granulocytów – G-CSF. W doświadczeniach myszy nastrzykiwano podskórnie przez okres 3 dni, komercyjnie dostępny lekiem Neupogen (Filgrastym, Amgen, Thousand Oaks, USA). Podawana dawka każdorazowo wynosiła 150 μ g/kg masy ciała myszy. Grupy kontrolne nastrzykiwano roztworem PBS. Myszy szczepiono w godzinach porannych, 6 godzin po ostatniej dawce G-CSF oceniono efektywność procesu mobilizacji.

6.4. Farmakologiczna mobilizacja z wykorzystaniem AMD3100

Mobilizację KKM przeprowadzono za pomocą czynnika AMD3100 (Plerixafor) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Myszy, w godzinach porannych, zostały nastrzyknięte dootrzewnowo dawką AMD3100 wynoszącą 5 mg/kg masy ciała myszy. Grupy kontrolne nastrzykiwano roztworem PBS. Po 1 godzinie od podania AMD3100 oceniono efektywność procesu mobilizacji.

6.5. Ocena efektywności procesu mobilizacji

Na ocenę efektywności mobilizacji składało się określenie wartości parametrów: ilość WBC, ilość komórek SKL ($Sca1^{+c}\text{-Kit}^{+}\text{Lin}^{-}$) oraz ilości kolonii progenitorowych szeregu CFU-GM.

W celu określenia parametru WBC, pobierano krew z żyły zagałkowej do pokrytych EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy) probówek. Analizy dokonywano wykorzystując analizator hematologiczny Exigo H400 (Boule Diagnostics, Spanga, Szwecja) bezpośrednio po pobraniu.

Następnie myszy poddawano eutanazji i pobierano krew obwodową z żyły głównej. Krew pobierano do strzykawek z antykoagulantem (50-100 μl , 5 μM EDTA), następnie zawieszano w hypotonicznym roztworze buforu lizującego krwinki czerwone (Lysis Buffer, BD Biosciences, San Jose, USA). Po 10 minutach komórki odwirowywano i poddawano ponownej lizie. Komórki odpłukiwano, następnie tak otrzymane jednojądrzaste komórki - monokariocyty (MKC) analizowano przy użyciu cytometru przepływowego (FACSVerse lub LSRII, BD Biosciences, San Jose, USA) określając ilości komórek SKL oraz oceniano liczbę jednostek tworzących kolonie CFU-GM w teście potencjału klonogennego progenitorów szeregu CFU-GM.

6.6. Analiza cytometryczna – oznaczanie komórek SKL

Otrzymywane MKC płukano dwukrotnie w medium RMPI 1640 (Corning Inc, Corning, USA) zawierającym 2% płodową surowicę bydlęcą (FBS, ang. *fetal bovine serum*, Corning Inc, Corning, USA). Następnie barwiono mieszaniną przeciwciał umożliwiającą oznaczenie populacji komórek o fenotypie $Sca1^{+c}\text{-Kit}^{+}\text{Lin}^{-}$. Używano następujących przeciwciał: anti-CD117 (c-Kit) (klon 2B8, skoniugowane z izotiocyjaninem fluoresceiny – FITC, BioLegend,

San Diego, USA), anty-Ly-6A/E (Sca1) (klon E13-161.7, skoniugowane z fikoerytryną-cyjaniną 5 – PE-Cy5, BD Biosciences, San Jose, USA) oraz mieszaniną przeciwciał skierowanych przeciwko markerom linowym (wszystkie skoniugowane z fikoerytryną – PE, BD Biosciences, San Jose, USA): anty-CD45R/B220 (klon RA3-6B2), anty-Gr1 (klon RB6-8C5), anty-CD11b (klon M1/70), anty-receptor β komórek T (klon H57-597), anty-receptor $\gamma\delta$ komórek T (klon GL3), anty-Ter119 (klon TER-119). Komórki barwiono przez 30 min, na lodzie i w ciemności, następnie odpłukiwano, zawieszano w medium RPMI 1640 z 2% FBS i analizowano z wykorzystaniem cytometru LSRII lub FASCVerse (BD Biosciences, San Jose, USA). Bramkowane ilości komórek SKL przeliczano na podstawie ogólnej ilości bramkowanych komórek (bramka wykluczająca płytki krwi, martwe fragmenty komórek) oraz uzyskiwane wartości WBC.

6.7. Test potencjału klonogennego progenitorów szeregu CFU-GM

Testy klonogenności wykorzystywano w kilku różnych eksperymentach, m.in. w ocenie stopnia mobilizacji, chemotaksji czy określaniu wydajności przeszczepów krwiotwórczych. W zależności od eksperymentu, w teście określano potencjał klonogeny progenitorów dla szeregu CFU-GM, dla komórek izolowanych z krwi bądź szpiku kostnego. Ogólne zasady przeprowadzenia testu zakładały: zawieszanie komórek (w procesie farmakologicznej mobilizacji ilość wysiewanych komórek wynosiła 1×10^6 ; w analizie procesu wszczepiania wysiewano wszystkie komórki izolowane z jednej kości udowej; w analizie wydajności zasiedlania nisz szpikowych, wysiewano komórki izolowane z dwóch kości udowych; w eksperymencie chemotaksji wysiewano wszystkie zbierane komórki) w medium wraz z metylocelulozą (R&D Systems, Minneapolis, USA). Medium wzbogacano w L-glutaminę, antybiotyki (1% penicylina/streptomycyna) (Corning Inc, Corning, USA) oraz czynniki wzrostowe: interleukinę 3 (IL-3, 10 ng/ml) (PeproTech, Rocky Hill, USA) i GM-CSF (25 ng/ml) (PeproTech, Rocky Hill, USA).

6.8. Ocena wydajności procesu wszczepiania się KKM do niszy szpikowej

W odpowiednich układach eksperymentalnych, myszy napromieniano letalną dawką promieniowania gamma (950 cGy). Po napromienieniu myszy otrzymywały wodę z dodatkiem

antybiotyków (1% penicylina/streptomycyna, Corning Inc, Corning, USA) oraz wilgotną, rozdrobnioną paszę zwierzęcą. 24 godziny po napromienieniu, do żyły ogonowej, wstrzykiwano zawiesinę izolowanych bezpośrednio przed eksperymentem komórek MKC. Wstrzykiwano komórki uprzednio wybarwiano zielonym markerem fluorescencji za pomocą zestawu PKH67 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) według zaleceń producenta. Minimalna ilość przeszczepianych komórek wynosiła 5×10^6 . Po 24 godzinach od przeszczepu, myszy poddano eutanazji. Izolowano kości udowe z których wyplukiwano komórki z nisz szpikowych. Uzyskaną zawiesinę wirowano, a następnie zawieszano w roztworze lizującym (Lysis Buffer, BD Biosciences, San Jose, USA). Po 10 minutach komórki odwirowywano. Część uzyskanych komórek była wysiewana w teście klonogenności szeregu CFU-GM jak opisano powyżej (6.7). Pozostałe komórki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego, gdzie zliczano komórki wybarwione PKH67 określając procent komórek, które uległy wszczepieniu.

6.9. Ocena wydajności procesu zasiedlania niszy szpikowej przez KKM

W odpowiednich układach eksperymentalnych, myszy napromieniano letalną dawką promieniowania gamma (950 cGy). Po napromienieniu myszy otrzymywały wodę z dodatkiem antybiotyków (1% penicylina/streptomycyna; Corning Inc, Corning, USA) oraz wilgotną, rozdrobnioną paszę zwierzęcą. 24 godziny po napromienieniu, do żyły ogonowej, wstrzykiwano zawiesinę izolowanych bezpośrednio przed eksperymentem MKC w ilości $2,0 \times 10^5$.

W dwunastym dniu po przeszczepie, zwierzęta poddawano eutanazji, a następnie pobierano kości udowe oraz śledziony. Wyplukiwano komórki z kości udowych, odwirowywano, po czym lizowano erytrocyty w buforze lizującym (Lysis Buffer, BD Biosciences, San Jose, USA). Uzyskiwane komórki wysiewano w teście klonogenności CFU-GM (6.7). W pobranych śledzionach analizowano ilość jednostek tworzących kolonie śledzionowe (CFU-S, ang. *spleen colony forming unit*). Śledziony utrwalano z wykorzystaniem odczynnika Fekete (o składzie: kwas octowy, formalina, etanol), którego zastosowanie uwidaczniało kolonie śledzionowe, które następnie zliczano.

6.10. Ocena skuteczności procesu odnowy układu krwiotwórczego

W odpowiednich układach eksperymentalnych, myszy napromieniano letalną dawką promieniowania gamma (950 cGy). Po napromienieniu zwierzęta otrzymywały wodę z dodatkiem antybiotyków (1% penicylina/streptomycyna; Corning Inc, Corning, USA) oraz wilgotną, rozdrobnioną paszę. 24 godziny po napromienieniu, do żyły ogonowej, wstrzykiwano zawiesinę izolowanych bezpośrednio przed eksperymentem komórek MKC w ilości $0,75 \times 10^6$. Przed napromienieniem (dzień 0) oraz w dniu 3, 7, 14, 21 i 28 po przeszczepie, pobierano niewielką ilość krwi obwodowej ze splotu żylnego zagłokowego, po czym oznaczano parametry krwi, tj. ilość WBC oraz płytek krwi (PLT, ang. *platelets*) przy wykorzystaniu weterynaryjnego analizatora hematologicznego Exigo H400 (Boule Diagnostics, Spanga, Szwecja).

6.11. Test chemotaktyczny

W eksperymentach oceniających proces migracji KKM wykorzystywano następujące czynniki chemotaktyczne: 100 ng/ml SDF-1 (Pepro Tech, Rocky Hill, USA), 10 μ M ATP (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), 0,1 μ M S1P (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA), 100 μ M ceramido-1-fosforan (C1P, ang. *ceramide-1-phosphate*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). MKC izolowano ze szpiku kostnego, następnie inkubowano w medium RPMI 1640 z 0,5% zawartością albuminy surowicy bydlęcej (BSA, ang. *bovine serum albumine*). Proces chemotaksji oceniano metodę filtrową z wykorzystaniem komory Boydena. Komórki w ilości 1×10^6 nanoszono na inserty płytkowe z filtrem miliporowym o wielkość pora wynoszącej 5 μ m, następnie inserty umieszczano w płytce 24-dołkowej (Costar Corning, Corning, USA), zawierającej roztwory odpowiednich czynników chemotaktycznych lub 0,5% BSA RPMI 1640. Płytki z insertami inkubowano przez 3 godziny (atmosfera 5% CO₂, temperatura 37°C). Komórki, które aktywnie przeszły przez pory insertu do dołka, zbierano i wysiewano w teście potencjału klonogenego CFU-GM (6.7).

6.12. *Analiza procesu migracji KKM*

Szalki ze szklanym dnem o średnicy 10 mm (FluoroDish, World Precision Instruments, Sarasota, USA) pokryto fibronektyną (40 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Komórki zawieszono w medium RPMI 1640 z 0,5% BSA (kontrola). Komórki inkubowano z SDF-1 (100 ng/ml), ATP (10 µM) lub ATP i PSB 12054 (10 µM) przez 30 min w 37°C i atmosferze 5% CO₂. Droga migracji (długość i szybkość) została zmierzona z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView1000 (Olympus, Tokio, Japonia) w 20 krotnym powiększeniu. Ścieżki migracji zostały wyznaczone w programie ImageJ (MTrack; National Institutes of Health, Bethesda, USA) na podstawie 80 obrazów zapisywanych w 45 sekundowych odstępach.

6.13. *Test adhezji*

96-dołkową płytkę pokryto fibronektyną (10 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), następnie płytkę inkubowano w medium RPMI 1640 z 0,5% BSA. Podczas inkubacji płytki, wyizolowano MKC ze szpiku kostnego myszy typu dzikiego. Wyizolowane komórki inkubowano przez 3 godz. w 37°C i 5% CO₂ w medium RPMI 1640 z 0,5% BSA. Następnie, do komórek dodano inhibitor NF 449 (10 µM) i inkubowano przez 1 godz. w 37°C i 5% CO₂. Po czasie inkubacji, komórki wysiano na przygotowaną płytkę. Po 5 min inkubacji, komórki, które nie uległy adhezji zostały odpłukane. Następnie ilość przyłączonych komórek została zliczona z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu świetlnego (FV1000, Olympus, Japonia).

6.14. *Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym - Real-time PCR*

Całkowite RNA zostało wyizolowane z mysich i ludzkich MKC i KKM z wykorzystaniem zestawu RNeasy Mini kit (Qiagen Inc., Hilden, Niemcy). Następnie zmierzono stężenie RNA oraz określono wartości parametrów świadczących o czystości otrzymanego materiału. 100 ng RNA zostało przepisane w reakcji odwrotnej transkrypcji (zestaw iScript reverse transcriptase; Bio-Rad, Hercules, USA). Ekspresję genów określano w reakcji wykorzystującej SYBR Green

- związek fluorescencyjny interkalujący z dwuniciowym DNA oraz specyficzne startery wymienione w **Tabeli 2**.

Reakcję prowadzono w następujących parametrach: preinkubacja (1 cykl: 95°C, 30 sek), amplifikacja (40 cykli: 95°C, 5 sek i 60°C, 15 sek) + analiza krzywej topnienia. Otrzymane wartości Ct (cykl o progowej wartości fluorescencji) zostały wykorzystane do obliczenia relatywnej ekspresji genów z wykorzystaniem metody delta-delta. Poziom ekspresji został znormalizowany względem genu referencyjnego β -2 mikroglobuliny. W doświadczeniach określających poziom ekspresji receptorów P2X, jako kontrolę przyjęto geny charakteryzujące się najniższą ekspresją. Dodatkowo, produkty reakcji Real-time PCR zostały rozdzielone w 2% żelu agarozowym i poddane wizualizacji w aparacie Chemi Doc (Bio-Rad, Hercules, USA).

Tabela 2. Startery wykorzystywane w reakcjach Real-time PCR.

Sekwencje starterów mysich		
Gen	Starter "Forward"	Starter "Reverse"
<i>P2X1</i>	CCAGACCTCAAGTGGCCTTATCAGC	CTGGGAAGACATAGTCAGCCACGTC
<i>P2X2</i>	GGCAACATTGCAAGCCAGAAGAGTG	CTGTGAAGTTCTCTCCTGCTTGCTCTAC
<i>P2X3</i>	TTCTTGACACGAGAAGGCCTACCAAG	CATCCATGACTCTGTTGGCATAGCGT
<i>P2X4</i>	CATTTATAATGCGCGGACGGATCCC	CTCCACTGCCATCTCCTGAAAGCTG
<i>P2X5</i>	GGCGGTGTGATAGGAATCCACATTGAAT	CCCAGAGGAGATGGATTGTGTGTGTTTG
<i>P2X6</i>	GTGGGCCCTCTTGCCAAAAAAG	GTGATGGCTTCACAAAGTCAGCCAC
<i>P2X7</i>	CAGTATGAGACAAACAAAGTCACCCGGA	ATGTAGGAAAAGACGATCATGTGCAAGACC
<i>β-2MG</i>	TGCTGCTTGTCTCACTGAC	GGATTTCAATGTGAGGCGG
Sekwencje starterów ludzkich		
Gen	Starter "Forward"	Starter "Reverse"
<i>P2X1</i>	GGTGGAGTGGTTGGCATCACCA	CTGAAGTTGAAGCCTGGGGAGAGATTTTC
<i>P2X2</i>	GTGGAAATGAAAGACATCATCGTGCTGGT	AGGCCCAGGAGGAATCTGAATGGG
<i>P2X3</i>	GGTTTCTTGACACGAGAAGGCTTACCA	TGAGGTGGCGTCACGTAATCAGACA
<i>P2X4</i>	GTGGGTGTTGTGTGGAAAAGGG	CTGAGCTGGTATCACATAATCCGCCA
<i>P2X5</i>	ACACCTCCCTGCAGAGTGCTGT	TTGGGGGTCACAATCAGTTGGTGA
<i>P2X6</i>	AGGCCAGTGTGTGGTGTCA	TCTCCACGGGGCACCAACTC
<i>P2X7</i>	CTTTGCTCTGGTGAGTGACAAGCTGT	CTGCAAAGGGAAGGTGTAGTCTGCG
<i>β-2MG</i>	TGACTTTGTACAGCCCAAGATA	AATGCGGCATCTTCAAACCT

6.15. Izolacja mysich oraz ludzkich KKM

Ludzkie MKC oraz KKM wyizolowano z krwi pępowinowej. Doświadczenia z wykorzystaniem materiału izolowanego w ramach współpracy z I Katedrą i Kliniką Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, na podstawie zgody Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (KB/3/2018). Krew rozcieńczano w PBS i wirowano w nieciągłym gradiencie odczynnika Ficoll (Ficoll-Paquet PLUS, Cytiva, Marlborough, USA) o gęstości $d=1.077$ g/ml, przy 400 g i w temp. 4°C. Następnie komórki z warstwy limfocytarno/monocytarnej (o wyglądzie tzw. kożuszka) przenoszono do nowych probówek. Frakcja ta w dalszych oznaczeniach nazywana była MKC. Następnie, otrzymane komórki barwiono koktajlem przeciwciał liniowych: anti-CD235a (klon GA-R2 [HIR2]), anti-CD2 (klon RPA-2.10), anti-CD3 (klon UCHT1), anti-CD14 (klon M5E2), anti-CD16 (klon 3G8), anti-CD19 (klon, HIB19), anti-CD24 (klon ML5), anti-CD56 (klon NCAM16.2) i anti-CD66b (klon G10F5) (BD Biosciences, San Jose, USA) skoniugowanych z FITC; anti-CD45 (klon HI30, BioLegend, San Diego, USA) skoniugowanym z fikoerytryną-cyjaniną 7 (PE-Cy7) oraz anti-CD34 (klon 581, BioLegend, San Diego, USA) skoniugowanym z PE. Komórki barwiono przez 30 min na lodzie, następnie izolowano komórki KKM o fenotypie $Lin^-CD45^+CD34^+$ z wykorzystaniem sortera komórkowego MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, Brea, USA).

Mysie komórki szpikowe izolowano poprzez wypłukania jam szpikowych kości udowych i piszczelowych. Otrzymaną zawiesinę komórkową lizowano w hypotonicznym buforze do lizy (Lysis Buffer, BD Biosciences, San Jose, USA). Otrzymane MKC barwiono mieszaniną przeciwciał skierowanych przeciwko markerom linowym (wszystkie skoniugowane PE, BD Biosciences, San Jose, USA): anti-CD45R/B220 (klon RA3-6B2), anti-Gr1 (klon RB6-8C5), anti-CD11b (klon M1/70), anti-receptor β komórek T (klon H57-597), anti-receptor $\gamma\delta$ komórek T (klon GL3), anti-Ter119 (klon TER-119) oraz przeciwciałami anti-CD45 (klon HI30, BD Biosciences, San Jose, USA) skoniugowane z PE-Cy7 oraz anti-Sca1 (klon E13-161.7, BioLegend, San Diego, USA) skoniugowane z allofikocyjaniną (APC). Komórki barwiono przez 30 min na lodzie, następnie izolowano komórki KKM o fenotypie $Lin^-Sca1^+CD45^+$ z wykorzystaniem sortera komórkowego MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, Brea, USA).

6.16. Test aktywacji inflamasomu Nlrp3

Poziom aktywacji inflamasomu Nlrp3 został zmierzony z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay (Promega, Madison, USA). Zestaw ten, wykorzystując zjawisko bioluminescencji pozwala na wykonanie pomiaru aktywności kaspazy 1. Test wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. Wyizolowano komórki SKL (Sca1⁺c-Kit⁺Lin⁻) ze szpiku myszy typu dzikiego. Następnie, komórki w ilości 5×10^4 wysiano na płytce 96-dółkowej. Do komórek kontrolnych, traktowanych $10 \mu\text{M}$ ATP oraz traktowanych $10 \mu\text{M}$ ATP wraz z $10 \mu\text{M}$ NF 449 dodano substrat z zestawu producenta. Substrat ten połączony jest z białkiem aminolucyferyny, które zostaje uwolnione po proteolitycznym rozkładzie substratu przez kaspazę 1. Aminolucyferyna jest substratem dla znajdującej się w zestawie termostabilnej lucyferazy. Następującej reakcji rozkładu towarzyszy wydzielanie światła. Otrzymany sygnał luminescencyjny jest stabilny i proporcjonalny do aktywności kaspazy 1. Intensywność luminescencji była mierzona za pomocą aparatu GloMax 9301 Multi Detection System (Promega, Madison, USA) 90 min po dodaniu odczynników.

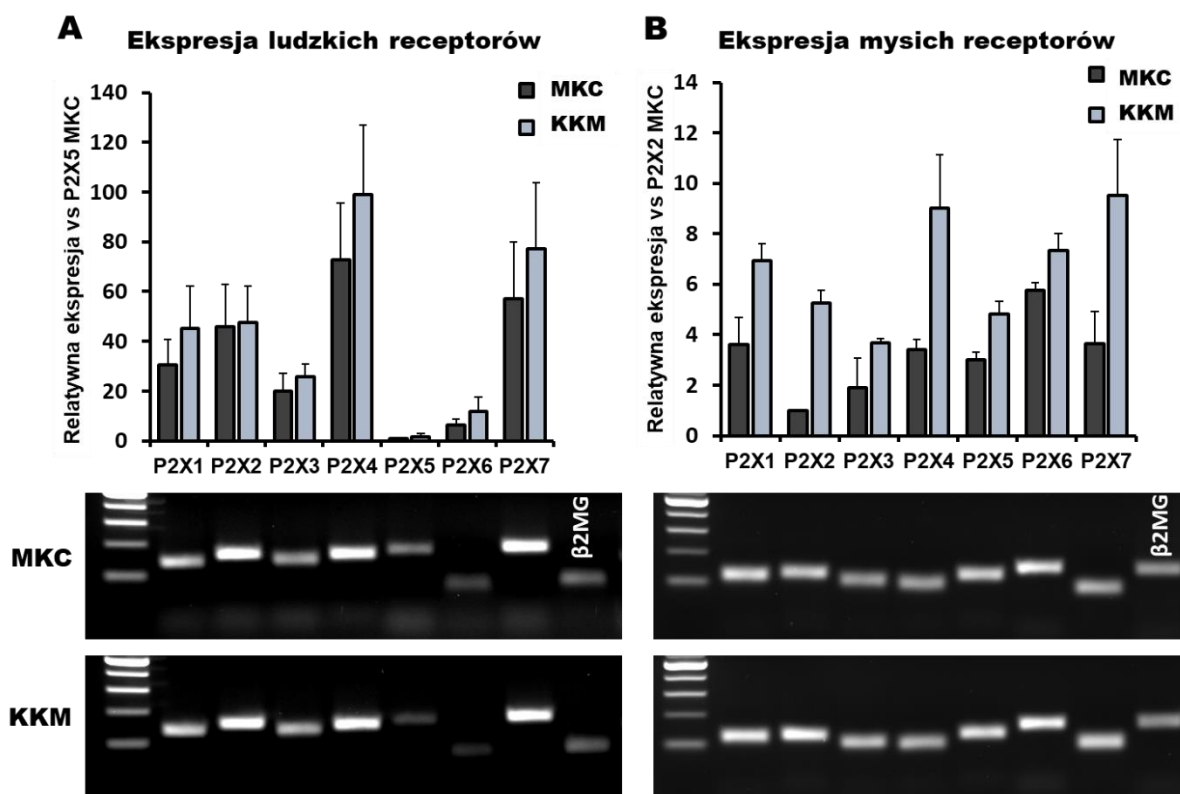
6.17. Analiza statystyczna

Istotność statystyczna otrzymywanych wyników, w zależności od układu eksperymentalnego, została obliczona na podstawie analizy wariancji ANOVA lub w oparciu o niesparowany test-t z wykorzystaniem narzędzi programu GraphPad (GraphPad Software Inc.). Otrzymywane wartości dla $p \leq 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

7. Wyniki

7.1. Ocena ekspresji receptorów P2X na mysich i ludzkich KKM

W pierwszym etapie prowadzonych doświadczeń potwierdzono ekspresję receptorów P2X na mysich i ludzkich KKM. Analiza ekspresji receptorów wykazała, iż wszystkie receptory P2X ulegają ekspresji zarówno na ludzkich (**Rycina 8A**), jak i mysich (**Rycina 8B**) MKC oraz komórkach KKM o fenotypie Lin⁻Sca1⁺CD45⁺ (mysie) oraz Lin⁻CD34⁺CD45⁺ (ludzkie). Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała, iż ludzkie KKM posiadają wyższą ekspresję receptorów P2X1, P2X4 i P2X7 w porównaniu do MKC.



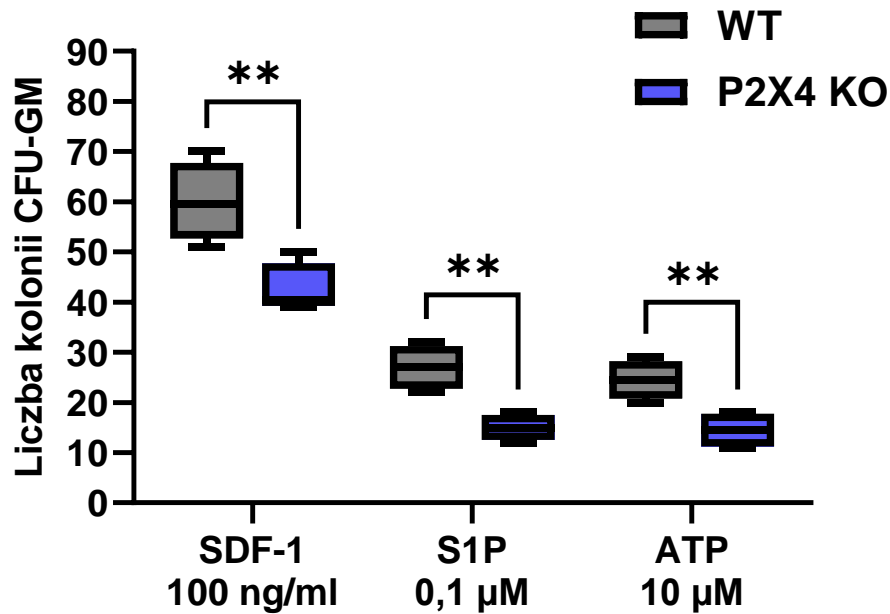
Rycina 8. Poziom ekspresji receptorów P2X na ludzkich oraz mysich KKM. Ekspresja receptorów P2X1-P2X7 na ludzkich (**Panel A**) i mysich (**Panel B**) KKM oraz MKC została określona w reakcji Real-time PCR. Relatywny poziom ekspresji mRNA dla P2X1-P2X7 wyznaczano, na mysich KKM izolowanych ze szpiku kostnego względem MKC oraz ludzkich KKM względem MKC izolowanych z krwi pępowinowej. Wyniki znormalizowano względem β 2-mikroglobuliny. Dane przedstawiają uśrednione wyniki z czterech niezależnych eksperymentów. Dodatkowo, otrzymywane produkty reakcji Real-time PCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym i zobrazowano. Przedstawiono reprezentatywny wynik.

7.2. Ocena roli receptora P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM i odnowie hematologicznej po przeszczepie

Dane literaturowe oraz wyniki własnych doświadczeń określających rolę receptora P2X7 w procesie mobilizacji i migracji KKM wykazały, iż brak lub obniżenie ekspresji tego receptora negatywnie wpływa na wymienione procesy. Przeprowadzona analiza ekspresji receptorów P2X, na mysich oraz ludzkich komórkach KKM, wykazała natomiast, iż receptor P2X4 charakteryzuje najwyższy poziom relatywnej ekspresji. Receptor ten, posiada bardzo wysokie podobieństwo sekwencji kodujących z receptorem P2X7. Dodatkowo, receptor P2X4 jest 1000 razy bardziej wrażliwy na działanie ATP w porównaniu do receptora P2X7, dlatego w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, postanowiono określić rolę receptora P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji i odnowie hematologicznej po przeszczepie.

7.2.1. Określenie roli receptora P2X4 w procesie migracji KKM

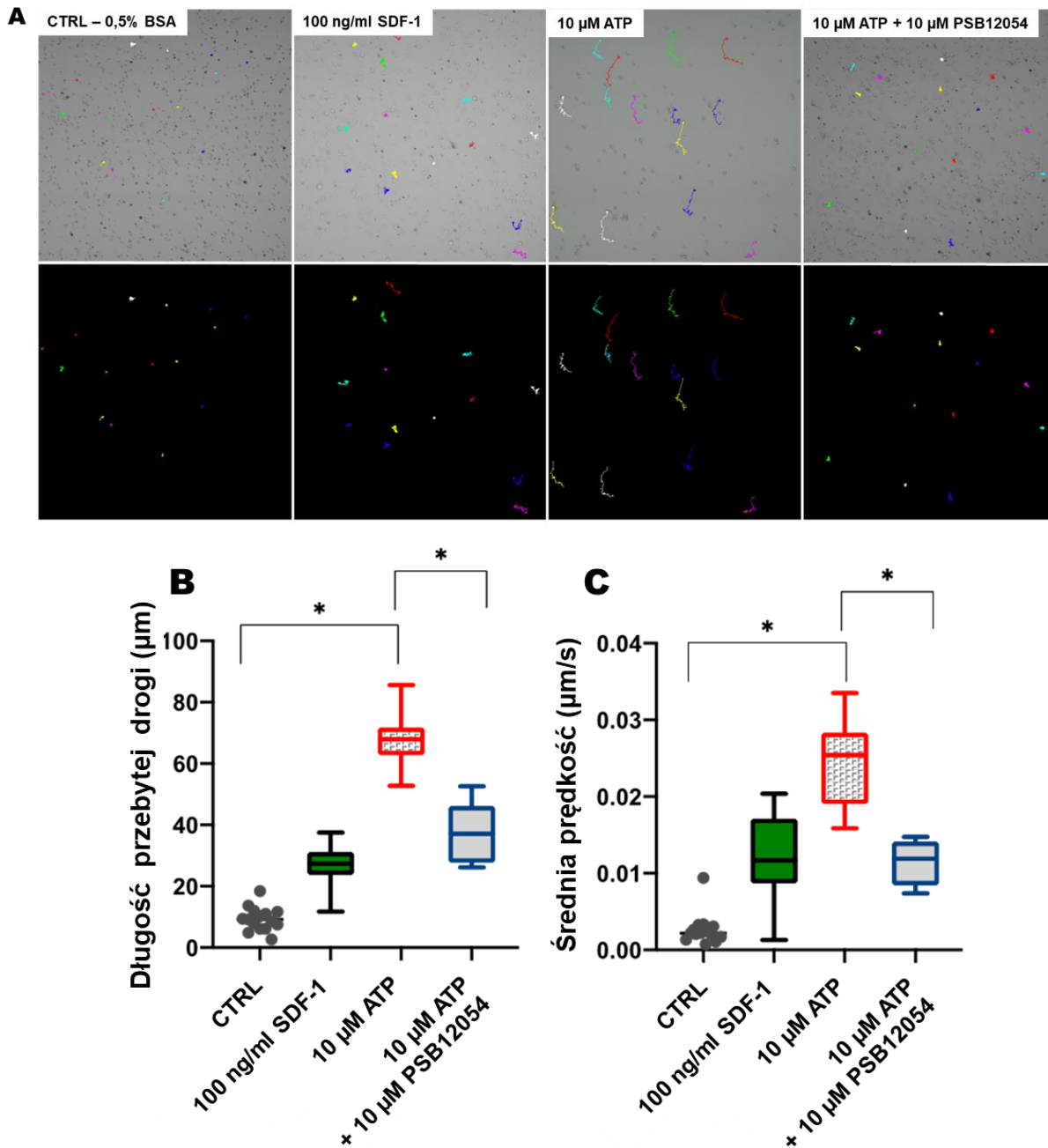
W pierwszej kolejności określono czy brak ekspresji receptora P2X4 wpływa na potencjał migracyjny mysich komórek jednojądrzastych szpiku kostnego. W teście chemotaksji, którego wyniki przedstawiono na **Rycinie 9**, wykazano, iż komórki z rekombinacją homologiczną receptora P2X4 (P2X4 KO) charakteryzują się obniżoną zdolnością migracji względem gradientu badanych czynników chemotaktycznych, w porównaniu do komórek pochodzących ze szpiku kostnego myszy typu WT. Migrujące komórki poddano analizie oceniającej potencjał klonogenny, otrzymując następujące ilości kolonii dla szeregu CFU-GM: migracja względem SDF-1: WT 60 ($\pm 7,87$), P2X4 KO 42,50 ($\pm 5,07$); względem S1P: WT 27 ($\pm 4,40$), P2X4 KO 15 ($\pm 2,58$); względem ATP: WT 24,50 ($\pm 3,87$), P2X4 KO 14,5 ($\pm 3,51$). Uzyskane różnice były istotne statystycznie (kolejno: $p=0,009$, $p=0,003$, $p=0,008$). Ilość kolonii uzyskanych w wariacie kontrolnym, bez zastosowania czynnika chemotaktycznego, była taka sama dla komórek izolowanych z myszy WT i P2X4 KO.



Rycina 9. Wpływ receptora P2X4 na migrację mysich komórek jednojądrzastych szpiku kostnego względem czynników chemotaktycznych. Izolowano komórki jednojądrzaste szpiku kostnego myszy WT oraz P2X4 KO. Komórki inkubowano w medium pozbawionym surowicy, następnie umieszczona w komorach Boydena w gradiencie czynników chemotaktycznych. Komórki, które aktywnie migrowały przez pory komory o średnicy 5 μm wysiano w teście klonogennym, gdzie po 7 dniach zliczono ilość kolonii dla szeregu CFU-GM. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniem standardowym dla wartości uzyskanych w dwóch niezależnych eksperymentach. ** $p \leq 0,01$.

W kolejnym doświadczeniu określono wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na dynamikę migracji komórek w obecności czynników chemotaktycznych (**Rycina 10**). Za pomocą mikroskopii konfokalnej oraz programu MTrack (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, USA), określono kierunki ruchów oraz wyliczono odległości przebyte przez komórki (**Rycina 10A**). Jak przedstawiono na **Rycinie 10B**, komórki kontrolne, zachowują względnie stałe pozycje, nie wykazując aktywnego przemieszczania się, natomiast dodanie czynników chemotaktycznych, takich jak SDF-1 i ATP, powoduje aktywne przemieszczanie się komórek. Według uzyskanych wyników, ogólna średnia długość migracji względem SDF-1 wyniosła 28 μm, natomiast względem gradientu ATP uzyskany wynik wyniósł 70 μm. Jednoczesne zastosowania ATP oraz PSB 12054, (swoistego inhibitora receptora P2X4) wpłynęło na obniżenia zdolności migracyjnych komórek i istotnie statystycznie skrócenia średniej odległości pokonywanych przez komórki do 38 μm. Pomiary szybkości ruchu komórek wykazały, iż obecność inhibitora receptora P2X4 znacząco wpłynęła na dynamikę migracji

komórek względem ATP (obniżenie średniej prędkości z 0,026 $\mu\text{m/s}$ do 0,012 $\mu\text{m/s}$ (**Figura 10C**).



Rycina 10. Wpływ receptora P2X4 na aktywność migracyjną jednojądrzastych komórek izolowanych ze szpiku kostnego. Komórki wyizolowane ze szpiku kostnego myszy typu WT inkubowano w medium RPMI 1640 z 0,5% BSA (CTRL) lub w medium z czynnikiem chemotaktycznym (SDF-1 lub ATP) lub czynnikiem chemotaktycznym i inhibitorem receptora P2X4 (ATP + PSB 12054). Ruchy komórek nagrywano przez 60 minut, po czym wyznaczano prędkość i długość przemieszczenia (**Panel A**). Przedstawiono reprezentatywny obraz. Na podstawie 2 niezależnych eksperymentów wyliczono średnią długość drogi komórek w poszczególnych warunkach oraz prędkość ruchów (**Panel B i C**).

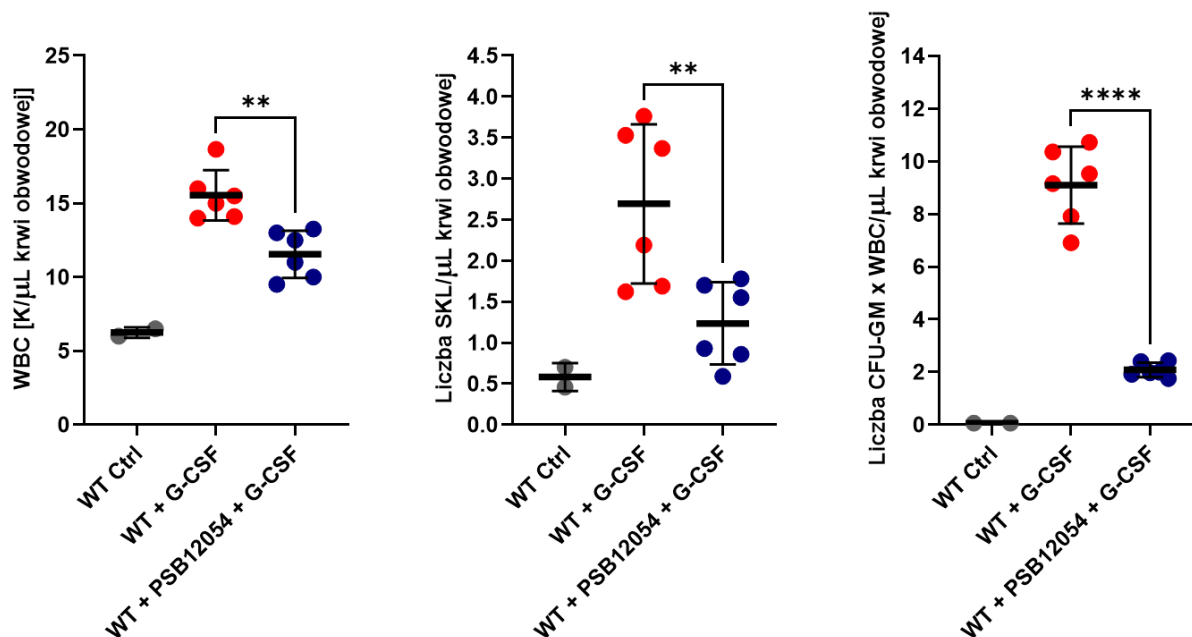
7.2.2. Określenie roli receptora P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM

Przedstawione wyniki wykazały, iż brak funkcjonalnego receptora P2X4 wpływa na obniżenie odpowiedzi chemotaktycznej mysich komórek szpikowych *in vitro*. W kolejnych etapach oceniono, czy brak ekspresji receptora P2X4 wpływa na efektywność migracji KKM z niszy szpikowej do krwi obwodowej w procesie farmakologicznej mobilizacji.

Przeprowadzono eksperymenty farmakologicznej mobilizacji z wykorzystaniem czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF) (**Rycina 11**) oraz swoistego antagonisty receptora CXCR4 (AMD3100) (**Rycina 12**). W doświadczeniach tych oceniono ilość izolowanych z krwi obwodowej (PB, ang. *peripheral blood*) WBC, KKM o fenotypie Sca1⁺c-Kit⁺Lin⁻ (SKL) oraz jednostek tworzących kolonie dla szeregu CFU-GM w teście klonogenności.

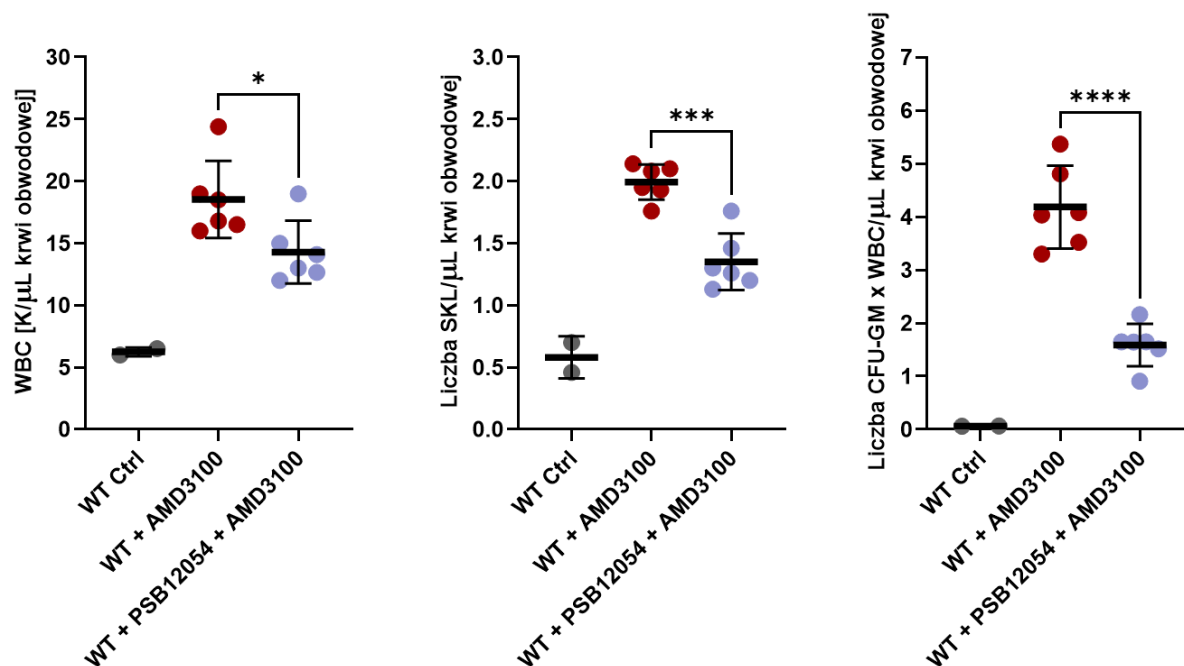
Układ doświadczalny zakładał ocenienie zjawiska mobilizacji w grupie kontroli negatywnej, przy nieobecności czynnika indukującego mobilizację, w której myszy nastrzykiwane były roztworem PBS, grupie kontroli pozytywnej, w której myszy WT otrzymywały czynnik indukujący mobilizację oraz w grupie eksperymentalnej docelowej, którą stanowiły myszy WT, którym uprzednio oraz w trakcie trwania doświadczenia podawano inhibitor receptora P2X4 – PSB 12054 wraz z czynnikiem mobilizującym.

Uzyskane wyniki mobilizacji z wykorzystaniem czynnika G-CSF przedstawiono na **Rycinie 11**. Jak wykazano, myszy, którym podawano środek mobilizujący wraz z inhibitorem receptora P2X4 wykazały obniżoną wydajność farmakologicznej mobilizacji. Średnia wartość WBC wyniosła 11,54 tys/ μ l PB (\pm 1,60), co stanowiło 75% średniej wartości WBC uzyskanej dla myszy, który otrzymywały jedynie G-CSF (15,54 tys/ μ l PB, \pm 1,71) ($p=0,002$). Wartość SKL (ilość komórek SKL przeliczona względem WBC) dla grupy G-CSF wyniosła 2,69 (\pm 0,97), natomiast w grupie G-CSF + PSB 12054 1,03 (\pm 0,50) ($p=0,008$). Różnice w średniej ilości kolonii dla szeregu CFU-GM były statystycznie istotne, a wartości uzyskane po przeliczeniu ilości kolonii CFU-GM względem wartości WBC wyniosły odpowiednio: 9,09 (\pm 1,46) dla grupy G-CSF oraz 2,08 (\pm 0,28) dla grupy G-CSF + PSB 12054 ($p<0,0001$).



Rycina 11. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na indukowaną poprzez G-CSF farmakologiczną mobilizację KKM. Efektywność mobilizacji została określona poprzez ocenę parametrów WBC oraz ilości KKM o fenotypie SKL ($Sca1^{+}c\text{-Kit}^{+}Lin^{-}$) i progenitorów kolonii szeregu CFU-GM izolowanych z krwi obwodowej. Mysiom typu WT w okresie 3 dni nastrzykiwano trzykrotnie PBS – grupa kontrolna WT Ctrl, czynnik mobilizujący G-CSF – grupa WT + G-CSF oraz czynnik mobilizujący G-CSF z jednoczesnym podawaniem inhibitora PSB12054 – grupa WT + G-CSF + PSB12054. Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie, liczba zwierząt w grupie każdorazowo wynosiła 3. ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

Na **Rycinie 12** przedstawiono wyniki farmakologicznej mobilizacji z wykorzystaniem czynnika AMD3100. W doświadczeniu, wykazano znaczące obniżenie wydajności mobilizacji, gdzie różnice w wartościach badanych parametrów były istotne statystycznie. Wartość WBC dla myszy mobilizowanych poprzez wykorzystanie AMD3100 wyniosła średnio 18,44 tys/ μ L PB ($\pm 3,46$), natomiast równoczesne zastosowanie PSB 12054 obniżyło wartość do 14,33 tys/ μ L PB ($\pm 2,84$) ($p=0,02$). W przypadku komórek SKL, uzyskany wynik dla grupy mobilizowanej z wykorzystaniem AMD3100 wyniósł średnio 2,00 ($\pm 0,16$) natomiast dla grupy AMD3100 + PSB 12054 było to średnio 1,36 ($\pm 0,23$) ($p=0,002$). Ilość kolonii szeregu CFU-GM, w przeliczeniu na wartość WBC wyniosła kolejno 4,21 ($\pm 0,87$) dla grupy AMD3100 i 1,58 ($\pm 0,45$) dla grupy, w której równocześnie stosowano inhibitor receptora P2X4 ($p < 0,0001$).

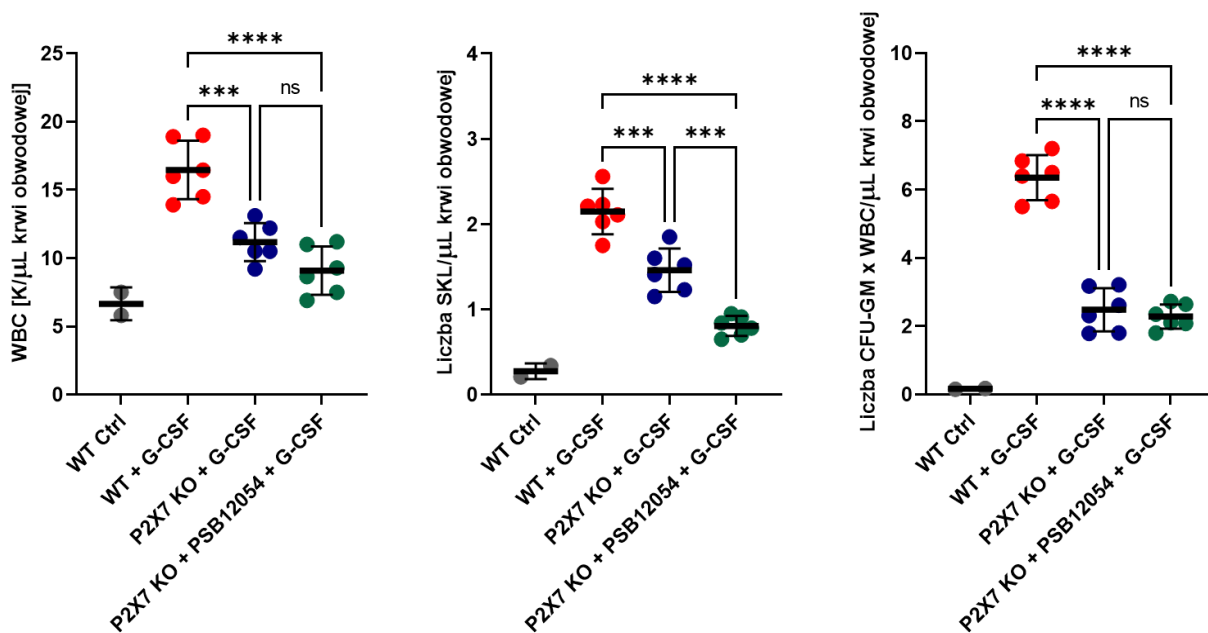


Rycina 12. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na farmakologiczną mobilizację indukowaną AMD3100. Efektywność mobilizacji została określona poprzez ocenę parametrów WBC oraz ilości KKM o fenotypie SKL (Sca1⁺c-Kit⁺Lin⁻) i progenitorów kolonii szeregu CFU-GM izolowanych z krwi obwodowej. Myszy typu WT jednorazowo nastrzyknięto PBS – grupa kontrolna WT Ctrl, czynnik mobilizujący AMD3100 – grupa WT + AMD3100 oraz czynnik mobilizujący AMD3100 z jednoczesnym podawaniem inhibitora PSB12054 – grupa WT + AMD3100 + PSB12054. Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie, liczba zwierząt w grupie każdorazowo wynosiła 3. *p≤0,05; ***p≤0,001; **** p≤0,0001.

W kolejnym badaniu, wykorzystano model doświadczalny pozwalający na jednoczesną ocenę wpływu zahamowania ekspresji receptorów P2X4 i P2X7, na farmakologiczną mobilizację indukowaną G-CSF oraz AMD3100. Jak wykazano we wcześniejszych eksperymentach, brak ekspresji funkcjonalnego receptora dla P2X7 na KKM oraz w niszy szpikowej myszy skutkowało upośledzeniem procesu mobilizacji indukowanej przez G-CSF, ale nie przez AMD3100 [210]. Natomiast, jak przedstawiono na **Rycinie 12**, hamowanie ekspresji receptora P2X4 obniżyło wydajność mobilizacji indukowanej przez AMD3100. W dalszych etapach postanowiono sprawdzić, jak na proces farmakologicznej mobilizacji wpłynie jednoczesne zahamowanie działania dwóch receptorów, tj. P2X7 i P2X4.

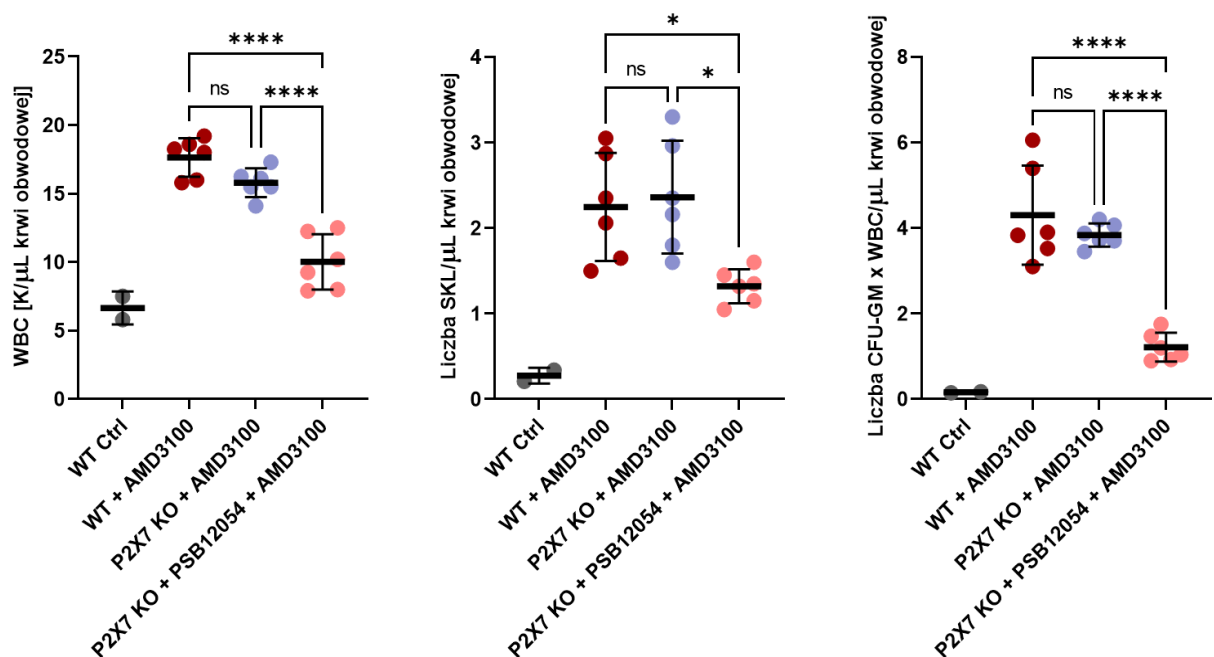
Na **Rycinie 13** przedstawiono wyniki farmakologicznej mobilizacji indukowanej przez G-CSF. Uzyskane wyniki wykazały, iż jednoczesne zahamowanie ekspresji receptora P2X7 i P2X4 nie obniżyło istotnie wartości WBC i CFU-GM w porównaniu do myszy P2X7 KO (WBC 9,09 tys/ μ l PB (\pm 1,77) vs 11,17 tys/ μ l PB (\pm 1,39)); CFU-GM 2,28 (\pm 0,36) vs 2,48 (\pm 0,63)). Wykazano natomiast istotne różnice w ilości komórek SKL (wartość SKL dla grupy P2X7 KO + G-CSF 1,45 (\pm 0,26), dla grupy P2X7 KO + G-CSF + PSB 12054 0,81 (\pm 0,12))(p=0,0004).

Jednocześnie wykazano, iż obydwie grupy zwierząt eksperymentalnych, w których blokowana była ekspresja receptora P2X7 lub receptora P2X7 oraz P2X4, charakteryzowały się istotnie statystycznie obniżonymi wartościami WBC, SKL i CFU-GM w stosunku do grupy typu WT mobilizowanych czynnikiem G-CSF.



Rycina 13. Wpływ zahamowania ekspresji receptorów P2X7 i P2X4 na indukowaną poprzez G-CSF mobilizację KKM. Efektywność mobilizacji została określona poprzez ocenę parametrów WBC oraz ilości komórek o fenotypie SKL (Sca1⁺c-Kit⁺Lin⁻) i progenitorów kolonii szeregu CFU-GM izolowanych z krwi obwodowej. Mysiom typu WT, w okresie 3 dni wstrzyknięto trzykrotnie PBS – grupa kontrolna (WT Ctrl) lub czynnik mobilizujący G-CSF (grupa WT + G-CSF). Myszy P2X7 KO mobilizowano G-CSF (grupa P2X7 KO + G-CSF) lub podawano czynnik mobilizujący wraz z inhibitorem PSB 12054 (grupa P2X7 KO + G-CSF + PSB12054). Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie, liczba zwierząt w grupie każdorazowo wynosiła 3. ns – nieistotne statystycznie; ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,0001.

Następnie, takie same grupy eksperymentalne poddano mobilizacji z wykorzystaniem czynnika AMD3100. Zgodnie z opublikowanymi wcześniej wynikami [210], nie wykazano istotnych różnic w wydajności procesu mobilizacji pomiędzy myszami WT i P2X7 KO (wartości odpowiednio: WBC 17,64 (\pm 1,41) vs 15,79 (\pm 1,06) (tys/ μ l PB); SKL 2,25 (\pm 0,63) vs 2,36 (\pm 0,66); CFU-GM 4,30 (\pm 1,16) vs 3,83 (\pm 0,27). Wartości SKL i CFU-GM przeliczono względem ilości WBC. Wartości parametrów określających wydajność mobilizacji uległy natomiast znaczącemu obniżeniu w grupie myszy P2X7 KO, w której oprócz czynnika mobilizującego, podawano inhibitor receptora P2X4. Uzyskano następujące średnie wartości WBC= 10,02 tys/ μ l PB (\pm 2,02), SKL= 1,32 (\pm 0,20), CFU-GM= 1,21 (\pm 0,37). Różnice wartości, w porównaniu do grupy P2X7 KO były istotne statystycznie (WBC p <0,0001, SKL p =0,013, CFU-GM p <0,0001). (**Rycina 14**).

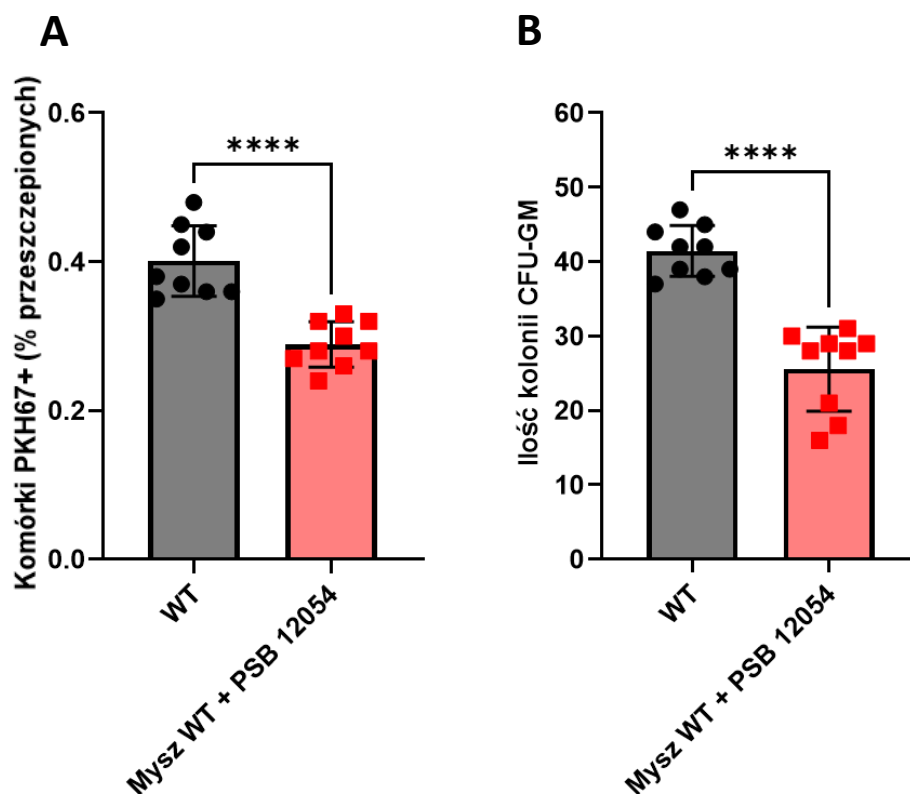


Rycina 14. Wpływ zahamowania ekspresji receptorów P2X7 i P2X4 na farmakologiczną mobilizację KKM indukowaną AMD3100. Efektywność mobilizacji została określona poprzez ocenę parametrów WBC oraz ilości komórek o fenotypie SKL (Sca1⁺c-Kit⁺Lin⁻) i progenitorów kolonii szeregu CFU-GM izolowanych z krwi obwodowej. Myszy typu WT jednorazowo nastrzyknięto PBS – grupa kontrolna (WT Ctrl), czynnikiem mobilizującym AMD3100 (grupa WT + AMD3100). Myszy P2X7 KO mobilizowano AMD3100 (grupa P2X7 KO + AMD3100) oraz czynnikiem mobilizującym AMD3100 z jednoczesnym podawaniem inhibitora PSB 12054 (grupa P2X7 KO + AMD3100 + PSB 12054). Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie, liczba zwierząt w grupie każdorazowo wynosiła 3. ns – nieistotne statystycznie; * p <0,05; **** p <0,0001.

7.2.3. *Określenie roli receptora P2X4 w procesie wszczepiania i zasiedlania niszy szpikowej oraz odnowie hematologicznej po przeszczepieniu KKM*

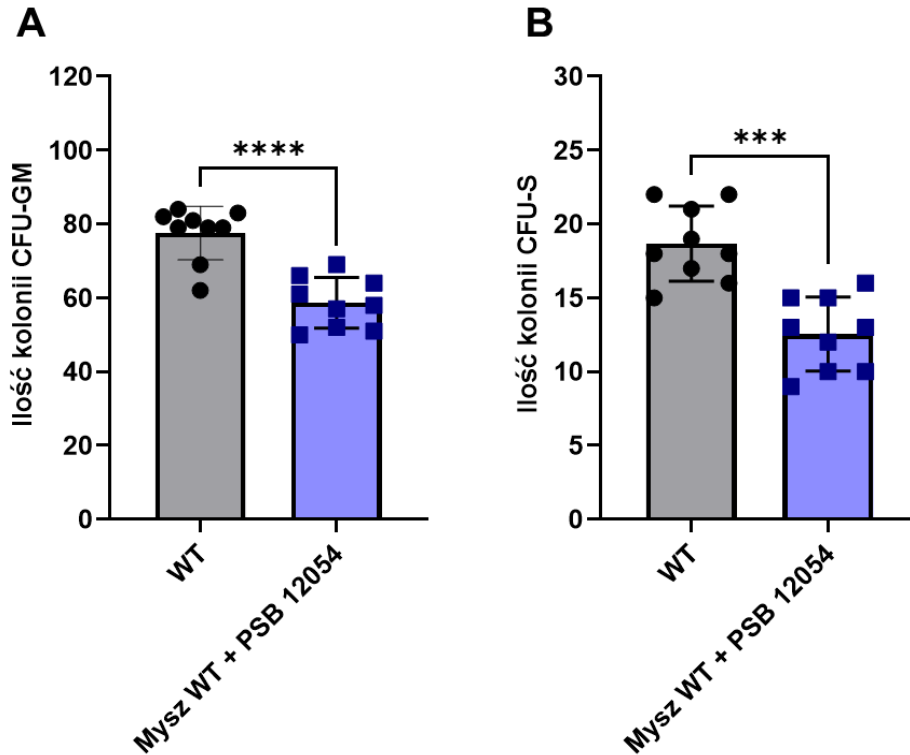
W kolejnych etapach pracy, przeprowadzono doświadczenia określające rolę receptora P2X4 w procesach wszczepiania się oraz pełnej odnowy hematologicznej po przeszczepie krwiotwórczym. W procesie wszczepiania można wyróżnić dwa zasadnicze etapy, mianowicie etap wejścia (wszczepianie podanych komórek do niszy szpikowej, tzw. *homing*) oraz etap zasiedlenia komórek w mikrośrodowisku szpiku (tzw. *engraftment*). W etapie odnowy hematologicznej określa się dynamikę oraz czas potrzebny do powrotu parametrów krwi (WBC oraz PLT) do wyjściowych wartości sprzed przeszczepu krwiotwórczego.

W pierwszym wariantcie doświadczeń wykorzystano myszy typu WT, które przed, oraz w trakcie trwania eksperymentów, otrzymywały inhibitor receptora P2X4, PSB 12054. Jak wykazano na **Rycinie 15**, ilość oznaczonych komórek, które uległy wszczepieniu do niszy szpikowej biorcy (jedna kość udowa) wyniosła średnio 0,4 % ($\pm 0,05$) ogółu wszystkich przeszczepionych komórek, natomiast dla myszy, które otrzymywały inhibitor receptora P2X4, oznaczona ilość wyniosła 0,2% ($\pm 0,03$) (**Rycina 15A**). Komórki izolowane z drugiej kości udowej zostały wysiane w teście klonogenności, gdzie średnia ilość kolonii dla szeregu CFU-GM otrzymanych w grupie kontrolnej wyniosła 41,5 ($\pm 3,4$), natomiast w grupie z podawanym inhibitorem PSB 12054, było to średnio 25,5 ($\pm 5,63$) (**Rycina 15B**). Otrzymane różnice wykazały istotność statystyczną ($p < 0,0001$).



Rycina 15. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 u myszy typu WT na proces wszczepiania się KKM. Myszy typu WT otrzymywały inhibitor receptora P2X4 (grupa Mysz WT + PSB 12054). Myszy z obydwu grup napromieniono dawką 950 cGy. Po 24 godzinach myszy przeszczepiono jednojądrzastymi komórkami izolowanymi ze szpiku myszy WT, wyznakowanymi barwnikiem PKH67. Po kolejnych 24 godzinach myszy poddano eutanazji, następnie wyizolowano komórki z kości udowych. W część izolowanego materiału, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, oznaczono komórki PKH67⁺ (**Panel A**). Pozostała część komórek została wysiana wraz z czynnikami wzrostu (GM-CSF oraz IL-3), po 7 dniach zliczono kolonie szeregu CFU-GM (**Panel B**). Zaprezentowane wyniki stanowią połączenie dwóch niezależnych eksperymentów dla których liczba zwierząt wynosiła odpowiednio 4 i 5. ****p \leq 0,0001.

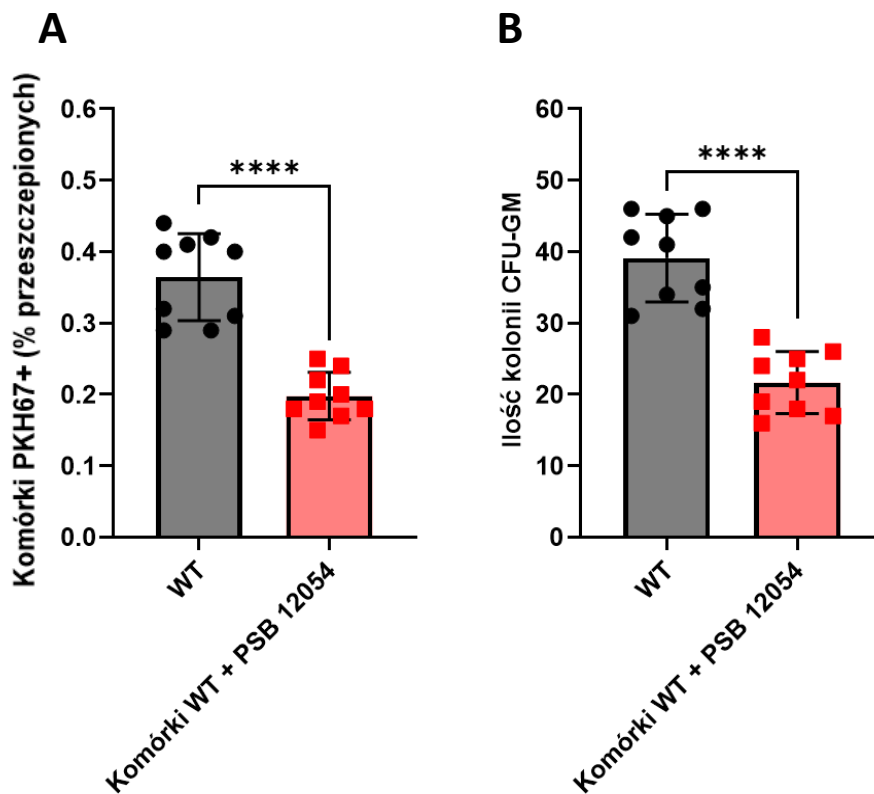
Przeprowadzone doświadczenia wykazały również upośledzenie efektywności zasiedlania niszy szpikowej u myszy, którym podawano inhibitor receptora P2X4. Jak wykazano na **Rycinie 16**, ilość kolonii szeregu CFU-GM, otrzymanych z komórek izolowanych z kości udowych 12 dni po przeszczepie wyniosła średnio 77,55 (\pm 7,3) w grupie kontrolnej oraz jedynie 58,68 (\pm 6,7) w grupie z podawanym inhibitorem PSB 12054, co stanowiło istotną statystycznie różnicę (p<0,0001) (**Rycina 16A**). W doświadczeniu tym izolowano również śledziony, celem określenia ilości kolonii śledzionowych CFU-S. Jak wykazano, suma kolonii CFU-S wyniosła średnio 18,67 (\pm 2,55) w grupie kontrolnej oraz 12,55 (\pm 2,5) w grupie myszy, którym podawano inhibitor receptora P2X4, PSB 12054 (p=0,000102) (**Rycina 16B**).



Rycina 16. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 u myszy WT na proces zasiedlenia KKM w niszy szpikowej. Myszy typu WT otrzymywały inhibitor receptora P2X4 (grupa Mysz WT + PSB 12054). Myszy zostały letalnie napromieniowane dawką 950 cGy, następnie po 24 godzinach przeprowadzono przeszczep jednojądrzastych komórek izolowanych ze szpiku kostnego myszy WT. W 12 dniu po przeszczepie, myszy poddano eutanazji, następnie wyizolowano śledziony oraz komórki z kości udowych. Komórki szpikowe wysiano w teście klonogenności, gdzie ilość otrzymanych kolonii szeregu CFU-GM została zliczona po 7 dniach (**Panel A**). Kolonie śledzionowe CFU-S zostały uwidocznione z wykorzystaniem roztworu Feketa, następnie policzone (**Panel B**). Zaprezentowane wyniki stanowią połączenie dwóch niezależnych eksperymentów dla których liczba zwierząt wynosiła odpowiednio 4 i 5. *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$

Inny wariant doświadczeń zakładał przeszczepienie myszom typu dzikiego komórek inkubowanych w obecności inhibitora PSB 12054. Wyniki tzw. *homingu* przedstawiono na **Rycinie 17**. Uzyskane wyniki wykazały obniżenie wydajności wszczepiania się do szpiku przez komórki inkubowane z inhibitorem receptora P2X4 w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie kontrolnej, oznaczona z użyciem cytometrii przepływowej, ilość komórek PKH67⁺, które uległy wszczepieniu do niszy szpikowej biorcy, wyniosła średnio 0,36% ($\pm 0,06$) wyjściowej ilości przeszczepianych komórek, natomiast w grupie z zastosowanym inhibitorem wykazano średnio 50% mniej komórek PKH67⁺ (0,18% $\pm 0,03$) ($p < 0,0001$) (**Rycina 17A**). Średnia ilość kolonii szeregu CFU-GM otrzymanych w teście klonogenności wyniosła kolejno

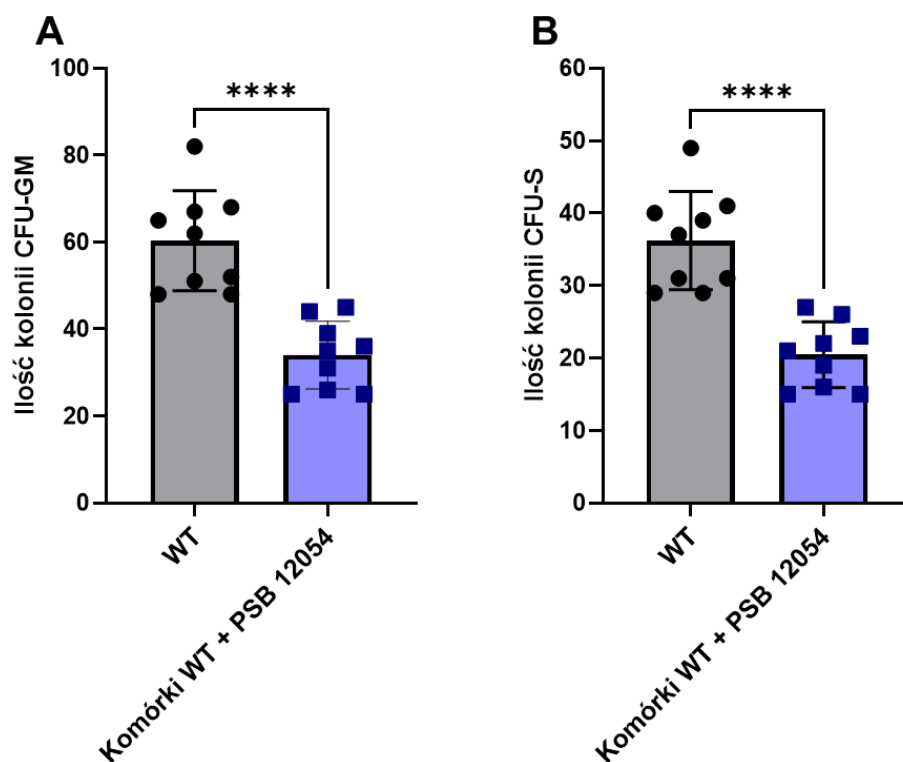
39,1 ($\pm 6,13$) (grupa kontrolna) oraz 21,67 ($\pm 4,33$) (grupa przeszczepiona komórkami inkubowanymi z PSB 12054) ($p < 0,0001$) (**Rycina 17B**).



Rycina 17. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na KKM na proces ich wszczepiania się do szpiku myszy WT. Myszy typu WT zostały letalnie napromieniowane dawką 950 cGy. Po 24 godzinach, przeprowadzono przeszczep jednojądrzastych komórek izolowanych ze szpiku kostnego myszy WT, wyznakowanych barwnikiem PKH67. Myszy typu WT otrzymywały komórki szpikowe (grupa WT) lub inkubowane z inhibitorem receptora P2X4 (grupa Komórki WT + PSB 12054). Po kolejnych 24 godzinach myszy poddano eutanazji, następnie wyizolowano komórki z kości udowych. W część izolowanego materiału, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, oznaczono komórki PKH67⁺ (**Panel A**). Pozostała część komórek została wysiana wraz z czynnikami wzrostu (GM-CSF oraz IL-3), po 7 dniach zliczono kolonie szeregu CFU-GM (**Panel B**). Zaprezentowane wyniki stanowią połączenie dwóch niezależnych eksperymentów dla których liczba zwierząt wynosiła odpowiednio 4 i 5. **** $p \leq 0,0001$.

Wyniki doświadczenia określającego efektywność zasiedlenia niszy szpikowej w wariacie przeszczepiania myszy typu WT komórkami inkubowanymi z inhibitorem receptora PSB 12054 przedstawiono na **Rycinie 18**. Uzyskane wyniki wskazują, iż hamowanie ekspresji receptora P2X4 na KKM przed przeszczepem wpływa na ich zdolność do prawidłowego zasiedlenia niszy szpikowej. Wydajność procesu zasiedlania określano w teście klonogenności

oraz zliczając ilość kolonii śledzionowych utworzonych z komórek progenitorowych CFU-S. Uzyskano średnio 60,33 ($\pm 11,5$) kolonii szeregu CFU-GM w grupie kontrolnej, natomiast w grupie z komórkami pre-inkubowanymi z inhibitorem receptora P2X4, było to średnio 34,0 ($\pm 7,80$) kolonii szeregu CFU-GM (**Rycina 18A**). Ilość kolonii CFU-S uwidoczniionych w śledzionach myszy kontrolnych wyniosła średnio 36,22 ($\pm 6,78$), u myszy przeszczepianych komórkami poddanymi działaniu inhibitora było to 20,44 ($\pm 4,53$) (**Rycina 18B**). Uzyskane różnice wartości parametrów CFU-GM i CFU-S były statystycznie istotne ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$).

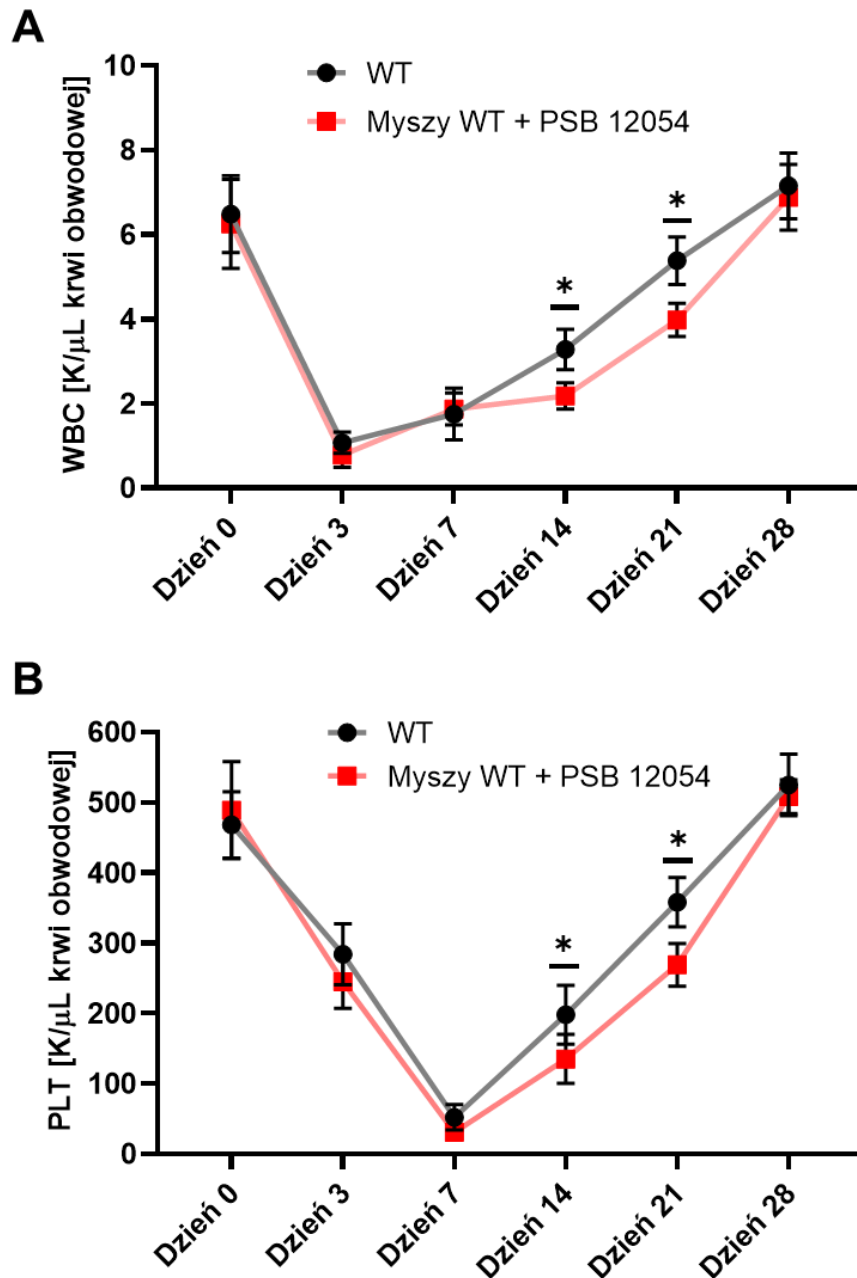


Rycina 18. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na KKM na wydajność zasiedlania niszy szpikowej myszy WT. Myszy typu WT zostały letalnie napromieniowane dawką 950 cGy. Po 24 godzinach, przeprowadzono przeszczep jednojądrzastych komórek izolowanych ze szpiku kostnego myszy WT (grupa WT) lub komórek inkubowanych z inhibitorem receptora P2X4 (grupa Komórki WT + PSB 12054). W 12 dniu po przeszczepie, myszy poddano eutanazji, następnie wyizolowano śledziony oraz komórki z kości udowych. Komórki szpikowe wysiano w teście klonogenności gdzie ilość otrzymanych kolonii szeregu CFU-GM została policzona po 7 dniach (**Panel A**). Kolonie śledzionowe CFU-S zostały uwidocznione z wykorzystaniem roztworu Feketa, następnie zliczone (**Panel B**). Zaprezentowane wyniki stanowią połączenie dwóch niezależnych eksperymentów dla których liczba zwierząt wynosiła odpowiednio 4 i 5. **** $p \leq 0,0001$.

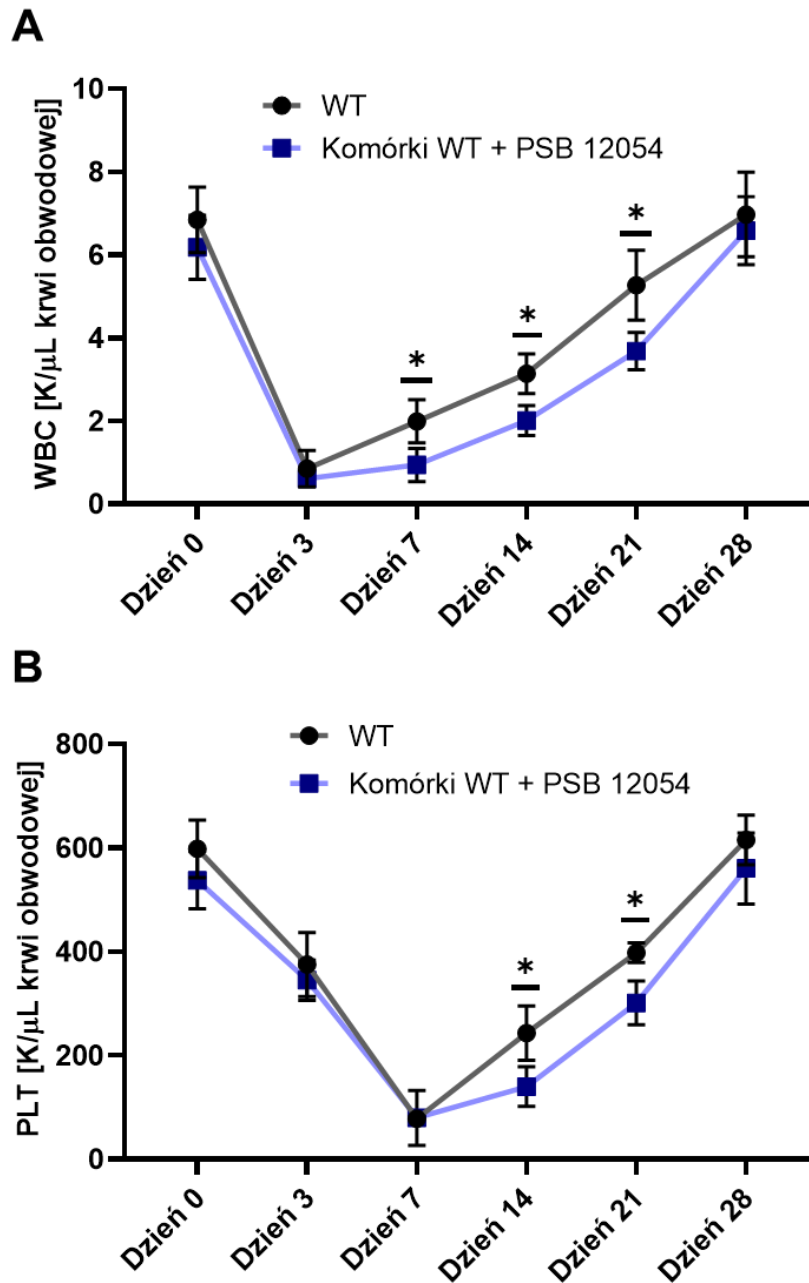
Jak wspomiano, o wydajności przeszczepu, oprócz efektywnego zasiedlania i wszczepiania się KKM do nisz szpikowych, świadczy również dynamika powrotu wartości parametrów morfologicznych we krwi obwodowej, czyli proces odnowy hematologicznej. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń, oceniających dynamikę procesu odnowy hematologicznej zaprezentowano na **Rycinie 19** i **20**. Podobnie jak w eksperymentach oceniających efektywność wszczepiania się KKM i zasiedlania niszy szpikowej, w tym doświadczeniu również wykorzystano dwa warianty: oceniający wpływ zahamowania receptora w środowisku szpikowym (**Rycina 19**) oraz wariant oceniający rolę receptora na przeszczepianych KKM (**Rycina 20**).

Jak wykazano, zahamowanie ekspresji receptora P2X4 poprzez zastosowanie jego swoistego inhibitora, spowolniło dynamikę procesu odnowy hematologicznej. Wartość WBC uzyskiwana w grupie myszy otrzymujących inhibitor była istotnie niższa w dniu 14 i 21 po przeszczepie jednojądrzastych komórek, w porównaniu do grupy kontrolnej (2,18 tys/ μ l PB (\pm 0,31) vs 3,28 tys/ μ l PB (\pm 0,45 oraz 3,98 tys/ μ l PB (\pm 0,39) vs 5,36 tys/ μ l PB (\pm 0,56)) (**Rycina 19A**). Podobnie prezentowała się statystyka istotności różnic dla ilości PLT (**Rycina 19B**). Obydwe badane grupy powróciły do wartości parametrów WBC i PLT sprzed przeszczepu około 28 dnia po przeszczepieniu komórek szpikowych.

W drugim wariantcie doświadczalnym, myszy typu WT zostały przeszczepione szpikowymi komórkami jednojądrzastymi (grupa WT) lub komórkami szpikowymi inkubowanymi z inhibitorem receptora P2X4, PSB 12054 (grupa Komórki WT + PSB 12054). Otrzymana wyniki wykazały spowolnienie dynamiki procesu odnowy hematologicznej w grupie z zastosowanym inhibitorem PSB 12054. Zaobserwowano istotnie niższe wartości WBC w 7, 14 i 21 dni pomiarów (Grupa Komórki WT + PSB 12054 vs WT kolejno: 0,94 tys/ μ l PB (\pm 0,4) vs 1,99 tys/ μ l PB (\pm 0,52); 2,01 tys/ μ l PB (\pm 0,36) vs 3,0 tys/ μ l PB (\pm 0,48); 3,68 tys/ μ l PB (\pm 0,4) vs 5,27 tys/ μ l PB (\pm 0,84)) (**Rycina 20A**). Wykazano również spowolnioną dynamikę odnowy ilości płytek krwi u myszy przeszczepionych komórkami traktowanymi PSB 12054 (istotnie niższa wartość PLT w dniu 14 i 21 od przeszczepu) (**Rycina 20B**). Zarówno różnice w wartości WBC jak i PLT dla obydwu grup powróciły do wartości sprzed przeszczepu około dnia 28 po podaniu materiału komórkowego.



Rycina 19. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 u myszy WT na proces odnowy hematologicznej po przeszczepie KKM. Myszy nastrzykiwano inhibitorem receptora P2X4, następnie napromieniowano dawką 950 cGy. Po 24 godzinach przeprowadzono przeszczep jednojądrzastych komórek izolowanych ze szpiku kostnego myszy WT. Ilość białych krwinek (WBC, **Panel A**) i płytek krwi (PLT, **Panel B**) oznaczono w dniu poprzedzającym przeszczep oraz w 3, 7, 14, 21 i 28 dniu po przeszczepie komórek szpikowych. W trakcie trwania odnowy myszy nastrzykiwano inhibitorem PSB 12054. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości z dwóch niezależnych doświadczeń (n=4 myszy/grupa x 2 powtórzenia). *p≤0,05.



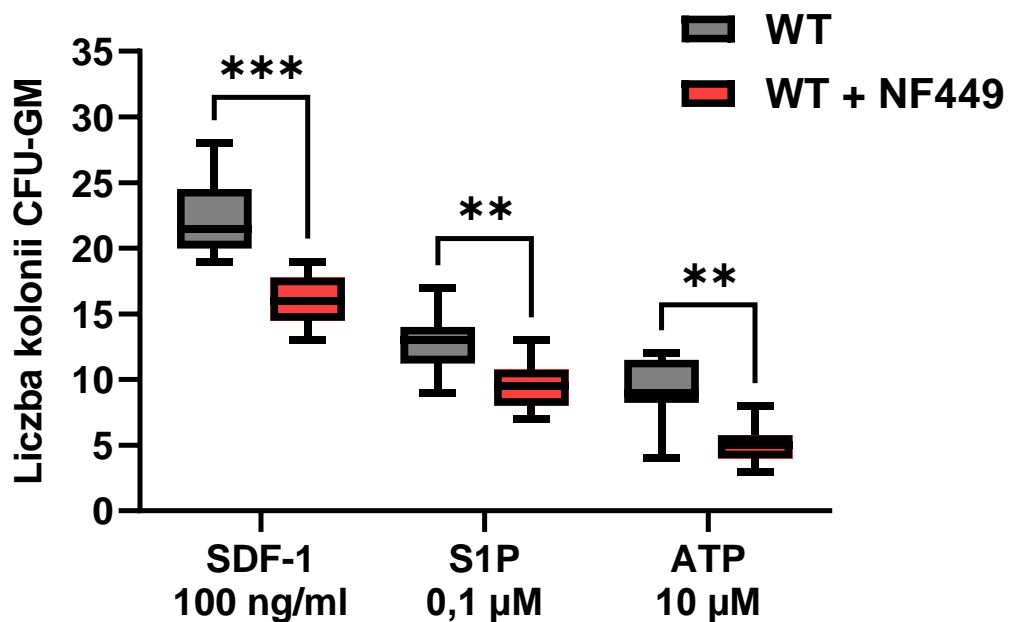
Rycina 20. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X4 na KKM na proces odnowy hematologicznej u myszy WT. Myszy zostały napromieniowane dawką 950 cGy, następnie po 24 godzinach przeprowadzono przeszczep jednojądrzastych komórek izolowanych ze szpiku kostnego myszy WT, które inkubowano z inhibitorem receptora P2X4, PSB 12054. Ilość białych krwinek (WBC, **Panel A**) i płytek krwi (PLT, **Panel B**) oznaczono w dniu poprzedzającym przeszczep oraz po 3, 7, 14, 21 i 28 dniach po podaniu materiału komórkowego. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości z dwóch niezależnych doświadczeń (n=4 myszy/grupa x 2 powtórzenia). *p<0,05.

7.3. Ocena roli receptora P2X1 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM i odnowie hematologicznej po przeszczepie

Przedstawiona na **Rycinie 8** analiza ekspresji receptorów P2X wykazała, iż wszystkie receptory P2X ulegają ekspresji na KKM oraz MKC izolowanych z ludzkiej krwi pępowinowej oraz mysiego szpiku. Dodatkowo, analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała, iż ludzkie KKM charakteryzowała wyższa ekspresja receptorów P2X1, P2X4 i P2X7 w porównaniu do MKC. Po określeniu roli receptora P2X4 w procesie mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych oraz procesach prowadzących do odnowy hematologicznej po przeszczepie, postanowiono określić czy receptor P2X1 również odgrywa istotną rolę w wymienionych procesach.

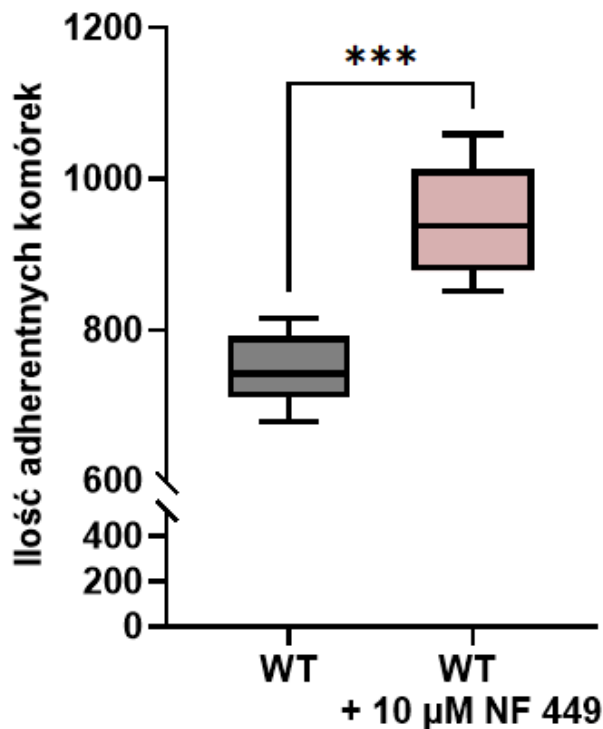
7.3.1. Określenie roli receptora P2X1 w procesie migracji i adhezji KKM

W pierwszej kolejności, poddano weryfikacji wpływ ekspresji receptora P2X1 na procesy migracji i osadzania/przylegania komórek. W teście chemotaksji, komórki aktywnie migrujące przez komorę Boydena, wysiano wraz z czynnikami wzrostowymi, celem określenia ich potencjału klonogenego. Jak wykazano na **Rycinie 21**, ilość otrzymywanych kolonii dla szeregu CFU-GM, przy jednoczesnym zastosowaniu czynnika chemotaktycznego oraz inhibitora receptora P2X1, została znacząco obniżona w stosunku do warunków w których stosowano jedynie czynnik chemotaktyczny. Otrzymane ilości kolonii wyniosły kolejno, dla czynnika SDF-1: 22,25 ($\pm 3,01$) i 16,13 ($\pm 1,96$) dla SDF-1 + NF 449; dla czynnika S1P: 12,86 ($\pm 2,36$) S1P wraz z NF 449: 9,5 ($\pm 1,93$); oraz ATP: 9,125 ($\pm 2,53$) i 5 ($\pm 1,51$) w grupie ATP + NF 449. Obniżenie ilości otrzymywanych kolonii szeregu CFU-GM po zastosowaniu inhibitora NF 449 było istotne statystycznie we wszystkich grupach badanych czynników chemotaktycznych (odpowiednio $p=0,0002$, $p=0,007$, $p=0,00102$).



Rycina 21. Wpływ receptora P2X1 na migrację mysich komórek szpiku względem czynników chemotaktycznych. Izolowano komórki jednojądrzaste z mysiego szpiku kostnego. Komórki umieszczano w komorach Boydena w gradiencie czynników chemotaktycznych (WT) lub w gradiencie czynników chemotaktycznych wraz z inhibitorem receptora P2X1, NF 449 (WT + 10 μM NF 449). Komórki, które aktywnie migrowały przez pory komory o wielkości 5 μm wysiano w teście klonogennym gdzie po 7 dniach policzono ilość kolonii szeregu CFU-GM. Wyniki przedstawiają średnie dla wartości uzyskanych w dwóch niezależnych eksperymentach (każdorazowo n=4). **p≤ 0,01; *** p≤ 0,001.

W kolejnym doświadczeniu określono rolę receptora P2X1 w procesie adhezji mysich komórek szpikowych. Właściwości adhezyjne komórek wpływają na ich zatrzymywanie w szpiku, jak i również na proces prawidłowego zasiedlenia i wszczepienia komórek do szpiku po przeszczepie komórkowym. Jak przedstawiono na **Rycinie 22**, pre-inkubacja komórek jednojądrzastych izolowanych ze szpiku, z inhibitorem receptora P2X1, NF 449 wpłynęła na istotne statystycznie, zwiększenie ilość komórek wykazujących właściwości adhezyjne do fibronektyny w porównaniu do nietraktowanych komórek mysiego szpiku. Średnia ilość przylegających komórek wyniosła 747 (±48,19) w próbie kontrolnej (nie traktowanej) oraz 944,67 (±78,82) w próbie z komórkami inkubowanymi z inhibitorem receptora P2X1, NF 449 (p=0,0004).

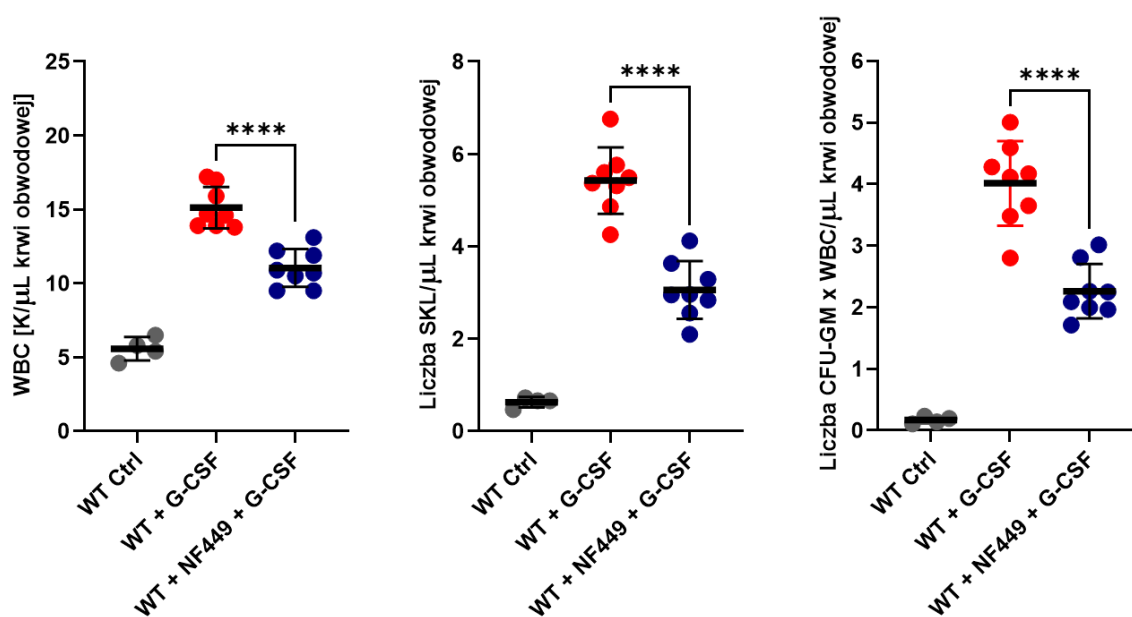


Rycina 22. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na adhezję mysich komórek szpiku. Wyizolowane z mysiego szpiku kostnego MKC, inkubowano w medium pozbawionym surowicy lub medium z inhibitorem receptora P2X1, NF 449. Następnie komórki naniesiono na płytkę pokrytą fibronektyną. Po 5 min inkubacji, odpłukano nieprzyłączone komórki. Następnie, za pomocą mikroskopu świetlnego zliczono totalną ilość przyłączonych komórek. Wyniki przedstawiają średnie dla wartości uzyskanych w dwóch niezależnych eksperymentach (každorazowo n=3). *** $p \leq 0,001$.

7.3.2. Określenie roli receptora P2X1 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM

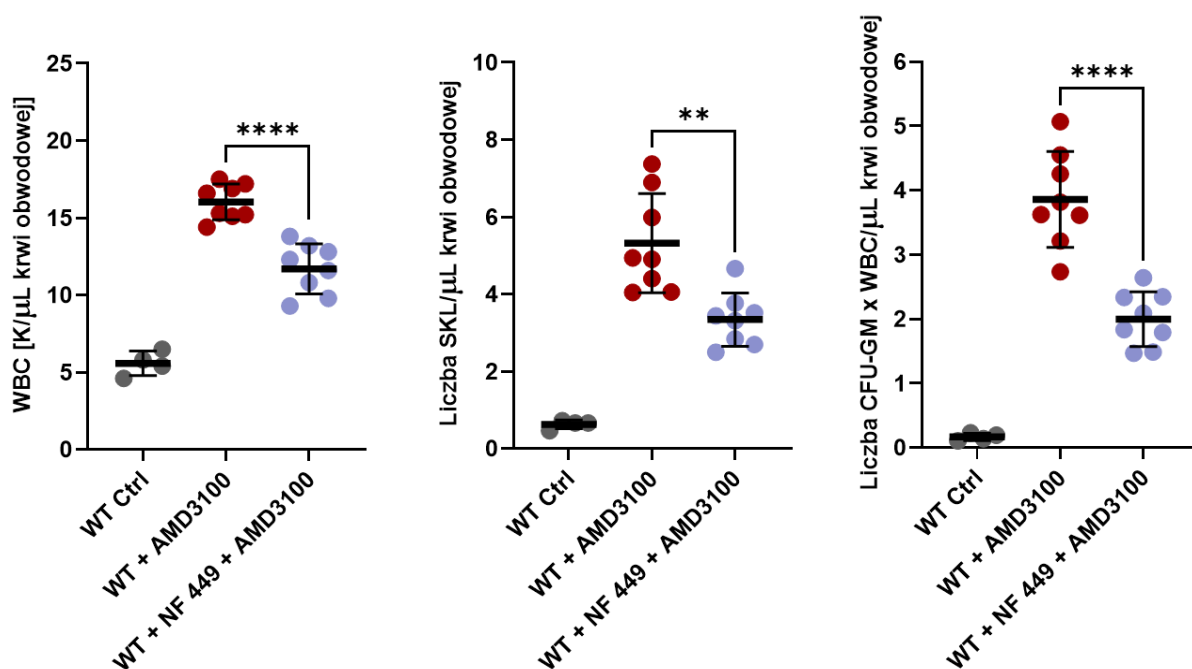
Określano rolę receptora P2X1 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM indukowanej z wykorzystaniem czynnika G-CSF (**Rycina 23**) oraz AMD3100 (**Rycina 24**). W doświadczeniach tych, izolowano PB i oceniono wartość WBC, ilość KKM o fenotypie komórek SKL ($Sca1^{+}c\text{-Kit}^{+}Lin^{-}$) oraz liczbę jednostek tworzących kolonie szeregu CFU-GM w teście klonogenności. Układ doświadczalnymi przewidywał ocenę zjawiska mobilizacji w grupie kontroli negatywnej, nie poddawanej działaniu czynnika mobilizującego, w której myszy nastrzykiwane były roztworem PBS, grupy kontroli pozytywnej, w której myszy WT otrzymywały czynnik indukujący mobilizację oraz z grupy docelowej, którą stanowiły myszy WT, którym uprzednio oraz w trakcie mobilizacji podawano inhibitor receptora P2X1, NF 449.

Jak przedstawiono na **Rycinie 23**, zastosowanie inhibitora receptora P2X1 znacząco obniżyło poziom mobilizacji indukowanej czynnikiem G-CSF. Wartość wyjściowa WBC, dla myszy WT, wynosiła średnio 5,58 tys/ μ l PB (\pm 0,79), trzykrotne podanie czynnika G-CSF skutkowało zwiększeniem ilości WBC we krwi do wartości 15,13 tys/ μ l PB (\pm 1,40), natomiast w przypadku dodatkowego zastosowania inhibitora NF 449 średnia wartość WBC wyniosła 11,04 tys/ μ l PB (\pm 1,28). Po przeliczeniu ilości oznaczonych cytometrycznie komórek SKL na μ l PB otrzymano następujące wartości: kontrola negatywna 0,68 (\pm 0,11), grupa WT + G-CSF 5,43 (\pm 0,72) oraz 3,06 (\pm 0,63) dla grupy z dodatkowo podawanym inhibitorem NF 449. Ilość uzyskanych kolonii szeregu CFU-GM została przeliczona z uwzględnieniem ilości WBC, otrzymując następujące wartości: średnio 0,17 (\pm 0,06) dla kontroli negatywnej, 4,01 (\pm 0,69) dla myszy mobilizowanych G-CSF oraz 2,26 (\pm 0,44) dla myszy mobilizowanych G-CSF z jednoczesnym hamowaniem ekspresji receptora P2X1 przy udziale inhibitora NF 449 (obniżenie wartości dla tej grupy o 45%).



Rycina 23. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na indukowaną poprzez G-CSF mobilizację KKM. Efektywność mobilizacji została określona poprzez ocenę parametrów WBC oraz ilości KKM o fenotypie SKL ($Sca1^{+}c\text{-Kit}^{+}Lin^{-}$) i progenitorów kolonii szeregu CFU-GM izolowanych z krwi obwodowej. Mysiom typu WT, w okresie 3 dni nastrzyknięto trzykrotnie PBS – grupa kontrolna (WT Ctrl), czynnik mobilizujący G-CSF (grupa WT + G-CSF) oraz czynnik mobilizujący G-CSF z jednoczesnym podawaniem inhibitora receptora P2X1, NF 449 (grupa WT + G-CSF + NF 449). Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie, liczba zwierząt w grupie każdorazowo wynosiła 4. **** $p \leq 0,0001$.

W doświadczeniu oceniającym wpływ receptora P2X1 na farmakologiczną mobilizację indukowaną poprzez AMD3100, posłużono się identycznymi grupami, jak w powyższym modelu eksperymentalnym. Po podaniu jednej dawki czynnika mobilizującego określono wartości WBC, SKL i CFU-GM (**Rycina 24**). Otrzymane wyniki wykazały, iż zastosowanie inhibitora receptora P2X1, NF 449 wraz z czynnikiem mobilizującym AMD3100 znacząco obniżyło efektywność mobilizacji. Wykazano istotnie statystycznie obniżone wartości WBC, SKL i CFU-GM dla grupy w której dodatkowo podano inhibitor w porównaniu do grupy nastrzykniętej jedynie czynnikiem mobilizującym. Uzyskano następujące wartości: WBC grupa WT + AMD3100 średnio 16,03 tys/ μ l PB, ($\pm 1,16$), grupa AMD3100 + inhibitor NF 449 11,7 tys/ μ l PB, ($\pm 1,62$), wartość SKL w grupie WT + AMD3100 średnio 5,32 ($\pm 1,28$), w grupie AMD3100 + inhibitor NF 449 3,34 ($\pm 0,69$); przeliczona średnia liczba kolonii szeregu CFU-GM: 3,86 ($\pm 0,75$) w grupie AMD3100 oraz 2,00 ($\pm 0,42$) w grupie AMD3100 + inhibitor NF 449.

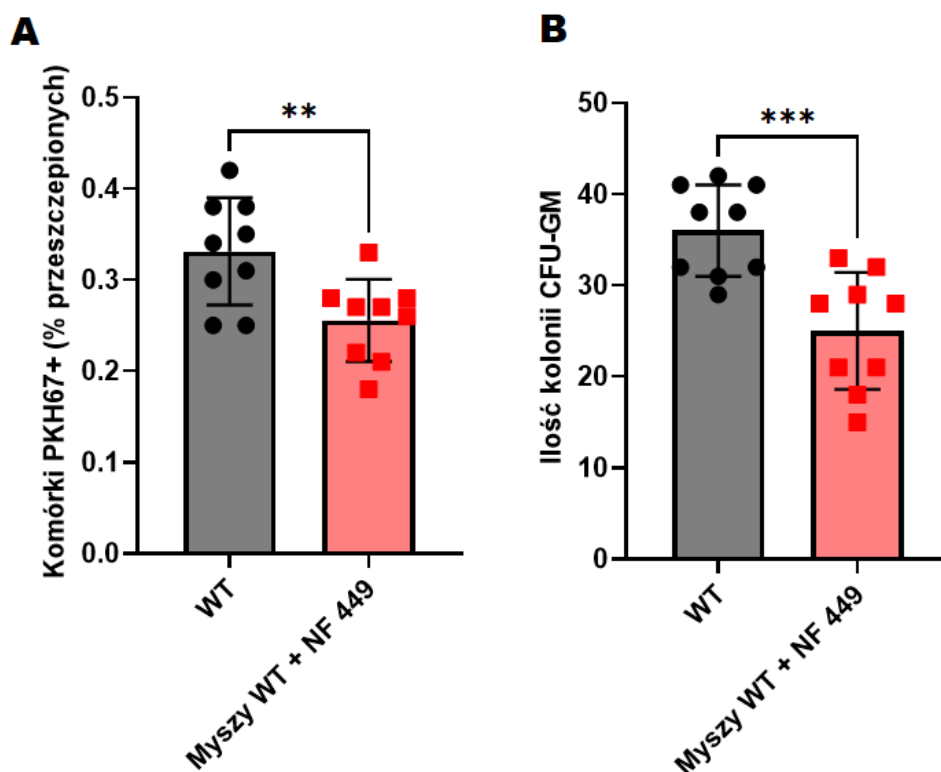


Rycina 24. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na mobilizację KKM indukowaną czynnikiem AMD3100. Efektywność mobilizacji została określona poprzez ocenę parametrów WBC oraz ilości KKM o fenotypie SKL (Sca1⁺c-Kit⁺Lin⁻) i progenitorów kolonii szeregu CFU-GM izolowanych z krwi obwodowej. Myszy typu WT jednorazowo nastrzyknięto PBS – grupa kontrolna (WT Ctrl), czynnikiem mobilizującym AMD3100 (grupa WT + AMD3100) oraz czynnikiem mobilizującym AMD3100 z jednoczesnym podawaniem inhibitora receptora P2X1, NF 449 (grupa WT + AMD3100 + NF 449). Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie, liczba zwierząt w grupie każdorazowo wynosiła 4. ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

7.3.3. Określenie roli receptora P2X1 w procesie wszczepiania i zasiedlania niszy szpikowej oraz odnowie hematologicznej po przeszczepieniu KKM

Przeprowadzona analiza wszczepiania, tzw. *homingu*, polegała na określeniu ilości komórek, które w krótkim czasie, tj. 24 godzin po przeszczepie ulegną zasiedleniu w jamie szpikowej. Izolowane z kości udowych, wyznakowane barwnikiem PKH67 komórki, zliczano metodą cytometrii przepływowej oraz określano liczbę kolonii dla szeregu CFU-GM w testach kolonogennych. Przyjęto dwa układy doświadczalne. W pierwszym, myszom typu WT podawano inhibitor receptora P2X1 i przeszczepiono normalnymi komórkami izolowanymi ze szpiku myszy WT (**Rycina 25**), natomiast w drugim, myszy typu WT przeszczepiono komórkami pre-inkubowanymi z inhibitorem NF 449 (**Rycina 26**).

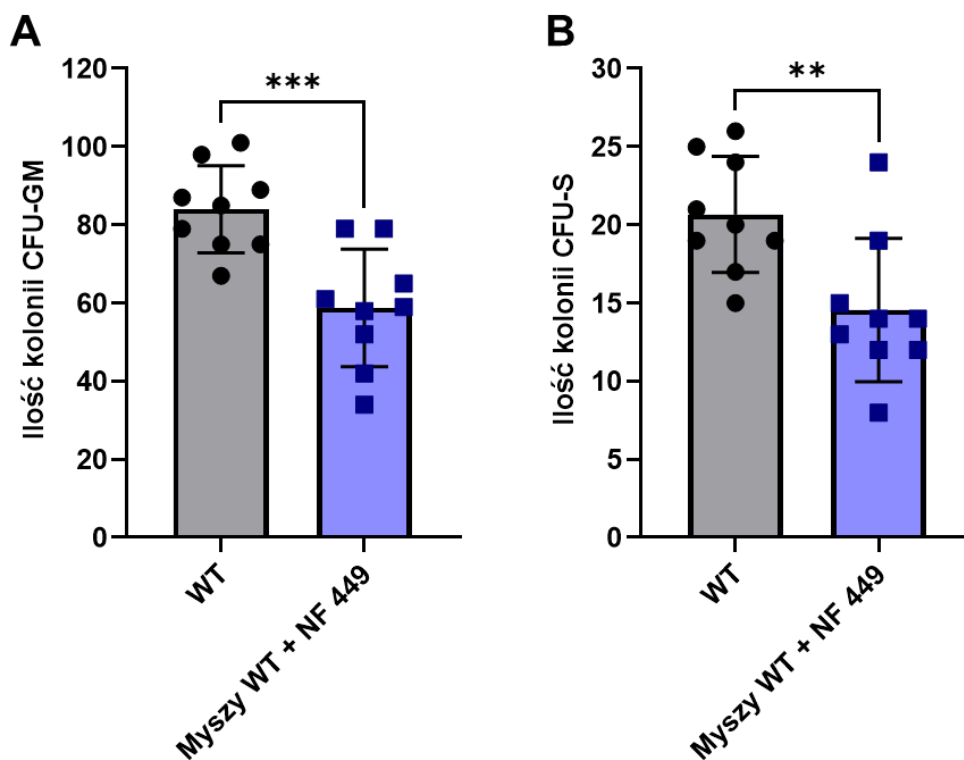
Jak przedstawiono na **Rycinie 25A**, podczas analizy cytometrycznej, w szpiku kostnym kości udowej myszy kontrolnych, zliczono ilość komórek PKH67⁺ stanowiącą średnio 0,33% ($\pm 0,06$) wszystkich przeszczepionych komórek, natomiast w szpiku kostnym myszy traktowanych inhibitorem receptora P2X1 uzyskana liczba komórek stanowiła 0,26% ($\pm 0,05$) ogółu ilości przeszczepionych jednojądrzastych komórek. W przypadku testu klonogenności (**Rycina 25B**), z komórek izolowanych z myszy kontrolnych otrzymano 36 kolonie dla szeregu CFU-GM (± 5), natomiast dla myszy z zahamowaną ekspresją receptora P2X1, liczba ta wyniosła 25 ($\pm 6,40$). Uzyskane różnice były istotne statystycznie i świadczyły o obniżonej zdolności do zasiedlania niszy szpiku kostnego myszy z obniżoną ekspresją receptora P2X1 przez prawidłowe komórki ($p=0,0075$, $p=0,009$).



Rycina 25. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 u myszy WT na proces wszczepiania się KKM do szpik kostnego. Myszy typu WT otrzymywały inhibitor receptora P2X1 – grupa WT + NF449. Myszy z obydwu grup zostały letalnie napromieniowane dawką 950 cGy. Po 24 godzinach przeprowadzono przeszczep jednojądrzastymi komórkami izolowanymi ze szpiku kostnego, wyznakowanymi barwnikiem PKH67. Po kolejnych 24 godzinach myszy poddano eutanazji, następnie wyizolowano komórki z kości udowych. W część izolowanego materiału, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, oznaczono komórki PKH67⁺ (**Panel A**). Pozostałą część komórek wysiano wraz z czynnikami wzrostu (GM-CSF oraz IL-3), po 7 dniach zliczono kolonie dla szeregu CFU-GM (**Panel B**). Zaprezentowane wyniki stanowią połączenie dwóch niezależnych eksperymentów dla których liczba zwierząt wynosiła odpowiednio 4 i 5. ** p≤ 0,01; ***p≤ 0,001.

Analizę zasiedlania niszy szpikowej przeprowadzono w takim samym układzie eksperymentalnym. Myszy przeszczepiono jednojądrzastymi komórkami szpiku kostnego po uprzednim napromienieniu letalną dawką promieniowania gamma wynoszącą 950 cGy. Oznaczono potencjał klonogeny w 12 dniu po przeszczepie komórkowym. Izolowane ze szpiku kostnego komórki wysiano i zliczono liczbę kolonii progenitorowych dla szeregu CFU-GM. Określono również ilość kolonii śledzionowych CFU-S. Uzyskane wyniki potwierdziły obniżenie efektywności zasiedlania niszy szpikowej oraz ilości tworzonych kolonii śledzionowych u myszy, którym przed przeszczepem, oraz w trakcie trwania eksperymentu podawano inhibitor receptora P2X1. Jak przedstawiono na **Rycinie 26A**, ilość kolonii

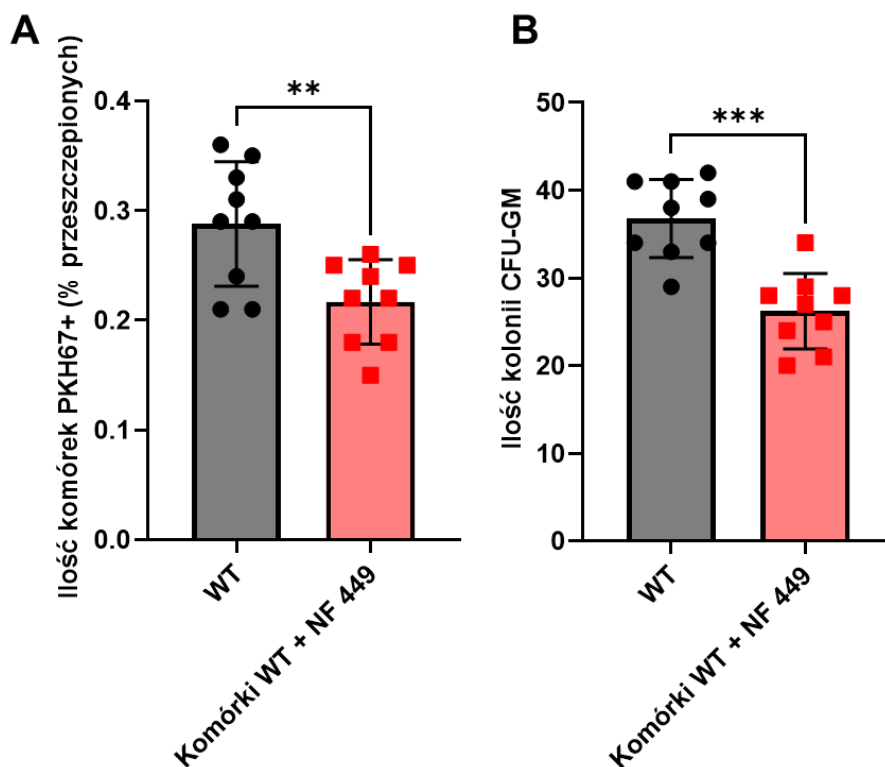
progenitorowych dla szeregu CFU-GM u myszy kontrolnych wyniosła 84 ($\pm 11,16$), natomiast u myszy z zahamowaną ekspresją receptora P2X1 ilość ta wyniosła 58,78 ($\pm 15,01$). Liczba zliczonych kolonii śledzionowych CFU-S dla myszy z grupy WT wyniosła 20,67 ($\pm 3,71$) a u myszy z grupy WT + NF 449 ilości kolonii śledzionowych wyniosła średnio 14,56 ($\pm 4,59$) (**Rycina 26B**). Uzyskane różnice były istotne statystycznie ($p=0,0009$, $p=0,0068$).



Rycina 26. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 u myszy WT na proces zasiedlania niszy szpikowej przez KKM. Myszy typu WT otrzymywały inhibitor receptora P2X1 – grupa WT + NF 449. Myszy z grupy WT + NF449 oraz kontrolnej – WT zostały letalnie napromieniowane dawką 950 cGy. Po 24 godzinach przeprowadzono przeszczep jednojądrzastych komórek izolowanych ze szpiku kostnego. W 12 dniu po przeszczepie, myszy poddano eutanazji, następnie wyizolowano komórki z kości udowych oraz śledziony. Komórki szpikowe wysiano w teście klonogenności gdzie ilość otrzymanych kolonii dla szeregu CFU-GM została policzona po 7 dniach (**Panel A**). Kolonie śledzionowe CFU-S zostały uwidocznione z wykorzystaniem roztworu Feketa, następnie zliczone (**Panel B**). Zaprezentowane wyniki stanowią połączenie dwóch niezależnych eksperymentów dla których liczba zwierząt wynosiła odpowiednio 4 i 5. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

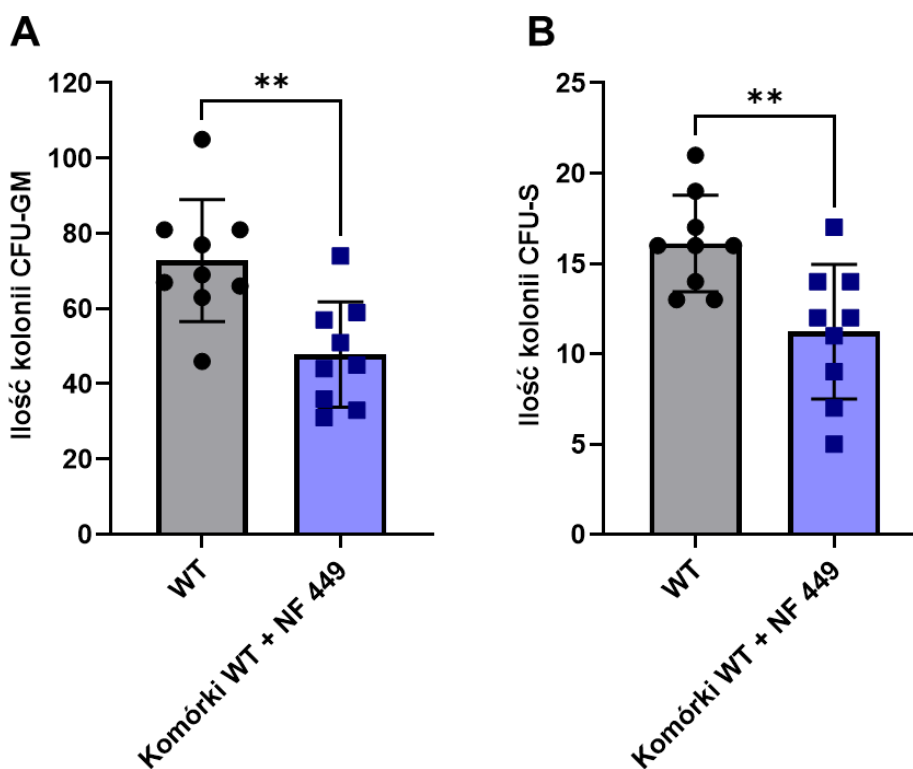
Wyniki eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem drugiego układu doświadczalnego, w którym myszom WT przeszczepiano komórki jednojądrzaste inkubowane z inhibitorem receptora P2X1, również wykazały znaczące obniżenie wydajności wszczepiania

oraz zasiedlania niszy szpikowej przez KKM. W analogicznie przeprowadzonych doświadczeniach „homingu”, ilość cytometrycznie zliczanych komórek PKH67⁺ wyniosła średnio 0,29% ($\pm 0,06$) ogółu przeszczepionych komórek izolowanych ze szpiku kostnego w grupie myszy kontrolnych oraz średnio 0,22% ($\pm 0,04$) w przypadku myszy przeszczepianych komórkami inkubowanymi z inhibitorem receptora P2X1 ($p=0,0067$) (**Rycina 27A**). Liczba utworzonych kolonii progenitorowych dla szeregu CFU-GM wyniosła średnio 36,78 ($\pm 4,47$) w grupie myszy WT oraz średnio 26,22 ($\pm 4,29$) w przypadku myszy przeszczepianych komórkami inkubowanymi z inhibitorem NF 449 ($p=0,001$) (**Rycina 27B**).



Rycina 27. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na KKM na proces wszczepiania się do szpiku myszy WT. Myszy typu WT zostały letalnie napromieniowane dawką 950 cGy. Po 24 godzinach przeprowadzono przeszczep jednojądrzastymi komórkami izolowanymi ze szpiku, wyznakowanymi barwnikiem PKH67. Myszy typu WT otrzymywały normalne komórki szpikowe – grupa WT, lub inkubowane z inhibitorem receptora P2X1 – grupa Komórki WT + NF 449. Po kolejnych 24 godzinach myszy poddano eutanazji i wyizolowano komórki z kości udowych. W część izolowanego materiału, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, oznaczono komórki PKH67⁺ (**Panel A**). Pozostała część została wysiana wraz z czynnikami wzrostu (GM-CSF oraz IL-3), po 7 dniach zliczono kolonie dla szeregu CFU-GM (**Panel B**). Zaprezentowane wyniki stanowią połączenie dwóch niezależnych eksperymentów dla których liczba zwierząt wynosiła odpowiednio 4 i 5. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Przeprowadzona analiza zasiedlania niszy szpikowej w tym samym układzie eksperymentalnym również wykazała obniżenie wydajności tego procesu. Uzyskano następujące wyniki: ilość kolonii progenitorowych dla szeregu CFU-GM utworzonych z komórek izolowanych z kości udowych myszy WT przeszczepionych normalnymi komórkami szpikowymi wyniosła średnio 72,78 ($\pm 16,19$), natomiast dla myszy WT przeszczepionych komórkami inkubowanymi z NF 449 było to średnio 47,78 ($\pm 14,01$) (**Rycina 28A**). Ilość kolonii śledzionowych CFU-S również była obniżona w grupie myszy przeszczepionych komórkami szpikowymi inkubowanymi z inhibitorem receptora P2X1 ((16,11 ($\pm 2,67$)) versus 11,22 ($\pm 3,74$)) (**Rycina 28B**). Różnice wartości CFU-GM jak i CFU-S pomiędzy grupami eksperymentalnymi były istotne statystycznie ($p=0,0029$, $p=0,0056$).

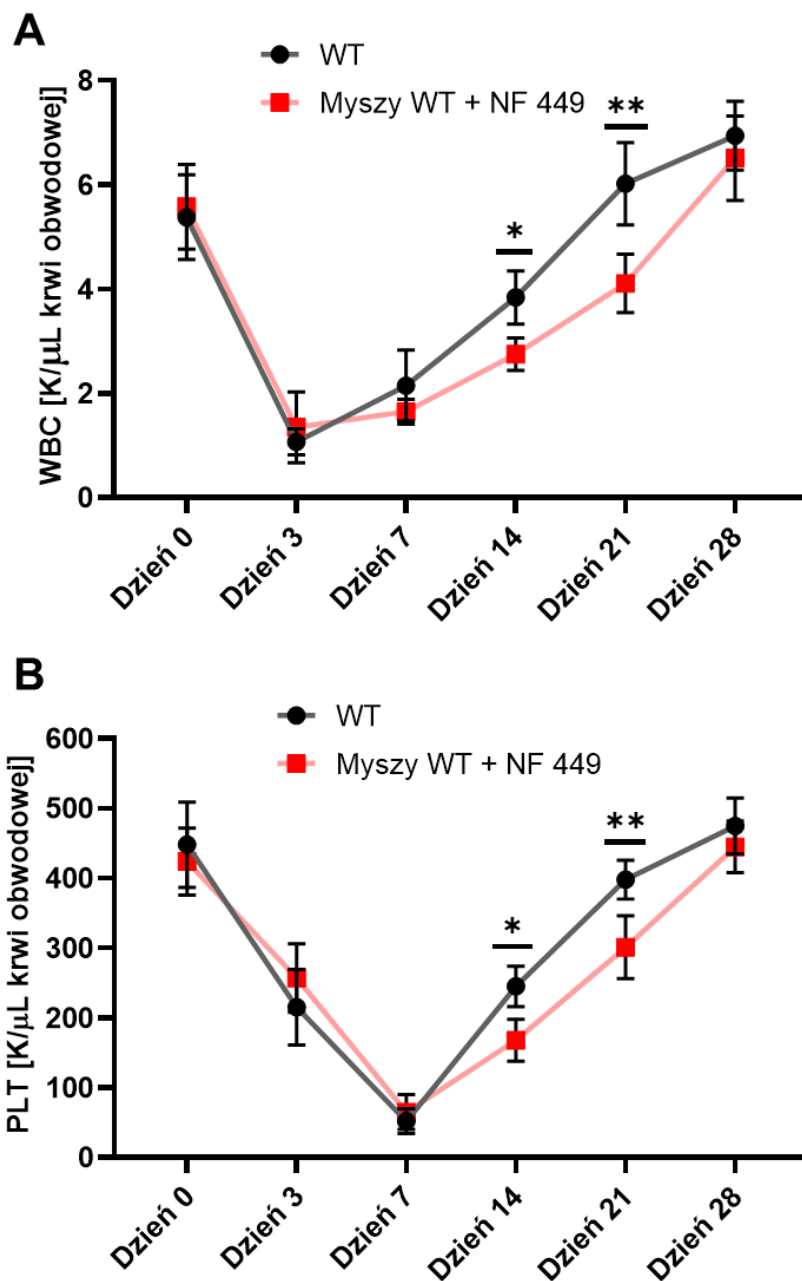


Rycina 28. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na KKM na proces zasiedlania niszy szpikowej u myszy WT. Myszy typu WT napromieniono letalną dawką promieniowania gamma (950 cGy). Po 24 godzinach przeprowadzono przeszczep jednojądrzastych komórek szpikowych – grupa WT, lub komórkami traktowanymi inhibitorem NF 449 – grupa Komórki WT + NF 449. Po 12 dniach, myszy poddano eutanazji i wyizolowano komórki z kości udowych oraz śledziony. Komórki szpikowe wysiano w teście klonogenności, gdzie ilość kolonii dla szeregu CFU-GM została policzona po 7 dniach (**Panel A**). Kolonie śledzionowe CFU-S zostały uwidocznione z wykorzystaniem roztworu Feketa, następnie zliczone (**Panel B**). Zaprezentowane wyniki stanowią połączenie dwóch niezależnych eksperymentów dla których liczba zwierząt wynosiła odpowiednio 4 i 5. ** $p \leq 0,01$.

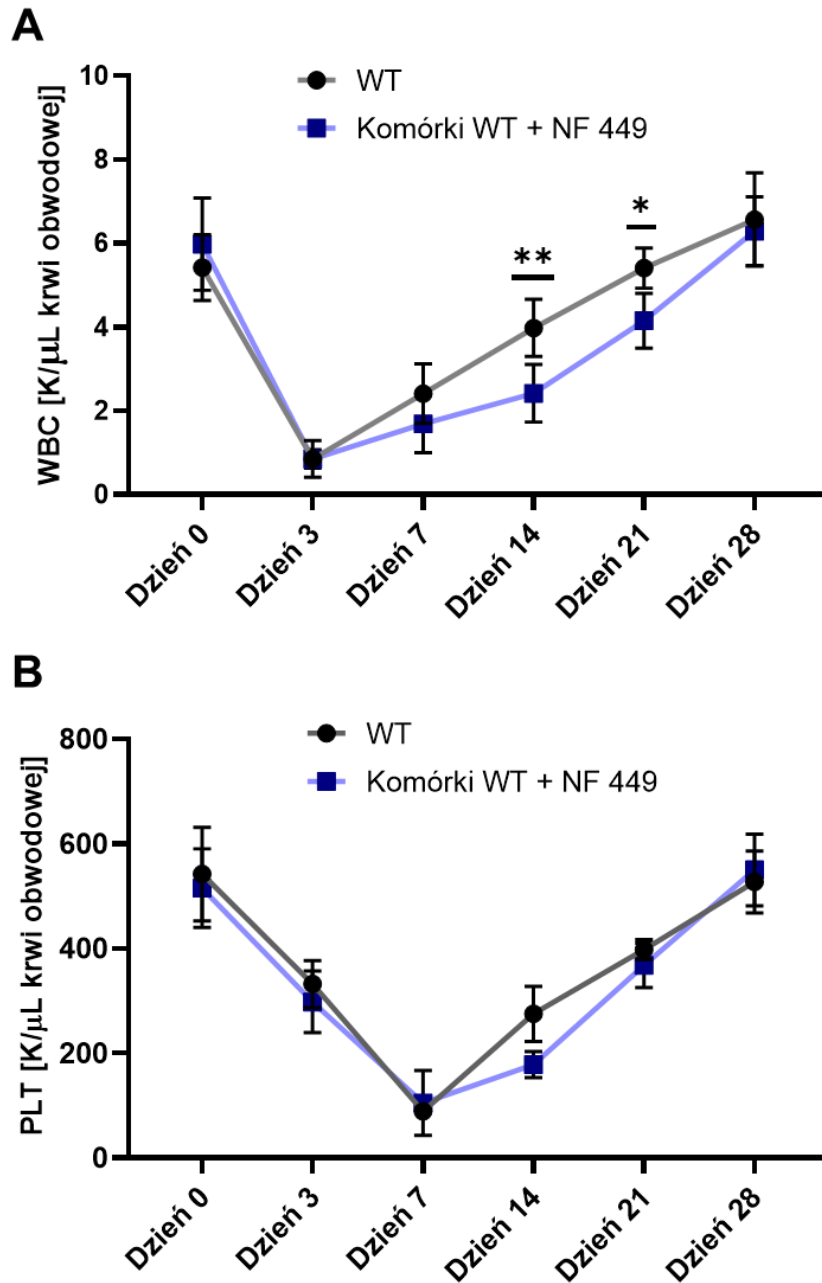
Następnie określono wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na proces odnowy hematologicznej. Zastosowano dwa układy doświadczalne, w których badano rolę receptora P2X1 na przeszczepianych KKM oraz w komórkach mikrośrodowiska szpiku, których prawidłowe funkcjonowanie również warunkuje skuteczność przeszczepu komórek krwiotwórczych. Jak opisano w rozdziale 6.10, dotyczącym wykorzystywanych metod, myszy WT zostały napromieniowane letalną dawką promieniowania gamma (950 cGy), a następnie przeszczepione jednojądrzastymi komórkami szpikowymi. W pierwszym doświadczeniu, badającym wpływ ekspresji receptora P2X1 w mikrośrodowisku niszy szpikowej, na wydajność odnowy hematologicznej, myszy WT przed napromieniowaniem oraz w trakcie trwania doświadczenia, otrzymywały inhibitor NF 449 (**Rycina 29**). W dzień przeszczepu, izolowano PB celem oznaczenia parametrów morfologicznych, WBC i PLT. Pomiarów powtarzano w odstępach czasowych wynoszących 3-7 dni w okresie 28 dni po przeszczepie komórek szpikowych. Jak przedstawiono na **Rycinie 29**, zahamowanie ekspresji receptora P2X1, poprzez podawanie jego swoistego inhibitora, spowolniło proces odnowy hematologicznej. Po osiągnięciu krytycznej wartości WBC w trzecim dniu po przeszczepie (odpowiednio $1,07 (\pm 0,25)$ oraz $1,35 (\pm 0,68)$), dynamika odnowy była szybsza u myszy kontrolnych, wartości WBC były u tych myszy wyższe w poszczególnych punktach czasowych. Dla porównania wartość WBC grupy kontrolnej w dniu 21 wynosiła $6,02 \text{ tys}/\mu\text{l}$ krwi obwodowej ($\pm 0,79$) (wartość przed przeszczepem), natomiast w przypadku myszy nastrzykiwanych inhibitorem receptora P2X1 było to $4,11 \text{ tys}/\mu\text{l}$ krwi obwodowej ($\pm 0,56$) (**Rycina 29A**). W przypadku wartości PLT, myszy kontrolne powróciły do wartości sprzed przeszczepu po 21 dniach, natomiast myszy z zahamowaną ekspresją receptora, po 28 dniach od przeszczepu (**Rycina 29B**).

W ostatnim układzie doświadczalnym, napromienionym letalną dawką promieniowania gamma myszom WT, przeszczepiono jednojądrzaste komórki szpikowe, które uprzednio poddano działaniu inhibitora receptora P2X1, NF 449 (**Rycina 30**). W dzień przeszczepu, izolowano PB celem oznaczenia wartości parametrów krwi (WBC oraz PLT). Pomiarów powtarzano w odstępach czasowych wynoszących 3-7 dni w okresie 28 dni po przeszczepie komórek. Jak przedstawiono na **Rycinie 30**, dynamika powrotu wartości WBC wykazała podobny schemat przebiegu jak w układzie doświadczalnym, gdzie myszy poddane działaniu inhibitora P2X1, zostały przeszczepione normalnymi szpikowymi. Myszy kontrolne potrzebowały 21 dni na pełny powrót do wartości WBC sprzed przeszczepu, natomiast u grupy kontrolnej, pełna odnowa nastąpiła między 21 a 28 dniem (**Rycina 30A**). Powrót wartości PLT

do normy, w przypadku grupy kontrolnej i myszy przeszczepionych komórkami szpikowymi o zahamowanej ekspresji P2X1 nastąpił po 28 dniach (**Rycina 30B**).



Rycina 29. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 u myszy WT na proces odnowy hematologicznej po przeszczepie KKM. Myszy nastrzykiwano inhibitorem receptora P2X1, następnie napromieniowano dawką 950 cGy. Po 24 godzinach przeprowadzono przeszczep jednojądrzastych komórek szpikowych pochodzących od myszy typu WT. Ilość białych krwinek (WBC, **Panel A**) i płytek krwi (PLT, **Panel B**) oznaczono w dniu przeszczepu oraz po 3, 7, 14, 21 i 28 dniach po przeszczepie komórek. W trakcie trwania odnowy myszy nastrzykiwano inhibitorem NF 449. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości z dwóch niezależnych doświadczeń (n=5 myszy/grupa x 2 powtórzenia). * p≤ 0,05; ** p≤ 0,01.

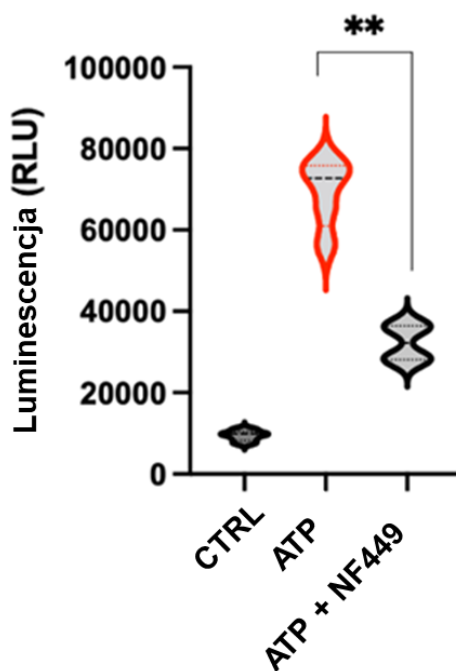


Rycina 30. Wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na KKM na proces odnowy hematologicznej u myszy WT. Myszy zostały napromieniowane dawką 950 cGy, następnie po 24 godzinach przeprowadzono przeszczep jednojądrzastych komórek szpikowych które inkubowano z inhibitorem receptora P2X1, NF 449. Ilość białych krwinek (WBC, **Panel A**) i płytek krwi (PLT, **Panel B**) oznaczono w dniu przeszczepu oraz po 3, 7, 14, 21 i 28 dniach po przeszczepie komórek. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości z dwóch niezależnych doświadczeń (n=5 myszy/grupa x 2 powtórzenia). * p≤ 0,05; ** p≤ 0,01.

7.3.4. Określenie roli receptora P2X1 w procesie aktywacji kompleksu inflamasomu Nlrp3

Ostatnim etapem prowadzonych badań było potwierdzenie, iż receptor P2X1 jest elementem pośredniczącym, przenoszącym sygnał z zewnątrzkomórkowej cząsteczki ATP na kompleks inflamasomu Nlrp3. W celu zweryfikowania hipotezy wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw, pozwalający na zmierzenie aktywności kaspazy 1 która, jak opisano we wstępnie niniejszej rozprawy, jest kluczowym elementem kompleksu inflamasomu Nlrp3.

Uzyskane wyniki, przedstawione na Rycinie 31, wykazały, iż receptor P2X1 zaangażowany jest w ATP zależną aktywację kompleksu inflamasomu Nlrp3. Średnia ilość umownych jednostek świetlnych (RLU, ang. *relative light unit*) mierzonych dla komórek inkubowanych z ATP wyniosła 73200, natomiast zastosowanie inhibitora NF 449 skutkowało zmniejszeniem intensywności sygnału świetlnego do 31000 RLU. Uzyskana różnica była istotna statystycznie ($p=0,0083$).



Rycina 31. Rola receptora P2X1 w aktywacji kompleksu inflamasomu Nlrp3 w KKM. Izolowano komórki SKL (Sca1+c-Kit+Lin-) z mysiego szpiku kostnego. Komórki inkubowano w medium pozbawionym surowicy (CTRL) lub w medium z 10 μ M ATP (ATP) lub z 10 μ M ATP wraz z inhibitorem receptora P2X1, NF 449 w stężeniu 10 μ M (ATP + NF449). Po 90 minutach inkubacji, z wykorzystaniem zestawu Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay (Promega, Madison, USA), zmierzono aktywność kaspazy 1 wykonując pomiar luminescencji wyrażany w umownych jednostkach świetlnych RLU (ang. *relative light unit*). Wyniki przedstawiają średnie dla wartości uzyskanych w dwóch niezależnych eksperymentach (każdorazowo $n=3$). *** $p\leq 0,01$.

8. Dyskusja

8.1. Nowe spojrzenie na cząsteczkę ATP – znaczenie sygnalowania purynergicznego

W organizmach żywych, ATP jest najważniejszym i uniwersalnym nośnikiem energii. Energia zgromadzona w wysoce energetycznych wiązaniach wykorzystywana jest w różnorodnych procesach komórkowych, wymagających nakładu energii [121-124]. Dobrze poznaną rolą ATP w organizmie jest również jego udział w proces transkrypcji [219] oraz sygnalowaniu wewnątrzkomórkowym, gdzie ATP pełni rolę substratu dla enzymów uczestniczących w fosforylacji białek lub wtórnych przekaźników sygnału [220]. W 1972 roku Geoffrey Burnstock przypisał ATP nową funkcję, mianowicie udział w zewnątrzkomórkowym przekaźnictwie sygnału z wykorzystaniem receptorów purynergicznych [117]. Badania Burnstocka zaowocowały szczegółowym zbadaniem udziału ATP i sygnalowania purynergicznego w przekaźnictwie sygnału nerwowego [120]. Natomiast stosunkowo niedawno potwierdzono, iż sygnalowanie purynergiczne zachodzi również w innych, poza nerwowym, układach [104,119]. Szereg badań dowiódł ekspresji receptorów purynergicznych na komórkach większości tkanek i układów oraz wykazano, iż ATP wydzielane parakrynnie lub autokrynnie, aktywuje receptory purynergiczne, zaangażowane w regulowanie prawidłowego działania m.in. układu odpornościowego, układu kostnego, tkanki skórnej, układu pokarmowego, moczowo-płciowego oraz krwionośnego [105-115].

Mimo początkowego sceptycyzmu dotyczącego uznania ATP jako nośnika, nie tylko energii ale i informacji, aktualnie udział sygnalowania purynergicznego w komunikacji międzykomórkowej jest powszechnie uznawany i znajduje się w centrum zainteresowania badaczy. Licznie prowadzone badania dostarczyły ogromne ilości danych dotyczących rodzajów nukleotydów i nukleozydów biorących udział w sygnalowaniu oraz ich konwersji w środowisku zewnątrzkomórkowym przez specyficzne ektonukleotyduazy [132,133]. Wykazano, że cząsteczki i hydrolizujące je enzymy są wszechobecne w organizmie ludzkim oraz, że modulują i regulują funkcje organizmu, zarówno w procesach fizjologicznych panujących w warunkach prawidłowych jak i w stanach patologicznych [133,136,142].

ATP oraz jego pochodne, poprzez receptory purynergiczne mogą wpływać na rozwój i hamowanie wzrostu różnego typu nowotworów. Przeprowadzone liczne badania wykazały, że ATP hamuje podziały komórek nowotworów trzustki, jelita cienkiego oraz grubego, raka płuc oraz komórek białaczkowych [114,135]. Jednocześnie wykazano, iż odpowiedź komórek jest ściśle uzależniona od zastosowanego stężenia nukleotydu, gdzie ATP w małej dawce może

indukować progresję nowotworu [140]. W toku badań wykazano, iż większość ludzkich nowotworów charakteryzuje zwiększona ekspresja receptora P2X7. Dowiedziano również, że zablokowanie działania receptora P2X7, poprzez wykorzystanie specyficznych inhibitorów, w przypadku niektórych typów nowotworów, m.in. czerniaka, glejaka oraz białaczek szpikowych, może powodować spowolnienie podziałów i wzrostu patologicznych komórek [221].

Rola sygnałowania purynergicznego została szczegółowo zbadana dla nowotworów układu krwiotwórczego. W przypadku B-komórkowej przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL, ang. *chronic lymphocytic leukemia*), poziom ekspresji receptora P2X7 powiązany został ze złośliwością nowotworu, gdzie w przypadku niskiej stymulacji receptora, jego aktywacja promuje rozrost komórek, natomiast w przypadku zwiększonej aktywacji wykazuje działanie cytotoksyczne [222]. Obecność funkcjonalnych receptorów purynergicznym, m.in. P2X1, P2X4, P2X5 oraz P2X7, została wykazana na komórkach ostrych białaczek szpikowych (AML, ang. *acute myeloid leukemia*) [223,224]. Charakteryzowały się one zwiększonym poziomem ekspresji w porównaniu do komórek normalnych, jednocześnie silna stymulacja receptorów P2X powodowała znaczące zahamowanie proliferacji i migracji komórek AML w warunkach *in vitro* [225,226]. Badania zespołu Profesora Lemoliego dowiodły, iż w komórkach AML, charakteryzujących się wysoką ekspresją receptora P2X7, pod wpływem silnej stymulacji ATP dochodzi do śmierci komórek spowodowanej dysfunkcją mitochondrium oraz aktywnością kaskady kaspaz. W badaniach potwierdzono zwiększoną aktywność kaspazy 3 – markera apoptotycznej śmierci komórek [226].

8.2. Rola sygnałowania purynergicznego w regulacji komórek krwi i KKM

Jak wspomiano powyżej, dotychczas prowadzone badania wykazały udział sygnałowania purynergicznego w regulowaniu funkcjonowania układu krwionośnego [106,182]. Potwierdzono ekspresję receptorów P2 m.in. na limfocytach i monocytach w krwi obwodowej, gdzie porównanie poziomu ekspresji poszczególnych receptorów wykazało istotnie większy poziom ekspresji P2X1, P2X4 i P2X7 na monocytach, co może sugerować ich rolę w aktywacji i regulowaniu właściwości chemotaktycznych tych komórek [227]. Udział sygnałowania purynergicznego w kontroli funkcjonowania zróżnicowanych leukocytów jest bezsprzeczny [228,229]. Zewnątrzkomórkowe ATP stymuluje procesy odpowiedzi komórkowej poprzez aktywację receptorów purynergicznym P2X, a w szczególności receptora P2X7, którego

aktywacja zapoczątkowuje kaskadę reakcji prozapalnych [141,156]. W procesie aktywacji swoistej odpowiedzi komórkowej, który opisano we wstępie niniejszej rozprawy, dochodzi do tworzenia kompleksu inflamasomu Nlrp3, który aktywowany jest właśnie poprzez połączenie zewnątrzkomórkowego ATP z receptorami, m.in P2X4 i P2X7 [141,156,212]. W dalszych etapach, dochodzi do wydzielania prozapalnych interleukin, aktywacji kaskady układu dopełniacza a także do śmierci komórkowej w wyniku procesu pyroptozy [143]. W toku badań wykazano, iż kompleksy inflamasomów, w tym inflamasom Nlrp3, aktywowane są nie tylko podczas odpowiedzi na infekcje bakteryjne i/lub wirusowe, ale także w warunkach sterylnej zapalenia w organizmie, i wydzielanych w jego procesie molekuł sygnalizacyjnych DAMP, m.in. ATP oraz białek HMGB1 i S100A9 [216].

ATP jest ligandem dla wielu receptorów zaangażowanych w sygnałowanie purynergiczne. Oddziałuje zarówno z receptorami P2X, jak i P2Y [118,119]. Aktywacja obydwu receptorów powoduje gwałtowny napływ jonów Ca^{2+} do cytozolu [166]. Receptory P2X i P2Y znacznie różni natomiast „szybkość działania”, związana z różną budową receptorów. Generowanie i przewodzenie sygnału przez receptory P2X jest bardzo szybkie, podczas gdy zaangażowanie białek G i wtórnych przekaźników w receptorach P2Y spowalnia ten proces [161,162]. Dodatkowo należy uwzględnić, iż ATP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hydrolyzowane jest przez ektonukleotyduazy do Ado, będącej ligandem dla receptorów P1, które jak potwierdzono, wykazują przeciwstawne działanie do ATP [132,134].

Uwzględniając dostępne dane literaturowe, doświadczalne wyjaśnienie i pełne poznanie mechanizmów sygnałowania purynergicznego stanowi wyzwanie współczesnej biologii komórek macierzystych. Niemniej, zaangażowanie ATP w krwiotworzenie oraz procesy wpływające na optymalną mobilizację oraz wszczepianie KKM po przeszczepie jest bezsprzeczne. Podczas gdy kompleksowe określenie roli receptorów P2Y jest utrudnione, ponieważ aktywowane są one przez różne nukleotydy i nukleozydy, receptory P2X posiadają jedyne znanego agonistę, którym jest ATP [161,164]. W związku z powyższym w ramach badań prowadzonych w prezentowanej rozprawie doktorskiej postanowiono określić rolę receptorów P2X w procesach towarzyszących terapiom komórkowym wykorzystujących KKM.

Terapia KKM obejmuje pobranie materiału do przeszczepu, a następnie jego przeszczepienie. W kolejnych etapach dochodzi do wszczepienia i zasiedlenia szpiku kostnego i ostatecznego odtworzenia hematopoezy w organizmie biorcy [41-46]. We wstępie omówiono kilka możliwości dotyczących pobrania KKM do przeszczepu krwiotwórczego. Aktualnie, biorąc pod uwagę czynniki takie jak inwazyjność poszczególnych procedur, czas regeneracji

zarówno dawcy jak i biorecy oraz uwzględniając działania niepożądane, dominującym źródłem KKM do przeszczepu jest farmakologicznie mobilizowana krew obwodowa [37,38]. Skuteczność terapii KKM zależy głównie od ilości przeszczepianych komórek, ale również od procesów wpływających na wydajność wszczepienia się komórek do niszy szpikowej [42,43]. Niestety, mimo ogromnych postępów medycyny, wciąż wśród pacjentów poddawanych terapiom z wykorzystaniem KKM, nadal notowany jest znaczny współczynnik śmiertelności [230]. Stąd niezbędne są dalsze badania celem identyfikacji czynników oraz procesów biorących udział w mobilizacji KKM oraz ich migracji do szpiku i odtwarzania hematopoezy, które w efekcie końcowym będą służyć do opracowania bardziej wydajnych protokołów terapii KKM. Powyżej uzasadniono słuszność skupienia uwagi na roli, jaką w terapii KKM może pełnić sygnałowanie purynergiczne z wykorzystaniem receptorów P2X.

8.3. Profil ekspresji receptorów P2X na KKM

W pierwszym etapie prowadzonych badań postanowiono określić profil ekspresji receptorów P2X w KKM. Dane literaturowe, jak i wyniki własne, potwierdzają ekspresję receptorów P2X na bardziej prymitywnych krwiotwórczych komórkach hematopoezy. Wykazano, iż komórki CD34⁺ izolowane z ludzkiego szpiku kostnego w warunkach fizjologicznych, charakteryzowały się ekspresją receptorów P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-13) oraz kilku receptorów P2X (P2X1, P2X4 i P2X7) [223,227]. Natomiast doświadczenia własne, których wyniki zostały ujęte w niniejszej rozprawie, wykazały ekspresję wszystkich receptorów P2X we wzbogaconej populacji KKM izolowanych z krwi pępowinowej. Jak wiadomo, jedynym agonistą receptorów P2X jest ATP. Poziom wewnątrzkomórkowego ATP, pełniącego rolę alarminy, wzrasta między innymi w warunkach niedotlenienia komórkowego lub sytuacjach stresowych, do jakich niewątpliwie należy poród [231,232]. Zwiększone wydzielanie ATP może tłumaczyć inny profil ekspresji receptorów P2X w KKM izolowanych z krwi pępowinowej w porównaniu do komórek izolowanych ze szpiku kostnego. Natomiast zarówno w KKM pochodzących z krwi pępowinowej, jak i szpiku, receptory P2X1, P2X4 i P2X7 charakteryzowały się najwyższą ekspresją (dodatkowo wykazano wysoką ekspresję receptora P2X2 na KKM krwi pępowinowej). Interesujące jest, iż jedynie ludzkie receptory P2X1, P2X4 i P2X7 wyróżniały się wyższą ekspresją na KKM w porównaniu do komórek jądrzastych, co może sugerować ich zaangażowanie w procesy

regulujące hematologiczną homeostazę organizmu. Jednak do tej pory funkcjonalna rola nukleotydów i receptorów purynergicznym pozostaje wciąż lepiej poznana w procesach regulujących działanie komórek w pełni zróżnicowanych oraz nowotworowych [106,114]. Natomiast dostępność danych dotyczących ich wpływu na funkcjonowanie komórek macierzystych układu krwiotwórczego oraz procesy mobilizacji oraz wszczepianie jest ograniczona.

Pionierskie doświadczenia zespołu Profesora Ratajczaka wykazały, że ATP, po połączeniu z receptorem P2X7, poprzez aktywację inflamasomu Nlrp3, wpływa na poziom mobilizacji KKM. Brak funkcjonalnego receptora znacząco obniżał wydajność badanych procesów, jednak nie hamował w pełni mobilizacji KKM do krwi obwodowej oraz zasiedlania szpiku przez KKM po przeszczepie [210]. Przyczyną takiego stanu rzeczy było najprawdopodobniej kompensacyjne działanie innych receptorów P2X, które również mogą aktywować kompleks inflamasomu Nlrp3, co wykazano w prezentowanych badaniach.

8.4. Uzasadnienie wyboru receptora P2X1 oraz P2X4 do badań określających ich rolę w procesach biologii KKM

Po wstępnej ocenie profilu ekspresji receptorów P2X na ludzkich oraz mysich KKM oraz uwzględniając dane literaturowe dotyczące sposobu działania receptorów, do szczegółowych badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wytypowano dwa receptory. Wybór receptora P2X4 podyktowany był podobieństwem sekwencyjnym do receptora P2X7 oraz jego 1000 razy większą wrażliwością na działanie ATP. Natomiast zainteresowanie receptorem P2X1 wynikało z faktu, iż jest on receptorem P2X najszybciej przewodzącym sygnał wewnątrzkomórkowy [161]. Do tej pory potwierdzono, iż receptor P2X4 ulega ekspresji m.in. na komórkach układu odpornościowego oraz nerwowego. Receptorowi P2X4 przypisuje się ważną rolę w regulowaniu funkcjonowania układu kardiologicznego [233], a przede wszystkim w bólach neuropatycznych, gdzie w wyniku uszkodzenia układu nerwowego następuje zwiększenie ekspresji receptora P2X4, który stymuluje MAPK i w kolejnych etapach wyrzut neurotroficznych czynników pochodzenia mózgowego (BDNFs, ang. *brain-derived neurotrophic factors*), powodujących nadpobudliwość neuronów [234-236]. Wykazano, iż stan zapalny, pojawiający się w przypadku uszkodzenia rdzenia kręgowego, wynika z zależnej od receptora P2X4 aktywacji inflamasomu Nlrp3 [237].

Prowadzone do tej pory badania nad receptorem P2X1 wykazały jego znaczenie w funkcjonowaniu płytek krwi oraz mięśni gładkich. Receptor P2X1 jest jedynym receptorem P2X ulegającym ekspresji na płytkach krwi, gdzie udowodniono, iż jego aktywacja wpływa na proces ich agregacji [186]. Wykazano również ogromne znaczenie receptora P2X1 dla funkcjonowania męskiego układu rozrodczego, gdzie brak ekspresji receptora powoduje niepłodność [238-239].

Badając pojedyncze receptory należy pamiętać jak rozległy i skomplikowany jest pełny obraz sygnałowania purynergicznego. Na komórkach ulega ekspresji wiele rodzajów receptorów wrażliwych na działanie takich samych ligandów. Stąd wyzwaniem eksperymentalnym jest wykorzystywanie specyficznych czynników stymulujących lub hamujących ich działanie. W niniejszej pracy zastosowano specyficzne inhibitory receptorów P2X1 oraz P2X4. Należy również brać pod uwagę, iż zewnątrzkomórkowy ATP, będący ligandem receptorów P2X, rozkładany jest przez ektonukleotydazy do ADP, AMP oraz Ado. Dane literaturowe wskazują, iż Ado będąca ligandem receptorów P1, wykazuje przeciwstawne działanie do ATP, również w regulacji procesu mobilizacji oraz procesów zachodzących po przeszczepieniu komórek [218]. Dlatego też nie można wykluczyć, iż przy skutecznym zablokowaniu receptorów P2X1 oraz P2X4, obniżenie efektywności wymienionych procesów nie jest dodatkowo wzmacniane wzmoczoną aktywnością ścieżki sygnałowania receptorów P1 [136].

8.5. Rola receptorów P2X1 oraz P2X4 w procesie migracji komórek względem czynników chemotaktycznych

Aby określić rolę receptorów P2X1 i P2X4 w procesie mobilizacji oraz wszczepienia KKM po przeszczepie, w pierwszym etapie zbadano czy receptory te wpływają na aktywność migracyjną KKM względem znanych czynników chemotaktycznych. Do tej pory, prowadzone eksperymenty, wykazały udział receptorów P2X1 i P2X4 w migracji innych niż KKM komórkach. Zespół Profesor Oury wykazał, iż receptor P2X1 reguluje ATP zależną migrację neutrofilii [187]. W przypadku receptora P2X4, potwierdzono jego udział w odpowiedzi chemotaktycznej kilku rodzajów komórek, m.in. monocytów oraz komórek mikrogleju [240]. Niewątpliwie interesujące, ze względu na powiązanie z procesami migracyjnymi KKM i znanymi czynnikami wyzwalającymi odpowiedź chemotaktyczną, są wyniki badań w których

wykazano, iż komórki mikrogleju migrują względem gradientu S1P, gdzie S1P indukuje uwalnianie ATP i aktywację m.in. receptora P2X4 [240]. Innym typem komórek, w których procesy migracyjne regulowane są przez receptory P2X4, są limfocyty T, gdzie wykazano m.in., że SDF-1 indukuje wyrzut ATP oraz aktywację receptorów P2X4 i ich autokrynną stymulację [203].

Potwierdzono również zaangażowanie sygnałowania purynergicznego w aspekcie migracji KKM. Badania wykazały, iż odpowiedź chemotaktyczna KKM względem SDF-1 warunkowana jest wydzielaniem ATP i autokrynną stymulacją oraz, że zablokowanie paneksyny 1, specyficznego kanału wydzielania ATP, powodowało obniżenie odpowiedzi chemotaktycznej [215]. Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki, w których wykazano, iż brak funkcjonalnego receptora P2X4 oraz blokowanie ekspresji receptora P2X1 poprzez wykorzystanie specyficznego inhibitora NF 449, znacząco obniżyło odpowiedź chemotaktyczną komórek względem chemoatraktantów, w tym również SDF-1, co sugeruje, iż ATP stymuluje migrację komórek poprzez aktywację badanych receptorów. Ciekawą obserwacją dotyczącą wpływu sygnałowania purynergicznego na proces migracji komórek był wynik pomiaru szybkości przemieszczania się komórek pod wpływem działania bodźca chemotaktycznego. Zaobserwowano zwiększoną szybkość przemieszczania się komórek pod wpływem ATP względem SDF-1 oraz potwierdzono zaangażowanie receptora P2X4 w ten proces poprzez wykorzystanie specyficznego inhibitora PSB 12054. Wpływ sygnałowania purynergicznego na szybkość migracji został również potwierdzony przez innych badaczy dla limfocytów T [203]. Obserwacje potwierdzają udział funkcjonalnego receptora P2X4 na procesy migracji komórek.

8.6. Znaczenie receptorów P2X1 oraz P2X4 w procesie farmakologicznej mobilizacji

Proces mobilizacji KKM do krwi obwodowej oraz przeciwstawny proces ich wszczepiania się do niszy szpikowej, mimo ogromnego znaczenia obydwu procesów, nie został jeszcze w pełni poznany i wyjaśniony. Pionierskie badania nad procesem mobilizacji wykazały, iż wyjście KKM ze szpiku kostnego do krwi obwodowej warunkowane jest powstaniem proteolitycznego środowiska w niszy szpikowej, które prowadzi do osłabienia wiązań utrzymujących KKM w niszy szpikowej (osie CXCR4-SDF-1 oraz VCAM-1-VLA-4) oraz permabilizacji błon endotelialnych na granicy anatomicznej szpiku i krwi obwodowej [57,87].

W toku prowadzonych badań identyfikowano kolejne czynniki wpływające na ten proces. Udowodniono m.in. bardzo ważną rolę komórek odporności nieswoistej w procesie mobilizacji [72,74]. Wyniki badań kilku zespołów wykazały, iż działanie granulocytów oraz makrofagów umożliwia wyjście KKM ze szpiku. Mechanizm działania granulocytów polega na “torowaniu” drogi wyjścia dla innych komórek oraz wydzielaniu enzymów proteolitycznych [74,241,242], natomiast monocyty są źródłem chemokin zaangażowanych w proces mobilizacji [243]. Jak wspomniano, w środowisku szpiku powstaje stan tzw. “sterylnego zapalenia”. Stan ten, w szpiku kostnym, związany jest z aktywnością uwalnianych przez granulocyty alarmin czyli cząstek DAMP [76,215,216]. Najlepiej poznana alarmina, ATP, wydzielana jest do przestrzeni zewnątrzkomórkowych głównie przez kanały paneksynowe [130,211]. Zaangażowanie samej cząsteczki ATP w proces mobilizacji została potwierdzona przez wyniki badań zespołu Profesora Ratajczaka. Udowodniono m.in., że wydzielane ATP aktywuje inflamasom Nlrp3 w KKM poprzez połączenie z receptorami P2X7 [210] oraz, iż ATP jednocześnie może aktywować alternatywną, lektynową drogę aktywacji kaskady układu dopełniacza, poprzez aktywację białka wiążącego mannozę (MBL, ang. *mannose binding lectin*) przez cząsteczki DAMP [75]. Kolejne badania wykazały również rolę inflamasomu Nlrp3 w procesach mobilizacji i wszczepienia KKM po przeszczepie krwiotwórczym [146].

Wykazanie roli ATP w procesie mobilizacji i jednoczesnej zależności procesu aktywacji kompleksu inflamasomu Nlrp3 i kaskady układu dopełniacza, przedstawionej schematycznie na **Rycinie 7**, było niewątpliwą przesłanką do prowadzenia badań nad sygnalizacją purynergiczną w aspekcie krwiotworzenia oraz procesów warunkujących prawidłową mobilizację, wszczepianie komórek po przeszczepie oraz prawidłowy proces odnowy hematologicznej.

Jak wielokrotnie wspomniano, sukces terapii KKM warunkowany jest w dużej mierze ilością przeszczepianych KKM [42,43]. Pobranie dostatecznej liczby komórek niestety wciąż stanowi wyzwanie dla medycyny transplantacyjnej. Identyfikowanie podłoża dla problemu obniżonej mobilizacji może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych protokołów pozyskiwania komórek. Pacjenci wykazujący obniżenie wydajności procesu mobilizacji, co w konsekwencji oznacza pozyskanie niewystarczającej ilości komórek CD34⁺ do przeszczepu, nazywani są tzw. “*poor mobilizers*” (z ang. „słabi mobilizatorzy”). Badania retrospektywne, analizujące poziom mobilizacji KKM do przeszczepów auto- i allo-genicznych wykazały, że około 5% zdrowych dawców i od 10 do nawet do 40% dawców w przypadku przeszczepów autologicznych okazuje się należeć do grupy „*poor mobilizers*” [244]. Podłoże problemu jest złożone i może być spowodowana kilkoma różnymi przyczynami. Do tej pory zidentyfikowano

kilka głównych czynników obniżających wydajność mobilizacji KKM do krwi obwodowej. Najogólniej, przyczyny można podzielić na wynikające z defektów samych KKM lub defektów niszy szpikowej. Badania genetyczne osób wykazujących niedostateczny stopień mobilizacji komórek CD34⁺, po zastosowaniu standardowego protokołu mobilizacji wykorzystującego G-CSF, przypisały zidentyfikowane polimorfizmy genów kodujących m.in. receptor czynnika stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (GCSFR, ang. *granulocyte colony-stimulating factor receptor*), molekułę adhezyjną VCAM-1 i/lub chemokinę SDF-1 [245]. Wszystkie te czynniki są oczywiście znanymi regulatorami procesu mobilizacji. Celowane analizy mutacji genetycznych dawców komórek do przeszczepów zidentyfikowały również mutacje m.in. w genach ASXL1, DNMT3A, JAK2, SF3B1, TET2 oraz TP53 jako czynniki ryzyka słabej mobilizacji [246]. Mobilizowanie niedostatecznej ilości komórek CD34⁺ może wynikać przede wszystkim z obniżonej ilości KKM w szpiku kostnym lub dysfunkcji w działaniu mechanizmów utrzymujących KKM w niszy szpikowej [245]. Zespół Profesora Geigera wykazał, iż receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*) negatywnie reguluje proces mobilizacji. Badacze potwierdzili, iż farmakologiczne zmniejszenie aktywności EGFR, poprzez zastosowanie specyficznych inhibitorów, wpływało na znaczne zwiększenie ilości mobilizowanych komórek progenitorowych [247]. Zespół Profesora Lapidota zbadał natomiast istotność prawidłowego funkcjonowania kaskady krzepnięcia krwi w prawidłowej retencji KKM w niszy szpikowej oraz ich wyjścia do krwi obwodowej w procesie mobilizacji. Szczególną uwagę badacze poświęcili działaniu receptora aktywowanego przez proteazę 1 (PAR1, ang. *protease activated receptor 1*). W czasie mobilizacji, wytwarzana trombina aktywuje PAR1, który następnie aktywuje odpowiedź prozapalną wpływającą na rekrutację KKM do krwi obwodowej. Wyniki uzyskiwane na modelu zwierzęcym zostały potwierdzone w badaniach na pacjentach poddawanych protokołowi mobilizacji komórek CD34⁺, gdzie wykazano, iż niska ekspresja receptora PAR1 korelowała z obniżeniem wydajności procesu mobilizacji [248]. Rola kaskady krzepnięcia krwi w procesie mobilizacji była również badana przez zespół Profesora Ratajczaka. W badaniach tych potwierdzono, iż kaskada krzepnięcia, fibrynoliza oraz kaskada układu dopełniacza ulegają aktywacji podczas procesu farmakologicznej mobilizacji [75,249,250].

Rola kaskady układu dopełniacza w procesie mobilizacji jest bezsprzeczna [73,96,251-254] i została również pokrótce opisana w niniejszej rozprawie. Natomiast przedstawione wyniki dotyczące udziału receptorów purynergicznych pozwoliły na zidentyfikowanie mechanizmów pośredniczących w tym procesie. Powiązanie sygnałowanie purynergicznego oraz inflamasomu Nlrp3 z aktywacją kaskady dopełniacza, schematycznie przedstawione na **Rycinie 7**, dostarcza

nowych informacji oraz czyni całościowy obraz procesu bardziej pełnym [136,144,146,156,207,218]. Potwierdzenie roli sygnałowania purynergicznego oraz wyniki określające znaczenie poszczególnych jego elementów, jak np. receptorów P2X1 i P2X4, które zostały przedstawione w niniejszej rozprawie może przyczynić się do zrozumienia mechanizmów regulujących proces mobilizacji oraz może pozwolić na zastosowanie lepszych strategii mobilizacji z wykorzystaniem dostępnych, lub nowo syntetyzowanych leków dla badań przedklinicznych oraz klinicznych.

Wybór receptorów P2X1 i P2X4 w aspekcie badań związanych z procesami towarzyszącymi terapii KKM wynikał z ich wysokiej wrażliwości na działanie ATP oraz szybkiego przewodzenia powstającego sygnału. Do tej pory określono rolę innego receptora z grupy P2 w procesie farmakologicznej mobilizacji KKM. Wykazano, iż prawidłowa ekspresja receptora P2X7 ma znaczenia dla optymalnej mobilizacji KKM, gdy czynnikiem mobilizującym był G-CSF, natomiast nie jest kluczowa podczas mobilizacji z wykorzystaniem AMD3100 [210]. Wyniki uzyskane w badaniach nad znaczeniem receptora P2X4, wykazującego bardzo dużą homologię z receptorem P2X7 dowiodły, iż receptor ten reguluje mobilizację KKM indukowaną zarówno G-CSF jak i AMD3100. Określono również czy jednoczesny brak receptorów P2X4 oraz P2X7, które według danych literaturowych mogą tworzyć heterodimery [255], wykaże synergistyczny efekt i zwiększy defekt mobilizacji. W tym celu, myszy P2X7 KO poddano działaniu inhibitora P2X4, PSB 12054, a następnie przeprowadzono mobilizację. Uzyskane wyniki świadczą o niewielkim efekcie synergistycznym obydwu receptorów. Jedynie ilość oznaczonych komórek SKL była statystycznie obniżona, porównując mobilizowane myszy P2X7 KO oraz grupę myszy P2X7 KO poddawanych działaniu PSB 12054, inhibitora P2X4. Uzyskany wynik świadczy, iż optymalna mobilizacja KKM ze szpiku do krwi obwodowej pod wpływem G-CSF wymaga prawidłowego funkcjonowania obydwu receptorów P2X7 i P2X4. Następnie określono czy inne receptory P2X, w tym receptor P2X7 mogą kompensować brak receptora P2X4 podczas mobilizacji z wykorzystaniem AMD3100. Według opublikowanych wcześniej danych, brak receptora P2X7 nie wpływał na istotne statystycznie obniżenie poziomu mobilizacji [210]. Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki wykazały natomiast, iż receptor P2X4 zaangażowany jest w mechanizmy mobilizacji zachodzące pod wpływem działania czynnika AMD3100. Wykazano istotne obniżenie poziomu mobilizacji, udowadniając, że pozostałe, prawidłowo działające receptory, nie wykazują działania w pełni kompensacyjnego, jakie miało miejsce w przytoczonym przykładzie mobilizacji myszy z defektem receptora P2X7. Dostępne dane literaturowe wskazują na dużą zależność receptorów P2X4 i P2X7 [255,256]. Pierwszą z

nich jest wspominana homologia budowy. Charakteryzują się one również podobnym profilem ekspresji, szczególnie na komórkach układu immunologicznego, które aktywnie uczestniczą m.in. w procesie mobilizacji [109,227,257]. Ponadto, udowodniono, iż obydwa receptory lokalizują się w tych samych obszarach błony komórkowej, co sugeruje, iż ich funkcjonowanie zależy od wspólnej interakcji [256]. Również obydwa receptory są znanymi silnymi aktywatorami inflamasomu Nlrp3, którego interakcja z kaskadą układu dopełniacza jest głównym mechanizmem warunkującym prawidłową mobilizację KKM. Natomiast różnica w znaczeniu obydwu receptorów w AMD3100 zależnej mobilizacji może być tłumaczona poprzez szybkość działania i wrażliwość obydwu receptorów na ATP. Jak wiadomo, ATP wydzielane z komórek ulegających aktywacji podczas procesu mobilizacji indukuje receptory purynergiczne, które następnie uczestniczą w aktywacji inflamasomu Nlrp3 i dalszych kaskad. Mobilizacja z wykorzystaniem AMD3100 jest procesem gwałtownym, prowadzącym do wyjścia KKM do krwi w bardzo krótkim czasie. Szybkość tego procesu może być właśnie kluczowym elementem, z którego wynika różnica w znaczeniu poszczególnych receptorów. Jak wiadomo, badany receptor P2X4 jest około 10 tys. razy bardziej wrażliwy na stężenie ATP niż receptor P2X7 [161].

Udowodnienie, iż nie tylko receptor P2X7, któremu do tej pory poświęcono największą uwagę, ale również receptor P2X4 ma ogromne znaczenie w procesie mobilizacji skłoniło do zweryfikowania eksperymentalnie czy pozostałe receptory purynergiczne P2X mogą również odgrywać podobną rolę. Jak już wspomniano, w grupie receptorów P2X, P2X1 jest receptorem najszybciej przewodzącym sygnał wewnątrzkomórkowy [161]. Dodatkowo, dane literaturowe wskazują, iż receptor ten również uczestniczy w aktywacji inflamasomu Nlrp3 [155]. Co więcej, receptor P2X1 reguluje właściwości migracyjne neutrofilii, komórek o dużym znaczeniu w procesach regulujących funkcjonowanie niszy szpikowej i procesie mobilizacji [258,259]. W związku z powyższym, określono wpływ zahamowania ekspresji receptora P2X1 na proces mobilizacji KKM. Otrzymane wyniki wykazały obniżenie wydajności mobilizacji indukowanej zarówno przez G-CSF, jak i AMD3100 przy jednoczesnym zastosowaniu NF 449, specyficznego inhibitora receptora P2X1. Stopień obniżenia mobilizacji był podobny do wyników uzyskanych dla receptora P2X4. Uzyskane wyniki potwierdziły również, iż funkcjonowanie wszystkich receptorów P2X jest warunkiem prawidłowej mobilizacji indukowanej z wykorzystaniem czynnika G-CSF oraz zidentyfikowały receptor P2X1 jako kolejny receptor o kluczowym znaczeniu podczas mobilizacji z wykorzystaniem AMD3100. Udział receptora P2X1 wymaga dalszych analiz w celu dokładniejszego poznania i rozróżnienia efektów warunkowanych ekspresją receptora na KKM oraz na komórkach odpowiedzi

immunologicznej, płytkach krwi oraz komórkach budujących niszę szpikową [186,260]. Dodatkowych badań wymaga również ocena zaangażowania w aktywowanie drogi kaskady krzepnięcia krwi, której udział w indukowaniu wyjścia KKM ze szpiku został wcześniej potwierdzony [250,261,262].

Uwzględniając rolę receptorów purynergicznych P2X w procesie mobilizacji należy zaznaczyć, iż są one jedynie pośrednikiem przekazywania sygnału, a ich aktywność uzależniona jest od obecności ich jedyne go ligandu, czyli ATP. Szereg badań potwierdził rolę ATP w procesie mobilizacji [192,209,210]. Dodatkowo wykazano przeciwstawne działanie metabolitu ATP czyli Ado, będącej ligandem dla receptorów P1, których aktywność negatywnie reguluje działanie, aktywowanego jest przez receptory P2X, inflamasomu Nlrp3.

8.7. Rola receptorów P2X1 oraz P2X4 w procesie wszczepienia i zasiedlania niszy szpikowej przez KKM oraz odnowie hematologicznej po przeszczepie

Jak wielokrotnie podkreślano, skuteczność terapii z wykorzystaniem KKM w głównej mierze zależy od przeszczepienia odpowiedniej liczby komórek CD34⁺. Dodatkowo na skuteczność terapii KKM może również wpływać opóźnione lub niedostateczne wszczepienie KKM do szpiku po przeszczepie [263-265]. Proces prawidłowego wszczepienia i zasiedlenia niszy szpikowej, w celu odtworzenia hematopoezy, w dużej mierze zależy od zdolności przeszczepianych komórek do odpowiedzi na gradient stężenia chemoatraktantów, migracji do szpiku i ich zdolności adhezyjnych [71,97,266]. Jednocześnie należy pamiętać, iż prawidłowe wszczepienie do niszy szpikowej zależy również od prawidłowego funkcjonowania i regulacji mikrośrodowiska jamy szpikowej dawcy [267]. Stąd, w kontekście terapii KKM, proces ten poddano wnikliwej analizie.

Oprócz głównych, dobrze odpisanych chemoatraktantów KKM, takich jak SDF-1 czy S1P, rola ATP w procesie migracji została potwierdzona i szczegółowo zbadana [89]. Udowodniono, iż stężenie ATP w niszy szpikowej znacząco wzrasta podczas terapii mieloablacyjnej [216]. W ostatnim czasie opisano również rolę tzw. stanu sterylnego zapalenia podczas wszczepiania się i zasiedlania niszy szpikowej przez KKM [216]. W pracy zespołu Profesora Ratajczaka udowodniono, iż do optymalnego wszczepienia się komórek niezbędne jest prawidłowe funkcjonowanie kanału paneksyny 1, za pomocą którego wewnątrzkomórkowe ATP transportowane jest na zewnątrz komórki [215]. Kanał paneksynowy jest elementem pośrednim

wpływającym na dostępność ATP i jego dalszą drogę w aktywacji np. inflamasomu Nlrp3 lub innych procesach, jak np. stymulowanie chemotaksji KKM.

Historycznie wiadomo, iż w procesie „*homingu*”, czyli wszczepienia KKM do niszy szpikowej, główną rolę odgrywa SDF-1. SDF-1 jest bardzo silnym chemoatraktantem, który nawiguje przeszczepiane, najczęściej za pomocą wlewu dożylnego, KKM do szpiku kostnego [71,268]. Jednak gromadzone dane, m.in. pochodzące z badań z wykorzystaniem myszy CXCR4 KO (receptora dla SDF-1) nie wykazały całkowitego upośledzenia procesu wszczepiania, co świadczyło o tym, iż inne czynniki lub mechanizmy uczestniczą (bądź kompensują) ten proces. Wykazano m.in. ważną rolę S1P [269]. Jednak kontynuacja badań udowodniła, że pozbawienie myszy receptorów dla SDF-1 i S1P nadal nie skutkowało całkowitym brakiem wszczepienia KKM do niszy szpikowej [269]. Ponieważ dostępne dane wykazywały, iż ATP jest również chemoatraktantem wpływającym na migrację komórek, określono jego rolę w procesie wszczepienia, gdzie uzyskane wyniki potwierdziły, iż ATP jest również czynnikiem warunkującym prawidłowy proces „*homingu*” [215]. Analizując mechanizmy zachodzące w niszy szpikowej podczas terapii mieloablacyjnej wykazano, iż odporne na napromienienie makrofagi oraz komórki zrębu ulegają aktywacji [270-271]. Dodatkowo wykazano aktywację kaskady układu dopełniacza [216]. Ponadto, działanie ATP może polegać na wzmacnianiu sygnału chemotaktycznego SDF-1 lub wykazywać działanie na komórki budujące niszę szpikową [272].

Przeszczepiona komórka aby dotrzeć do mikrośrodowiska niszy szpikowej i ją zasiedlić w celu odtworzenia hematopoezy musi aktywnie przemieszczać się pod wpływem działającego gradientu chemotaktycznego [71,72,97,100,268]. W procesie tym istotną rolę odgrywają tzw. tratwy lipidowe [204,273]. Dane literaturowe wskazują, iż reorganizacja błony komórkowej i wbudowywanie receptorów CXCR4 w wiodącym brzegu (ang. *leading edge*) wędrującej komórki zależna jest od aktywacji inflamasomu Nlrp3, a w konsekwencji wydzielania ATP, gdzie wywołany efekt auto- i parakryny indukuje wbudowywanie receptora CXCR4 i przemieszczanie w gradiencie stężenia SDF-1 [136]. Stąd niewątpliwy udział sygnałowania purynergicznego w niniejszym procesie. Dodatkowo, dane uzyskiwane podczas badania procesów migracyjnych innych typów komórek wykazały, iż działanie SDF-1 oraz S1P może indukować wzrost stężenia ATP oraz aktywację receptorów P2X1 oraz P2X4 i ich autokrynną stymulację [203,240].

Udowodnienie, iż terapia mieloablacyjna indukuje stan sterylnego zapalenia niszy szpikowej [216] oraz bliższe przyjrzenie się poszczególnym elementom wywołującym ten stan, potwierdza słuszność dokładnego zbadania znaczenia sygnałowania purynergicznego w

procesie wszczepienia KKM do niszy szpikowej, a wyniki niniejszej pracy stanowią kontynuację tego toku badań. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, iż zarówno receptor P2X1, jak i P2X4 odgrywają istotną rolę w procesach wszczepienia, zasiedlania oraz odnowy hematologicznej. Użyte modele doświadczalne pozwoliły na zweryfikowanie czy wydajność wyżej wymienionych procesów zależy od prawidłowo funkcjonujących receptorów P2X na przeszczepianych KKM, czy od ich udziału w regulacji mikrośrodowiska niszy szpikowej, lub być może jest istotne są w obydwu wyżej wymienionych przypadkach. Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły tezę o istotności prawidłowego funkcjonowania receptorów zarówno na KKM, jak i w mikrośrodowisku niszy szpikowej.

Wykazano, iż ilość wszczepianych do niszy szpikowej, w krótkim eksperymencie „*homingu*”, jak i w eksperymencie określającym wydajność zasiedlania niszy szpikowej jest obniżona, jeśli zdrowym osobnikom przeszczepia się KKM preinkubowane z inhibitorem receptora P2X1 lub P2X4. Wynik ten świadczy o istotności funkcjonalnych receptorów na KKM. Obniżenie wydajności wymienionych procesów wynika najprawdopodobniej z przytaczanej wcześniej regulacji procesu tworzenia tratw lipidowych i stymulującego działania ATP [136,204,240]. Ciąg następujących po sobie zdarzeń i ich konsekwencje dla potencjału migracyjnego komórek oraz zaangażowania sygnałowania purynergicznego w ten proces zostało szczegółowo opisane w pracy Profesora Ratajczaka [274]. W pracy tej, analizując szereg doświadczeń, przeprowadzonych na myszach wykazujących defekty w aktywacji kompleksu inflamasomu Nlrp3, sygnałowaniu purynergicznym oraz działaniu oksydazy NAPDH (Nox2, ang. *NADPH oxidase 2*) zaproponowano, iż w odpowiedzi na sygnał chemotaktyczny, Nox2 produkuje ROS, które są aktywatorami inflamasomu Nlrp3 [275,276]. Jak wiadomo, aktywacja inflamasomu Nlrp3 powoduje wyrzut ATP z komórki, którego zadaniem jest autokrynną stymulacja działania inflamasomu [146]. Jak udowodniono, stymulacja przez zewnątrzkomórkowy ATP odbywa się poprzez połączenie z receptorami purynergicznymi. Mechanizm ten tłumaczy rolę receptorów P2X1 i P2X4 w procesie wszczepienia i zasiedlania szpiku na poziomie KKM.

W drugim układzie eksperymentalnym, kiedy myszy przed i w trakcie trwania eksperymentu poddawane były działaniu PSB 12054 lub NF 449, specyficznych inhibitorów receptorów P2X4 i P2X1, a następnie zostały przeszczepione normalnymi komórkami, również wykazano obniżenie efektywności wszczepienia i zasiedlania niszy szpikowej. Podobna oś sygnałowania została prawdopodobnie zachwiana również w tym przypadku. Dostępne wyniki badań wskazują, iż podczas mieloablacji szpiku kostnego dochodzi do aktywacji inflamasomu Nlrp3 w niszy szpikowej [216]. Odpowiedzialne za ten proces są komórki odporności oporne

na napromienienie. W przypadku niszy szpikowej, badania nad rolą sygnałowania purynergicznego wykazały, iż blokowanie kanału paneksyny 1 upośledza proces wszczepiania [215] stąd należy wnioskować, iż niezbędna jest autokrylna aktywacja inflamasomu Nlrp3, z wykorzystaniem ATP oraz receptorów purynergicznych, dla optymalnego wszczepienia i zasiedlenia szpiku po przeszczepie krwiotwórczym.

Rekonstytucja szpiku oraz odtworzenie hematopoezy przez przeszczepione komórki jest ostatnim etapem terapii z wykorzystaniem KKM. Uzyskanie remisji choroby warunkowane jest prawidłowym wszczepieniem i zasiedleniem niszy szpikowej. Doświadczalnie określono dynamikę odnowy hematologicznej w takich samych układach eksperymentalnych, jakie omówiono powyżej. W przypadku obydwu układów eksperymentalnych udało się całkowicie odnowić układ krwiotwórczy biorcy, zaobserwowano jednak obniżoną dynamikę i wydłużony czas powrotu wartości WBC i PLT do wartości sprzed przeszczepu. Defekt ten jest najprawdopodobniej konsekwencją obniżonej wydajności wszczepienia i zasiedlenia niszy szpikowej wskazującej na to, iż mniejsza liczba komórek odpowiedzialna była za wznowienie procesu krwiotworzenia.

Uzyskane wyniki wskazują, iż regulacja procesów warunkujących skuteczną terapię z wykorzystaniem KKM jest złożona i wielopoziomowa. Badane do tej pory elementy osi łączących sygnałowanie purynergiczne z aktywacją inflamasomu Nlrp3 oraz kaskadą układu dopełniacza zdają się być niezwykle istotne. W żadnym wypadku nie zaobserwowano natomiast całkowitego zahamowania procesu wszczepiania czy zasiedlania szpiku co świadczy, iż wykluczenie jednego elementu może być częściowo kompensowane poprzez działanie pozostałych mechanizmów. Siłą napędową, czy też centralnym elementem, zdaje się być cząsteczka ATP stąd zasadne jest bliższe poznanie znaczenia oraz funkcjonowania pozostałych receptorów purynergicznych, ulegających aktywacji pod wpływem działania ATP.

9. Podsumowanie

Sygnalowanie purynergiczne jest pierwotnym rodzajem sygnalizacji pozakomórkowej, w której elementami pośredniczącymi w przekazywaniu sygnału są zewnątrzkomórkowe nukleotydy, w tym ATP. Prowadzone do tej pory badania skupiały uwagę na określeniu roli ATP oraz receptora P2X7 w regulacji wielu procesów, zarówno w warunkach prawidłowych, jak i patologicznych. W aspekcie badań nad procesami towarzyszącymi terapii z wykorzystaniem KKM wykazano, iż ATP jest ważnym regulatorem procesu mobilizacji, wszczepiania się komórek oraz odnowy hematologicznej po przeszczepie. Dodatkowo wykazano, iż mediatorem działania ATP jest receptor P2X7. Celem niniejszej pracy było zbadanie potencjalnego znaczenia innych receptorów P2X w wymienionych procesach.

Ocena profilu ekspresji receptorów P2X na KKM pochodzenia ludzkiego i mysiego, pozwoliła na wytypowanie dwóch receptorów do badań, P2X1 i P2X4. Receptory te charakteryzowały się wysoką ekspresją na badanych komórkach oraz cechami, takimi jak wysoka wrażliwość na ATP i szybkie przewodnictwo sygnały, które mogły mieć znaczenie w regulowaniu KKM podczas procesu mobilizacji czy wszczepienia.

Wyniki farmakologicznej mobilizacji z wykorzystaniem czynników G-CSF oraz AMD3100 wykazały, że zablokowanie prawidłowej funkcji receptorów P2X1 oraz P2X4 z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów powodowało znaczące upośledzenie tego procesu co wskazuje, iż brak aktywnego receptora P2X1 lub P2X4 nie jest w pełni kompensowany poprzez inne receptory.

Obserwacje oraz wyniki uzyskiwane podczas eksperymentów określających wydajność wszczepienia oraz zasiedlania niszy szpikowej wykazały również, iż poprawne funkcjonowanie receptora P2X1 oraz P2X4 jest niezbędne dla uzyskania prawidłowego wszczepienia. Dodatkowo wykazano, iż obniżenie wydajności procesu wszczepienia i zasiedlenia niszy szpikowej prowadzi do wydłużenia czasu potrzebnego do pełnej odnowy hematologicznej po przeszczepie. Zastosowane układy doświadczalne wykazały istotność prawidłowego działania receptorów zarówno na KKM, jak i w komórkach niszy szpikowej. Istotne znaczenie ekspresji receptorów P2X1 oraz P2X4 w procesach towarzyszących migracji do szpiku oraz w procesie sterylnego zapalenia powstającego podczas terapii mieloablacyjnej przed przeszczepem (jak również w czasie farmakologicznej mobilizacji z wykorzystaniem G-CSF oraz ATP) wynika z ich zaangażowania w przewodzenie sygnału pomiędzy ATP a infamasomem Nlrp3 i pośrednio, właśnie przez inflamasom Nlrp3, udział w aktywacji kaskady układu dopełniacza.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy znacząco zwiększają poziom wiedzy o roli sygnałowania purynergicznego w procesach warunkujących prawidłową mobilizację KKM do krwi obwodowej oraz wszczepienie i zasiedlanie niszy szpikowej przez komórki po przeszczepie, w celu odtworzenia hematopoezy. Wymienione procesy warunkują przeprowadzenie skutecznej terapii z wykorzystaniem KKM, począwszy od uzyskania odpowiedniej ilości komórek CD34⁺ w procesie mobilizacji, po najkrótszy możliwy czas potrzebny na odtworzenie układu krwiotwórczego już po przeszczepie. Wykazanie znaczenia receptorów P2X1 oraz P2X4 może zostać wykorzystane do optymalizacji protokołów klinicznych dla pacjentów poddawanych mobilizacji, gdzie wytypowanie mutacji w genach kodujących receptory purynergiczne będzie wskazówką do zastosowania niestandardowych procedur mobilizacji.

10. Wnioski

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń, zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej pozwalają na sformułowanie wniosków:

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

11. Piśmiennictwo

1. Hawley RG, Ramezani A, Hawley TS. Hematopoietic stem cells. *Methods Enzymol.* 2006; 419:149-79. doi: 10.1016/S0076-6879(06)19007-2.
2. Raza Y, Salman H, Luberto C. Sphingolipids in Hematopoiesis: Exploring Their Role in Lineage Commitment. *Cells.* 2021; 10(10):2507. doi: 10.3390/cells10102507.
3. Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell.* 2020; 11(1):34-44. doi: 10.1007/s13238-019-0633-0.
4. Muhr J, Hagey DW. The cell cycle and differentiation as integrated processes: Cyclins and CDKs reciprocally regulate Sox and Notch to balance stem cell maintenance. *Bioessays.* 2021; 43(7):e2000285. doi: 10.1002/bies.202000285.
5. Cho IJ, Lui PP, Obajdin J, Riccio F, Stroukov W, Willis TL, Spagnoli F, Watt FM. Mechanisms, Hallmarks, and Implications of Stem Cell Quiescence. *Stem Cell Reports.* 2019; 12(6):1190-1200. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.05.012.
6. Chen C, Fingerhut JM, Yamashita YM. The ins(ide) and outs(ide) of asymmetric stem cell division. *Curr Opin Cell Biol.* 2016; 43:1-6. doi: 10.1016/j.ceb.2016.06.001.
7. Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, Hunt AJ. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(1):a001313. doi: 10.1101/cshperspect.a001313.
8. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* 2008; 132(4):631-644. doi:10.1016/j.cell.2008.01.025.
9. Man Y, Yao X, Yang T, Wang Y. Hematopoietic Stem Cell Niche During Homeostasis, Malignancy, and Bone Marrow Transplantation. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:621214. doi:10.3389/fcell.2021.621214.
10. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004; 118(2):149-161. doi:10.1016/j.cell.2004.07.004.
11. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* 2012; 481(7382):457-462. doi:10.1038/nature10783.
12. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2005; 106(4):1232-1239. doi:10.1182/blood-2004-11-4422.

13. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(6):671-684. doi:10.1016/j.stem.2007.10.008.
14. Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, et al. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med*. 2012; 18(11):1651-1657. doi:10.1038/nm.2969.
15. Demirci S, Leonard A, Tisdale JF. Hematopoietic stem cells from pluripotent stem cells: Clinical potential, challenges, and future perspectives. *Stem Cells Transl Med*. 2020; 9(12):1549-1557. doi:10.1002/sctm.20-0247.
16. Ho AD. Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2005; 33(1):1-8. doi:10.1016/j.exphem.2004.09.004.
17. Walkley CR, McArthur GA, Purton LE. Cell division and hematopoietic stem cells: not always exhausting. *Cell Cycle*. 2005; 4(7):893-896. doi:10.4161/cc.4.7.1831.
18. Punzel M, Liu D, Zhang T, Eckstein V, Miesala K, Ho AD. The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment. *Exp Hematol*. 2003; 31(4):339-347. doi:10.1016/s0301-472x(03)00024-9.
19. Catlin SN, Busque L, Gale RE, Guttorp P, Abkowitz JL. The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood*. 2011; 117(17):4460-4466. doi:10.1182/blood-2010-08-303537.
20. Sieburg HB, Cattarossi G, Muller-Sieburg CE. Lifespan differences in hematopoietic stem cells are due to imperfect repair and unstable mean-reversion. *PLoS Comput Biol*. 2013; 9(4):e1003006. doi:10.1371/journal.pcbi.1003006.
21. Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*. 2018; 553(7689):418-426. doi:10.1038/nature25022.
22. Servida F, Soligo D, Caneva L, et al. Functional and morphological characterization of immunomagnetically selected CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*. 1996; 14(4):430-438. doi:10.1002/stem.140430.
23. Shahin H, Gupta M, Janowska-Wieczorek A, Rozmus W, Tsui YY. Physical characterization of hematopoietic stem cells using multidirectional label-free light scatterings. *Opt Express*. 2016; 24(25):28877-28888. doi:10.1364/OE.24.028877.
24. Ratajczak MZ. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*. 2008; 15(4):293-300. doi:10.1097/MOH.0b013e328302c7ca.

25. Rossi L, Challen GA, Sirin O, Lin KK, Goodell MA. Hematopoietic stem cell characterization and isolation. *Methods Mol Biol.* 2011; 750:47-59. doi:10.1007/978-1-61779-145-1_3.
26. Lin KK, Goodell MA. Detection of hematopoietic stem cells by flow cytometry. *Methods Cell Biol.* 2011; 103:21-30. doi:10.1016/B978-0-12-385493-3.00002-4.
27. Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, et al. Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Front Immunol.* 2016; 7:470. doi:10.3389/fimmu.2016.00470.
28. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2006; 354(17):1813-1826. doi:10.1056/NEJMra052638.
29. Takami A. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2018; 107(5):513-518. doi:10.1007/s12185-018-2412-8.
30. Saadeh SS, Litzow MR. Hematopoietic stem cell transplant in adults with acute lymphoblastic leukemia: the present state. *Expert Rev Hematol.* 2018; 11(3):195-207. doi:10.1080/17474086.2018.1433030.
31. Peccatori J, Ciceri F. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2010; 95(6):857-859. doi:10.3324/haematol.2010.023184.
32. Saber W, Horowitz MM. Transplantation for myelodysplastic syndromes: who, when, and which conditioning regimens. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016; 2016(1):478-484. doi:10.1182/asheducation-2016.1.478.
33. Shimomura Y, Hara M, Konuma T, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome in adolescent and young adult patients. *Bone Marrow Transplant.* 2021; 56(10):2510-2517. doi:10.1038/s41409-021-01324-8.
34. Rzepecki P. Autologous stem cell transplantation in lymphomas: current indications. *Acta Haematol Pol.* 2021; 52(4):225-233. doi:10.5603/AHP.2021.0044.
35. Zahid U, Akbar F, Amaraneni A, et al. A Review of Autologous Stem Cell Transplantation in Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017; 12(3):217-226. doi:10.1007/s11899-017-0382-1.
36. Gratwohl A, Baldomero H, Demirer T, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for solid tumors in Europe. *Ann Oncol.* 2004; 15(4):653-660. doi:10.1093/annonc/mdh142.

37. D'Souza A, Fretham C, Lee SJ, et al. Current Use of and Trends in Hematopoietic Cell Transplantation in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020; 26(8):e177-e182. doi:10.1016/j.bbmt.2020.04.013.
38. Pelus LM, Broxmeyer HE. Peripheral blood stem cell mobilization; a look ahead. *Curr Stem Cell Rep*. 2018; 4(4):273-281. doi:10.1007/s40778-018-0141-9.
39. Rennert W, Cormier K, Sprott S. The Donor – Recipient Weight Ratio is a Reliable Marker for Cell Yield in Hematopoietic Stem Cell Donations. *OBM Transplantation*. 2021; 5(4), doi:10.21926/obm.transplant.2104156.
40. Moody KM, Baker RA, Santizo RO, et al. A randomized trial of the effectiveness of the neutropenic diet versus food safety guidelines on infection rate in pediatric oncology patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2018; 65(1):10.1002/pbc.26711. doi:10.1002/pbc.26711.
41. Giralt S, Costa L, Schriber J, et al. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20(3):295-308. doi:10.1016/j.bbmt.2013.10.013.
42. Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2000; 18(6):1360-1377. doi:10.1200/JCO.2000.18.6.1360.
43. Singhal S, Powles R, Treleaven J, et al. A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should 2 x 10(6) CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold?. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 26(5):489-496. doi:10.1038/sj.bmt.1702542.
44. Mehta RS, Saliba RM, Alsfield LC, et al. Bone Marrow versus Peripheral Blood Grafts for Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation with Post-Transplantation Cyclophosphamide. *Transplant Cell Ther*. 2021; 27(12):1003.e1-1003.e13. doi:10.1016/j.jtct.2021.09.003.
45. Alousi A, Wang T, Hemmer MT, et al. Peripheral Blood versus Bone Marrow from Unrelated Donors: Bone Marrow Allografts Have Improved Long-Term Overall and Graft-versus-Host Disease-Free, Relapse-Free Survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019; 25(2):270-278. doi:10.1016/j.bbmt.2018.09.004.

46. Arai S, Klingemann HG. Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Arch Med Res.* 2003; 34(6):545-553. doi:10.1016/j.arcmed.2003.07.002.
47. Shi PA, Luchsinger LL, Grealley JM, Delaney CS. Umbilical cord blood: an undervalued and underutilized resource in allogeneic hematopoietic stem cell transplant and novel cell therapy applications. *Curr Opin Hematol.* 2022; 29(6):317-326. doi:10.1097/MOH.0000000000000732.
48. Fernández MN, Regidor C, Cabrera R, et al. Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp Hematol.* 2003; 31(6):535-544. doi:10.1016/s0301-472x(03)00067-5.
49. Gupta AO, Wagner JE. Umbilical Cord Blood Transplants: Current Status and Evolving Therapies. *Front Pediatr.* 2020; 8:570282. doi:10.3389/fped.2020.570282.
50. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood.* 2013; 122(4):491-498. doi:10.1182/blood-2013-02-453175.
51. Khorshed RA, Hawkins ED, Duarte D, et al. Automated Identification and Localization of Hematopoietic Stem Cells in 3D Intravital Microscopy Data. *Stem Cell Reports.* 2015; 5(1):139-153. doi:10.1016/j.stemcr.2015.05.017.
52. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* 2014; 505(7483):327-334. doi:10.1038/nature12984.
53. Lévesque JP, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia.* 2010; 24(12):1979-1992. doi:10.1038/leu.2010.214.
54. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003; 425(6960):841-846. doi:10.1038/nature02040.
55. Rasheed A. Niche Regulation of Hematopoiesis: The Environment Is "Micro," but the Influence Is Large. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2022; 42(6):691-699. doi:10.1161/ATVBAHA.121.316235.
56. Kandarakov O, Belyavsky A, Semenova E. Bone Marrow Niches of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(8):4462. doi:10.3390/ijms23084462.

57. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006; 25(6):977-988. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.016.
58. Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Matsumoto Y, Suda T. Role of N-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1266:72-77. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06576.x.
59. Shirvaikar N, Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Homing after Transplantation: The Role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. *Biochem Res Int*. 2012; 2012:685267. doi:10.1155/2012/685267.
60. Budkowska M, Ostrycharz E, Wojtowicz A, et al. A Circadian Rhythm in both Complement Cascade (ComC) Activation and Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Levels in Human Peripheral Blood Supports a Role for the ComC-S1P Axis in Circadian Changes in the Number of Stem Cells Circulating in Peripheral Blood. *Stem Cell Rev Rep*. 2018; 14(5):677-685. doi:10.1007/s12015-018-9836-7.
61. Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 2008; 452(7186):442-447. doi:10.1038/nature06685.
62. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, et al. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell*. 2007; 131(5):994-1008. doi:10.1016/j.cell.2007.09.047.
63. King KY, Goodell MA. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(10):685-692. doi:10.1038/nri3062.
64. Baldridge MT, King KY, Boles NC, Weksberg DC, Goodell MA. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature*. 2010; 465(7299):793-797. doi:10.1038/nature09135.
65. Collins A, Mitchell CA, Passegué E. Inflammatory signaling regulates hematopoietic stem and progenitor cell development and homeostasis. *J Exp Med*. 2021; 218(7):e20201545. doi:10.1084/jem.20201545.
66. Baker JM, Nederveen JP, Parise G. Aerobic exercise in humans mobilizes HSCs in an intensity-dependent manner. *J Appl Physiol (1985)*. 2017; 122(1):182-190. doi:10.1152/jappphysiol.00696.2016.

67. Agha NH, Baker FL, Kunz HE, et al. Vigorous exercise mobilizes CD34+ hematopoietic stem cells to peripheral blood via the β_2 -adrenergic receptor. *Brain Behav Immun.* 2018; 68:66-75. doi:10.1016/j.bbi.2017.10.001.
68. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science.* 2001; 294(5548):1933-1936. doi:10.1126/science.1064081.
69. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood.* 2015; 125(17):2621-2629. doi:10.1182/blood-2014-09-570192.
70. Skulimowska I, Sosniak J, Gonka M, Szade A, Jozkowicz A, Szade K. The biology of hematopoietic stem cells and its clinical implications. *FEBS J.* 2022; 289(24):7740-7759. doi:10.1111/febs.16192.
71. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home?. *Blood.* 2005; 106(6):1901-1910. doi:10.1182/blood-2005-04-1417.
72. Suárez-Álvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C. Mobilization and homing of hematopoietic stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 741:152-170. doi:10.1007/978-1-4614-2098-9_11.
73. Bujko K, Rzeszotek S, Hoehlig K, Yan J, Vater A, Ratajczak MZ. Signaling of the Complement Cleavage Product Anaphylatoxin C5a Through C5aR (CD88) Contributes to Pharmacological Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *Stem Cell Rev Rep.* 2017; 13(6):793-800. doi:10.1007/s12015-017-9769-6.
74. Adamiak M, Poniewierska-Baran A, Borkowska S, et al. Evidence that a lipolytic enzyme--hematopoietic-specific phospholipase C- β_2 --promotes mobilization of hematopoietic stem cells by decreasing their lipid raft-mediated bone marrow retention and increasing the promobilizing effects of granulocytes. *Leukemia.* 2016; 30(4):919-928. doi:10.1038/leu.2015.315.
75. Adamiak M, Abdelbaset-Ismail A, Suszynska M, Abdel-Latif A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Novel evidence that the mannan-binding lectin pathway of complement activation plays a pivotal role in triggering mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells by activation of both the complement and coagulation cascades. *Leukemia.* 2017; 31(1):262-265. doi:10.1038/leu.2016.278.
76. Ratajczak MZ, Adamiak M, Plonka M, Abdel-Latif A, Ratajczak J. Mobilization of hematopoietic stem cells as a result of innate immunity-mediated sterile inflammation in the bone marrow microenvironment-the involvement of extracellular nucleotides and

- purinergic signaling. *Leukemia*. 2018; 32(5):1116-1123. doi:10.1038/s41375-018-0087-z.
77. Miyazaki K, Suzuki K. Poor mobilizer and its countermeasures. *Transfus Apher Sci*. 2018; 57(5):623-627. doi:10.1016/j.transci.2018.09.007.
78. López-Castaño F, Manresa P, Díaz V, et al. Comparison and cost analysis of three protocols for mobilization and apheresis of haematopoietic progenitor cells. *J Clin Apher*. 2019; 34(4):461-467. doi:10.1002/jca.21699.
79. Goker H, Etgul S, Buyukasik Y. Optimizing mobilization strategies in difficult-to-mobilize patients: The role of plerixafor. *Transfus Apher Sci*. 2015; 53(1):23-29. doi:10.1016/j.transci.2015.05.011.
80. Song GY, Jung SH, Ahn SY, et al. Optimal chemo-mobilization for the collection of peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma. *BMC Cancer*. 2019; 19(1):59. doi:10.1186/s12885-019-5285-1.
81. Domingues MJ, Nilsson SK, Cao B. New agents in HSC mobilization. *Int J Hematol*. 2017; 105(2):141-152. doi:10.1007/s12185-016-2156-2.
82. Tighe CC, McKoy JM, Evens AM, Trifilio SM, Tallman MS, Bennett CL. Granulocyte-colony stimulating factor administration to healthy individuals and persons with chronic neutropenia or cancer: an overview of safety considerations from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40(3):185-192. doi:10.1038/sj.bmt.1705722.
83. Shah NC, Bhoopatiraju S, Abraham A, et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Is Safe and Well Tolerated following Allogeneic Transplantation in Patients with Sickle Cell Disease. *Transplant Cell Ther*. 2022; 28(3):174.e1-174.e5. doi:10.1016/j.jtct.2021.12.016.
84. CHARAKTERYSTYKA PRODUKTU LECZNICZEGO, Amgen, Neupogen.
85. Gazitt Y, Freytes CO, Callander N, et al. Successful PBSC mobilization with high-dose G-CSF for patients failing a first round of mobilization. *J Hematother*. 1999; 8(2):173-183. doi:10.1089/106161299320442.
86. Kim HK, De La Luz Sierra M, Williams CK, Gulino AV, Tosato G. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood*. 2006; 108(3):812-820. doi:10.1182/blood-2005-10-4162.
87. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002; 3(7):687-694. doi:10.1038/ni813.

88. Calvi LM, Link DC. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood*. 2015; 126(22):2443-2451. doi:10.1182/blood-2015-07-533588.
89. Ratajczak MZ, Lee H, Wysoczynski M, et al. Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex. *Leukemia*. 2010; 24(5):976-985. doi:10.1038/leu.2010.53.
90. Ng ML, Yarla NS, Menschikowski M, Sukocheva OA. Regulatory role of sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate receptor signaling in progenitor/stem cells. *World J Stem Cells*. 2018; 10(9):119-133. doi:10.4252/wjsc.v10.i9.119.
91. Winkler IG, Pettit AR, Raggatt LJ, et al. Hematopoietic stem cell mobilizing agents G-CSF, cyclophosphamide or AMD3100 have distinct mechanisms of action on bone marrow HSC niches and bone formation. *Leukemia*. 2012; 26(7):1594-1601. doi:10.1038/leu.2012.17.
92. Rosenkilde MM, Gerlach LO, Jakobsen JS, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *J Biol Chem*. 2004; 279(4):3033-3041. doi:10.1074/jbc.M309546200.
93. Devine SM, Flomenberg N, Vesole DH, et al. Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22(6):1095-1102. doi:10.1200/JCO.2004.07.131.
94. Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, et al. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(6):1667-1673. doi:10.1128/AAC.44.6.1667-1673.2000.
95. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15(12):1628-1633. doi:10.1016/j.bbmt.2009.07.004.
96. Adamiak M, Ciechanowicz A, Chumak V, et al. Novel Evidence That Alternative Pathway of Complement Cascade Activation is Required for Optimal Homing and Engraftment of Hematopoietic Stem/progenitor Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2022; 18(4):1355-1365. doi:10.1007/s12015-021-10318-4.

97. Quesenberry PJ, Colvin G, Abedi M. Perspective: fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond. *Exp Hematol*. 2005; 33(1):9-19. doi:10.1016/j.exphem.2004.10.012.
98. Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Andrian UH. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1998; 188(3):465-474. doi:10.1084/jem.188.3.465.
99. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000; 95(11):3289-3296.
100. Buitenhuis M, van der Linden E, Ulfman LH, Hofhuis FM, Bierings MB, Coffier PJ. Protein kinase B (PKB/c-akt) regulates homing of hematopoietic progenitors through modulation of their adhesive and migratory properties. *Blood*. 2010; 116(13):2373-2384. doi:10.1182/blood-2009-10-250258.
101. Peled A, Grabovsky V, Habler L, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest*. 1999; 104(9):1199-1211. doi:10.1172/JCI7615.
102. Berrios VM, Dooner GJ, Nowakowski G, et al. The molecular basis for the cytokine-induced defect in homing and engraftment of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2001; 29(11):1326-1335. doi:10.1016/s0301-472x(01)00734-2.
103. Basu S, Ray NT, Atkinson SJ, Broxmeyer HE. Protein phosphatase 2A plays an important role in stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12-mediated migration and adhesion of CD34+ cells. *J Immunol*. 2007; 179(5):3075-3085. doi:10.4049/jimmunol.179.5.3075.
104. Burnstock G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays*. 2012; 34(3):218-225. doi:10.1002/bies.201100130.
105. Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(3):364-373. doi:10.1161/hq0302.105360.
106. Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017; 120(1):207-228. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309726.

107. Huang Z, Xie N, Illes P, et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021; 6(1):162. doi:10.1038/s41392-021-00553-z.
108. Illes P, Xu GY, Tang Y. Purinergic Signaling in the Central Nervous System in Health and Disease. *Neurosci Bull.* 2020; 36(11):1239-1241. doi:10.1007/s12264-020-00602-7.
109. Di Virgilio F, Vuerich M. Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci.* 2015; 191:117-123. doi:10.1016/j.autneu.2015.04.011.
110. Eberhardt N, Bergero G, Mazzocco Mariotta YL, Aoki MP. Purinergic modulation of the immune response to infections. *Purinergic Signal.* 2022; 18(1):93-113. doi:10.1007/s11302-021-09838-y.
111. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(3):201-212. doi:10.1038/nri2938.
112. Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7(7):575-590. doi:10.1038/nrd2605.
113. Ralevic V, Burnstock G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect.* 2003; 16(3):133-140. doi:10.1358/dnp.2003.16.3.876886.
114. Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal.* 2013; 9(4):491-540. doi:10.1007/s11302-013-9372-5.
115. Savio LEB, Coutinho-Silva R. Purinergic signaling in infection and autoimmune disease. *Biomed J.* 2016; 39(5):304-305. doi:10.1016/j.bj.2016.09.002.
116. Di Virgilio F, Sarti AC, Coutinho-Silva R. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020; 318(5):C832-C835. doi:10.1152/ajpcell.00053.2020.
117. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 1972; 24:509-81.
118. Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol.* 1976; 62(2):491-503. doi:10.1016/0022-5193(76)90133-8.
119. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* 2004; 240:31-304. doi:10.1016/S0074-7696(04)40002-3.
120. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007; 87(2):659-797. doi:10.1152/physrev.00043.2006.

121. Neupane P, Bhujju S, Thapa N, Bhattarai HK. ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomol Concepts*. 2019; 10(1):1-10. doi:10.1515/bmc-2019-0001.
122. Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, et al. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal*. 2012; 8(3):343-357. doi:10.1007/s11302-012-9305-8.
123. Senior AE, Nadanaciva S, Weber J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1553(3):188-211. doi:10.1016/s0005-2728(02)00185-8.
124. Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T. ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(9):669-677. doi:10.1038/35089509.
125. Khakh BS, Burnstock G. The double life of ATP. *Sci Am*. 2009; 301(6):84-92. doi:10.1038/scientificamerican1209-84.
126. Martins I, Wang Y, Michaud M, et al. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ*. 2014; 21(1):79-91. doi:10.1038/cdd.2013.75.
127. Churcher Y, Gomperts BD. ATP-dependent and ATP-independent pathways of exocytosis revealed by interchanging glutamate and chloride as the major anion in permeabilized mast cells. *Cell Regul*. 1990; 1(4):337-346. doi:10.1091/mbc.1.4.337.
128. Estévez-Herrera J, Domínguez N, Pardo MR, et al. ATP: The crucial component of secretory vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(28):E4098-E4106. doi:10.1073/pnas.1600690113.
129. Sabirov RZ, Okada Y. ATP release via anion channels. *Purinergic Signal*. 2005; 1(4):311-328. doi:10.1007/s11302-005-1557-0.
130. D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, et al. Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell Signal*. 2011; 23(2):305-316. doi:10.1016/j.cellsig.2010.07.018.
131. Guidotti G. ATP transport and ABC proteins. *Chem Biol*. 1996; 3(9):703-706. doi:10.1016/s1074-5521(96)90244-6.
132. Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014; 49(6):473-497. doi:10.3109/10409238.2014.953627.
133. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem*. 2000; 275(40):31061-31068. doi:10.1074/jbc.M003255200.

134. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev.* 2018; 98(3):1591-1625. doi:10.1152/physrev.00049.2017.
135. Boison D, Yegutkin GG. Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer Cell.* 2019; 36(6):582-596. doi:10.1016/j.ccell.2019.10.007.
136. Ratajczak MZ, Kucia M. Extracellular Adenosine Triphosphate (eATP) and Its Metabolite, Extracellular Adenosine (eAdo), as Opposing "Yin-Yang" Regulators of Nlrp3 Inflammasome in the Trafficking of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Front Immunol.* 2021; 11:603942. doi:10.3389/fimmu.2020.603942.
137. Burnstock, G. Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. New York: Raven, 1978, 107-118.
138. Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?. *Gen Pharmacol.* 1985; 16(5):433-440. doi:10.1016/0306-3623(85)90001-1.
139. Savio LEB, Leite-Aguiar R, Alves VS, Coutinho-Silva R, Wyse ATS. Purinergic signaling in the modulation of redox biology. *Redox Biol.* 2021; 47:102137. doi:10.1016/j.redox.2021.102137.
140. Di Virgilio F, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene.* 2017; 36(3):293-303. doi:10.1038/onc.2016.206.
141. Gombault A, Baron L, Couillin I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol.* 2013; 3:414. doi:10.3389/fimmu.2012.00414.
142. Rai R. Cross Talk of Purinergic and Immune Signaling: Implication in Inflammatory and Pathogenic Diseases. *Biochemistry [Internet].* 2022; doi:10.5772/intechopen.104978.
143. Laudisi F, Spreafico R, Evrard M, et al. Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1 β release. *J Immunol.* 2013; 191(3):1006-1010. doi:10.4049/jimmunol.1300489.
144. Ratajczak MZ, Adamiak M, Thapa A, Bujko K, Brzezniakiewicz-Janus K, Lenkiewicz AM. NLRP3 inflammasome couples purinergic signaling with activation of the complement cascade for the optimal release of cells from bone marrow. *Leukemia.* 2019; 33(4):815-825. doi:10.1038/s41375-019-0436-6.

145. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019; 19(8):477-489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0.
146. Thapa A, Adamiak M, Bujko K, et al. Danger-associated molecular pattern molecules take unexpectedly a central stage in Nlrp3 inflammasome-caspase-1-mediated trafficking of hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia.* 2021; 35(9):2658-2671. doi:10.1038/s41375-021-01158-9.
147. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol.* 2010; 185(7):4385-4392. doi:10.4049/jimmunol.1000803.
148. Lu B, Wang H, Andersson U, Tracey KJ. Regulation of HMGB1 release by inflammasomes. *Protein Cell.* 2013; 4(3):163-167. doi:10.1007/s13238-012-2118-2.
149. Simard JC, Cesaro A, Chapeton-Montes J, et al. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF- κ B(1.). *PLoS One.* 2013; 8(8):e72138. doi:10.1371/journal.pone.0072138.
150. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010; 20(1):34-50. doi:10.1038/cr.2009.139.
151. Lo MW, Woodruff TM. Complement: Bridging the innate and adaptive immune systems in sterile inflammation. *J Leukoc Biol.* 2020; 108(1):339-351. doi:10.1002/JLB.3MIR0220-270R.
152. Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol.* 2007; 171(3):715-727. doi:10.2353/ajpath.2007.070166.
153. Adinolfi E, Pizzirani C, Idzko M, et al. P2X(7) receptor: Death or life?. *Purinergic Signal.* 2005; 1(3):219-227. doi:10.1007/s11302-005-6322-x.
154. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity.* 2017; 47(1):15-31. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.020.
155. Oury C, Wéra O. P2X1: a unique platelet receptor with a key role in thromboinflammation. *Platelets.* 2021; 32(7):902-908. doi:10.1080/09537104.2021.1902972.

156. Chen K, Zhang J, Zhang W, et al. ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: a novel pathway of diabetic nephropathy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(5):932-943. doi:10.1016/j.biocel.2013.02.009.
157. Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, Auchampach JA. Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 317(1):172-180. doi:10.1124/jpet.105.096016.
158. Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology.* 1999; 29(1):126-132. doi:10.1002/hep.510290104.
159. Du X, Ou X, Song T, et al. Adenosine A2B receptor stimulates angiogenesis by inducing VEGF and eNOS in human microvascular endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 240(11):1472-1479. doi:10.1177/1535370215584939.
160. Feoktistov I, Biaggioni I, Cronstein BN. Adenosine receptors in wound healing, fibrosis and angiogenesis. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; (193):383-397. doi:10.1007/978-3-540-89615-9_13.
161. North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40:563-580. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.563.
162. Xing S, Grol MW, Grutter PH, Dixon SJ, Komarova SV. Modeling Interactions among Individual P2 Receptors to Explain Complex Response Patterns over a Wide Range of ATP Concentrations. *Front Physiol.* 2016; 7:294. doi:10.3389/fphys.2016.00294.
163. Habermacher C, Dunning K, Chataigneau T, Grutter T. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology.* 2016; 104:18-30. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.07.032.
164. Dal Ben D, Buccioni M, Lambertucci C, Marucci G, Thomas A, Volpini R. Purinergic P2X receptors: structural models and analysis of ligand-target interaction. *Eur J Med Chem.* 2015; 89:561-580. doi:10.1016/j.ejmech.2014.10.071.
165. Burnstock G, Verkhratsky, A. Evolution of P2X receptors. *WIREs Membr Transp Signal.* 2012; 1:188-200. doi:10.1002/wmts.13
166. Egan TM, Khakh BS. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci.* 2004; 24(13):3413-3420. doi:10.1523/JNEUROSCI.5429-03.2004.

167. Sun C, Heid ME, Keyel PA, Salter RD. The second transmembrane domain of P2X7 contributes to dilated pore formation. *PLoS One*. 2013; 8(4):e61886. doi:10.1371/journal.pone.0061886.
168. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev*. 2006; 58(3):281-341. doi:10.1124/pr.58.3.3.
169. Jacobson KA, Jayasekara MP, Costanzi S. Molecular Structure of P2Y Receptors: Mutagenesis, Modeling, and Chemical Probes. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*. 2012; 1(6):WMTS68. doi:10.1002/wmts.68.
170. Jacobson KA, Delicado EG, Gachet C, et al. Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol*. 2020; 177(11):2413-2433. doi:10.1111/bph.15005.
171. Torres B, Zambon AC, Insel PA. P2Y11 receptors activate adenylyl cyclase and contribute to nucleotide-promoted cAMP formation in MDCK-D(1) cells. A mechanism for nucleotide-mediated autocrine-paracrine regulation. *J Biol Chem*. 2002; 277(10):7761-7765. doi:10.1074/jbc.M110352200.
172. Kudirka JC, Panupinthu N, Tesseyman MA, Dixon SJ, Bernier SM. P2Y nucleotide receptor signaling through MAPK/ERK is regulated by extracellular matrix: involvement of beta3 integrins. *J Cell Physiol*. 2007; 213(1):54-64. doi:10.1002/jcp.21087.
173. Jankowski M, Szczepańska-Konkel K, Kalinowski L, Angielski S. Involvement of Rho-kinase in P2Y-receptor-mediated contraction of renal glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 302(4):855-859. doi:10.1016/s0006-291x(03)00272-9.
174. Erlinge D. P2Y receptors in health and disease. *Adv Pharmacol*. 2011; 61:417-439. doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00013-8.
175. Verkhratsky A, Krishtal OA, Burnstock G. Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol*. 2009; 39(3):190-208. doi:10.1007/s12035-009-8063-2.
176. Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*. 1997; 36(9):1127-1139. doi:10.1016/s0028-3908(97)00125-1.
177. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-

- adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol.* 1970; 40(4):668-688. doi:10.1111/j.1476-5381.1970.tb10646.x.
178. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 2007; 14(7):1315-1323. doi:10.1038/sj.cdd.4402132.
179. Beukers MW, den Dulk H, van Tilburg EW, Brouwer J, Ijzerman AP. Why are A(2B) receptors low-affinity adenosine receptors? Mutation of Asn273 to Tyr increases affinity of human A(2B) receptor for 2-(1-Hexynyl)adenosine. *Mol Pharmacol.* 2000; 58(6):1349-1356. doi:10.1124/mol.58.6.1349.
180. Murphree LJ, Marshall MA, Rieger JM, MacDonald TL, Linden J. Human A(2A) adenosine receptors: high-affinity agonist binding to receptor-G protein complexes containing Gbeta(4). *Mol Pharmacol.* 2002; 61(2):455-462. doi:10.1124/mol.61.2.455.
181. Fredholm BB. Physiological and pathophysiological roles of adenosine. *Sleep and Biological Rhythms.* 2011; 9:24-28. doi:10.1111/j.1479-8425.2010.00460.x.
182. Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal.* 2008; 4(1):1-20. doi:10.1007/s11302-007-9078-7.
183. Hogarth DK, Sandbo N, Taurin S, Kolenko V, Miano JM, Dulin NO. Dual role of PKA in phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells by extracellular ATP. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 287(2):C449-C456. doi:10.1152/ajpcell.00547.2003.
184. Bennetts FM, Mobbs JI, Ventura S, Thal DM. The P2X1 receptor as a therapeutic target. *Purinergic Signal.* 2022; 18(4):421-433. doi:10.1007/s11302-022-09880-4.
185. Jones S, Evans RJ, Mahaut-Smith MP. Ca²⁺ influx through P2X1 receptors amplifies P2Y1 receptor-evoked Ca²⁺ signaling and ADP-evoked platelet aggregation. *Mol Pharmacol.* 2014; 86(3):243-251. doi:10.1124/mol.114.092528.
186. Mahaut-Smith MP, Jones S, Evans RJ. The P2X1 receptor and platelet function. *Purinergic Signal.* 2011; 7(3):341-356. doi:10.1007/s11302-011-9224-0.
187. Lecut C, Frederix K, Johnson DM, et al. P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation. *J Immunol.* 2009; 183(4):2801-2809. doi:10.4049/jimmunol.0804007.
188. Burnstock G, Boeynaems JM. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal.* 2014; 10(4):529-564. doi:10.1007/s11302-014-9427-2.

189. Kaufmann A, Musset B, Limberg SH, et al. "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280(37):32459-32467. doi:10.1074/jbc.M505301200.
190. Lemoli RM, Ferrari D, Fogli M, et al. Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo. *Blood.* 2004; 104(6):1662-1670.
191. Barbosa CM, Leon CM, Nogueira-Pedro A, et al. Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines. *Cell Death Dis.* 2011; 2(6):e165. doi:10.1038/cddis.2011.49.
192. Adamiak M, Bujko K, Brzezniakiewicz-Janus K, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. The Inhibition of CD39 and CD73 Cell Surface Ectonucleotidases by Small Molecular Inhibitors Enhances the Mobilization of Bone Marrow Residing Stem Cells by Decreasing the Extracellular Level of Adenosine. *Stem Cell Rev Rep.* 2019; 15(6):892-899. doi:10.1007/s12015-019-09918-y.
193. Hirata Y, Furuhashi K, Ishii H, et al. CD150^{high} Bone Marrow Tregs Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Immune Privilege via Adenosine. *Cell Stem Cell.* 2018; 22(3):445-453.e5. doi:10.1016/j.stem.2018.01.017.
194. Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol.* 2005; 6(3):314-322. doi:10.1038/ni1164.
195. Zhang CC, Lodish HF. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol.* 2008; 15(4):307-311. doi:10.1097/MOH.0b013e3283007db5.
196. de Graaf CA, Metcalf D. Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle.* 2011; 10(10):1582-1589. doi:10.4161/cc.10.10.15619.
197. Cheshier SH, Prohaska SS, Weissman IL. The effect of bleeding on hematopoietic stem cell cycling and self-renewal. *Stem Cells Dev.* 2007; 16(5):707-717. doi:10.1089/scd.2007.0017.
198. Olofsson TB. Growth regulation of hematopoietic cells. An overview. *Acta Oncol.* 1991; 30(8):889-902. doi:10.3109/02841869109088241.
199. Racioppi L, Lento W, Huang W, et al. Calcium/calmodulin-dependent kinase kinase 2 regulates hematopoietic stem and progenitor cell regeneration. *Cell Death Dis.* 2017; 8(10):e3076. doi:10.1038/cddis.2017.474.

200. Yang L, Hu M, Lu Y, Han S, Wang J. Inflammasomes and the Maintenance of Hematopoietic Homeostasis: New Perspectives and Opportunities. *Molecules*. 2021; 26(2):309. doi:10.3390/molecules26020309.
201. Luo H, Mu WC, Karki R, et al. Mitochondrial Stress-Initiated Aberrant Activation of the NLRP3 Inflammasome Regulates the Functional Deterioration of Hematopoietic Stem Cell Aging. *Cell Rep*. 2019; 26(4):945-954.e4. doi:10.1016/j.celrep.2018.12.101.
202. Paredes-Gamero EJ, Leon CM, Borojevic R, Oshiro ME, Ferreira AT. Changes in intracellular Ca²⁺ levels induced by cytokines and P2 agonists differentially modulate proliferation or commitment with macrophage differentiation in murine hematopoietic cells. *J Biol Chem*. 2008; 283(46):31909-31919. doi:10.1074/jbc.M801990200.
203. Ledderose C, Liu K, Kondo Y, et al. Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. *J Clin Invest*. 2018; 128(8):3583-3594. doi:10.1172/JCI120972.
204. Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J, et al. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood*. 2005; 105(1):40-48. doi:10.1182/blood-2004-04-1430.
205. Ratajczak MZ, Adamiak M. Membrane lipid rafts, master regulators of hematopoietic stem cell retention in bone marrow and their trafficking. *Leukemia*. 2015; 29(7):1452-1457. doi:10.1038/leu.2015.66.
206. Alomari M, Almohazey D, Almoftly SA, Khan FA, Al Hamad M, Ababneh D. Role of Lipid Rafts in Hematopoietic Stem Cells Homing, Mobilization, Hibernation, and Differentiation. *Cells*. 2019; 8(6):630. doi:10.3390/cells8060630.
207. Ratajczak MZ, Bujko K, Cymer M, et al. The Nlrp3 inflammasome as a "rising star" in studies of normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2020; 34(6):1512-1523. doi:10.1038/s41375-020-0827-8.
208. Jiang LH, Mousawi F, Yang X, Roger S. ATP-induced Ca²⁺-signalling mechanisms in the regulation of mesenchymal stem cell migration. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(20):3697-3710. doi:10.1007/s00018-017-2545-6.
209. Adamiak M, Abdel-Latif A, Ratajczak MZ. Purinergic signaling regulates mobilization of hematopoietic stem cells. *Oncotarget*. 2018; 9(90):36052-36054. doi:10.4749/oncotarget.26290.

210. Adamiak M, Bujko K, Cymer M, et al. Novel evidence that extracellular nucleotides and purinergic signaling induce innate immunity-mediated mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia*. 2018; 32(9):1920-1931. doi:10.1038/s41375-018-0122-0.
211. Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett*. 2004; 572(1-3):65-68. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.009.
212. Franceschini A, Capece M, Chiozzi P, et al. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J*. 2015; 29(6):2450-2461. doi:10.1096/fj.14-268714.
213. Koldej R, Collins J, Ritchie D. P2X7 polymorphisms and stem cell mobilisation. *Leukemia*. 2018; 32(12):2724-2726. doi:10.1038/s41375-018-0232-8.
214. Adamiak M, Chelvarajan L, Lynch KR, Santos WL, Abdel-Latif A, Ratajczak MZ. Mobilization studies in mice deficient in sphingosine kinase 2 support a crucial role of the plasma level of sphingosine-1-phosphate in the egress of hematopoietic stem progenitor cells. *Oncotarget*. 2017; 8(39):65588-65600. doi:10.18632/oncotarget.19514.
215. Cymer M, Brzeźniakiewicz-Janus K, Bujko K, et al. Pannexin-1 channel "fuels" by releasing ATP from bone marrow cells a state of sterile inflammation required for optimal mobilization and homing of hematopoietic stem cells. *Purinergic Signal*. 2020; 16(3):313-325. doi:10.1007/s11302-020-09706-1.
216. Ratajczak MZ, Adamiak M, Deptała A, Domagała-Kulawik J, Ratajczak J, Kucia M. Myeloablative Conditioning for Transplantation Induces State of Sterile Inflammation in the Bone Marrow: Implications for Optimizing Homing and Engraftment of Hematopoietic Stem Cells. *Antioxid Redox Signal*. 2022; 37(16-18):1254-1265. doi:10.1089/ars.2022.0042.
217. Adamiak M, Bujko K, Thapa A, et al. The P2X4 purinergic receptor has emerged as a potent regulator of hematopoietic stem/progenitor cell mobilization and homing—a novel view of P2X4 and P2X7 receptor interaction in orchestrating stem cell trafficking. *Leukemia*. 2022; 36(1):248-256. doi:10.1038/s41375-021-01352-9.
218. Thapa A, Abdelbaset-Ismail A, Chumak V, et al. Extracellular Adenosine (eAdo) - A_{2B} Receptor Axis Inhibits in Nlrp3 Inflammasome-dependent Manner Trafficking of Hematopoietic Stem/progenitor Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2022; 18(8):2893-2911. doi:10.1007/s12015-022-10417-w.

219. Jiang Y, Smale ST, Gralla JD. A common ATP requirement for open complex formation and transcription at promoters containing initiator or TATA elements. *J Biol Chem.* 1993; 268(9):6535-6540.
220. Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J, Steegborn C. Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol.* 2006; 362(4):623-639. doi:10.1016/j.jmb.2006.07.045.
221. Lara R, Adinolfi E, Harwood CA, et al. P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Front Pharmacol.* 2020; 11:793. doi:10.3389/fphar.2020.00793.
222. Adinolfi E, Melchiorri L, Falzoni S, et al. P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 99(2):706-708. doi:10.1182/blood.v99.2.706.
223. Feng W, Wang L, Zheng G. Expression and function of P2 receptors in hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cell Investig.* 2015; 2:14. doi:10.3978/j.issn.2306-9759.2015.07.01.
224. Chong JH, Zheng GG, Zhu XF, et al. Abnormal expression of P2X family receptors in Chinese pediatric acute leukemias. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391(1):498-504. doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.087.
225. Salvestrini V, Zini R, Rossi L, et al. Purinergic signaling inhibits human acute myeloblastic leukemia cell proliferation, migration, and engraftment in immunodeficient mice. *Blood.* 2012; 119(1):217-226. doi:10.1182/blood-2011-07-370775.
226. Salvestrini V, Orecchioni S, Talarico G, et al. Extracellular ATP induces apoptosis through P2X7R activation in acute myeloid leukemia cells but not in normal hematopoietic stem cells. *Oncotarget.* 2017; 8(4):5895-5908. doi:10.18632/oncotarget.13927.
227. Wang L, Jacobsen SE, Bengtsson A, Erlinge D. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC Immunol.* 2004; 5:16. doi:10.1186/1471-2172-5-16.
228. Barberà-Cremades M, Baroja-Mazo A, Pelegrín P. Purinergic signaling during macrophage differentiation results in M2 alternative activated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2016; 99(2):289-299. doi:10.1189/jlb.1A0514-267RR.

229. Kaebisch C, Schipper D, Babczyk P, Tobiasch E. The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Comput Struct Biotechnol J*. 2014; 13:75-84. doi:10.1016/j.csbj.2014.11.003.
230. Gauntner TD, Brunstein CG, Cao Q, et al. Association of CD34 Cell Dose with 5-Year Overall Survival after Peripheral Blood Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Adults with Hematologic Malignancies. *Transplant Cell Ther*. 2022; 28(2):88-95. doi:10.1016/j.jtct.2021.11.004.
231. Zhang H, Shen Z, Hogan B, Barakat AI, Misbah C. ATP Release by Red Blood Cells under Flow: Model and Simulations. *Biophys J*. 2018; 115(11):2218-2229. doi:10.1016/j.bpj.2018.09.033.
232. Burnstock G, Ralevic V. Purinergic Signaling and Blood Vessels. *Pharmacol Rev*. 2014; 66 (1)102-192. doi:10.1124/pr.113.008029.
233. Shen JB, Pappano AJ, Liang BT. Extracellular ATP-stimulated current in wild-type and P2X4 receptor transgenic mouse ventricular myocytes: implications for a cardiac physiologic role of P2X4 receptors. *FASEB J*. 2006; 20(2):277-284. doi:10.1096/fj.05-4749com.
234. Tsuda M, Kuboyama K, Inoue T, Nagata K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Mol Pain*. 2009; 5:28. doi:10.1186/1744-8069-5-28.
235. Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, et al. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci*. 2008;28(44):11263-11268. doi:10.1523/JNEUROSCI.2308-08.2008
236. Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW. P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci*. 2009; 29(11):3518-3528. doi:10.1523/JNEUROSCI.5714-08.2009.
237. de Rivero Vaccari JP, Bastien D, Yurcisin G, et al. P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2012; 32(9):3058-3066. doi:10.1523/JNEUROSCI.4930-11.2012.
238. Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, et al. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature*. 2000; 403(6765):86-89. doi:10.1038/47495.

239. White CW, Choong YT, Short JL, et al. Male contraception via simultaneous knockout of α 1A-adrenoceptors and P2X1-purinoceptors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(51):20825-20830. doi:10.1073/pnas.1318624110.
240. Zahiri D, Burow P, Großmann C, Müller CE, Klapperstück M, Markwardt F. Sphingosine-1-phosphate induces migration of microglial cells via activation of volume-sensitive anion channels, ATP secretion and activation of purinergic receptors. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2021; 1868(2):118915. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118915.
241. Juarez JG, Harun N, Thien M, et al. Sphingosine-1-phosphate facilitates trafficking of hematopoietic stem cells and their mobilization by CXCR4 antagonists in mice. *Blood*. 2012; 119(3):707-716. doi:10.1182/blood-2011-04-348904.
242. Pelus LM, Bian H, King AG, Fukuda S. Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4. *Blood*. 2004; 103(1):110-119. doi:10.1182/blood-2003-04-1115.
243. Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J Exp Med*. 2011; 208(2):251-260. doi:10.1084/jem.20101700.
244. Giebel S. Postępy w przeszczepianiu krwiotwórczych komórek macierzystych. *Hematologia*. 2015; 6(1):85–89. doi:10.5603/Hem.2015.0019.
245. To LB, Levesque JP, Herbert KE. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood*. 2011; 118(17):4530-4540. doi:10.1182/blood-2011-06-318220.
246. Gifford G, Hesson L, Wong JWH, et al. Poor mobilization of autologous CD34+ peripheral blood stem cells in haematology patients undergoing autologous stem cell transplantation is associated with the presence of variants in genes implicated in clonal haematopoiesis of indeterminant potential. *Br J Haematol*. 2021; 193(4):841-844. doi:10.1111/bjh.17316.
247. Ryan MA, Nattamai KJ, Xing E, et al. Pharmacological inhibition of EGFR signaling enhances G-CSF-induced hematopoietic stem cell mobilization. *Nat Med*. 2010; 16(10):1141-1146. doi:10.1038/nm.2217.

248. Nevo N, Zuckerman T, Gur-Cohen S, et al. PAR1 Expression Predicts Clinical G-CSF CD34+ HSPC Mobilization and Repopulation Potential in Transplanted Patients. *Hemasphere*. 2019; 3(4):e288. doi:10.1097/HS9.0000000000000288.
249. Borkowska S, Suszynska M, Mierzejewska K, et al. Novel evidence that crosstalk between the complement, coagulation and fibrinolysis proteolytic cascades is involved in mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs). *Leukemia*. 2014; 28(11):2148-2154. doi:10.1038/leu.2014.115.
250. Borkowska S, Suszynska M, Wysoczynski M, Ratajczak MZ. Mobilization studies in C3-deficient mice unravel the involvement of a novel crosstalk between the coagulation and complement cascades in mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia*. 2013; 27(9):1928-1930. doi:10.1038/leu.2013.84.
251. Lee HM, Wysoczynski M, Liu R, et al. Mobilization studies in complement-deficient mice reveal that optimal AMD3100 mobilization of hematopoietic stem cells depends on complement cascade activation by AMD3100-stimulated granulocytes. *Leukemia*. 2010; 24(3):573-582. doi:10.1038/leu.2009.271.
252. Lee HM, Wu W, Wysoczynski M, et al. Impaired mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells in C5-deficient mice supports the pivotal involvement of innate immunity in this process and reveals novel promobilization effects of granulocytes. *Leukemia*. 2009; 23(11):2052-2062. doi:10.1038/leu.2009.158.
253. Ratajczak J, Reza R, Kucia M, et al. Mobilization studies in mice deficient in either C3 or C3a receptor (C3aR) reveal a novel role for complement in retention of hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow. *Blood*. 2004; 103(6):2071-2078. doi:10.1182/blood-2003-06-2099.
254. Adamiak M, Cymer M, Anusz K, Tracz M, Ratajczak MZ. A Novel Evidence That Mannan Binding Lectin (MBL) Pathway of Complement Cascade Activation is Involved in Homing and Engraftment of Hematopoietic Stem Progenitor Cells (HSPCs). *Stem Cell Rev Rep*. 2020; 16(4):693-701. doi:10.1007/s12015-020-09983-8.
255. Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol*. 2007; 72(6):1447-1456. doi:10.1124/mol.107.035980.
256. Schneider M, Prudic K, Pippel A, et al. Interaction of Purinergic P2X4 and P2X7 Receptor Subunits. *Front Pharmacol*. 2017; 8:860. doi:10.3389/fphar.2017.00860.
257. Boumechache M, Masin M, Edwardson JM, Górecki DC, Murrell-Lagnado R. Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in

- rodent immune cells. *J Biol Chem.* 2009; 284(20):13446-13454. doi:10.1074/jbc.M901255200.
258. Pruijt JF, Verzaal P, van Os R, et al. Neutrophils are indispensable for hematopoietic stem cell mobilization induced by interleukin-8 in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(9):6228-6233. doi:10.1073/pnas.092112999.
259. Cossío I, Lucas D, Hidalgo A. Neutrophils as regulators of the hematopoietic niche. *Blood.* 2019; 133(20):2140-2148. doi:10.1182/blood-2018-10-844571.
260. Mahaut-Smith MP, Taylor KA, Evans RJ. Calcium Signalling through Ligand-Gated Ion Channels such as P2X1 Receptors in the Platelet and other Non-Excitable Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 898:305-329. doi:10.1007/978-3-319-26974-0_13.
261. Gachet C, Hechler B. Platelet Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. *Hamostaseologie.* 2020; 40(2):145-152. doi:10.1055/a-1113-0711.
262. Hechler B, Lenain N, Marchese P, et al. A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J Exp Med.* 2003; 198(4):661-667. doi:10.1084/jem.20030144.
263. Yamamoto C, Ogawa H, Fukuda T, et al. Impact of a Low CD34+ Cell Dose on Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018; 24(4):708-716. doi:10.1016/j.bbmt.2017.10.043.
264. Lutfi F, Skelton Iv WP, Wang Y, et al. Clinical predictors of delayed engraftment in autologous hematopoietic cell transplant recipients. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2020; 13(1):23-31. doi:10.1016/j.hemonc.2019.08.003.
265. Appelbaum FR. Hematopoietic Cell Transplantation. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e.* McGraw Hill; 2018.
266. Al-Amoodi AS, Li Y, Al-Ghuneim A, et al. Refining the migration and engraftment of short-term and long-term HSCs by enhancing homing-specific adhesion mechanisms. *Blood Adv.* 2022; 6(15):4373-4391. doi:10.1182/bloodadvances.2022007465.
267. Caocci G, Greco M, La Nasa G. Bone Marrow Homing and Engraftment Defects of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017; 9(1):e2017032. doi: 10.4084/MJHID.2017.032.
268. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med.* 1997; 185(1):111-20. doi: 10.1084/jem.185.1.111.

269. Adamiak M, Borkowska S, Wysoczynski M, et al. Evidence for the involvement of sphingosine-1-phosphate in the homing and engraftment of hematopoietic stem cells to bone marrow. *Oncotarget*. 2015; 6(22):18819-18828. doi:10.18632/oncotarget.4710.
270. van Balen P, van der Zouwen B, Kruisselbrink AB, Eefting M, Szuhai K, Jordanova ES, Falkenburg JHF, Jedema I. Tissue Damage Caused by Myeloablative, but Not Non-Myeloablative, Conditioning before Allogeneic Stem Cell Transplantation Results in Dermal Macrophage Recruitment without Active T-Cell Interaction. *Front Immunol*. 2018; 9:331. doi: 10.3389/fimmu.2018.00331.
271. Kaur S, Raggatt LJ, Millard SM, et al. Self-repopulating recipient bone marrow resident macrophages promote long-term hematopoietic stem cell engraftment. *Blood*. 2018; 132(7):735-749. doi:10.1182/blood-2018-01-829663.
272. Laupheimer M, Skorska A, Große J, et al. Selective Migration of Subpopulations of Bone Marrow Cells along an SDF-1 α and ATP Gradient. *Bone Marrow Res*. 2014; 2014:182645. doi:10.1155/2014/182645.
273. Huang X, Broxmeyer HE. Progress towards improving homing and engraftment of hematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2019; 26(4):266-272. doi:10.1097/MOH.0000000000000510.
274. Ratajczak MZ, Kucia M. The Nlrp3 inflammasome - the evolving story of its positive and negative effects on hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2021; 28(4):251-261. doi:10.1097/MOH.0000000000000658.
275. Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol*. 2010; 40(3):616-619. doi:10.1002/eji.200940168.
276. Bujko K, Adamiak M, Abdelbaset-Ismail A, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. Novel Evidence That NADPH Oxidase 2 (Nox-2) Enhances Trafficking of Hematopoietic Stem Progenitor Cells (HSPCs) By Involving ROS Mediated Activation of Nlrp3 Inflammasome. *Blood*. 2022; 140(1):11397. doi: 10.1182/blood-2022-159672.

Kopie zgód Komisji Etycznych oraz Bioetycznych na prowadzenie badań.

**UNIVERSITY OF
LOUISVILLE.**

David Magnuson, Ph.D.
Vice Chair
Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

November 19, 2019

Dr. Mariusz Ratajczak, M.D. Ph.D.
Department: U of L - 42 - Med-Oncology
Protocol Number: IACUC 19617
Expiration Date:
Protocol Title: The role of inflammasome and purinergic signalling in stem cell trafficking

Dear Dr. Ratajczak,

The University of Louisville Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) has reviewed and approved your Proposal to use animals in research and teaching as listed above.

IACUC approval to use laboratory animals is granted for a period of three (3) years subject to annual review. Although continued approval may be granted annually, a new application must be submitted at the end of the three years. During the approval period, it is the responsibility of the Principal Investigator to notify the IACUC of *any* change in the protocol (e.g., animal species/number, personnel, procedures, project classification, funding source(s), study site, and/or use of hazardous materials). The protocol may not be transferred to any other project or investigator without IACUC approval and the Principal Investigator may not use the IACUC approval number to conduct another project. Any adverse effects observed during the course of this activity must be reported to the IACUC.

All individuals involved with the use of laboratory animals in this project should be knowledgeable of the contents of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Guide), National Research Council (NRC), National Academy Press, 2011. A copy of the Guide can be obtained from the IACUC office (HSC, MDR, Room 015). All individuals associated with this project must comply with IACUC training and occupational health and safety requirements. Any individuals associated with this project in the future must also receive training and fulfill health and safety requirements.

Sincerely,



David Magnuson
IACUC Vice Chair

University of Louisville, Louisville, KY 40292
P: 502.852.7307 F: 502-852.7943

UCHWAŁA NR WAW2/124/2019

z dnia 22 lipca 2019 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1¹ ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Rola sygnalowania purynergicznego w procesach mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych” z dnia 03 lipca 2019 roku, złożonego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny, II Wydział Lekarski z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim oraz Oddziałem Fizjoterapii, adres: ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa, zaplanowanego przez Mariusza Ratajczaka²

przy udziale³ -

Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: [PB13] badania podstawowe, inne: badania z zakresu układu krwiotwórczego, wszczepiania krwiotwórczych komórek macierzystych.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: umiarkowana.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków⁴:

Gatunek	Wiek/stadium	Liczba
Mysz domowa, model: C57BL/6, P2X7-KO, CD39-KO, CD73-KO, P1R-KO	3-17 tygodni	162

4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Lenkiewicz Anna Magdalena, Adamiak Mateusz, Ciechanowicz Andrzej.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie⁵ od 01.09.2019 do 31.09.2022 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku⁶: Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Banacha 1B, 02-097 Warszawa.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem, w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.

¹ Niewłaściwy zapis usunąć

² imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

³ Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

⁴ Podać liczbę, szczerp/stado, wiek/stadium rozwoju

⁵ Nie dłużej niż 5 lat

⁶ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

9. Doświadczenie ~~zostanie/nie zostanie~~ poddane ocenie retrospektywnej ~~w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.~~

§ 3

Uzasadnienie:

Komisja oceniła wniosek zgodnie z kryteriami zawartymi w art. 47.1. ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266). Po zapoznaniu się z problematyką badawczą przedstawioną we wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 poz. 1257) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż uwzględnia ona w całości żądanie strony.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
II Lokalna Komisja Etyczna
Rs. Doświadczeń na Zwierzętach
02-786 Warszawa, ul. Giszewskiego 8
tel. 22 55-35622

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)



(Podpis Przewodniczącej komisji)

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – tj.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA NR WAW2/125/2019

z dnia 22 lipca 2019 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1¹ ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Rola sygnalowania purynergicznego w procesie zasiedlania krwiotwórczych komórek macierzystych do nisz szpikowych” z dnia 03 lipca 2019 roku, złożonego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny, II Wydział Lekarski z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim oraz Oddziałem Fizjoterapii, adres: ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa, zaplanowanego przez Mariusza Ratajczaka²

przy udziale³ -

Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: [PB13] badania podstawowe, inne: badania z zakresu układu krwiotwórczego, wszczepiania krwiotwórczych komórek macierzystych.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: umiarkowana.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków⁴:

Gatunek	Wiek/stadium	Liczba
Mysz domowa, model: C57BL/6, CD39-KO, CD73-KO, P1R-KO	3-17 tygodni	160

4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Lenkiewicz Anna Magdalena, Adamiak Mateusz, Ciechanowicz Andrzej.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie⁵ od 01.09.2019 do 31.09.2022 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku⁶: Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Banacha 1B, 02-097 Warszawa.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem, w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.
9. Doświadczenie ~~zostanie/nie zostanie~~ poddane ocenie retrospektywnej ~~w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę~~

¹ Niewłaściwy zapis usunąć

² imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

³ Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

⁴ Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju

⁵ Nie dłużej niż 5 lat

⁶ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

~~dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.~~

§ 3

Uzasadnienie:

Komisja oceniła wniosek zgodnie z kryteriami zawartymi w art. 47.1. ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266). Po zapoznaniu się z problematyką badawczą przedstawioną we wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 poz. 1257) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż uwzględnia ona w całości żądanie strony.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
W Łopieniu Komisja Etyczna
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
02-786 Warszawa, ul. Gozewalskiego 8
tel. 22 50-35022

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)



(Podpis Przewodniczącej komisji)

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – tj.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

