

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk**



**Agata Ciechanowska**

**Porównanie zmian immunologicznych  
po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego  
oraz zbadanie wpływu farmakologicznej modulacji wybranych chemokin  
na transmisję nocycyptywną u myszy**

**Comparison of immunological changes occurring  
after injury to the central and peripheral nervous systems  
and investigation of the influence of pharmacological modulation of selected  
chemokines on nociceptive transmission in mice**

Pracę doktorską wykonano  
w Zakładzie Farmakologii Bólu

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika

Badania opisane w pracy zostały zrealizowane w ramach projektów grantowych  
Narodowego Centrum Badań i Rozwoju – ERA-NET NEURONCOFUND /1/LEAP/15/1  
oraz Narodowego Centrum Nauki – Opus 2016/21/B/NZ4/00128 i Opus 2021/43/B/NZ7/00230

**Kraków 2023**

*Serdecznie dziękuję Wszystkim, dzięki którym niniejsza  
rozprawa doktorska mogła zostać zrealizowana:*

Pani Promotor, **Prof. dr hab. n. med. Joannie Mice**  
za pomoc w przygotowaniu rozprawy doktorskiej, zaangażowanie  
i poświęcony czas. Dziękuję także za wyrozumiałość,  
szansę na rozwijanie warsztatu naukowego  
oraz możliwość wzięcia udziału w ciekawych badaniach

**Koleżankom z Zakładu Farmakologii Bólu**  
za wsparcie, serdeczność, przyjazną atmosferę podczas pracy,  
nieustającą gotowość do pomocy oraz sumienność  
i zaangażowanie podczas wykonywania badań

**Prof. Marii Grazii De Simoni i Jej Zespołowi  
z Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri**  
za wykonanie modelu urazowego uszkodzenia mózgu, dostarczenie nam tkanki  
do badań, wkład w pisanie publikacji, oraz spotkania i dyskusje naukowe  
podczas wspólnej pracy w projekcie ERA-NET

**dr hab. Grzegorzowi Kreinerowi i mgr Justynie Barut  
z Zakładu Biochemii Mózgu**  
za wprowadzenie w techniki immunohistochemiczne, wspólną pracę  
i pomoc w interpretacji uzyskanych wyników

## SPIS TREŚCI

<b>SPIS ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....</b>	<b>4</b>
<b>ALFABETYCZNY WYKAZ SKRÓTÓW .....</b>	<b>5</b>
<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>10</b>
<b>1. WPROWADZENIE .....</b>	<b>13</b>
1.1. Urazowe uszkodzenie mózgu, a procesy nocycypcji .....	13
1.2. Urazowe uszkodzenie nerwu, a procesy nocycypcji .....	17
1.3. Zmiany immunologiczne po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego.....	20
1.3.1. Układ dopełniacza.....	20
1.3.2. Chemokiny.....	24
1.3.2.1. CCL3, CCL4, CCL9 i ich receptory .....	27
1.3.2.2. XCL1 i jej receptory .....	29
1.4. Terapia.....	30
<b>2. CEL BADAŃ .....</b>	<b>33</b>
<b>3. METODOLOGIA BADAŃ .....</b>	<b>34</b>
<b>4. GŁÓWNE ZAGADANIENIA DOKTORATU .....</b>	<b>36</b>
4.1. Zbadanie poziomu markerów wybranych populacji komórek immunologicznych i glejowych, a także inicjatorów oraz enzymów efektorowych klasycznej i lektynowej drogi aktywacji układu dopełniacza podczas rozwoju zmian zachodzących w mysim modelu urazowego uszkodzenia mózgu - <i>Ciechanowska i wsp. Immunobiology 2020</i> oraz <i>Int J Mol Sci 2021</i> .....	36
4.2. Zbadanie poziomu chemokin z rodziny MIP-1 oraz ich receptorów podczas rozwoju zmian zachodzących w mysim modelu urazowego uszkodzenia mózgu - <i>Ciechanowska i wsp. Immunobiology 2020</i> .....	38
4.3. Zbadanie poziomu chemokiny XCL1 oraz jej receptorów podczas rozwoju zmian zachodzących w mysim modelu urazowego uszkodzenia mózgu - <i>Ciechanowska i wsp. Pharmacol Rep 2020</i> .....	39

4.4. Zbadanie poziomu markerów wybranych populacji komórek immunologicznych i glejowych podczas rozwoju zmian zachodzących w mysim modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego – <i>Ciechanowska i wsp, Front Immunol 2022 oraz Brain Sci 2023</i> .....	40
4.5. Zbadanie poziomu chemokin z rodziny MIP-1 oraz ich receptorów, a także wpływu ich modulacji na symptomy bólowe, w mysim modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego – <i>Ciechanowska i wsp. Brain Sci 2023</i> .....	41
4.6. Zbadanie poziomu chemokiny XCL1 oraz jej receptorów, a także wpływu ich modulacji na symptomy bólowe, w mysim modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego – <i>Ciechanowska i wsp. Front Immunol 2022</i> .....	42
<b>5. PRACE ORYGINALNE .....</b>	<b>43</b>
<b>6. DYSKUSJA.....</b>	<b>142</b>
6.1. Aktywacja wybranych populacji komórkowych po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego.....	142
6.2. Układ dopełniacza po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego .....	145
6.3. Rodzina MIP-1 po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego .....	148
6.4. XCL1 po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego .....	151
6.5. Chemokiny (CCL3, CCL9 i XCL1) oraz ich receptory a leki opioidowe.....	153
<b>7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI.....</b>	<b>156</b>
<b>8. WNIOSKI KOŃCOWE.....</b>	<b>158</b>
<b>9. PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>159</b>
<b>10. SPIS WSZYSTKICH DOTYCHCZASOWYCH PUBLIKACJI DOKTORANTKI .....</b>	<b>177</b>
<b>11. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW .....</b>	<b>179</b>
<b>12. ZGODY KOMISJI ETYCZNEJ .....</b>	<b>191</b>

# SPIS ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

## **1. Initiators of classical and lectin complement pathways are differently engaged after traumatic brain injury-time-dependent changes in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus in a mouse model**

Ciechanowska A., Ciapała K., Pawlik K., Oggioni M., Mercurio D., De Simoni M.G., Mika J. *Int J Mol Sci.* 2020; 22(1):45. doi: 10.3390/ijms22010045.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33375205/>

**IF<sub>2020</sub>=5.924, MEN<sub>2020</sub>=140**

## **2. Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice**

Ciechanowska A., Popiolek-Barczyk K., Pawlik K., Ciapała K., Oggioni M., Mercurio D., De Simoni M.G., Mika J.

*Immunobiology* 2020; 225(3):151911. doi: 10.1016/j.imbio.2020.151911.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32059938/>

**IF<sub>2020</sub>= 3.144, MEN<sub>2020</sub>=100**

## **3. Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes**

Ciechanowska A., Popiolek-Barczyk K., Ciapała K., Pawlik K., Oggioni M., Mercurio D., De Simoni M.G., Mika J.

*Pharmacol Rep.* 2020; 72(6):1579-1592. doi: 10.1007/s43440-020-00187-y.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33185818/>

**IF<sub>2020</sub>= 3.027, MEN<sub>2020</sub>=100**

## **4. Pharmacological modulation of the MIP-1 family and their receptors reduces neuropathic pain symptoms and influences morphine analgesia: evidence from a mouse model**

Ciechanowska A., Pawlik K., Ciapała K., Mika J.

*Brain Sci.* 2023; 13(4),579. doi: 10.3390/brainsci13040579.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37190544/>

**IF<sub>2023</sub>= 3.300, MEN<sub>2023</sub>=100**

## **5. New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies**

Ciechanowska A., Rojewska E., Piotrowska A., Barut J., Pawlik K., Ciapała K., Kreiner G., Mika J.

*Front Immunol.* 2022; 13:1058204. doi: 10.3389/fimmu.2022.1058204.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36618360/>

**IF<sub>2022</sub>= 7.300, MEN<sub>2022</sub>=140**

**Sumaryczny Impact Factor = 22.695**

**Sumaryczna liczba punktów Ministerstwo Edukacji i Nauki (MEN) = 580**

## ALFABETYCZNY WYKAZ SKRÓTÓW

<b>skrót</b>	<i>rozwińcie w języku angielskim</i>	–	<i>rozwińcie w języku polskim</i>
<b>21ser</b>	<i>serine isoform of CC- chemokine ligand</i>	–	izoforma serynowa liganda chemokinowego z rodziny CC-
<b>3L1</b>	<i>CC- Motif Chemokine Ligand 3 Like 1</i>	–	ligand chemokinowy 3 z rodziny CC- podobny do 1
<b>4L1</b>	<i>CC- Motif Chemokine Ligand 4 Like 1</i>	–	ligand chemokinowy 4 z rodziny CC- podobny do 1
<b>ACKR</b>	<i>Atypical Chemokine Receptor</i>	–	atypowy receptor chemokinowy
<b>ANOVA</b>	<i>analysis of variance</i>	–	analiza wariancji
<b>C1s</b>	<i>complement component 1s</i>	–	składowa 1s układu dopełniacza
<b>C1r</b>	<i>complement component 1r</i>	–	składowa 1r układu dopełniacza
<b>C1q</b>	<i>complement component 1q</i>	–	składowa 1q układu dopełniacza
<b>CCI</b>	<i>Chronic Constriction Injury</i>	–	model podwiązania nerwu kulszowego
<b>CCL</b>	<i>CC- motif ligand</i>	–	ligandy chemokinowe z rodziny CC-
<b>CCR1</b>	<i>CC- chemokine receptor type 1</i>	–	receptor chemokinowy z rodziny CC- typu 1
<b>CCR5</b>	<i>CC- chemokine receptor type 5</i>	–	receptor chemokinowy z rodziny CC- typu 5
<b>Cd177</b>	<i>Cluster of differentiation 177 antigen</i>	–	antygen różnicowania powierzchniowego 177
<b>Cd8</b>	<i>Cluster of differentiation 8 antigen</i>	–	antygen różnicowania powierzchniowego 8
<b>cFOS</b>	<i>c-Fos protein</i>	–	białko cFOS
<b>CGRP</b>	<i>Calcitonin gene-related Peptide</i>	–	peptyd związany z genem kalcytoniny
<b>CX3CL</b>	<i>CX3C- motif ligand</i>	–	ligandy chemokinowe z rodziny CX3C-
<b>CXCL</b>	<i>CXC- motif ligand</i>	–	ligandy chemokinowe z rodziny CXC-
<b>DAMP</b>	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>	–	wzorce molekularne związane z uszkodzeniem
<b>DARC</b>	<i>The Duffy Antigen Receptor for Chemokines</i>	–	antygen Duffy
<b>DOR</b>	<i>δ opioid receptor</i>	–	receptor opioidowy typu δ
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	–	test immunoenzymatyczny
<b>FCN</b>	<i>ficolin</i>	–	fikolina
<b>GABA</b>	<i>Gamma Aminobutyric Acid</i>	–	kwas gamma-aminomasłowy
<b>GFAP</b>	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>	–	kwaśne białko włókienkowe
<b>GPCR</b>	<i>G Protein-Coupled Receptor</i>	–	receptor sprzężony z białkiem G
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>	–	ludzki wirus niedoboru odporności
<b>i.p.</b>	<i>intraperitoneal injection</i>	–	podanie dootrzewnowe
<b>i.t.</b>	<i>intrathecal injection</i>	–	podanie podpajęczynówkowe

<b>IASP</b>	<i>International Association for the Study of Pain</i> – Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu
<b>IBA-1</b>	<i>Ionized Calcium-Binding Adapter molecule</i> – domena wiążąca wapń 1
<b>IgG</b>	<i>immunoglobulin G</i> – immunoglobulina G
<b>IgM</b>	<i>immunoglobulin M</i> – immunoglobulina M
<b>iNOS</b>	<i>inducible nitric oxide synthase</i> – indukowalna syntaza tlenku azotu
<b>IL</b>	<i>interleukin</i> – interleukina
<b>ITGA9</b>	<i>integrin <math>\alpha 9</math></i> – integryna $\alpha 9$
<b>KL-11</b>	<i>collectin 11</i> – kolektyna 11
<b>KOR</b>	<i><math>\kappa</math> opioid receptor</i> – receptor opioidowy typu $\kappa$
<b>LPS</b>	<i>lipopolysaccharide</i> – lipopolisacharyd
<b>MAC</b>	<i>Membrane Attack Complex</i> – kompleks atakujący błonę
<b>MASP</b>	<i>Mannose-associated serine protease</i> – wiążąca mannozę, skojarzona z lektyną proteaza serynowa
<b>MBL</b>	<i>Mannose-binding lectin</i> – lektyna wiążąca mannozę
<b>MIP-1</b>	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1</i> – białko zapalne makrofagów 1
<b>MOR</b>	<i><math>\mu</math> opioid receptor</i> – receptor opioidowy typu $\mu$
<b>mRNA</b>	<i>messenger ribonucleic acid</i> – informacyjny RNA
<b>NGF</b>	<i>nerve growth factor</i> – czynnik wzrostu nerwów
<b>NOR</b>	<i>nociceptin opioid receptor</i> – receptor nocyceptyny
<b>Olig2</b>	<i>oligodendrocyte transcription factor-2</i> – czynnik transkrypcyjny oligodendrocytów-2
<b>OX-42</b>	<i>CD11b antibody, clone OX-42</i> – antygen CD11b, klon OX-42
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> – wzorce molekularne związane z patogenami
<b>pERK</b>	<i>phosphorylated extracellular signal-regulated kinase</i> – ufosforylowana kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
<b>pp38</b>	<i>phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase</i> – ufosforylowana kinaza białkowa p38 aktywowana mitogenem
<b>RT-qPCR</b>	<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> – ilościowa reakcja odwrotnej transkrypcji w czasie rzeczywistym
<b>SCM-1<math>\alpha</math></b>	<i>Single C motif-1</i> – zawierający jedną resztę cysteinową ligand 1
<b>TBI</b>	<i>Traumatic Brain Injury</i> – urazowe uszkodzenie mózgu
<b>TMEM119</b>	<i>Transmembrane protein 119</i> – białko transbłonowe 119
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> – czynnik martwicy nowotworu $\alpha$
<b>TNF<math>\beta</math></b>	<i>tumor necrosis factor <math>\beta</math></i> – czynnik martwicy nowotworu $\beta$
<b>V</b>	<i>vehicle</i> – rozpuszczalnik
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> – Światowa Organizacja Zdrowia
<b>XCL</b>	<i>chemokine (XC- motif) ligand</i> – ligandy chemokinowe z rodziny XC-
<b>XCR1</b>	<i>XC- motif chemokine receptor 1</i> – receptor chemokinowy z rodziny XC- typu 1

## STRESZCZENIE

Zaburzenia funkcjonowania układu nerwowego nadal stanowią wyzwanie dla lekarzy i naukowców, pomimo ogromnego postępu współczesnej medycyny i farmakologii. Jak sugerują najnowsze badania, w wyniku uszkodzenia zarówno ośrodkowego jak i obwodowego układu nerwowego dochodzi do zmian o podłożu neuroimmunologicznym, które w konsekwencji mogą doprowadzić do nadwrażliwości bólowej. Wciąż nie jest jasne jakie populacje komórek są wówczas zaangażowane w kaskadę następujących po sobie przemian molekularnych. Wydaje się, że szczególne znaczenie w tym procesie, poza komórkami nerwowymi, mogą mieć również komórki immunologiczne i glejowe. Tym samym wskazanie podobieństw i różnic wynikających z etiologii uszkodzenia otwiera i nakreśla interesujący obszar badań. Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie i porównanie zaangażowania tych komórek oraz czynników układu dopełniacza, a także wybranych chemokin z grupy CC- i XC- w patomechanizm uszkodzenia ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, a ponadto sprawdzenie wpływu farmakologicznej modulacji wybranych chemokin i ich receptorów na procesy bólowe u myszy w modelu bólu neuropatycznego. To właśnie złożone i wciąż nie do końca poznane mechanizmy neuroimmunologiczne są powodem braku efektywnej farmakoterapii zaburzeń układu nerwowego, co podkreśla potrzebę wielokierunkowego podejścia w ich leczeniu. Wyniki badań prowadzonych w ramach tej rozprawy doktorskiej, zostały opublikowane w **5 pracach oryginalnych** - *Ciechanowska i wsp. Immunobiology 2020, Pharmacol Rep 2020, Int J Mol Sci 2021, Front Immunol 2022, Brain Sci 2023*.

**W modelu urazowego uszkodzenia mózgu**, podjęto się określenia zaangażowania w rozwój wtórnego uszkodzenia wybranych na podstawie literatury komórek oraz czynników immunologicznych. Dokonano tego poprzez sprawdzenie w kilku punktach czasowych zmian ekspresji mRNA/białka markerów komórkowych, a także czynników układu dopełniacza, chemokin z rodziny MIP-1 (CCL3, CCL4, CCL9) i ich receptorów (CCR1, CCR5) oraz XCL1 i jej receptorów (XCR1, ITGA9) w poszczególnych strukturach mózgu (kora, wzgórze, prążkowie, i/lub hipokamp). Ponadto podjęto się sprawdzenia źródła komórkowego wybranych czynników immunologicznych i określenia lokalizacji ich receptorów. Badania prowadzono w latach 2018-2021, w ramach projektu grantowego ERA-NET NEURONCOFUND /1/LEAP/15/1. **W modelu uszkodzenia nerwu obwodowego** również badano wybrane komórki oraz czynniki immunologiczne w neuropatii poprzez sprawdzenie, w kilku punktach czasowych, zmian poziomu mRNA/białka markerów komórkowych, chemokin z rodziny MIP-1 (CCL3, CCL4, CCL9) i ich receptorów (CCR1, CCR5) oraz chemokiny XCL1 wraz z jej receptorami (XCR1, ITGA9) w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego. Ponadto przeprowadzono eksperymenty farmakologiczne w celu zbadania wpływu neutralizacji chemokin, a także blokady ich receptorów (CCR1, CCR5, XCR1, ITGA9) na procesy nocycepcji w modelu bólu neuropatycznego. Ponieważ efektywność monoterapii nie jest wystarczająca, założeniem kolejnych eksperymentów było sprawdzenie czy zablokowanie wyżej wymienionych receptorów, a także ich ligandów, może korzystnie wpływać na przeciwbólowe właściwości leków opioidowych. Badania prowadzono w latach 2020-2023, w ramach dwóch projektów grantowych: Opus 2016/21/B/NZ4/ 00128, a następnie Opus 2021/43/B/NZ7/00230.

Eksperymenty *in vivo* wykonane były w dwóch etapach. Pierwszy cykl badań przeprowadzony był we współpracy z grupą badawczą kierowaną przez prof. M.G. De Simoni w modelu urazowego uszkodzenia mózgu u samców myszy C57BL/6J (Charles River, Włochy) - wyniki opublikowano w 3 pracach oryginalnych - *Immunobiology 2020, Pharmacol Rep 2020, Int J Mol Sci 2021*. Drugi cykl badań prowadzony był w modelu bólu neuropatycznego polegającym na luźnym jednostronnym podwiązaniu nerwu kulszowego, który jest procedurą od lat wykorzystywaną w Zakładzie Farmakologii Bólu, na samcach myszy Albino Swiss (Charles



River, Niemcy). Wyniki opublikowano w 2 pracach oryginalnych - **Front Immunol 2022, Brain Sci 2023**. Doświadczenia miały miejsce w Instituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri oraz w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja i prowadzone były zgodnie z zaleceniami Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu, Narodowego Instytutu Zdrowia oraz za zgodą Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (Włochy –numer zgody 753/2017-PR; Polska – numery zgód 1277/2015, 301/2017, 75/2017, 305/2017, 235/2020, 40/2023, 236/2021, 297/2021, 89/2021, 98/2022). Materiał do badań biochemicznych (kora, wzgórze, prążkowie, hipokamp lub rdzeń kręgowy) pobierano w pięciu punktach czasowych (1, 4, 7, 14, 35 dni) po uszkodzeniu mózgu/nerwu kulszowego. Pomiar zmian w poziomie mRNA wykonano metodą RT-qPCR, natomiast do oceny zmian w ekspresji białka posłużono się metodami ELISA i Western blot. Ponadto zastosowano techniki immunohistochemii w celu określenia lokalizacji badanych czynników. Narzędzia farmakologiczne były podawane jednokrotnie lub wielokrotnie, najczęściej podpajęczynówkowo, ale także dootrzewnowo. Do oceny nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne w badaniach behawioralnych wykorzystano 2 testy - von Frey'a oraz zimnej płytki. Równolegle realizowano eksperymenty w warunkach *in vitro* z użyciem pierwotnych hodowli komórek mikrogleju i astrogleju z kory mózgowej pobranej od nowonarodzonych myszy szczepu C57BL/6J. Wyniki te zostały opublikowane w 3 pracach - **Immunobiology 2020, Pharmacol Rep 2020, Int J Mol Sci 2021**. Hodowle wykorzystano do określenia źródła komórkowego wybranych receptorów i czynników immunologicznych. Do analizy wyników użyto programu GraphPad Prism z wykorzystaniem testu t-studenta oraz jedno- i dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Następnie wykonano konieczne testy *post hoc*.

W modelu urazowego uszkodzenia mózgu, we wczesnej fazie, wykazano wzrost ekspresji markera neutrofilii nie tylko w korze mózgowej, czyli w miejscu bezpośredniego uszkodzenia, ale również w prążkowie i hipokampie (**Int J Mol Sci 2021, Immunobiology 2020**). Zmiany te utrzymywały się stosunkowo krótko (do 7 dnia). W dalszych analizach stwierdzono znaczące i długotrwałe podwyższenie markerów komórkowych świadczące o silnej aktywacji astrogleju oraz mikrogleju/makrofagów. Co ważne, po raz pierwszy wykazano zmiany we wszystkich 4 badanych strukturach mózgu. Uzyskane dane pozwoliły stwierdzić, że w zależności od upływającego czasu i badanego obszaru, różne typy komórek odgrywają rolę po bezpośrednim uszkodzeniu mózgu, a wydzielane przez nie czynniki immunologiczne stały się przedmiotem kolejnych eksperymentów. Wyniki pokazują, że w pierwszym tygodniu po uszkodzeniu nerwów obwodowych następuje aktywacja mikrogleju/makrofagów oraz astrogleju, którego poziom pozostaje znacznie podniesiony aż do 35 dnia (**Brain Sci 2023**). Wyniki eksperymentów przeprowadzonych w ramach tej pracy oraz dane literaturowe sugerują, że ważną częścią terapii powinno stać się zastosowanie leków modulujących funkcje neutrofilii, makrofagów, mikrogleju i astrogleju w ośrodkowym układzie nerwowym. Poszukiwanie nowych, skutecznych substancji o takim potencjale jest jednym z najważniejszych zadań badań podstawowych. Zaktywowane komórki immunologiczne i glejowe mają kluczowe znaczenie w kaskadzie zmian będącej konsekwencją uszkodzenia układu nerwowego. Szczególnie biorąc pod uwagę fakt, że wpływają one na biosyntezę czynników układu dopełniacza oraz licznych i wciąż słabo poznanych chemokin, które stały się przedmiotem dalszych prac badawczych.

Uzyskane w kolejnej części badań wyniki (**Int J Mol Sci 2021**) sugerują, że wśród inicjatorów klasycznej drogi aktywacji układu dopełniacza cały kompleks C1 (C1q, C1r i C1s), a w przypadku drogi lektynowej fikolina A, odgrywają ważną rolę po uszkodzeniu mózgu we wszystkich badanych strukturach (kora, prążkowie, wzgórze i hipokamp). Eksperymenty przeprowadzone w hodowli pierwotnej komórek mikrogleju sugerują, że są one w dużej mierze odpowiedzialne za biosyntezę inicjatorów szlaku klasycznego, ale w bardzo niewielkim stopniu szlaku lektynowego. Selektywne celowanie w C1q i fikolinę A, może okazać się skuteczną

strategią w leczeniu uszkodzeń mózgu, jednak wymagane są dalsze badania w celu zweryfikowania tej hipotezy.

W kolejnym cyklu eksperymentów wykazano zmiany ekspresji wszystkich chemokin z rodziny MIP-1 (CCL3, CCL4, CCL9) na poziomie kory, prążkowie i hipokampa po uszkodzeniu mózgu (*Immunobiology 2020*), natomiast na poziomie rdzenia kręgowego po uszkodzeniu nerwu kulszowego tylko CCL3 i CCL9 (*Brain Sci 2023*). W badaniach behawioralnych dowiedziono, że blokada CCL3 i CCL9 przez przeciwciała neutralizujące ma działanie antynocyceptywne, a także nasila przeciwbólowe właściwości morfiny po podwiązaniu nerwu kulszowego. W dalszych eksperymentach skoncentrowano się na receptorach rodziny MIP-1: CCR1 i CCR5. Ich neuronalna lokalizacja sugeruje ważną rolę w transmisji nocyceptywnej i wyjaśnia, dlaczego podpajęczynówkowe podania CCL3 i CCL9 mają tak silne i szybkie działanie pronocyceptywne. Uzyskane wyniki po raz pierwszy wskazują, że pojedyncze podanie podpajęczynówkowe antagonisty CCR1 (J113863) i antagonistów CCR5 (TAK-220, AZD-5672) w sposób zależny od dawki, zmniejsza nadwrażliwość bólową rozwiniętą w badanym modelu, a także nasila efekty morfiny (*Brain Sci 2023*). W związku z tym, farmakologiczna modulacja wybranych chemokin z rodziny MIP-1 i ich receptorów może stanowić całkowicie nowe podejście w terapii po uszkodzeniach ośrodkowego jak i obwodowego układu nerwowego.

W ostatnim cyklu badań postanowiono określić i porównać zaangażowanie chemokiny XCL1 i jej receptorów (XCR1, ITGA9) w zmiany zachodzące w mózgu po jego uszkodzeniu (*Pharmacol Rep 2020*) oraz w rdzeniu kręgowym po podwiązaniu nerwu kulszowego (*Front Immunol 2022*). Wykazano po raz pierwszy, że poziom XCL1 w korze mózgowej, hipokampie i wzgórzu ulega podniesieniu zarówno w fazie wczesnej jak i późnej. XCL1 można uznać za jeden z kluczowych czynników inicjujących wtórne uszkodzenie, a spośród receptorów dla tej chemokiny nie tylko klasyczny XCR1, ale także niedawno zidentyfikowany w tej roli receptor ITGA9, mogą stać się w przyszłości ważnymi punktami uchwytu dla farmakoterapii po urazowym uszkodzeniu mózgu (*Pharmacol Rep 2020*). Na podstawie wyników badań immunohistochemicznych dowiedziono, że XCL1 jest wytwarzana przez astroglej, natomiast jej oba receptory zlokalizowane są na neuronach (*Front Immunol 2022*). Co ważne również na poziomie rdzenia kręgowego po uszkodzeniu nerwu, wykazano szybki i znaczący wzrost ekspresji XCL1 utrzymujący się aż do 5 tygodni (*Front Immunol 2022*). Ponadto dowiedziono, że podpajęczynówkowe podanie myszom zdrowym XCL1, które wywołuje nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne, jest osłabiane przez podanie zarówno vMIP-II (antagonisty XCR1), jak i YA4 (przeciwciała neutralizującego ITGA9) (*Front Immunol 2022*). Ponadto, badania dostarczyły pierwszych dowodów na to, że po podwiązaniu nerwu kulszowego blokadanie XCL1, jak również XCR1 i ITGA9 nie tylko przynosi ulgę w bólu, ale także nasila efekty analgetyczne morfiny i/lub buprenorfiny (*Front Immunol 2022*). Przeprowadzone eksperymenty pokazują po raz pierwszy, że osie XCL1/XCR1 i XCL1/ITGA9 są zaangażowane w transmisję nocyceptywną. Dane literaturowe wskazują, że neutralizacja chemokin, jak i blokada ich receptorów jest z powodzeniem stosowana w leczeniu niektórych schorzeń neurodegeneracyjnych, dlatego też proponowana modulacja sygnalizacji XCL1 może zostać wykorzystana przy opracowaniu skuteczniejszej farmakoterapii.

**Podsumowując, ważnym aspektem w terapii po uszkodzeniach układu nerwowego jest wielokierunkowe podejście w projektowaniu nowych narzędzi farmakologicznych zorientowanych na modulację interakcji neuroimmunologicznych i funkcji komórek zaangażowanych w ten patomechanizm. Leczenie oparte na zahamowaniu aktywacji inicjatorów układu dopełniacza (C1q i fikoliny A), jak również chemokin (XCL1, CCL3) i zablokowanie ich receptorów (CCR1, CCR5, XCR1, ITGA9), może w sposób istotny wpłynąć na poprawę jakości życia pacjentów zarówno po uszkodzeniach mózgu jak i nerwów obwodowych.**

## SUMMARY

Disorders of the nervous system continue to pose a challenge for doctors and scientists, despite significant advancements in modern medicine and pharmacology. Recent research suggests that damage to both the central and peripheral nervous systems can lead to neuroimmunological changes, which can ultimately result in pain hypersensitivity. It is still unclear which cell populations are involved in the cascade of subsequent molecular changes. It appears that in addition to nerve cells, immune cells and glial cells can also play a significant role in this process. Therefore, identifying similarities and differences arising from the etiology of damage opens up and highlights an interesting area of research. The main objective of this doctoral dissertation was to investigate and compare the involvement of these cells, the complement system factors, and selected chemokines from the CC- and XC- groups in the pathomechanism of damage to the central and peripheral nervous systems. Additionally, the dissertation aimed to examine the influence of pharmacological modulation of selected chemokines and their receptors on pain processes in a mouse model of neuropathic pain. These complex and still not fully understood neuroimmunological mechanisms are responsible for the lack of effective pharmacotherapy for nervous system disorders, highlighting the need for a multidirectional approach in their treatment. The results of the research conducted within this doctoral dissertation were published in **5 original papers**. – *Ciechanowska et al. Immunobiology 2020, Pharmacol Rep 2020, Int J Mol Sci 2021, Front Immunol 2022, Brain Sci 2023*.

**In a traumatic brain injury model**, the involvement of selected cells and immunological factors identified in the literature in the secondary injury development was assessed. This was achieved by examining changes in the mRNA/protein levels of cellular markers, the complement system factors, chemokines from the MIP-1 family (CCL3, CCL4, CCL9) and their receptors (CCR1, CCR5), as well as XCL1 and its receptors (XCR1, ITGA9) at various time points in different brain structures (cortex, thalamus, striatum, and/or hippocampus). Additionally, the cellular source of selected immunological factors and the location of their receptors were determined. The research was conducted in 2018-2021 as part of the ERA-NET NEURONCOFUND /1/LEAP/15/1 grant project. **In a peripheral nerve injury model**, the involvement of the selected cells and immunological factors in neuropathy was determined by examining changes in mRNA/protein levels of cellular markers, chemokines from the MIP-1 family (CCL3, CCL4, CCL9) and their receptors (CCR1, CCR5), as well as chemokine XCL1 and its receptors (XCR1, ITGA9) at various time points in the lumbar spinal cord. Moreover, pharmacological experiments were conducted to investigate the impact of the neutralization of the analysed chemokines and blocking their receptors (CCR1, CCR5, XCR1, ITGA9) on nociception processes in the neuropathic pain model. Owing to the insufficient effectiveness of monotherapy, the objective of the subsequent experiments was to determine whether blocking the aforementioned receptors and their ligands could positively influence analgesic properties of opioid drugs. The research was conducted in 2020-2023 as part of two grant projects: Opus 2016/21/B/NZ4/00128 followed by Opus 2021/43/B/NZ7/00230.

The *in vivo* experiments were conducted in two stages. The first cycle, carried out in collaboration with a research group led by Prof. M.G. De Simoni, was conducted in a traumatic brain injury model in male C57BL/6J mice (Charles River, Italy). The results were published in 3 original papers – *Immunobiology 2020, Pharmacol Rep 2020, Int J Mol Sci 2021*. In the second stage, the experiments were conducted in a neuropathic pain model involving loose unilateral sciatic nerve ligation, a procedure long used at the Department of Pain Pharmacology, in male Albino Swiss mice (Charles River, Germany). The results were published in 2 original papers –

**Front Immunol 2022, Brain Sci 2023.** The experiments were conducted at the Instituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri and the Jerzy Maj Institute of Pharmacology, in accordance with the recommendations of the International Association for the Study of Pain, the National Institute of Health, and with the approval of the Ethical Committee for Animal Experiments (Italy – approval numbers 753/2017-PR; Poland – approval numbers 1277/2015, 301/2017, 75/2017, 305/2017, 235/2020, 40/2023, 236/2021, 297/2021, 89/2021, 98/2022). Samples for biochemical analysis (cortex, thalamus, striatum, hippocampus, or spinal cord) were collected at five time points (on day 1, 4, 7, 14, 35) after brain/sciatic nerve injury. Changes in mRNA levels were measured with the RT-qPCR method, whereas changes in protein expression were assessed by means of the ELISA and Western blot methods. Additionally, immunohistochemistry techniques were employed to determine the location of the studied factors. Pharmacological tools were administered either as single or multiple doses, most often intrathecally but also intraperitoneally. Two behavioural tests, von Frey and cold plate, were used to evaluate sensitivity to mechanical and thermal stimuli. Simultaneously, *in vitro* experiments were conducted using primary microglial and astroglial cell cultures obtained from the cerebral cortex of newborn C57BL/6J mice. The results from these experiments were published in 3 papers – **Immunobiology 2020, Pharmacol Rep 2020, Int J Mol Sci 2021**. The cell cultures were used to determine the cellular source of selected receptors and immunological factors. Data analysis was performed using the GraphPad Prism software, involving a student's t-test, and a one-way and two-way analysis of variance (ANOVA), followed by essential *post hoc* tests.

In the traumatic brain injury model, in the early phase, an increase in the expression of the neutrophil marker was observed not only in the brain cortex, the site of the direct damage, but also in the striatum and hippocampus (**Int J Mol Sci 2021, Immunobiology 2020**). These changes persisted relatively briefly (up to day 7). Further analyses revealed a significant and long-lasting increase in the levels of cellular markers, indicating strong activation of astroglia and microglia/macrophages. Importantly, for the first time, changes were observed in each of the 4 studied brain structures. Based on the obtained data a conclusion was made that depending on the elapsed time and studied brain area, different types of cells played a role after direct brain injury, and the immunological factors secreted by them became the subject of subsequent experiments. The results showed that in the first week after peripheral nerve injury, microglia/macrophages and astroglia were activated, and the levels of the latter remained significantly elevated up to day 35 (**Brain Sci 2023**). Both the results of experiments conducted as part of this work and literature data suggest that an important part of therapy should include drugs that modulate the function of neutrophils, macrophages, microglia, and astroglia in the central nervous system. The search for new, effective substances with such potential is one of the most important tasks in basic research. Activated immune and glial cells play a crucial role in the cascade of changes resulting from damage to the nervous system, especially considering their impact on the biosynthesis of the complement system factors and numerous, still poorly understood chemokines, which have become the subject of further research.

The results obtained in the subsequent part of the research (**Int J Mol Sci 2021**) suggest that among the initiators of the classical pathway of the complement system activation, the entire C1 complex (C1q, C1r, and C1s), and in the case of the lectin pathway, ficolin A, play an important role after injury to all the studied brain structures (cortex, striatum, thalamus, and hippocampus). Experiments conducted on primary microglial cell cultures suggest that they are largely responsible for the biosynthesis of initiators of the classical pathway, however, their role in the lectin pathway is minor. Selective targeting of C1q and ficolin A may prove to be an

effective strategy in treatment of brain injuries. Nevertheless, further research is required to verify this hypothesis.

In the next cycle of experiments, changes in the expression of all chemokines from the MIP-1 family (CCL3, CCL4, CCL9) were detected in the cortex, striatum, and hippocampus after brain injury (*Immunobiology 2020*). However, in the spinal cord after sciatic nerve injury, only CCL3 and CCL9 exhibited changes (*Brain Sci 2023*). Behavioural studies demonstrated that blocking CCL3 and CCL9 with neutralizing antibodies has antinociceptive effects and enhances the analgesic properties of morphine after sciatic nerve ligation. Subsequent experiments focused on the MIP-1 family receptors: CCR1 and CCR5. Their neuronal location suggests an important role in nociceptive transmission, explaining why intrathecal administration of CCL3 and CCL9 has such strong and rapid pronociceptive effects. For the first time, the obtained results indicated that single intrathecal administration of CCR1 antagonists (J113863) and CCR5 antagonists (TAK-220, AZD-5672) reduces pain hypersensitivity developed in tested model in a dose-dependent manner and enhances the effects of morphine (*Brain Sci 2023*). Therefore, pharmacological modulation of selected chemokines from the MIP-1 family and their receptors may represent a completely new approach in the therapy of injury to both central and peripheral nervous systems.

The aim of the last cycle of experiments was to determine and compare the involvement of chemokine XCL1 and its receptors (XCR1, ITGA9) in changes occurring in the brain after injury (*Pharmacol Rep 2020*) and in the spinal cord after sciatic nerve ligation (*Front Immunol 2022*). It was demonstrated for the first time that the levels of XCL1 in the cortex, hippocampus, and thalamus increased in both early and late phases. XCL1 can be considered one of the key factors initiating secondary damage, and among all the receptors for this chemokine, not only the classic XCR1 but also the recently identified ITGA9 may serve as important targets in traumatic brain injury pharmacotherapy (*Pharmacol Rep 2020*). Based on immunohistochemical results, it was shown that XCL1 is produced by astroglia, while both of its receptors are located on neurons (*Front Immunol 2022*). Importantly, also in the spinal cord after nerve injury, a rapid and strong increase in XCL1 expression was observed, persisting for up to 5 weeks (*Front Immunol 2022*). Furthermore, it was demonstrated that intrathecal administration of XCL1 to healthy mice, which induces sensitivity to thermal and mechanical stimuli, was weakened by the administration of both vMIP-II (XCR1 antagonist) and YA4 (ITGA9 neutralizing antibody) (*Front Immunol 2022*). In addition, the research offered initial evidence that after sciatic nerve ligation, blocking XCL1, as well as XCR1 and ITGA9, not only provides pain relief but also enhances the analgesic effects of morphine and/or buprenorphine (*Front Immunol 2022*). These experiments showed for the first time that the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes are involved in nociceptive transmission. Literature data indicate that neutralization of chemokines and blocking their receptors are successfully used in the treatment of selected neurodegenerative disorders. Therefore, the proposed modulation of XCL1 signalling can be used to develop more effective pharmacotherapy.

**Summing up, a multidirectional approach in designing new pharmacological tools targeting the modulation of neuroimmune interactions and functions of cells involved in this pathomechanism is a crucial aspect of therapy for nervous system injuries. Treatment based on inhibiting the activation of the complement system initiators (C1q and ficolin A), as well as chemokines (XCL1, CCL3), and blocking their receptors (CCR1, CCR5, XCR1, ITGA9), can significantly improve the quality of life for patients with both brain and peripheral nerve injuries.**

# 1. WPROWADZENIE

## 1.1. Urazowe uszkodzenie mózgu, a procesy nocyciepcji

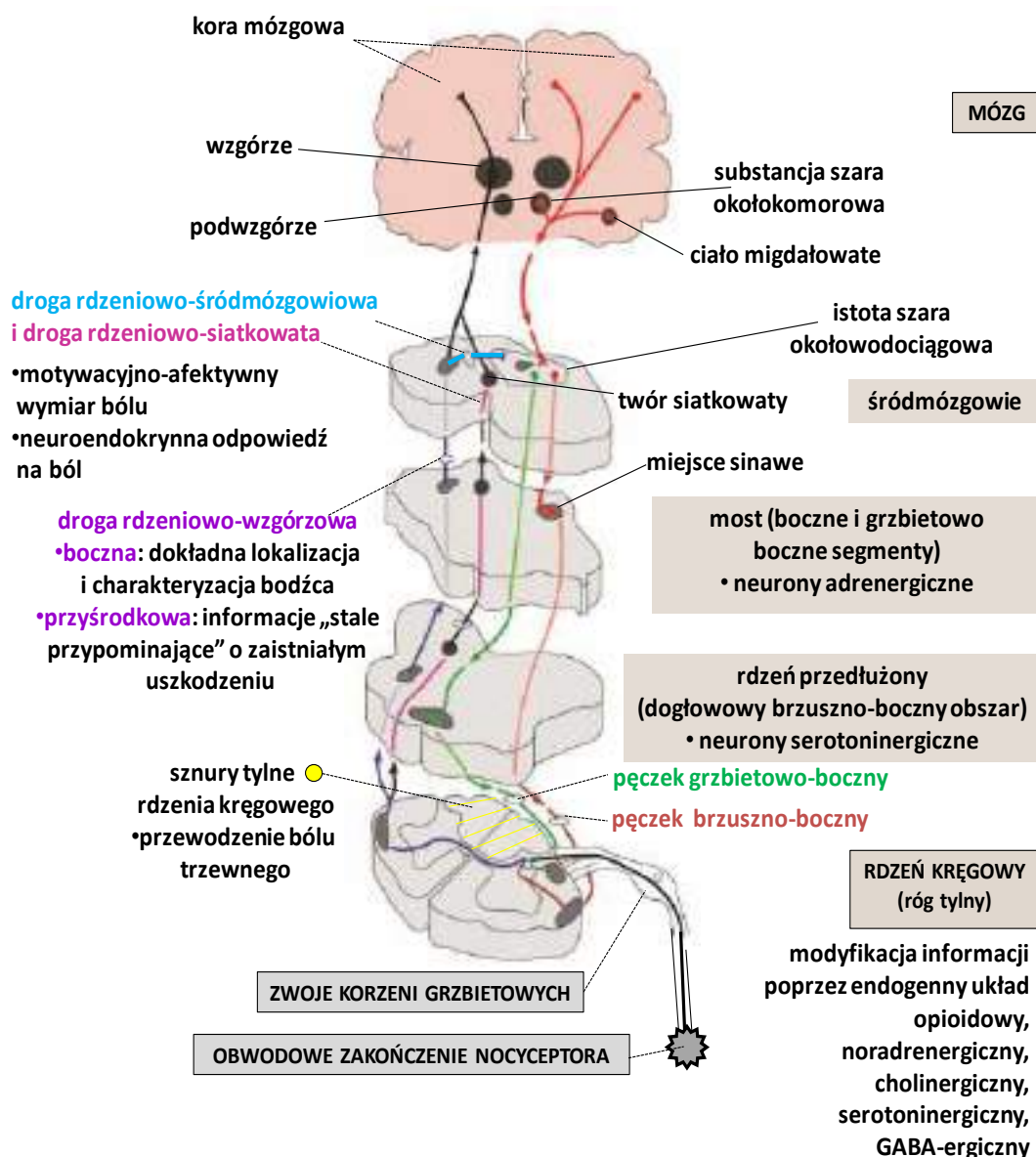
Urazowe uszkodzenie mózgu to jedna z głównych przyczyn śmierci i trwałego inwalidztwa ludzi na całym świecie, a globalna roczna częstość jego występowania jest zmiennie szacowana na 27 do 69 milionów poszkodowanych<sup>1,2</sup>. Istnieją dwa główne rodzaje urazów głowy: penetrujący, gdy obiekt przebija czaszkę i wchodzi do tkanki mózgowej oraz niepenetrujący, znany również jako zamknięty uraz głowy, gdy na poszkodowanego zadziała duża siła zewnętrzna, która nie prowadzi do uszkodzenia opon mózgowych i czaszki, jednak powoduje uraz mózgu. W zależności od stopnia uszkodzenia objawy mogą być łagodne, umiarkowane lub ciężkie<sup>3</sup>. Po urazie występuje bezpośrednie naruszenie struktur mózgu w miejscu uderzenia, które może obejmować stłuczenia, pęknięcia i krwotoki, a co za tym idzie, powodować utratę przytomności, zaburzenia świadomości, deficyty ruchowe i czuciowe oraz inne tymczasowe lub trwałe objawy neurologiczne<sup>3</sup>. Jednak to, co czyni urazowe uszkodzenie mózgu tak złożonym schorzeniem są procesy wtórne. Obejmują one między innymi: zmiany niedotlenieniowo-niedokrwienne, zaburzenia metaboliczne i przepuszczalności naczyń, obrzęk mózgu, rozlane uszkodzenie aksonalne, wodogłowie oraz wzrost ciśnienia śródczaszkowego. Mająca miejsce neurodegeneracja polega zarówno na stopniowej utracie części komórek nerwowych, jak i na aktywacji pozostałych. To przyczynia się do zaburzeń neuroplastyczności, zakłóceń w sieciach neuronalnych, w przekazywaniu sygnałów oraz w komunikacji pomiędzy różnymi obszarami mózgu<sup>3</sup>. Ponadto dochodzi do silnej, choć słabo jeszcze poznanej aktywacji komórek glejowych i immunologicznych<sup>4,5</sup>. Mają też miejsce apoptoza, nekroza, degeneracja aksonalna oraz tworzenie blaszek amyloidowych wokół neuronów<sup>6-8</sup>. W ich konsekwencji dochodzi do długoterminowych zmian neurodegeneracyjnych oraz zaburzeń funkcji poznawczych, takich jak utrata pamięci, otępienie i demencja<sup>9-13</sup>. Ze względu na to, że pourazowa patofizjologia mózgu rozwija się w ciągu kilku dni po uszkodzeniu, występuje tzw. „okno czasowe”, które stwarza możliwość farmakologicznej interwencji terapeutycznej. W trakcie realizacji badań w ramach projektu ERA-NET dążyliśmy do ujawnienia nieznanych lub słabo poznanych zmian pourazowych w czynnikach układu dopełniacza i wybranych chemokin w różnych strukturach mózgu.

Pomimo obszernych danych literaturowych wciąż stosunkowo mało wiadomo jest na temat tego, w jaki sposób wtórne uszkodzenie przyczynia się do zaostrej odpowiedzi immunologicznej, która następuje w wyniku aktywacji lokalnych komórek immunologicznych oraz glejowych<sup>14,15</sup>. Wiadomo, że brak integralności bariery krew-mózg umożliwia komórkom i czynnikom immunologicznym krążącym we krwi wejście do

uszkodzonej tkanki mózgowej, gdzie reakcje zapalne ulegają nasileniu<sup>16-18</sup>. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że w pierwszej kolejności do miejsca objętego urazem rekrutowane są neutrofile, po czym następuje lokalna aktywacja komórek immunologicznych i glejowych oraz obwodowych komórek immunologicznych<sup>19</sup>. Wciąż brakuje jednak kompleksowego porównania zmian markerów komórkowych poszczególnych populacji w czasie, dlatego stało się to przedmiotem badań tej pracy doktorskiej. Ponadto, postanowiliśmy przeprowadzić analizy zarówno w korze mózgowej (czyli w miejscu uszkodzenia), jak i w głębszych strukturach mózgu, czyli we wzgórzu, prążkowie i hipokampie ze względu na brak tego rodzaju danych w dostępnej literaturze. Poznanie zaangażowania komórek immunologicznych w rozwijające się wtórne uszkodzenie wydaje się istotne, ponieważ, jak sugerują najnowsze doniesienia, wydzielane przez nie czynniki powodują stan zapalny, chemotaksję, fagocytozę, a nawet śmierć komórek<sup>20,21</sup>.

Dane literaturowe jednoznacznie pokazują, że w wyniku uszkodzenia mózgu dochodzi do rozwoju bólu ośrodkowego (zmian w obrębie II lub III neuronu czuciowego). Powstające ostre odczucia bólowe są związane z określoną dysfunkcją, trwają zazwyczaj do kilku tygodni i często ustępują z czasem, np. po wygojeniu pęknięcia czaszki<sup>22</sup>. Ten rodzaj dolegliwości trwa zwykle od trzech do sześciu miesięcy i nie jest bezpośrednio związany z uszkodzeniem tkanek. Zdecydowanie najwięcej badań dotyczących nadwrażliwości bólowej powstającej w wyniku urazu mózgu dotyczy głowy, która jest najczęstszym miejscem występowania dyskomfortu u pacjentów<sup>23,24</sup>. Innymi często zgłaszanymi miejscami występowania bolesności, która określana jest jako mięśniowo-szkieletowa, są szyja, ramiona, plecy oraz kończyny<sup>25</sup>. Ponadto wielu pacjentów z umiarkowanym lub ciężkim urazowym uszkodzeniem mózgu doświadcza bolesnej spastyczności, związanej ze sztywnością kończyn, niekontrolowanymi ruchami mięśni i słabą koordynacją<sup>26</sup>. U niektórych pacjentów po urazowym uszkodzeniu mózgu rozwija się późny zespół bólowy, którego objawy pojawiają się sześć miesięcy lub dłużej po urazie<sup>27</sup>. Wreszcie, wszystkie doniesienia jasno pokazują, że dysfunkcje związane z urazowym uszkodzeniem mózgu mają bardzo niejednorodny charakter i są trudne w leczeniu.

Sam proces nocycypcji, czyli powstawania odczuć bólowych, jest złożony. Składa się z czterech głównych etapów, tzn. z transdukcji (zamiana energii bodźca bólowego na impuls elektryczny), przewodzenia (przekazywanie informacji bólowej), modulacji (torowanie i hamowanie informacji bólowej) i percepcji (uświadomienie działania stymulacji bólowej w korze mózgowej).



**Rycina 1.** Proces nocycepcji. W przypadku urazowego uszkodzenia mózgu dochodzi do zmian zarówno w korze mózgowej jak i w głębszych strukturach. Prowadzi to do zaburzeń w głównych ośrodkach związanych z hamowaniem zstępującym, takich jak jądro sinawe i istota szara okołowodociągowa, co przyczynia się do rozwoju nadwrażliwości. W przypadku uszkodzenia obwodowego układu nerwowego z rogu tylnego rdzenia kręgowego informacja nocyceptywna jest przekazywana do wyższych pięter ośrodkowego układu nerwowego przede wszystkim drogami wstępującymi zlokalizowanymi w przedniobocznym kwadracie istoty białej rdzenia kręgowego i w sznurach tylnych (boczną i przyśrodkową drogą rdzeniowo-wzgórzową, drogą rdzeniowo-śródmózgowiową i rdzeniowo-siatkowatą) – schemat opracowany według Irvine i Clark, 2018<sup>22</sup>, zmieniony na podstawie literatury<sup>28-30</sup>

Dane literaturowe wskazują, że po urazowym uszkodzeniu mózgu dochodzi do zaburzeń hamowania zstępującego, co wtórnie prowadzi do zaburzenia transmisji nocyceptywnej<sup>22</sup>. W warunkach fizjologicznych zstępujące szlaki bólowe przekazują informacje z kilku obszarów mózgu, w tym z kory mózgowej, podwzgórza i ciała migdałowego, do istoty szarej okołowodociągowej w śródmózgiu (**Rycina 1, zaznaczone na czerwono**). Pobudzone neurony istoty szarej okołowodociągowej aktywują zawierające



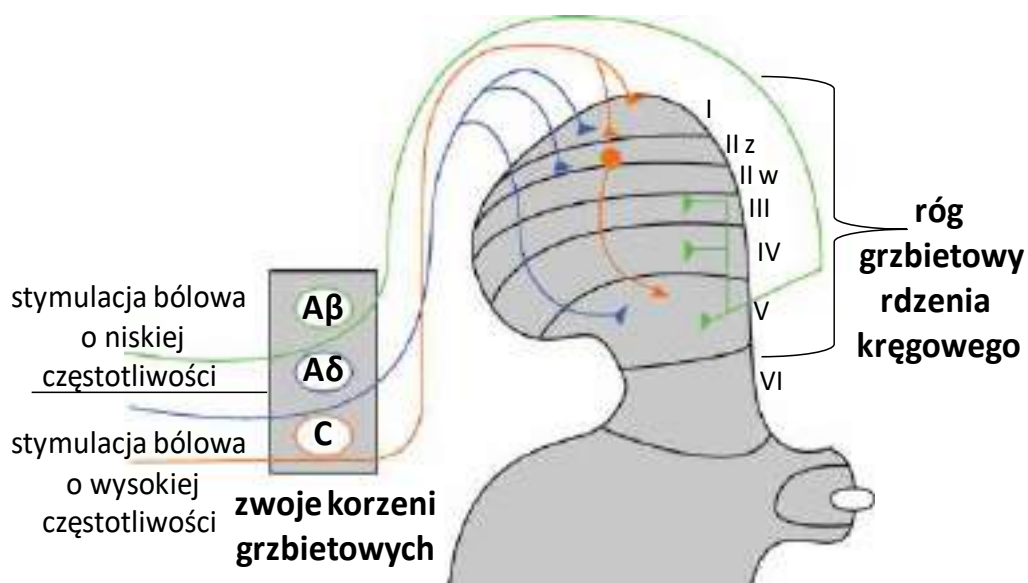
serotoninę i enkefalinę neurony w dogłowym brzuszno-bocznym obszarze rdzenia przedłużonego, a następnie poprzez pęczek grzbietowo-boczny przechodzą do rogu grzbietowego rdzenia kręgowego (**Rycina 1, zaznaczone na zielono**) i wywierają hamujący wpływ na procesy nocycyptywne. Neurony istoty szarej okołowodociągowej aktywują również zawierające noradrenalinę neurony w miejscu sinawym. Ta ścieżka noradrenergiczna (**Rycina 1, zaznaczone na czerwono**) schodzi w pęczku brzuszno-bocznym, aby mieć hamujący wpływ na transmisję nocycyptywną drogi rdzeniowo-wzgórzowej w rogu grzbietowym<sup>22,28-30</sup>. Natomiast stwierdzono, że osoby z przewlekłym pourazowym bólem głowy mają niższy próg bólu w odpowiedzi na ucisk i zmniejszoną modulację bólu warunkowego<sup>31</sup>. Zaburzone hamowanie zstępujące, w którym pośredniczy uwalnianie noradrenaliny z zakończeń neuronów, których ciała komórkowe są zlokalizowane w miejscu sinawym oraz serotoniny z zakończeń neuronów, których ciała komórkowe są zlokalizowane w dogłowym brzuszno-bocznym obszarze rdzenia przedłużonego (**Rycina 1**), wydaje się być ważnym mechanizmem wpływającym na transmisję informacji nocycyptywnej po uszkodzeniu mózgu<sup>32</sup>. W eksperymentalnym modelu urazu czaszkowo-mózgowego wykazano zmniejszony poziom noradrenaliny w mózgu i rdzeniu kręgowym oraz utratę ciał komórkowych w głównych ośrodkach noradrenergicznych związanych ze zstępującym hamowaniem nocycyptywnym, między innymi w miejscu sinawym<sup>26,33</sup>. Wyniki badań behawioralnych wskazują na występowanie nadwrażliwości bólowej w modelu kontrolowanego stłuczenia kory mózgowej u myszy szczepu C57BL/6<sup>34,35</sup>. We wspomnianej pracy udowodniono, że uszkodzenie kory somatosensorycznej jest związane ze znacznym wzrostem nadwrażliwości bólowej w obszarze oczodołów co wykazano za pomocą filamentów von Frey'a<sup>34</sup>, zarówno po stronie uszkodzenia jak i po przeciwnej<sup>35</sup>. Dodatkowo u myszy poddanych uszkodzeniom mózgu obserwowano także wzrost ekspresji czynników pronocycyptywnych cytokin (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12) oraz neuropeptydów (substancja P i CGRP) w pniu mózgu<sup>34,35</sup>. Ponadto, w 2017 roku w szczurzym modelu wykazano, że po urazowym uszkodzeniu mózgu w rdzeniu kręgowym dochodzi do aktywacji czynników immunologicznych z powodu zaburzeń w funkcjonowaniu zstępujących układów nocycyptywnych<sup>36</sup>, co jak wskazują badania, może być związane z aktywacją komórek glejowych i rekrutacją obwodowych komórek immunologicznych<sup>37-40</sup>. Utrzymujący się stan zapalny przyczynia się do apoptozy neuronów oraz nasila procesy bólowe<sup>22,41,42</sup>. Niestety strategie terapeutyczne bólu ośrodkowego są ograniczone ze względu na nie do końca poznany patomechanizm, dlatego stał się on przedmiotem badań realizowanych w ramach tej pracy.

## 1.2. Urazowe uszkodzenie nerwu, a procesy nocycepcji

W przypadku uszkodzenia obwodowego układu nerwowego zaburzenia w transmisji nocyceptywnej dotyczą w pierwszej kolejności dwóch początkowych etapów, czyli transdukcji i przewodzenia. Doświadczenia zmysłowe zaczynają się na obwodzie, gdzie zakończenia pierwotnych włókien doprowadzających reagują na niezliczoną ilość bodźców. Istnieją trzy główne typy włókien czuciowych w obwodowym układzie nerwowym - włókna A $\beta$ , A $\delta$  i C<sup>28</sup> (**Rycina 2**). Włókna A $\beta$  mają dużą średnicę i są grubo zmielinizowane, co pozwala im szybko przewodzić potencjały czynnościowe i reagować na bodźce o niskiej częstotliwości (lekki dotyk). Włókna A $\delta$  mają mniejszą średnicę i są cienko zmielinizowane. Ich budowa sprawia, że przenoszenie informacji jest wolniejsze niż w przypadku włókien A $\beta$ . Reagują na bodźce termiczne i mechaniczne, jednak o wysokiej częstotliwości. Włókna C są najcieńszym rodzajem pierwotnych włókien doprowadzających. Są całkowicie pozbawione osłonek mielinowych, co czyni je najwolniej przewodzącymi. Mają najwyższe progi aktywacji, więc selektywnie wykrywają bodźce nocyceptywne o wysokiej częstotliwości. Połowa włókien doprowadzających, również tych które tworzą włókna C, uwalnia neuropeptydy, takie jak substancja P, CGRP. Obydwa typy włókien C kończą się w powierzchniowych blaszkach rogu grzbietowego – z tym że peptydergiczne kończą się głównie w blaszce I i zewnętrznej części blaszki II (blaszce II z), natomiast niepeptydergiczne zawiązują się w wewnętrznej części blaszki II (blaszce II w). Jest prawdopodobne, że obydwa rodzaje włókien C działają jako nocyceptory, jednak niewiele wiadomo na temat różnic funkcjonalnych między nimi<sup>43</sup>. Łącznie włókna A $\delta$  i C określamy mianem „włókien bólowych”, reagujących na bodźce które mogą mieć charakter mechaniczny, termiczny lub chemiczny. Projektują one głównie do blaszek I-II rogu tylnego rdzenia kręgowego (**Rycina 2**). Włókna A $\beta$  natomiast unerwiają przeważnie blaszki III-V<sup>44</sup> (**Rycina 2**).

Następnie po transdukcji, w procesie przewodzenia informacja nocyceptywna jest przekazywana z rogu tylnego rdzenia kręgowego do wyższych piętér ośrodkowego układu nerwowego przede wszystkim drogami zlokalizowanymi w przedniobocznym kwadracie istoty białej rdzenia kręgowego i w sznurach tylnych (**Rycina 1**, boczną i przyśrodkową drogą rdzeniowo-wzgórzową *zaznaczone fioleto*, rdzeniowo-śródmózgowiową *zaznaczone na niebiesko* i rdzeniowo-siatkowatą *zaznaczone na różowo*). Droga rdzeniowo-wzgórzowa (**Rycina 1**, *zaznaczona na fioleto*) jest główną wstępującą ścieżką projekcyjną rdzenia kręgowego, która przekazuje bodźce nocyceptywne, termiczne i dotykowe do wzgórza, tworzącego siatkowatego mostu, substancji szarej okołowodociągowej oraz podwzgórza. Podczas przewodzenia informacji nocyceptywnej do struktur mózgu dochodzi do jej hamowania lub

torowania, czyli do procesu modulacji, a następnie w korze mózgowej dochodzi do procesu percepcji w trakcie którego informacja bólowa poddawana jest subiektywnej interpretacji <sup>28</sup>.



**Rycina 2.** Pierwotne włókna doprowadzające (włókna Aβ, Aδ i C) przekazujące impulsy z obwodu, przez zwoje korzeni grzbietowych do rogu grzbietowego rdzenia kręgowego - schemat opracowany według D'Mello i Dickenson, 2008 <sup>45</sup>, zmieniony na podstawie literatury <sup>43</sup>. **Legenda:** „II z” - zewnętrzna część blaszki II; „II w” - wewnętrzna część blaszki II

Dane literaturowe wskazują, że w populacji leczonej w następstwie urazów, uszkodzenia nerwów obwodowych stanowią od 2 do 3% wszystkich przypadków, a dochodzi do nich najczęściej w trakcie wypadków komunikacyjnych <sup>46</sup> oraz działań wojennych <sup>47</sup>. Co ważne, obrażenia jatrogenne spowodowane zabiegami medycznymi stanowią 17,4% uszkodzeń nerwów <sup>48</sup>. Pośród urazów najczęstsze są te związane z rozciąganiem, gdy na nerw zadziałają siły, które przekraczają jego naturalną elastyczność. Urazy szarpane spowodowane ostrymi przedmiotami są drugim w kolejności typem, który powoduje częściową lub całkowitą utratę ciągłości nerwu. Trzecim powszechnym typem uszkodzenia nerwów obwodowych są urazy kompresyjne, które pomimo całkowitego zachowania ciągłości mogą skutkować utratą funkcji nerwów czuciowych. Uważa się, że przyczyną tego jest zarówno niedokrwienie, jak i deformacja mechaniczna, będąca bezpośrednim skutkiem ucisku. Inne mniej powszechne mechanizmy obejmują uraz termiczny lub niedokrwienie z powodu uszkodzenia naczyń krwionośnych <sup>49</sup>. Problem uszkodzenia nerwów obwodowych dotyczy zarówno kończyn górnych (najczęściej nerwu łokciowego lub promieniowego) jak i kończyn dolnych (w tym szczególnie często nerwu kulszowego i strzałkowego) <sup>46,50,51</sup>.

Ból neuropatyczny powstaje w wyniku uszkodzenia układu nerwowego, a jego etiologia jest bardzo zróżnicowana <sup>52</sup>. Jest następstwem między innymi uszkodzeń mechanicznych, a także chorób metabolicznych, neurodegeneracyjnych, autoimmunologicznych,

nowotworowych, udarów i urazów mózgu<sup>53</sup>. Pomimo odmiennej przyczyny powstawania, wiele z tych zespołów chorobowych ma wspólne objawy kliniczne. Są to m.in. brak widocznego uszkodzenia tkanek, obecność bólu napadowego, paradoksalna kombinacja ubytku czucia oraz hiperalgezji w obszarze objętym bólem, występowanie allodynii po stymulacji bodźcami niebólowymi (np. dotyk), a także stopniowe nasilanie się nadwrażliwości w odpowiedzi na powtarzającą się stymulację<sup>29</sup>. Ból neuropatyczny jest opisywany jako palący, piekący, pulsujący, przeszywający, kłujący, ściskający czy miazdzący<sup>29</sup>. Wszystkie te odczucia bardzo niekorzystnie wpływają na jakość życia, natomiast leczenie jest szczególnie trudne ze względu na złożony i nie do końca jeszcze poznany mechanizm powstawania. Uszkodzenia aksonów powodowane przez uraz mechaniczny, niedotlenienie, stan zapalny, czy nadmierną stymulację mogą wywołać degenerację włókien, zmiany w ich ogólnej liczbie, rozmieszczeniu, rozgałęzianiu, czy w ekspresji i składzie kanałów jonowych na powierzchni komórek satelitarnych i neuronów. To z kolei skutkuje ektopową pobudliwością elektryczną aferentnych aksonów i błędną transmisją sygnału, co również może nasilać rozwój bólu<sup>54-63</sup>. Poza tendencją do powtarzalnych spontanicznych wyładowań, uszkodzone aksony czuciowe są łatwo pobudzane przez stymulację mechaniczną. Ostatecznym skutkiem mechanizmów wyzwanych w konsekwencji uszkodzenia nerwów jest stan nieprawidłowej sygnalizacji do miejsc projekcji, co prowadzi do błędów na etapach transdukcji i transmisji informacji bólowej<sup>64-66</sup>. Kolejnym aspektem jest tworzenie połączeń pomiędzy włóknami A $\beta$  i C - tzw. „efaps” oraz zmian morfologicznych w tylnym rogu rdzenia kręgowego, polegających na patologicznych połączeniach pomiędzy jego warstwami. Zaburzenia te prowadzą do powstania odpowiedzi bólowej nawet w konsekwencji zadziałania bodźców niebólowych<sup>28</sup>. Zjawisko to nosi nazwę sensytyzacji, która rozwija się w odpowiedzi na stymulację neuronów czuciowych, co w miejscu uszkodzenia przyczynia się do uwalniania czynników nocyceptywnych, zarówno przez neurony jak i komórki immunologiczne<sup>58</sup>. Dane literaturowe wskazują, że z komórek immunologicznych to neutrofile reagują jako pierwsze, a następnie dochodzi do chemotaksji makrofagów i limfocytów zarówno do miejsca uszkodzenia jak i do zwojów korzeni grzbietowych. Komórki te odgrywają kluczową rolę w rozwoju sensytyzacji obwodowej. Natomiast liczne badania sugerują istotny udział neutrofilii, makrofagów i mikrogleju w rozwoju sensytyzacji ośrodkowej na poziomie rdzenia kręgowego<sup>67-72</sup>. Ból neuropatyczny jest sam w sobie chorobą, która wymaga wielokierunkowego postępowania terapeutycznego. Jednakże mechanizm jego powstawania do dziś nie jest w pełni wyjaśniony i wymaga dalszych wnikliwych badań. W trakcie realizacji badań w ramach projektów OPUS

2016/21/B/NZ4/00128 oraz OPUS 2021/43/B/NZ7/00230, które stały się przedmiotem tej pracy, dążyliśmy do lepszego zrozumienia nieznanych lub wciąż słabo zbadanych zmian wywoływanych uszkodzeniem obwodowego układu nerwowego. Niewątpliwie interakcje pomiędzy poszczególnymi typami komórek są ważne, a dane dotyczące tego zjawiska wciąż niekompletne. Rosnąca liczba doniesień naukowych dotyczących neuropatii sugeruje, że jednymi z kluczowych mediatorów bólowych są chemokiny<sup>73</sup>, co jest omówione w kolejnym podrozdziale.

### **1.3. Zmiany immunologiczne po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego**

Po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego dochodzi do szeregu zmian w obrębie czynników immunologicznych, które odgrywają istotną rolę w procesach naprawczych, regulacyjnych i zapalnych. Ze względu na to, że aktywacja wtórnych kaskad molekularnych rozwija się w ciągu kilku dni po pierwotnym uszkodzeniu, są szanse na farmakologiczne interwencje terapeutyczne<sup>74</sup>. Konieczne jest jednak poznanie czynników leżących u podłoża rozwijających się procesów, które zaburzą funkcjonowanie układu nerwowego. Ze względu na stosunkowo skromne dane literaturowe, w prowadzonych badaniach skupiliśmy się na roli inicjatorów aktywacji układu dopełniacza oraz wybranych chemokin.

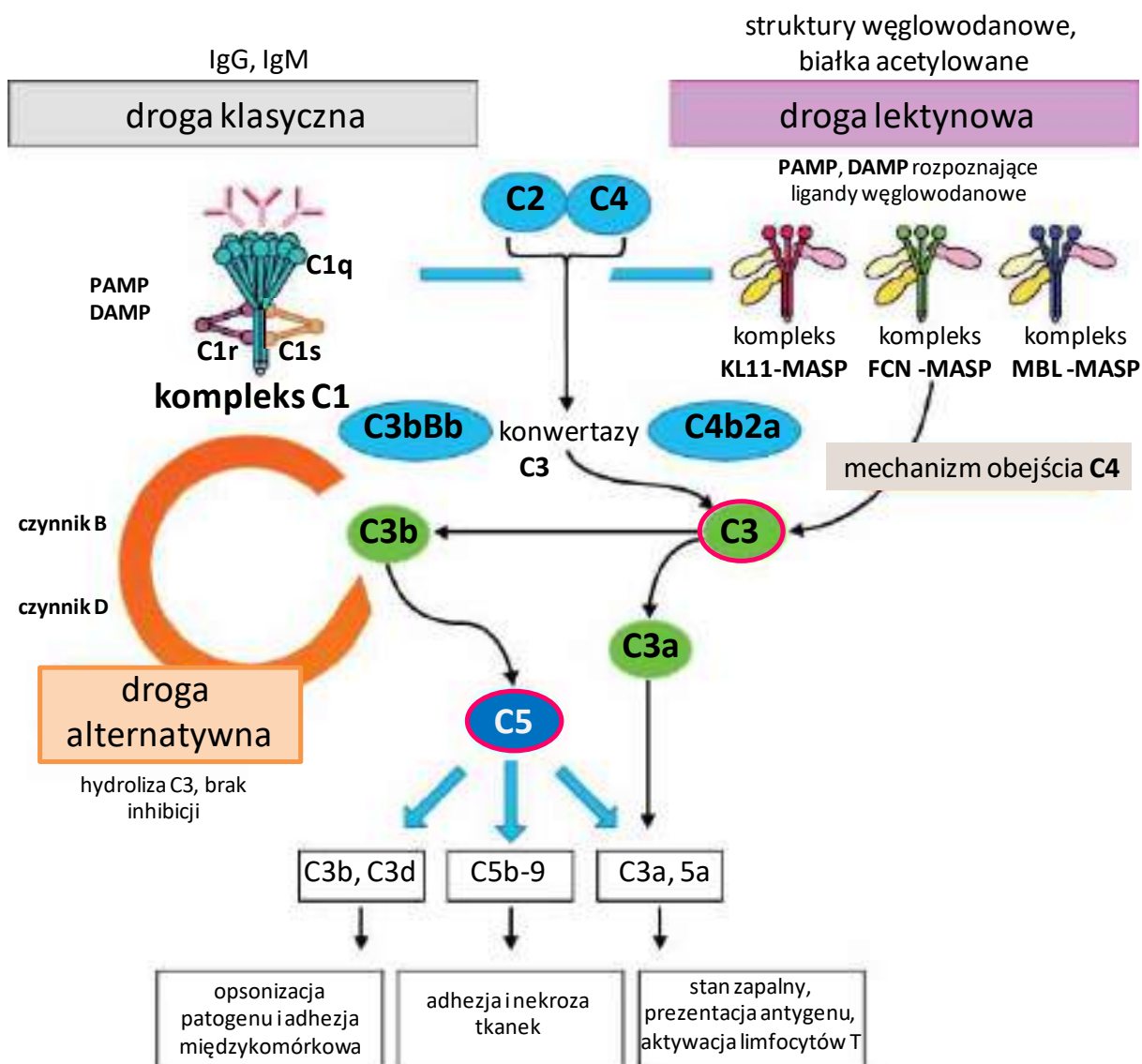
#### **1.3.1. Układ dopełniacza**

Układ dopełniacza działa jako główny koordynator stanu zapalnego, fagocytozy i śmierci komórek. Pośredniczy on w patofizjologii różnych stanów chorobowych takich jak uszkodzenie niedokrwienne, urazy i inwazja patogenów. Jego aktywacja może nastąpić za pomocą różnych dróg: klasycznej, lektynowej i alternatywnej, składających się z określonych inicjatorów i enzymów efektorowych (**Rycina 3**). W przypadku jego aktywacji za pośrednictwem każdej z tych dróg, dochodzi do utworzenia konwertazy C3. Rozszczepia ona nieaktywne C3 na aktywne fragmenty a i b. Następnie, poprzez wygenerowanie konwertazy C5 i aktywnych fragmentów a i b, dochodzi do pełnej aktywacji kaskady z wytworzeniem kompleksu oddziałującego na błonę, prowadzącego do lizy komórek. Funkcjonalnie układ dopełniacza można podzielić na dwie główne części: kaskadę enzymatyczną i szlak lityczny. Kaskada enzymatyczna generuje cząsteczki potrzebne do zainicjowania szlaku litycznego, w którym rozpuszczalne białka przechodząc zmiany konformacyjne umożliwiają tworzenie kompleksu atakującego błonę<sup>75</sup>.

**Droga klasyczna** zaczyna się od aktywacji kompleksu C1, który składa się z wykrywającej cząsteczki C1q i dwóch heterodimerów utworzonych przez proenzymy C1r i C1s<sup>75,76</sup> (**Rycina 3**). Niewątpliwie najważniejszą cechą tej drogi aktywacji dopełniacza jest jej zależność od przeciwciał, ponieważ głównymi celami C1q są antygeny połączone ze specyficznymi przeciwciałami IgG1, IgG2 i IgG3 (ale nie IgG4) lub IgM<sup>77</sup>. Same przeciwciała nie są w stanie zniszczyć antygeny z którym się związały, jednak uruchamiają enzymy efektorowe dopełniacza. Przy braku przeciwciał specyficznych dla patogenu, C1q może inicjować obronę poprzez wiązanie bezpośrednio na powierzchni patogenów, a także może wchodzić w interakcje z cząsteczkami takimi jak wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMP) oraz wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP) lub substancjami takimi jak np.: pentaksyna 3, białko C-reaktywne, mielina, fosfatydyloseryna, laminina, aktyna, adiponektyna, fibryle amyloidowe, kardiolipina, fibronektyna. Wszystkie z nich mogą powodować silny stan zapalny<sup>76</sup>. Najnowsze dane wskazują, że C1q jest również lokalnie produkowany w ośrodkowym układzie nerwowym i może odgrywać rolę w modulowaniu funkcji mikrogleju oraz w procesie eliminowania niektórych synaps<sup>78</sup>. Wiązanie C1q indukuje zmiany konformacyjne i aktywację proteaz serynowych C1r i C1s<sup>78</sup>. Powstały kompleks enzymatyczny C1qC1r2C1s2 pośredniczy w rozszczepianiu natywnego C4, a następnie rozszczepianiu C2 i późniejszym tworzeniu konwertazy C3 (C4bC2a) i dalszej aktywacji kaskady aż do wytworzenia kompleksu atakującego błonę<sup>76,78,79</sup> (**Rycina 3**).

**Droga lektynowa** jest obecnie uważana za najskuteczniejszą barierę immunologiczną odporności wrodzonej (**Rycina 3**). Proces jej aktywacji przypomina w dużej mierze aktywację szlaku klasycznego, jednak w tym przypadku antygen nie musi zostać rozpoznany przez przeciwciała. Struktury węglowodanowe lub białka acetylowane występujące na powierzchni uszkodzonych komórek są rozpoznawane przez drogę lektynową. Wykorzystuje ona inicjatory takie jak lektyny wiążące mannozę (u ludzi: MBL; u gryzoni: dwie izoformy MBL-A i -C), fikoliny (u ludzi: FCN-1, -2 i -3; u gryzoni: FCN-A i -B) i kolektyny takie jak kolektyna-11 (KL-11), które wykrywają sygnały o niebezpieczeństwie ze strony patogenów i innych zagrożeń. Aktywowane przez te sygnały enzymy (wiązące mannozę, skojarzone z lektyną proteazy serynowe: MASP-1, -2 oraz -3) pośredniczą w produkcji C4b<sup>80</sup>. Jednak co ważne, to przy braku MASP-2, ale nie MASP-1/-3, zaobserwowano całkowite zahamowanie aktywacji ścieżki lektynowej<sup>81,82</sup>. Od tego momentu szlak lektynowy obejmuje te same etapy, co ścieżka klasyczna (**Rycina 3**). W skrócie, na drodze dalszych przemian

polegających na rozszczepianiu kolejnych kompleksów i tworzeniu konwertaz, inicjowana jest druga część systemu - szlak lityczny, w którym powstaje kompleks atakujący błonę.



**Rycina 3.** Uproszczony schemat aktywacji układu dopełniacza trzema głównymi drogami: klasyczną, lektynową i alternatywną. W przypadku drogi klasycznej najczęściej następuje wiązanie C1q przez immunoglobulinę. Jednak C1q może wiązać również inne cząsteczki jak PAMP oraz DAMP. Tymczasem droga lektynowa jest inicjowana przez wiązanie lektyny wiążącej mannozę (MBL), kolektyny 11 (KL-11), ficoliny (FCN) z PAMP lub DAMP rozpoznającymi ligandy węglowodanowe. Na schemacie przedstawiono również mechanizm obejścia C4, w którym MASP-2 w połączeniu z cząsteczkami lektyny bezpośrednio rozszczepia C3. Droga alternatywna jest aktywowana przez wiązanie C3b z powierzchnią komórki i działa jako proces amplifikacji centralnego składnika dopełniacza C3, w którym zbiegają się zarówno szlaki lektynowy, jak i klasyczny. Poprzez szereg konwertaz generowane są enzymy efektorowe układu dopełniacza, są to: C3b i jego metabolit C3d (pośredniczą w opsonizacji i adhezji komórka-komórka), kompleks atakujący błonę (MAC, C5b-9) C3a i C5a (anafilatoksyny). Czynniki, których zaangażowania w transmisję nocycyptyczną dowiedziono, zaznaczone zostały czerwoną obwódką – schemat opracowany według Nauser i wsp., 2018<sup>83</sup>, zmieniony na podstawie literatury<sup>84-86</sup>

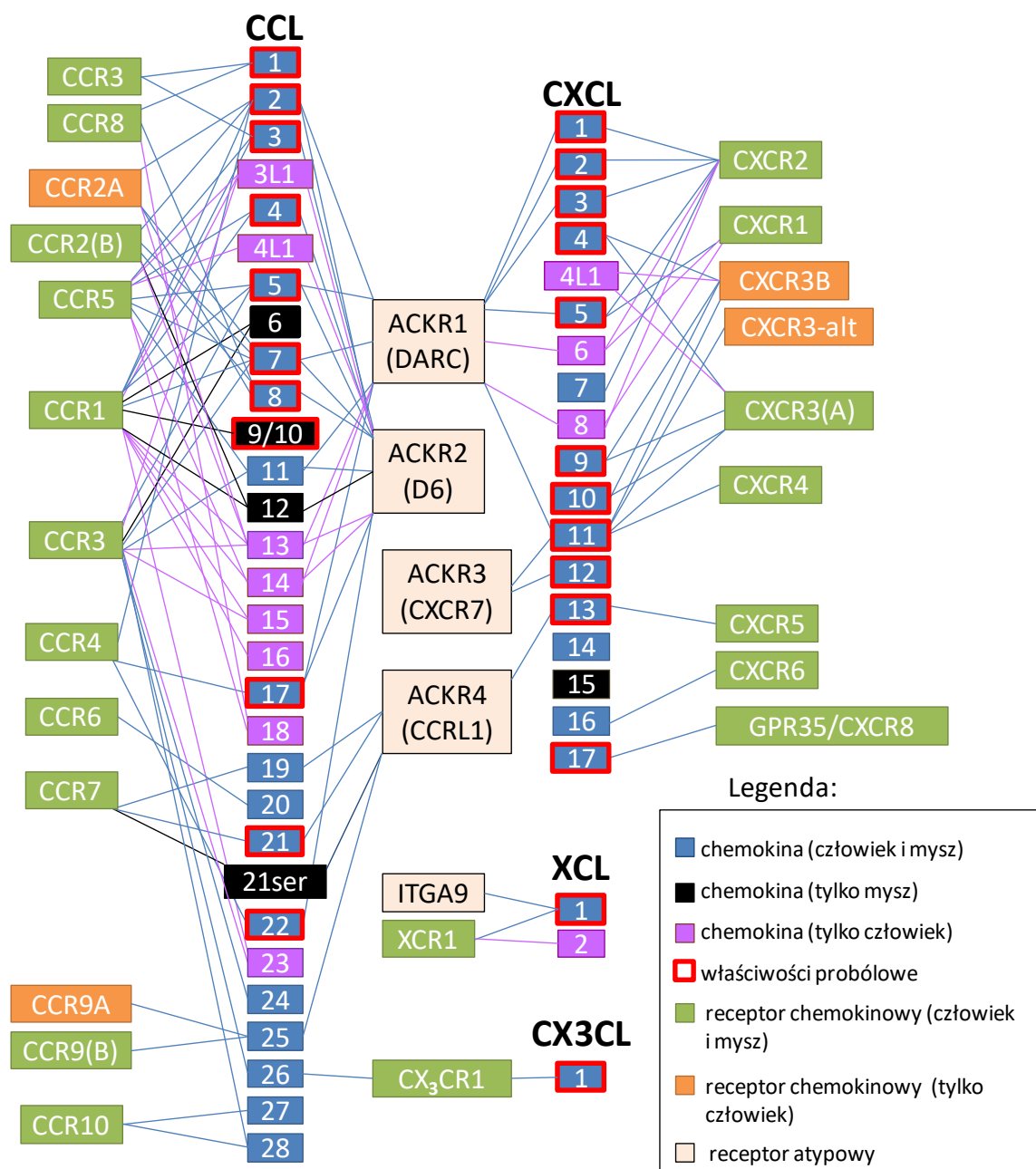
Układ dopełniacza, składający się z licznych białek i receptorów, pełni ważną funkcję w odpowiedzi immunologicznej po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Dane kliniczne dostarczają dowodów na jego zaangażowanie w liczne schorzenia dotyczące uszkodzenia obwodowego układu nerwowego takie jak: zespół Guillaina-Barrégo<sup>87</sup>, przewlekła zapalna polineuropatia demielinizacyjna<sup>88,89</sup>, czy ból neuropatyczny<sup>86</sup>, a także w liczne schorzenia ośrodkowego układu nerwowego jak na przykład stwardnienie rozsiane<sup>90-93</sup>, stwardnienie zanikowe boczne<sup>94</sup>, autoimmunologiczne zapalenie mózgu<sup>95</sup>, choroba Alzheimera<sup>96</sup>, choroba Huntingtona<sup>97</sup> i schizofrenia<sup>98</sup>. Ponadto jego aktywacja może występować na różnych etapach postępującej patogenezy ośrodkowego układu nerwowego<sup>76</sup>. W przypadku urazowego uszkodzenia mózgu, wykazano, że w wyniku aktywacji układu dopełniacza może dochodzić do naruszenia bariery krew-mózg i rozwoju procesów neurodegeneracyjnych<sup>99-101</sup>. Dotychczasowe badania na myszach wykazały tendencję do zwiększonej ekspresji mRNA *Clq* po urazowym uszkodzeniu mózgu, zarówno we wzgórzu, jak i korze mózgowej<sup>39</sup>, podczas gdy transkrypty *Clr* i *Cls* nie zostały wykryte. Znany jest również fakt znacznej kumulacji *Clq* na synapsach w hipokampie, co jak wykazano prowadzi do ich utraty 30 dni po urazie<sup>102</sup>. Nie badano natomiast dotychczas inicjatorów klasycznej drogi aktywacji dopełniacza w prążkowie, dlatego stało się to przedmiotem analiz będących częścią tej pracy. Jeszcze mniej wiadomo było na temat zaangażowania drogi lektynowej w rozwój urazowego uszkodzenia mózgu, a dostępne dane literaturowe dotyczyły głównie zmian poziomu jej inicjatorów w osoczu pacjentów. Zaobserwowano m.in., że wyższe poziomy FCN-2, -3, a w szczególności MASP-2 wcześniej po urazie były skorelowane z rozwojem niekorzystnych symptomów po 90 dniach. Objawy obejmowały ciężką niepełnosprawność, stan wegetatywny, czy nawet śmierć<sup>15</sup>. Podobne konkluzje płyną z badań grupy prof. M.G. De Simoni. Naukowcy Ci dowiedli, że myszy MASP-2<sup>-/-</sup>, MBL<sup>-/-</sup> i FCN-A<sup>-/-</sup> wykazywały poprawę deficytów czuciowo-ruchowych w porównaniu z myszami typu dzikiego, a spośród nich zwierzęta MASP-2<sup>-/-</sup> największą<sup>103</sup>. Niekompletne dane literaturowe przyczyniły się do przeprowadzenia w ramach tej pracy kompleksowych badań na poziomie tkanki mózgowej. Ich celem stało się określenie zdolności syntezy inicjatorów drogi klasycznej i lektynowej w korze mózgowej (czyli w miejscu uszkodzenia) oraz również w głębszych strukturach mózgu, w wielu punktach czasowych. Poznanie zależnych od czasu zmian ekspresji poszczególnych czynników odpowiedzialnych za inicjację aktywacji układu dopełniacza stwarza bowiem możliwości jego modulacji w fazie początkowej i duże pole do planowania przyszłych terapii uszkodzeń układu nerwowego.



### 1.3.2. Chemokiny

Chemokiny to bardzo duża grupa cytokin o wciąż nie w pełni poznanej roli w ośrodkowym układzie nerwowym. U ludzi zidentyfikowano co najmniej 46 chemokin i 24 receptory chemokin<sup>20</sup>, natomiast u myszy 39 chemokin i 19 receptorów chemokin<sup>20</sup>. Obecnie obowiązująca nomenklatura została stworzona przez Złotnik i wsp., którzy wprowadzili system klasyfikacji opisujący ligandy chemokinowe jako „L” i receptory jako „R”<sup>104</sup>. Ze względu na reszty cysteinowe w cząsteczkach podzielili chemokiny na 4 grupy, czyli CC-, CXC-, XC- i CX3C-. Każda chemokina nosi nazwę zawierającą przedrostek CCL-, CXCL-, XCL- lub CX3CL-, a receptor CCR-, CXCR-, XCR- lub CX3CR- (**Rycina 4**).

**Grupa CC-** jest największa i charakteryzuje ją występowanie bezpośrednio po sobie dwóch pierwszych, konserwatywnych reszt cysteinowych, a jej członkowie mają szerokie spektrum działania<sup>105</sup>. Chemokiny należące do tej grupy odgrywają ważną rolę w rozwoju m.in. chorób autoimmunologicznych oraz neurodegeneracyjnych co zostało już dobrze udokumentowane<sup>106–108</sup>. Najnowsza literatura sugeruje, że osłabienie działania zarówno CCL2, jak i CCL5 może być korzystne w leczeniu urazowego uszkodzenia mózgu<sup>109</sup>. Również u pacjentów po udarze występuje wzrost ekspresji CCL2 w płynie mózgowo-rdzeniowym<sup>110,111</sup> i surowicy<sup>112</sup>. Ponadto dowiedziono, że poziom CCL5 jest podniesiony w osoczu po uszkodzeniu mózgu, a jego stężenie koreluje ze złym rokowaniem u pacjentów<sup>113</sup>. W badaniach prowadzonych w ramach grantu ERA-NET, jednak nie stanowiących części tej pracy doktorskiej, pokazano po raz pierwszy wzrost CCL2 nie tylko w korze mózgowej, czyli w miejscu bezpośredniego uszkodzenia, ale także w strukturach głębszych takich jak wzgórze i prądkowie, w różnych punktach czasowych<sup>114</sup>. Dodatkowo udowodniono, że CCL7 i CCL12 ulegają podobnym zmianom<sup>114</sup>. Jak pokazują prace badawcze prowadzone od lat w Zakładzie Farmakologii Bólu przez zespół prof. Joanny Miki, aż 11 chemokin z grupy CC- ma bardzo silne właściwości pronocyceptywne po podaniu podpajęczynówkowym: CCL1<sup>115</sup>; CCL2<sup>116,117</sup>; CCL3<sup>117,118</sup>; CCL4<sup>118</sup>; CCL5<sup>117</sup>; CCL7<sup>116,117</sup>; CCL8<sup>117</sup>; CCL9<sup>117,118</sup>; CCL17<sup>119</sup>; CCL21<sup>120</sup>; i CCL22<sup>119</sup>. Z kolei neutralizacja niektórych z nich, np. CCL1<sup>115</sup>, CCL2<sup>116</sup>, CCL7<sup>116</sup> oraz blokada kilku receptorów chemokinowych np. CCR2<sup>106</sup>, CCR3<sup>121</sup>, CCR4<sup>122</sup>, CCR5<sup>123</sup> zmniejsza rozwój objawów bólowych w zwierzęcych modelach neuropatii. W badaniach prowadzonych w ramach tej pracy doktorskiej skupiliśmy się na słabo do tej pory poznanych trzech chemokinach (CCL3, CCL4, CCL9) z rodziny MIP-1 oraz ich receptorach CCR1 i CCR5, co jest dokładniej opisane w następnym podrozdziale.



**Rycina 4.** Występowanie i powinowactwo chemokin do klasycznych receptorów chemokinowych sprzężonych z białkiem G oraz do ich atypowych receptorów. Chemokiny, których probolowych właściwości dowiedziano w badaniach na myszach, zaznaczone zostały czerwoną obwódką – schemat opracowany według Hughes i Nibbs, 2018<sup>20</sup>, zmieniony na podstawie literatury<sup>115–118,120,124–141</sup> **Legenda:** 21ser – izoforma serynowa liganda chemokinowego z rodziny CC-; 3L1 – ligand chemokinowy 3 z rodziny CC- podobny do 1; 4L1– ligand chemokinowy 4 z rodziny CC- podobny do 1; ACKR – atypowy receptor chemokinowy; CCL– ligandy chemokinowe z rodziny CC-; CXCL – ligandy chemokinowe z rodziny CXC-; CX3CL – ligandy chemokinowe z rodziny CX3C-; DARC – antygen Duffy; XCL – ligandy chemokinowe z rodziny XC-

**Grupa CXC-** jest drugą co do wielkości<sup>105</sup> i charakteryzuje się występowaniem pojedynczego aminokwasu między dwiema pierwszymi resztami cysteiny i liczy 17 przedstawicieli. Dowiedziono zmian wielu z nich po urazowym uszkodzeniu mózgu, między innymi wzrostu poziomu CXCL1<sup>142</sup>, CXCL8<sup>143</sup>, CXCL10<sup>109,143,144</sup>, CXCL12<sup>109</sup>,

CXCL13<sup>144,145</sup>. Ponadto pokazano zwiększoną ekspresję osi CXCL12-CXCR4 w hipokampie pacjentów z padaczką skroniową, głównie w mikrogleju, ale także w astrogleju<sup>146</sup>. Wykazano, że CXCL12 aktywuje mikroglej oraz nasila uwalnianie glutaminianu, powodując nadpobudliwość neuronów<sup>146</sup>. Również po udarze mózgu zaobserwowano wyższy poziom CXCL12<sup>147</sup>. Tak jak wspomniano wcześniej, ból ośrodkowy jest często odczuwany u pacjentów po uszkodzeniach mózgu, w tym w obszarach oddalonych od miejsca urazu. Niewiele doniesień tłumaczy, dlaczego tak się dzieje. Natomiast najnowsze dane literaturowe sugerują, że na poziomie rdzenia kręgowego po urazowym uszkodzeniu mózgu, dochodzi do zaburzeń w zstępujących drogach bólowych co powoduje aktywację chemokin, w tym tych będących ligandami CXCR2<sup>36</sup>. Dowiedziono, że CXCR2 przyczynia się do sensytyzacji ośrodkowej po urazowym uszkodzeniu mózgu, a podanie selektywnego antagonisty CXCR2 (SCH527123)<sup>36</sup> uśmierza ból. Co ważne wiele chemokin z grupy CXC ma już bardzo dobrze udokumentowane działanie probólowe, na przykład CXCL1<sup>141</sup>, CXCL2<sup>141</sup>, CXCL3<sup>141</sup>, CXCL4<sup>120</sup>, CXCL9<sup>120</sup>, CXCL10<sup>120</sup>, CXCL11<sup>120</sup>, CXCL12<sup>148</sup>, CXCL13<sup>125</sup>, CXCL14<sup>149</sup> i CXCL17<sup>126</sup>, a ich blokowanie za pomocą przeciwciał neutralizujących oraz przy użyciu antagonistów ich receptorów wykazuje efekty analgetyczne. Zaobserwowano zmiany CXCL1, CXCL11, CXCL12, CXCL13 w modelu podwiązania nerwu rdzeniowego<sup>150-153</sup> oraz CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 w modelu podwiązania nerwu kulszowego<sup>154</sup>, a także CXCL1, CXCL5, CXCL9, CXCL12 w bolesnej neuropatii cukrzycowej<sup>124</sup>. Ponadto, blokada i/lub inaktywacja genów receptorów chemokinowych CXCR2<sup>141</sup>, CXCR3<sup>120</sup>, CXCR4<sup>148</sup> oraz CXCR5<sup>125</sup>, przynosi ulgę w bólu neuropatycznym. Podsumowując, udział chemokin z grupy CXC- zarówno w procesach neurodegeneracyjnych jak i nocyceptywnych po uszkodzeniu układu nerwowego jest bardzo dobrze udokumentowany, wciąż jednak brakuje narzędzi farmakologicznych, które mogłyby być z powodzeniem zastosowane w klinice.

**Grupa XC-** składa się z dwóch blisko spokrewnionych cząsteczek: XCL1 i XCL2<sup>155,156</sup>, które mają tylko dwie z czterech konserwatywnych cystein. Gen kodujący XCL1, ale nie XCL2, występuje u myszy<sup>156</sup>, stąd nie uwzględniliśmy tej drugiej chemokiny w opisanych w tej pracy badaniach. Wiadomo od dawna, że XCL1 działa poprzez receptor chemokinowy XCR1<sup>157</sup>, natomiast w ostatnich latach pojawiły się dane pochodzące z badań *in vitro* które pokazały, że ta chemokina wykazuje również powinowactwo do integryny alfa-9 (ITGA9)<sup>158</sup>, co jest niezmiernie ciekawe i wpłynęło na nasze postulaty badawcze. Co szczególnie istotne, nie ma wielu badań dotyczących zmian poziomu XCL1 u ludzi po uszkodzeniach układu nerwowego. Nie był on badany u pacjentów po uszkodzeniu mózgu, ani nerwów

obwodowych. Dlatego informacje na temat tej słabo poznanej grupy XC- pochodzą jedynie z nielicznych badań na zwierzętach, co zostało przybliżone w podrozdziale poniżej.

Do **grupy CX3C-** należy tylko jedna chemokina mianowicie CX3CL1, powszechnie znana jako fraktalkina <sup>105</sup>. Charakteryzuje się ona posiadaniem trzech niekonserwatywnych aminokwasów pomiędzy dwiema pierwszymi resztami cysteinowymi. Wykazano, że CX3CL1 jest produkowana głównie przez komórki neuronalne i działa poprzez CX3CR1, który znajduje się w ośrodkowym układzie nerwowym głównie na mikrogleju <sup>159</sup>. Choć wydaje się, że zarówno związane z błoną, jak i rozpuszczalne formy CX3CL1 wchodzi w interakcje z CX3CR1, prawdopodobnie mają one różne zdolności sygnalizacyjne <sup>160</sup>. CX3CL1 sprzyja neurodegeneracji <sup>160</sup>, a jej poziom znacznie wzrasta w korze mózgowej w modelu urazowego uszkodzenia mózgu u szczurów przyczyniając się do aktywacji mikrogleju <sup>161</sup>. Ponadto w neuropatii oś CX3CL1/CX3CR1 bierze udział w rozwoju nadwrażliwości bólowej <sup>162,163</sup>. Niewątpliwie należy dokładniej zbadać interakcje neuroimmunologiczne, pośredniczone przez CX3CL1/CX3CR1, których zaburzenia obserwuje się po uszkodzeniach układu nerwowego o różnej etiologii <sup>164</sup>. Modułacja CX3CR1 jest obecnie możliwa ze względu na dostępność niedawno odkrytego antagonisty AZD8797 <sup>165</sup>, a takie badania mogą zaowocować poprawą terapii w przyszłości.

Podsumowując, zarówno po urazowym uszkodzeniu mózgu jak i nerwów obwodowych, odpowiedź chemokin nie jest uniwersalna i charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem. Dlatego wnikliwe zbadanie tych czynników i dokładne rozróżnienie wzorca ich aktywacji w patologich układu nerwowego o odmiennej etiologii wydają się niezwykle istotne. Obiecujące, lecz wciąż niekompletne dane kliniczne i eksperymentalne spowodowały, że celem badań planowanych w ramach tej pracy doktorskiej stało się określenie zmian i poznanie roli trzech chemokin z grupy CC- oraz jednej z grupy XC- w procesach następujących po uszkodzeniach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego.

### **1.3.2.1. CCL3, CCL4, CCL9 i ich receptory**

Trzy chemokiny CCL3 (MIP-1-alfa), CCL4 (MIP-1-beta) i CCL9 (MIP-1-gamma) określane są zbiorczo nazwą rodzina MIP-1 (rodzina białka zapalnego makrofagów 1). Dotychczas pokazano wzrost poziomu CCL3 w mózgu w eksperymentalnym szczurzym modelu padaczki skroniowej wywołanej iniekcją kwasu kainowego <sup>166</sup> oraz podczas stresu oksydacyjnego wywołanego podaniem LPS <sup>167</sup>. Ponadto dowiedziono, że CCL3 jest zlokalizowana głównie w komórkach OX-42+ <sup>167</sup>. Dotychczas udokumentowano wzrost poziomu CCL3 i CCL9 w rdzeniu kręgowym i/lub zwojach korzeni grzbietowych po uszkodzeniu nerwu, zarówno u myszy i szczurów <sup>168-170</sup>. Zaobserwowano też wzrost poziomu

mRNA *CCL3* w korze i hipokampie u myszy w modelu urazowego uszkodzenia mózgu, jednakże eksperymenty przeprowadzono jedynie w 3 dni <sup>171</sup>. Co ważne, u pacjentów po słuczeniu mózgu pokazano zwiększenie ekspresji *CCL3* i *CCL4* w istocie białej <sup>172</sup>, co może świadczyć o ich zaangażowaniu w procesy neurodegeneracyjne. Ponadto, neutralizacja *CCL3* zapobiega rozwojowi zarówno ostrych, jak i nawracających objawów stwardnienia rozsianego (w modelu eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia rdzenia kręgowego i mózgu) oraz naciekaniu komórek jednojądrzastych do ośrodkowego układu nerwowego <sup>173–175</sup>. Dotychczas brakowało danych dotyczących zmian chemokin z rodziny MIP-1 w różnych strukturach mózgu oraz w wielu punktach czasowych, w związku z tym stało się to przedmiotem analiz tej pracy doktorskiej. Pozostałe eksperymenty przeprowadziliśmy również na poziomie rdzenia kręgowego po uszkodzeniu nerwu kulszowego. Z wcześniejszych badań zespołu prof. Miki wynikało, że chemokiny z rodziny MIP-1 mają silne właściwości pronocycyptywne <sup>117,118</sup> i są zaangażowane w rozwój bólu neuropatycznego spowodowanego cukrzycą <sup>118</sup>. Natomiast szczegółowa rola tych chemokin w transmisji nocycyptywnej pozostawała nie do końca wyjaśniona, stała się więc kolejnym przedmiotem naszych badań.

Chemokiny z omawianej rodziny oddziałują na komórki poprzez receptory sprzężone z białkiem G, mianowicie *CCR1* i *CCR5* <sup>176</sup>. Obydwa te receptory i ich ligandy odgrywają niebagatelną rolę w patologii stwardnienia rozsianego, co pokazano po raz pierwszy w modelu eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia rdzenia kręgowego i mózgu. We wspomnianym modelu myszy pozbawione genu *CCR1* wykazują zmniejszoną nadwrażliwość bólową po podrażnieniu acetonem oraz dochodzi u nich do słabszej aktywacji komórek immunologicznych na poziomie ośrodkowego układu nerwowego <sup>177</sup>. Co ważne analizy immunohistochemiczne wykonane na tkance mózgowej pochodzącej od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym wykazały dużą liczbę mikrogleju/makrofagów posiadających na swej powierzchni *CCR1* <sup>178</sup>, ale nie *CCR5*. Jednakże dane literaturowe świadczą o tym, że oba receptory mają znaczenie w przebiegu i ciężkości tej choroby <sup>179,180</sup>. Nieliczne odkrycia dotyczące zaangażowania *CCR1* i *CCR5* w procesy neurodegeneracyjne zachodzące po uszkodzeniach mózgu skłoniły nas do wykonania analizy na poziomie mRNA i białka w kilku strukturach mózgu, w mysim modelu urazowego uszkodzenia mózgu. Wiadomo było jedynie, że ekspresja *CCR5* wzrasta po udarze, a zablokowanie tego receptora korzystnie wpływa na regenerację <sup>181</sup>. Co ważne badania kliniczne przeprowadzone w grupie pacjentów po udarze dowodzą, że nosiciele naturalnie występującej mutacji powodującej utratę funkcji *CCR5*, szybciej wracają do zdrowia, a co więcej dochodzi u nich do poprawy

funkcji poznawczych<sup>182,183</sup>. Wykazano też, że zablokowanie CCR5 poprzez podanie marawiroku w modelach zwierzęcych korzystnie wpływa na regenerację motoryczną po udarze<sup>184</sup> oraz przyczynia się do poprawy funkcji poznawczych po urazowym uszkodzeniu mózgu<sup>185</sup>. Ponadto, wyniki badania przeprowadzonego przez zespół prof. Miki w modelu neuropatii cukrzycowej dowiodły, że pojedyncze podpajęczynówkowe podanie antagonisty CCR1 (J113863) w sposób zależny od dawki zmniejsza nadwrażliwość bólową u myszy<sup>118</sup>. Oprócz tego, badania zespołu udowodniły, że u szczurów po uszkodzeniu nerwu, marawirok podawany wielokrotnie podpajęczynówkowo zmniejsza odpowiedź immunologiczną w ośrodkowym układzie nerwowym<sup>123,186</sup>. W przypadku jednorazowych podań podpajęczynówkowych u myszy marawirok wykazuje jednak mniejszą skuteczność<sup>170</sup>. Dlatego ze względu na możliwość zastosowania niebadanych dotychczas pod tym kątem, silnych i selektywnych antagonistów CCR5 (TAK-220 i AZD-5672) kontynuowaliśmy eksperymenty nad rolą tego receptora w neuropatii. Ponadto, wcześniej uzyskano obiecujące wyniki po podaniu związków będących podwójnymi antagonistami, czyli cenicriwiroku (antagonisty CCR2/5)<sup>170</sup> oraz UCB35625 (antagonisty CCR1/3)<sup>117</sup>. Skłoniło nas to do sprawdzenia czy jednoczesna, podwójna blokada CCR1 i CCR5 jest skuteczniejsza od pojedynczej blokady każdego z tych receptorów, w uśmierzaniu bólu neuropatycznego.

### 1.3.2.2. XCL1 i jej receptory

Na temat roli XCL1, znanej również jako limfotaktyna lub SCM-1 $\alpha$ , po uszkodzeniach obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego dostępna jest ograniczona liczba danych literaturowych. Natomiast dowiedziono jej podwyższonego poziomu u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów<sup>187</sup>, w chorobie nowotworowej<sup>188,189</sup>, Leśniowskiego-Crohna<sup>190</sup> oraz w zakażeniu HIV-1<sup>191</sup>. Bird i wsp. w badaniach na skrawkach mózgu pokazali, że po ekspozycji tkanki pnia mózgu i nerwu trójdzielnego na XCL1 następuje zwiększenie poziomu c-Fos, pERK i pp38, które mogą przyczyniać się do rozwoju ośrodkowej sensytyzacji<sup>192</sup>. Co ważne badacze dowiedli także, że zwiększona przez XCL1 ekspresja wspomnianych czynników i pobudliwość neuronalna jest znacząco osłabiana poprzez podania antagonisty XCR1 (vMIP-II)<sup>192</sup>. Publikacja ta wskazuje, że po uszkodzeniu nerwu bródkowego u szczurów poziom XCL1 i XCR1 wzrasta w miejscu urazu, a XCL1 jest czynnikiem pronocyceptywnym w bólu ustno-twarzowym<sup>192</sup>. Również wcześniejsze badania zespołu prof. Miki dostarczyły dowodów na silne właściwości probólwe XCL1 po podaniu podpajęczynówkowym zwierzętom zdrowym<sup>128</sup>. Od dawna znanym jest fakt, że XCL1 może działać poprzez klasyczny receptor sprzężony z białkiem G - XCR1<sup>157</sup>. Jednak, co przełomowe, w ostatnich latach okazało się, że XCR1 nie jest jedynym receptorem dla XCL1.

Matsumoto i wsp. wykazali, że XCL1 wpływa na migrację fibroblastów działając poprzez ITGA9<sup>158</sup>, co niewątpliwie znacznie poszerzyło horyzonty badawcze. W ramach tej pracy doktorskiej postanowiliśmy sprawdzić czy oba te receptory są zlokalizowane na poziomie mózgu i rdzenia kręgowego oraz czy mogą być zaangażowane w zaburzenia transmisji nocyceptywnej.

#### 1.4. Terapia

Ból ma różną etiologię i jest trudny do scharakteryzowania, dlatego wielokrotnie próbowano stworzyć jego adekwatną definicję. Według Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu (ang. *International Association for the Study of Pain, IASP*) nazywamy nim „nieprzyjemne doświadczenie czuciowe i emocjonalne, związane z, lub przypominające to związane z faktycznym lub potencjalnym uszkodzeniem tkanki”<sup>193</sup>. W 1986 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zaproponowała schemat leczenia bólu, który nazwano drabiną analgetyczną<sup>194</sup>. Miał on na celu poprawę strategii leczenia bólu nowotworowego. To postępowanie przeszło na przestrzeni lat kilka modyfikacji i obecnie jest stosowane w leczeniu zarówno bólu nowotworowego, jak i nienowotworowego, w tym neuropatycznego<sup>195</sup>, który jest niezwykle trudny do uśmierzenia. Dotyczy to zarówno bólu neuropatycznego obwodowego, który powstaje w wyniku uszkodzenia I neuronu czuciowego, jak i ośrodkowego, który rozwija się po uszkodzeniu II lub III neuronu czuciowego w obrębie rdzenia kręgowego, pnia lub półkul mózgowych. Według statystyk jedynie u 50% cierpiących z powodu neuropatii udaje się załagodzić symptomy bólowe, niestety z umiarkowaną skutecznością wynoszącą zaledwie 30–50%<sup>196,197</sup>. Stosowanie strategii leczenia bólu zgodnie z drabiną analgetyczną WHO pozwala na jego zindywidualizowaną terapię oraz na zmniejszanie niepożądanych działań leków przeciwbólowych. Najnowsza drabina analgetyczna składa się z czterech stopni:

- **PIERWSZY** – obejmuje leczenie bólu łagodnego: stosuje się nieopiodowe leki przeciwbólowe (niesteroidowe leki przeciwzapalne, paracetamol i metamizol) oraz opcjonalnie leki wspomagające<sup>198,199</sup>.
- **DRUGI** – dotyczy leczenia bólu umiarkowanego: stosuje się słabe opioidy (hydrokodon, kodeina, tramadol) oraz analgetyki nieopiodowe i opcjonalnie leki wspomagające<sup>198,199</sup>.
- **TRZECI** – obejmuje leczenie bólu silnego: stosuje się silne opioidy (morfina, metadon, fentanyl, oksykodon, buprenorfina, tapentadol, hydromorfon, oksymorfon) oraz opcjonalnie analgetyki nieopiodowe i leki wspomagające<sup>198,199</sup>.

- **CZWARTY** – obejmuje procedury nefarmakologiczne, czyli np. zabiegi interwencyjne takie jak znieczulenie zewnątrzoponowe, dokanałowe podawanie leków przeciwbólowych i miejscowo znieczulających z pompą lub bez, zabiegi neurochirurgiczne (blokady nerwów, procedury ablacyjne, w tym krioablację, alkoholizację, fale radiowe, mikrofały, termoterapię indukowaną laserem, nieodwracalną elektroporację, elektrochemioterapię, cementoplastykę, a także radioterapię paliatywną)<sup>194,198</sup>.

W leczeniu neuropatii najczęściej stosowane są leki III stopnia drabiny analgetycznej oraz procedury IV stopnia<sup>198-200</sup>. Dodatkowo, w przypadku bólu po urazie mózgu stosuje się leki uspokajające, ponieważ dowiedziono, że sedacja poprawia parametry takie jak ciśnienie śródczaszkowe i mózgowy przepływ krwi<sup>200</sup>. Istotną grupą leków stanowią leki wspomagające, zwane także koanalgetykami, które często są także stosowane w celu nasilenia działania leków przeciwbólowych oraz zmniejszenia ich efektów niepożądanych. Zgodnie z rekomendacjami WHO w terapii bólu neuropatycznego w pierwszej kolejności należy rozważyć zastosowanie leków przeciwdrgawkowych (pregabaliny, gabapentyny), a w drugiej leków przeciwdepresyjnych z grupy trójcyklicznych antydepresantów (amitryptylina, imipramina, doksepina), inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (fluoksetyna, fluwoksamina, paroksetyna, sertralina, citalopram) lub inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (wenlafaksyna, duloksetyna, milnacipram). Stosowane są również miejscowe środki znieczulające (kapsaicyna), kortykosteroidy i kannabinoidy<sup>198</sup>. Silne opioidy są lekami trzeciego wyboru w terapii bólu neuropatycznego<sup>201</sup>, a ich stosowanie jest ograniczone ze względu na działania niepożądane, takie jak utrata przeciwbólowych właściwości, nudności, czy zaparcia. W leczeniu bólu neuropatycznego skuteczny efekt obserwuje się po podaniu dużo wyższych dawek aniżeli w bólu ostrym, a największą skuteczność po łącznych podaniach z lekami wspomagającymi<sup>201</sup>. Do najczęściej stosowanych leków opioidowych należą morfina i buprenorfina, które stały się przedmiotem badań przedstawionych w tej pracy. Istnieją dowody sugerujące, że wyciąg z maku lekarskiego był stosowany już w 3000 roku p.n.e. natomiast morfina została wyizolowana z opium dopiero w 1803 r. przez F. Sertürnera i to doprowadziło do jej zastosowania w terapii bólu w klinice<sup>202,203</sup>. Lek ten jest silnym agonistą receptora opioidowego  $\mu$  (MOR) oraz słabym  $\delta$  (DOR) i  $\kappa$  (KOR)<sup>204</sup>. Wśród jej skutków niepożądanych należy wymienić depresję oddechową, a także zaparcia, nudności, wymioty, świąd, sztywność mięśni, zwężenie źrenic<sup>205</sup>. Długotrwała terapia z wykorzystaniem tego związku może też przyczyniać się do upośledzenia funkcji poznawczych oraz dysforii<sup>205</sup>. Ponadto, udowodniono że w neuropatii morfina częściowo traci swoją efektywność,



a ponadto bardzo szybko rozwija się tolerancja na jej efekty analgetyczne, której następstwem jest stopniowe zwiększanie dawki, a co za tym idzie pojawianie się coraz silniejszych efektów niepożądanych<sup>206-208</sup>. Natomiast buprenorfina jest stosunkowo nowym, półsyntetycznym, silnym opioidem o bardziej złożonym mechanizmie działania niż morfina - jest bowiem częściowym agonistą MOR, receptora nocycetynowego (NOR) oraz antagonistą DOR i KOR<sup>28,209-211</sup>. Buprenorfina ma 30 razy silniejsze i 2 razy dłuższe działanie w porównaniu z morfiną, co umożliwia jej rzadsze dawkowanie<sup>212,213</sup>, ponadto nie zaburza funkcji poznawczych<sup>214</sup>. Jest wykorzystywana w przypadku silnego bólu neuropatycznego<sup>206</sup>. Niestety obydwie leki opioidowe wykazują ograniczoną skuteczność i dlatego wciąż poszukuje się innowacyjnych narzędzi farmakologicznych<sup>215</sup>.

Sygnalizacja opioidowa jest niewątpliwie związana z chemokinami, ponieważ przyczyniają się one do rozwoju tolerancji na morfinę<sup>216</sup> i utraty analgezji morfinowej w neuropatii<sup>217</sup>. Tworzenie heterodimerów z receptorami MOR i DOR przez receptory chemokinowe ma wpływ na efekty przeciwbólowe wielu konwencjonalnie stosowanych leków<sup>218,219</sup>. Wciąż istnieją możliwości stworzenia terapii opartej o nowe immunologiczne punkty uchwytu. Co ważne zmiany neuroimmunologiczne pojawiające się na poziomie mózgu i rdzenia kręgowego po uszkodzeniu układu nerwowego są podobne, chociaż nie identyczne dlatego ciągle potrzebne są dalsze badania w zwierzęcych modelach. W naszej opinii, farmakoterapia skojarzona oparta na dwóch lekach przeciwbólowych jest uzasadniona, jeśli stosowane leki posiadają różne mechanizmy działania, jak w przypadku modulacji systemów opioidowych i chemokinowych. Skuteczne przełożenie bogactwa danych z modeli zwierzęcych do wykorzystania w klinice może w przyszłości skutkować opracowaniem nowej terapii.

## 2. CEL BADAŃ

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie i porównanie zmian poziomu markerów wybranych komórek immunologicznych i glejowych oraz wydzielanych przez te komórki czynników na poziomie mózgu i/lub rdzenia kręgowego, odpowiednio po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Ponadto kolejnym celem było sprawdzenie efektów farmakologicznej modulacji wybranych chemokin i ich receptorów u myszy w modelu bólu neuropatycznego.

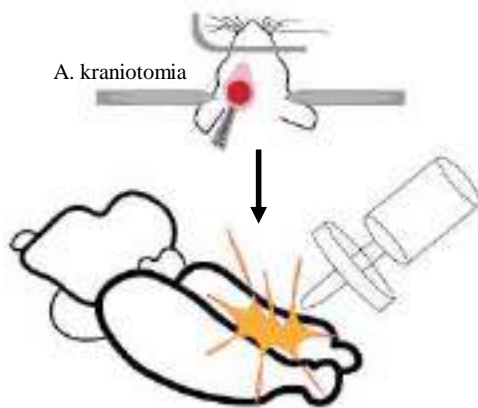
### CELE SZCZEGÓŁOWE

<b>Po kontrolowanym złuczeniu kory mózgowej (bezpośrednie uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego)</b>	
<b>I. Zbadanie zaangażowania komórek oraz inicjatorów układu dopełniacza poprzez określenie:</b>	
<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>zmian ekspresji wybranych markerów komórkowych i czynników układu dopełniacza zachodzących na przestrzeni 5 tygodni po urazie (w 1, 4, 7, 14, 35 dniu), w czterech wybranych strukturach mózgu (kora, wzgórze, prążkowie, hipokamp)</li><li>źródła komórkowego C1q - inicjatora klasycznej drogi układu dopełniacza</li></ul>
<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>w pierwotnych hodowlach komórkowych, czy mikroglej może być źródłem dla inicjatorów klasycznej i/lub lektynowej drogi aktywacji układu dopełniacza</li></ul>
<b>II. Określenie roli rodziny MIP-1 poprzez sprawdzenie:</b>	
<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>zmian ekspresji CCL3, CCL4, CCL9, CCR1, CCR5 zachodzących na przestrzeni 5 tygodni po urazie (w 1, 4, 7, 14, 35 dniu), w czterech wybranych strukturach mózgu (kora, wzgórze, prążkowie, hipokamp)</li></ul>
<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>w pierwotnych hodowlach komórkowych zmian ekspresji CCR1 i CCR5 na powierzchni komórek mikrogleju i astrogleju po stymulacji LPS</li></ul>
<b>III. Sprawdzenie zaangażowania XCL1 poprzez zweryfikowanie:</b>	
<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>zmian ekspresji XCL1, XCR1, ITGA9 zachodzących na przestrzeni 5 tygodni po urazie (w 1, 4, 7, 14, 35 dniu), w trzech wybranych strukturach mózgu (kora, wzgórze, hipokamp)</li></ul>
<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>zmian ekspresji XCL1, XCR1, ITGA9 w hodowli komórek mikrogleju i astrogleju po stymulacji LPS</li><li>zmian w wydzielaniu wybranych cytokin przez pierwotne hodowle komórkowe mikrogleju i astrogleju po zastosowaniu XCL1</li></ul>
<b>Po podwiązaniu nerwu kulszowego (bezpośrednie uszkodzenie obwodowego układu nerwowego)</b>	
<b>I. Zbadanie zaangażowania komórek układu immunologicznego poprzez określenie:</b>	
<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>zmian ekspresji wybranych markerów komórkowych zachodzących na przestrzeni 5 tygodni po urazie (w 1, 4, 7, 14, 35 dniu) w rdzeniu kręgowym</li></ul>
<b>II. Określenie roli rodziny MIP-1 poprzez sprawdzenie:</b>	
<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>zmian ekspresji CCL3, CCL4, CCL9, CCR1, CCR5 zachodzących w rdzeniu kręgowym na przestrzeni 5 tygodni po urazie (w 1, 4, 7, 14, 35 dniu)</li></ul>
<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>wpływu neutralizacji CCL3 i CCL4 oraz blokady CCR1 i CCR5:<ul style="list-style-type: none"><li>na objawy bólu neuropatycznego</li><li>na efekty przeciwbólowe leków opioidowych</li></ul></li><li>efektywności jednoczesnej blokady receptorów CCR1 i CCR5:<ul style="list-style-type: none"><li>na objawy bólu neuropatycznego</li></ul></li></ul>
<b>III. Sprawdzenie zaangażowania XCL1 poprzez zweryfikowanie:</b>	
<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>zmian ekspresji XCL1, XCR1, ITGA9 zachodzących na przestrzeni 5 tygodni po urazie (w 1, 4, 7, 14, 35 dniu) w rdzeniu kręgowym</li><li>źródła XCL1 i lokalizacji komórkowej XCR1, ITGA9</li></ul>
<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>przez który receptor XCL1 wykazuje probólowe działanie (u myszy zdrowych)</li><li>wpływu neutralizacji XCL1 oraz zablokowania jej receptorów:<ul style="list-style-type: none"><li>na objawy bólu neuropatycznego</li><li>na efekty przeciwbólowe leków opioidowych</li></ul></li></ul>

### 3. METODOLOGIA BADAŃ

#### **Badania *in vivo*:**

- **w modelu urazowego uszkodzenia mózgu** (ang. *Traumatic Brain Injury* – **model TBI**, opracowany przez Lighthall i współpracowników w latach 1988-1990) prowadzone były badania we współpracy z grupą włoską prof. M.G. De Simoni, na samcach myszy C57BL/6J (Charles River, Włochy). Wszystkie procedury dotyczące zwierząt i opieki nad nimi przeprowadzono w Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri zgodnie z wytycznymi krajowymi i przepisami polityki międzynarodowej (prot.9F5F5.81 nr 753/2017-PR). Wyniki opublikowano w 3 pracach oryginalnych [Ciechanowska i wsp. Immunobiology 2020](#), [Pharmacol Rep 2020](#), [Int J Mol Sci 2021](#) <sup>220-222</sup>. Kontrolowane stłuczenie kory mózgowej (ang. Controlled Cortical Impact), przy pomocy specjalistycznej aparatury, pozwala na nadzorowanie siły i prędkości z jakimi przeprowadzane jest urazowe uszkodzenie mózgu. To przyczynia się do niezawodności, dokładności i co bardzo ważne powtarzalności modelu. Przed przystąpieniem do procedury myszy znieczulano za pomocą izofluranu i umieszczano w aparacie stereotaktycznym. Zwierzęta poddawano kraniotomii (**Rycina 5A**) wyśrodkowanej pomiędzy szwem strzałkowym, a wieńcowym (z granicami w pobliżu lambda i bregma) po stronie lewej, a następnie wykonywano kontrolowane stłuczenie kory mózgowej. Do przeprowadzenia urazu wykorzystywano sztywny 3-milimetrowy pręt napędzany przez pneumatyczny tłok, który był osadzony stabilnie pod kątem 20° do płaszczyzny pionowej i prostopadle do odsłoniętej opony twardej (**Rycina 5**). Poruszał się on z prędkością 5 m/s i docierał do 1 mm w głąb tkanki mózgowej, co powodowało uraz. Następnie wykonywano kranioplastykę i zszywano skórę głowy. Myszy pozornie uszkodzone (sham) zostały poddane identycznym procedurom operacyjnym z pominięciem uszkodzenia.
- **w modelu podwiązania nerwu kulszowego** (ang. *Chronic Constriction Injury of the sciatic nerve* – **model CCI** opracowany przez Bennetta & Xie w 1988) prowadzone były eksperymenty na samcach myszy Albino Swiss (Charles River, Niemcy). Jest to procedura od lat wykorzystywana z powodzeniem w Zakładzie Farmakologii Bólu. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja zgodnie z zaleceniami Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu (*International Association for the Study of Pain, IASP*) oraz zasadami Narodowego Instytutu Zdrowia (*National Institute of Health, NIH*) dotyczącymi opieki nad zwierzętami laboratoryjnymi oraz za zgodą II LKE do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (nr 1277/2015, 301/2017, 75/2017, 305/2017, 235/2020, 40/2023, 236/2021, 297/2021, 89/2021, 98/2022). Podczas zabiegu, w znieczuleniu izofluranem, nacinano skórę na prawym udzie, odsłaniało nerw kulszowy, który był następnie trzykrotnie, luźno podwiązany w odstępach 1 mm (**Rycina 6**), aż do zaobserwowania krótkiego drgnięcia w operowanej kończynie. Wyniki opublikowano w 2 pracach oryginalnych [Ciechanowska i wsp. Front Immunol 2022](#), [Brain Sci 2023](#) <sup>127,223</sup>.



**Rycina 5.** Model urazowego uszkodzenia mózgu – schemat własny

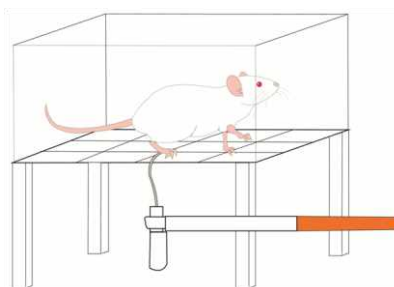


**Rycina 6.** Model podwiązania nerwu kulszowego – schemat własny

- **material do badań biochemicznych** pochodził ze zwierząt kontrolnych oraz poddanych zabiegom, w następujących punktach czasowych: **1, 4, 7, 14, 35 dni**. W pierwszym cyklu badań analizy prowadzono na korze mózgowej, wzgórzu, prążkowi i/lub hipokampie po **urazowym uszkodzeniu mózgu** [Ciechanowska i wsp. Immunobiology 2020, Pharmacol Rep 2020, Int J Mol Sci 2021](#)<sup>220-222</sup>, natomiast w drugim pobierano odcinek L4-L6 rdzenia kręgowego **po uszkodzeniu nerwu kulszowego** [Ciechanowska i wsp. Front Immunol 2022, Brain Sci 2023](#)<sup>127,223</sup>.
- **narzędzia farmakologiczne** zastosowano celem określania ich wpływu na procesy nocycypcji, a wyniki opublikowano w 2 pracach [Ciechanowska i wsp. Front Immunol 2022, Brain Sci 2023](#)<sup>127,223</sup>. Substancje podawano jednorazowo, podpajęczynówkowo w dniu 7, w wybranych dawkach: CCL3 nAb (0.5, 2, 4 µg/5 µL), CCL9 nAb (0.5, 2, 4 µg/5 µL), XCL1 nAb (1, 4, 8, 16 µg/5 µL), J113863 (1, 15, 30 µg/5 µL), TAK-220 (0.5, 2, 4, 15 µg/5 µL), AZD-5672 (0.5, 2, 4, 15 µg/5 µL), vMIP-II (0.05, 0.5, 1 µg/5 µL), YA4 (0.05, 0.5, 1 µg/5 µL), morfinę (2.5 µg/5 µL), buprenorfinę (2.5 µg/5 µL). Ponadto minocyklinę (30 mg/kg) podawano dootrzewnowo, wielokrotnie, a dokładniej 16 godzin i 1 godzinę przed podwiązaniem nerwu kulszowego, a następnie dwa razy dziennie przez 7 dni.
- **testy behawioralne** przeprowadzono po podaniu wyżej wymienionych substancji, a także zwierzętom kontrolnym. Wyniki opublikowano w 2 pracach: [Ciechanowska i wsp. Front Immunol 2022, Brain Sci 2023](#)<sup>127,223</sup>. Badano nadwrażliwość na bodźce mechaniczne (**Rycina 7A**, test von Frey'a) i termiczne (**Rycina 7B**, test zimnej płytki). Badania rozpoczynano od przeprowadzenia testów wstępnych mających na celu sprawdzenie prawidłowego wykształcenia nadwrażliwości nocycyptywnej po uszkodzeniu nerwu kulszowego w dniu 7. Kontrolę stanowiły zarówno zwierzęta, którym podawano rozpuszczalnik, jak i zwierzęta zdrowe.

A. test von Frey'a

B. test zimnej płytki



**Rycina 7.** Testy behawioralne – schemat własny

**Badania *in vitro*:** wyniki badań z użyciem pierwotnych hodowli komórek mikrogleju i astrogleju z kory mózgowej pobranej od nowonarodzonych myszy szczepu C57BL/6J opublikowano w 3 pracach [Ciechanowska i wsp. Immunobiology 2020, Pharmacol Rep 2020, Int J Mol Sci 2021](#)<sup>220-222</sup>. Hodowle wykorzystano do określenia lokalizacji receptorów, a także źródła komórkowego badanych czynników. Ponadto sprawdzano jak zastosowanie zarówno LPS jak i chemokiny XCL1 wpływa na wydzielanie przez pierwotne komórki mikrogleju i astrogleju czynników immunologicznych.

**Badania *ex vivo*:** pomiar zmian w poziomie mRNA przeprowadzono metodą RT-qPCR, natomiast do oceny zmian w poziomie białka posłużyły metody takie jak ELISA i Western blot. Wykonano również barwienia immunofluorescencyjne metodą immunohistochemii.

**Analiza statystyczna:** wyniki eksperymentów były analizowane w programie GraphPad Prism wersja 8.1.1 (330) z wykorzystaniem testu t-studenta oraz jednoczynnikowej i dwuczynnikowej analizy wariancji, a następnie testu *post hoc* z korektą Bonferroniego. Liczba wszystkich zwierząt wykorzystanych w badaniach ***in vivo*** i ***ex vivo*** wynosi 850 myszy.

## 4. GŁÓWNE ZAGADANIENIA DOKTORATU




### 4.1. Zbadanie poziomu markerów wybranych populacji komórek immunologicznych i glejowych, a także inicjatorów oraz enzymów efektorowych klasycznej i lektynowej drogi aktywacji układu dopełniacza podczas rozwoju zmian zachodzących w mysim modelu urazowego uszkodzenia mózgu - *Ciechanowska i wsp. Immunobiology 2020* oraz *Int J Mol Sci 2021*

























Urazowe uszkodzenie mózgu jest jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności i śmiertelności w dzisiejszym świecie. Wiadomo, że jest ono związane zarówno z pierwotnym, mechanicznym uszkodzeniem tkanek oraz z wyzwalanymi w jego konsekwencji kaskadami sygnałowymi. Wciąż jednak nie do końca znane są populacje komórek oraz wydzielane przez nie czynniki, które są zaangażowane w rozwijające się wtórne uszkodzenie. Jak wiadomo, układ dopełniacza silnie moduluje aktywację komórek immunologicznych

i glejowych. W dwóch pracach oryginalnych będących podstawą tej rozprawy doktorskiej (*Immunobiology 2020*, *Int J Mol Sci 2021* 220,222) pokazaliśmy zmiany wybranych

markerów komórkowych oraz inicjatorów klasycznej i lektynowej drogi aktywacji układu dopełniacza na poziomie mRNA i/lub białka w aż czterech strukturach mózgu (kora, prążkowie, wzgórze i hipokamp), w szerokim spektrum czasu po uszkodzeniu (24 godziny – 5 tygodni) (**Tabela 1,2**).

Wykazaliśmy wzrost ekspresji mRNA markera neutrofilii (*Cd177*) nie tylko w korze mózgowej, czyli w miejscu bezpośredniego uszkodzenia, co było już wcześniej opisane przez innych autorów, ale również w prążkowie i hipokampie, a zmiany te utrzymywały się do 7 dni. Wzrostu *Cd177* nie obserwowaliśmy we wzgórzu (*Int J Mol Sci 2021* 222). Natomiast na poziomie białka, już dobie po urazie zauważyliśmy silny wzrost poziomu markera neutrofilii (MPO) w korze mózgowej (*Immunobiology 2020* 220). Neutrofile przyczyniają się do rozwoju ciężkich powikłań produkując mediatory zapalne takie jak cytokiny. Niewątpliwie ich liczny napływ w tak wczesnej fazie urazu może przyczynić się do powstania poważnych uszkodzeń, które przekraczają możliwości systemów naprawczych. Do 4 dni po urazie wzrasta również ekspresja mRNA markera oligodendrocytów (*Olig2*) w korze, prążkowie i hipokampie. W przeciwieństwie do neutrofilii i oligodendrocytów, odgrywających rolę we wczesnej fazie, nasze badania sugerują, że po uszkodzeniu długotrwale wzrasta liczba limfocytów T *Cd8+*. Co znaczące, podobne zmiany zachodzą również w prążkowie, wzgórzu oraz hipokampie i utrzymują się nawet do 5 tygodnia. Dlatego, sądzimy, że to właśnie limfocyty T *Cd8+* sprzyjają wtórnemu uszkodzeniu w badanych rejonach mózgu. W dalszych analizach stwierdziliśmy również znaczące zmiany poziomu mRNA i/lub białka markerów astrogleju (GFAP) oraz mikrogleju/makrofagów (IBA-1), co ważne we wszystkich 4 badanych strukturach mózgu. Przy wykorzystaniu markera różnicującego komórki mikrogleju od makrofagów (*TMEM119*) wykazaliśmy wzrost jego ekspresji na poziomie




**Tabela 1.** Zmiany ekspresji mRNA wybranych populacji komórkowych w 7 dniu po urazowym uszkodzeniu mózgu u myszy. Legenda: brak zmian  wzrost poziomu  

























BADANA TKANKA:	BADANE CZYNNIKI					
	neutrofile	limfocyty T	oligodendrocyty	astroglej	makrofagi/ mikroglej	mikroglej
KORA MÓZGOWA						
WZGÓRZE						
HIPOKAMP						
PRĄŻKOWIE						

mRNA w korze mózgowej, hipokampie i prążkowie, głównie w pierwszym tygodniu po urazie. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że w zależności od upływającego czasu i badanego obszaru, różne typy komórek odgrywają rolę po bezpośrednim uszkodzeniu mózgu, a wydzielane przez nie czynniki immunologiczne stały się przedmiotem naszych dalszych eksperymentów.

Uzyskane w kolejnej części badań rezultaty (*Int J Mol Sci* 2021<sup>222</sup>) dowodzą istotnych zmian inicjatorów klasycznej drogi aktywacji dopełniacza (**Tabela 2**). Między innymi zaobserwowaliśmy wzrost poziomu mRNA *C1q* do 2 tygodni zarówno w korze mózgowej, prążkowie jak i wzgórzu, natomiast w hipokampie zmiany utrzymywały się krócej. W przypadku *C1s*, wzrost ekspresji mRNA odnotowaliśmy we wszystkich badanych obszarach mózgu, natomiast w korze mózgowej był on istotnie podniesiony we wszystkich badanych punktach czasowych. Wzrost poziomu mRNA *C1r* także następował we wszystkich badanych częściach mózgu, ale w mniejszym stopniu. Analiza przeprowadzona metodą immunofluorescencji

potwierdziła obecność *C1q* w sąsiedztwie mikrogleju/makrofagów, ale nie astrogleju. W badaniach *in vitro* w pierwotnej hodowli komórek mikrogleju wykazaliśmy istotnie

**Tabela 2.** Zmiany ekspresji mRNA wybranych składowych układu dopełniacza w 7 dniu po urazowym uszkodzeniu mózgu u myszy. Legenda: brak zmian  wzrost poziomu  

BADANA TKANKA:	BADANE CZYNNIKI					
	<i>C1q</i>	<i>C1s</i>	<i>C1r</i>	kolektyna 11	fikolina A	fikolina B
KORA MÓZGOWA						
WZGÓRZE						
HIPOKAMP						
PRAŻKOWIE						

wyższy poziom mRNA *C1q*, *C1s* i *C1r* po stymulacji LPS sugerujący, że to właśnie mikroglej może być istotnym źródłem tych czynników. Wyniki dotyczące *C1q* są zgodne z danymi literaturowymi, jednak po raz pierwszy dowiedliśmy, że komórki te mogą być również źródłem *C1s* i *C1r*. Natomiast w przypadku lektynowej drogi aktywacji układu dopełniacza, wykryliśmy w analizowanych strukturach mózgu mRNA *KL-11*, *FCN-A* i *-B*, ale nie *MBL-A* i *-C*. Znaczące zmiany zaobserwowaliśmy jedynie w poziomie mRNA dla *FCN-A*, we wczesnej fazie, we wszystkich analizowanych obszarach, do dnia 7 w korze i hipokampie, a do 2 tygodni w prążkowie (**Tabela 2**).

Wyniki przedstawionych eksperymentów wskazują, że ważną częścią rozwoju terapii uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego powinno stać się zastosowanie leków modulujących funkcje komórek immunologicznych, które napływają do miejsca urazu, jak chociażby neutrofile oraz limfocyty T Cd8+, a także komórek glejowych takich jak mikroglej, astroglej i oligodendrocyty. Ponadto dowiedziono, że wśród inicjatorów dopełniacza kompleks C1 (*C1q*, *C1r*, *C1s*) odgrywa szczególnie ważną rolę po uszkodzeniu mózgu we wszystkich badanych strukturach (kora, prążkowie, wzgórze i hipokamp). Opisane eksperymenty w hodowli pierwotnej komórek mikrogleju sugerują, że mogą one być w dużej mierze odpowiedzialne za biosyntezę inicjatorów szlaku klasycznego, ale w bardzo niewielkim stopniu szlaku lektynowego. Celowanie w kompleks C1 i fikolinę A może być skuteczną strategią w leczeniu skutków uszkodzeń mózgu, jednak wymagane są badania farmakologiczne w celu zweryfikowania tej hipotezy.

## 4.2. Zbadanie poziomu chemokin z rodziny MIP-1 oraz ich receptorów podczas rozwoju zmian zachodzących w mysim modelu urazowego uszkodzenia mózgu - *Ciechanowska i wsp. Immunobiology 2020*

Badania dotyczące odpowiedzi immunologicznej wywołanej urazowym uszkodzeniem mózgu podkreślają ważną rolę chemokin. Rola członków rodziny MIP-1 nie została jednak dotąd zbadana pod tym kątem. Dlatego zdecydowaliśmy się przeprowadzić eksperymenty mające na celu sprawdzenie, czy poziomy CCL3, CCL4 i CCL9 oraz ich receptorów (CCR1 i CCR5) ulegają zmianom w mysim modelu urazowego uszkodzenia mózgu. Analizy przeprowadziliśmy aż w czterech strukturach mózgu (kora, hipokamp, wzgórze i prążkowie), w szerokim spektrum czasu (24 godziny 5 tygodni).

Nasze badania po raz pierwszy ujawniły wzrost ekspresji mRNA wszystkich trzech badanych chemokin, we wszystkich 4 badanych strukturach mózgu. Najsilniejsze zmiany były obserwowane zaraz po uszkodzeniu, jednakże utrzymywały się aż do 5 tygodni. Na poziomie białka zdecydowanie najsilniejszą aktywację wszystkich trzech chemokin zaobserwowaliśmy w pierwszym dniu po urazie, w korze mózgowej. Natomiast zmiany te utrzymywały się do 7 dnia w przypadku CCL3 i CCL4 (**Tabela 3**). Jest to ważny wynik, ponieważ te dwie chemokiny występują również u ludzi, w przeciwieństwie do CCL9. Analizy ekspresji mRNA *CCR1* i *CCR5* wykazały wzrost we wszystkich czterech strukturach mózgu, głównie we wczesnych fazach po urazie (24 h, 4 dni i 7 dni). Analiza białka wykazała wzrost poziomu CCR1 i CCR5 jedynie we wzgórzu, 24 godziny po uszkodzeniu mózgu, za to brak jakichkolwiek zmian w korze mózgowej (**Tabela 3**). Dlatego uważamy, że za obserwowane efekty odpowiada ekspozycja badanych receptorów na ich agonistów z rodziny MIP-1, co może prowadzić do ich internalizacji. Prowadzone przez nas równoległe eksperymenty w pierwotnych hodowlach komórkowych potwierdziły obecność CCR1 i CCR5 na komórkach mikrogleju i astrogleju uzyskanych z kory mózgowej mysich osesków, co wskazuje na ważną rolę obu tych receptorów we wtórnym uszkodzeniu mózgu.

**Tabela 3.** Zmiany ekspresji białka chemokin z rodziny MIP-1 i ich receptorów 24 h i 7 dni po urazowym uszkodzeniu mózgu u myszy. Legenda: brak zmian □ wzrost poziomu ↑

BADANA TKANKA:	BADANE CZYNNIKI									
	CCL3		CCL4		CCL9		CCR1		CCR5	
	24 h	7 d	24 h	7 d	24 h	7 d	24 h	7 d	24 h	7 d
KORA MÓZGOWA	↑	↑	↑	↑	↑	□	□	□	□	□
WZGÓRZE	□	□	↑	□	↑	□	↑	□	↑	□



Biorąc pod uwagę opisane obserwacje można wnioskować, że dwie chemokiny z rodziny MIP-1 (CCL4 i CCL3) i ich receptory (CCR1 i CCR5) stanowią obiecujące punkty uchwytu do modulacji wtórnych zmian po uszkodzeniu mózgu. Prezentowane doniesienia być może w przyszłości zaowocują poprawą terapii licznych objawów powstających w wyniku tego urazu.

### 4.3. Zbadanie poziomu chemokiny XCL1 oraz jej receptorów podczas rozwoju zmian zachodzących w mysim modelu urazowego uszkodzenia mózgu - Ciechanowska i wsp. Pharmacol Rep 2020

Występująca u ludzi chemokina XCL1 jest znana jako ważny czynnik w rozwoju chorób autoimmunologicznych, a ostatnio również dowiedziono wzrostu jej poziomu w tkance mózgowej pacjentów z pourazowymi stłuczeniami mózgu. Jednakże nie określono dotychczas, jakie są mechanizmy działania XCL1 w patologii uszkodzenia mózgu. Wydało nam się to szczególnie ciekawe do zbadania w świetle najnowszych doniesień, że XCL1 działa nie tylko przez klasyczny receptor XCR1, ale również przez integrynę  $\alpha 9$  - ITGA9. To zachęciło nas by sprawdzić zmiany zarówno w poziomie mRNA oraz białka XCL1 i obydwu jej receptorów, w trzech wybranych strukturach mózgu (kora, wzgórze i hipokamp), również w bardzo szerokim przedziale czasowym (24 godziny – 5 tygodni) po zainicjowaniu urazowego uszkodzenia mózgu u myszy.


Przeprowadzone doświadczenia wykazały zależny od czasu wzrost ekspresji mRNA *XCL1* oraz jej receptorów *XCR1* i *ITGA9* we wszystkich badanych obszarach mózgu (kora, wzgórze i hipokamp), z wyjątkiem *ITGA9* we wzgórzu. Analiza poziomu białka XCR1 i ITGA9 nie wykazała zmian w badanych strukturach mózgu. Co ważne, po raz pierwszy dostarczyliśmy dowodów, że we wszystkich badanych obszarach podniesiony jest poziom białka XCL1 24 godziny po urazie mózgu, co sugeruje jej udział w inicjacji wtórnych zmian zachodzących po uszkodzeniu (**Tabela 4**).

















**Tabela 4.** Zmiany ekspresji białka XCL1 24 h i 7 dni po urazowym uszkodzeniu mózgu u myszy.

Legenda: brak zmian   
wzrost poziomu 

BADANA TKANKA:	XCL1	
	24 h	7 d
KORA MÓZGOWA		
WZGÓRZE		
HIPOKAMP		

Nasze eksperymenty prowadzone w pierwotnej hodowli komórkowej dowiodły, że stymulacja LPS komórek astrogleju, ale nie mikrogleju powoduje zwiększoną ekspresję *XCL1*, na poziomie mRNA. Co ważne zastosowanie XCL1 okazało się nie wywoływać żadnych zmian w poziomie mRNA *CCL3*, *CCL4*, *CCL9*, *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *IL-6*, *IL-10* oraz *IL-18BP* w pierwotnych hodowlach komórek mikrogleju, ani astrogleju (**Tabela 5**). Uzyskane wyniki sugerują, że XCL1 może działać poprzez neuronalnie zlokalizowane receptory.

**Tabela 5.** Zmiany ekspresji mRNA wybranych cytokin w pierwotnych hodowlach komórek mikrogleju i astrogleju po upływie 6 h od stymulacji XCL1. Legenda: brak zmian 

STYMULACJA XCL1:	BADANE CZYNNIKI							
	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-18	CCL3	CCL4	CCL9	IL-10	IL-18BP
MIKROGLEJ								
ASTROGLEJ								

XCL1 wydaje się być jednym z kluczowych czynników zaangażowanych w rozwój wtórnych zmian po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego. Obydwa receptory tej chemokiny, nie tylko klasyczny XCR1, ale także niedawno zidentyfikowany w tej roli ITGA9, mogą być ważnymi punktami uchwytu dla interwencji farmakologicznej po urazowym uszkodzeniu mózgu.











#### 4.4. Zbadanie poziomu markerów wybranych populacji komórek immunologicznych i glejowych podczas rozwoju zmian zachodzących w mysim modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego – *Ciechanowska i wsp, Front Immunol 2022 oraz Brain Sci 2023*

Dostępne, choć wciąż niekompletne dane literaturowe sugerują, że zaktywowane komórki immunologiczne i glejowe odgrywają istotną rolę podczas powstawania obwodowej i ośrodkowej sensytyzacji w neuropatii o różnej etiologii. Skłoniło nas to do przeprowadzenia badań w modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego u myszy i oceny zmian ekspresji mRNA i białka markerów wybranych komórek immunologicznych (makrofagów/mikrogleju, mikrogleju astrogleju i/lub oligodendrocytów) w szerokim spektrum czasu (24 godziny – 5 tygodni).

Wykazaliśmy, przy użyciu markera aktywacji mikrogleju/makrofagów (*IBA-1*), wzrost jego ekspresji na poziomie mRNA już w 1 dniu po uszkodzeniu nerwu kulszowego, natomiast zmiany w poziomie markera aktywacji mikrogleju (*TMEM119*) pojawiły się później, czyli w 4-7 dniu. Wyniki naszych badań pokazują, że prawdopodobnie w pierwszej kolejności po uszkodzeniu nerwu kulszowego są aktywowane makrofagi, a następnie mikroglej (*Front Immunol 2022*<sup>127</sup>). Niewielkie zmiany zaobserwowaliśmy w poziomie mRNA dla markera astrogleju, a pojawiły się one w dniu 4. W dalszych analizach stwierdziliśmy jednak znaczący wzrost poziomu białka markerów zarówno mikrogleju/makrofagów (*IBA-1*, 7 dzień) jak i astrogleju (*GFAP*, 7-35 dzień) po podwiązaniu nerwu kulszowego (*Brain Sci 2023*<sup>223</sup>). Obserwowane zmiany są zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi, że to

prawdopodobnie uszkodzone włókna aferentne uwalniają czynniki aktywujące makrofagi i mikroglej, a także wywołują proliferację i napływ

**Tabela 6.** Zmiany ekspresji mRNA wybranych populacji komórkowych w 7 dniu po podwiązaniu nerwu kulszowego u myszy. Legenda: brak zmian  wzrost poziomu 

BADANA TKANKA:	BADANE CZYNNIKI					
	neutrofile	limfocyty T	oligodendrocyty	astroglej	makrofagi/mikroglej	mikroglej
RDZEŃ KRĘGOWY	 Pawlik i wsp. <sup>135</sup>	 Pawlik i wsp. <sup>135</sup>				

tych komórek. To z kolei prowadzi do opóźnionej aktywacji astrogleju, w naszych badaniach obserwowanej aż do 35 dnia. Natomiast ekspresja mRNA oligodendrocytów (*Olig2*) nie ulegała zmianie (*Brain Sci 2023*<sup>223</sup>). Jednakże w pracy, której jestem współautorem, ale nie będącej podstawą tego doktoratu, wykazaliśmy brak zmian w poziomie markera limfocytów T *Cd8+*, natomiast podniesioną ekspresję markera neutrofili (MPO) w rdzeniu kręgowym od 2 do 14 dnia, a białka w dniu 12<sup>121</sup>. Te dane sugerują, że po uszkodzeniu nerwu limfocyty T *Cd8+* na poziomie rdzenia kręgowego są w niewielkim stopniu zaangażowane, w przeciwieństwie do tego co obserwowaliśmy po bezpośrednim uszkodzeniu mózgu (*Int J Mol Sci 2021*<sup>222</sup>). Co jednak ważne udział neutrofili, makrofagów, mikrogleju i astrogleju wydaje się być równie istotny (Tabela 6).

Podsumowując, po uszkodzeniu nerwów obwodowych, podobnie jak obserwowano po urazie mózgu, wzrasta ekspresja markerów zarówno komórek immunologicznych (makrofagi, neutrofile), jak i glejowych (mikroglej, astroglej). Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, modulacja tych komórek może mieć znaczny potencjał terapeutyczny, zarówno po uszkodzeniach obwodowego, jak i ośrodkowego układu nerwowego.




#### 4.5. Zbadanie poziomu chemokin z rodziny MIP-1 oraz ich receptorów, a także wpływu ich modulacji na symptomy bólowe, w mysim modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego – Ciechanowska i wsp. Brain Sci 2023











Ważnym powodem braku skutecznej terapii bólu neuropatycznego jest niepełne zrozumienie jego patofizjologii, dlatego badania nad mechanizmem jego powstawania są tak bardzo istotne. Dowiedziono już, że członkowie rodziny MIP-1 mają silne właściwości pronocyceptywne u zdrowych myszy. Nie było jednak danych pokazujących zaangażowania tych chemokin w rozwój neuropatii po uszkodzeniu nerwów, a także czy i w jaki sposób ich farmakologiczna modulacja może wpłynąć na symptomy bólu neuropatycznego. Stąd naszym celem stała się zarówno ocena zmian CCL3, CCL4, CCL9 oraz ich receptorów CCR1 i CCR5 w szerokim spektrum czasu po podwiązaniu nerwu kulszowego (24 godziny – 5 tygodni), jak również sprawdzenie, w jaki sposób ich farmakologiczna blokada może wpłynąć na procesy nocycepcji w neuropatii.

Prowadzone przez nas eksperymenty wykazały, że rozwój nadwrażliwości u myszy idzie w parze ze wzrostem poziomu mRNA wszystkich chemokin z rodziny MIP-1 w rdzeniu kręgowym. Jednakże podniesiony

poziom białka obserwowany był tylko w przypadku CCL3 i CCL9 od 1 do 7 dnia po uszkodzeniu (Tabela 7). Dalsze badania behawioralne wskazały, że blokowanie obydwu tych

**Tabela 7.** Zmiany ekspresji białka chemokin z rodziny MIP-1 i ich receptorów 24 h i 7 dni po podwiązaniu nerwu kulszowego u myszy.

Legenda: brak zmian  wzrost  spadek poziomu 

BADANA TKANKA:	BADANE CZYNNIKI									
	CCL3		CCL4		CCL9		CCR1		CCR5	
	24 h	7 d	24 h	7 d	24 h	7 d	24 h	7 d	24 h	7 d
RDZEŃ KRĘGOWY										

chemokin za pomocą jednorazowych, podpajęczynówkowych podań przeciwciał neutralizujących osłabia symptomy bólu neuropatycznego, potwierdzając ich ważną rolę w procesach nocycepcji. Warto pamiętać jednak, że spośród nich u ludzi występuje tylko CCL3. Co ciekawe poziom białka CCR1 i CCR5 nie wzrasta w rdzeniu kręgowym 7 dni po uszkodzeniu nerwu, a nawet spada w przypadku CCR1 (Tabela 7). Jest to zapewne spowodowane jego silną internalizacją po ekspozycji na endogenne ligandy, których ekspresja wzrasta w neuropatii. Co ważne, blokada receptorów poprzez jednorazowe, podpajęczynówkowe podania antagonistów, to jest J113863 (CCR1), TAK-220 (CCR5) i AZD-5672 (CCR5) odwraca dobrze rozwiniętą nadwrażliwość mechaniczną i termiczną u myszy. Pragniemy podkreślić, że w naszych eksperymentach wykazaliśmy po raz pierwszy dużą skuteczność silnych i selektywnych antagonistów CCR5, niebadanych wcześniej pod kątem łagodzenia objawów bólowych. Co szczególnie cenne z klinicznego punktu widzenia, zarówno przeciwciała neutralizujące CCL3, jak i antagoniści obu receptorów nie tylko skutecznie obniżają nadwrażliwość, ale również podnoszą analgetyczne właściwości morfiny.




Uzyskane wyniki dowodzą ważnej roli dwóch chemokin z rodziny MIP-1, CCL3 i CCL9, w patologii bólu neuropatycznego u myszy, ze względu na ich silne zmiany na poziomie rdzenia kręgowego oraz efekty analgetyczne uzyskane w wyniku ich blokady. Przeprowadzone eksperymenty wskazują na CCR1 i CCR5 jako nowe potencjalne punkty uchwytu w leczeniu bólu neuropatycznego. Ponadto, co ważne, farmakologiczna blokada CCL3, jak i CCR1, CCR5 może być korzystna w przypadku terapii skojarzonej z lekami opioidowymi.







#### 4.6. Zbadanie poziomu chemokiny XCL1 oraz jej receptorów, a także wpływu ich modulacji na symptomy bólowe, w mysim modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego – Ciechanowska i wsp. Front Immunol 2022

Badania w modelu neuropatii cukrzycowej dowiodły znacznego udziału XCL1 w transmisji nocycytywnej, jednak rola jej receptorów nie została wówczas zgłębniona. Było to prawdopodobnie spowodowane brakiem odpowiednich narzędzi farmakologicznych w tamtym czasie. W świetle najnowszych doniesień o dwóch funkcjonalnych receptorach, postanowiliśmy sprawdzić zmiany w poziomie XCL1, XCR1 i ITGA9, w szerokim spektrum czasu po podwiązaniu nerwu kulszowego (24 godziny – 5 tygodni), a także jak ich farmakologiczna modulacja wpływa na objawy bólu neuropatycznego oraz efekty przeciwbólowe dwóch leków opioidowych.

W pierwszym etapie badań wykazaliśmy istotny wzrost XCL1 na poziomie mRNA i białka (**Tabela 8**) utrzymujący się do 5 tygodni. W przypadku receptorów obserwowaliśmy wzrost w poziomie białka XCR1 do 7 dni oraz nieznaczny spadek poziomu ITGA9 w dniu 7 (**Tabela 8**). Bogatsi o wiedzę o istnieniu dwóch funkcjonalnych receptorów XCL1 postanowiliśmy sprawdzić przede wszystkim, za pomocą którego z nich chemokina ta wywołuje probólowe działanie i udowodniliśmy, że obydwa receptory są zaangażowane w rozwój nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne. Ponadto neutralizacja XCL1 oraz blokada obydwu receptorów za pomocą vMIP-II (antagonista XCR1) i YA4 (przeciwciało neutralizujące ITGA9) zmniejsza nadwrażliwość termiczną i mechaniczną. W następnym etapie, po podaniu przeciwciał neutralizujących XCL1 wykazaliśmy wzmocnione działanie morfiny. Z kolei blokada XCR1 pozytywnie wpłynęła na skuteczność buprenorfiny, a neutralizacja ITGA9 wzmocniała zarówno analgetyczne działanie buprenorfiny, jak i morfiny. Jednak, spośród zastosowanych narzędzi farmakologicznych, to neutralizacja XCL1 zasługuje na szczególną uwagę ze względu na długi czas utrzymywania się efektów, czyli co najmniej 48 godzin. Przeprowadziliśmy także badanie immunofluorescencyjne które wykazało, że XCL1 jest uwalniana przez astroglej w rdzeniu kręgowym, podczas gdy obydwa badane receptory są zlokalizowane na neuronach. Co ważne to odkrycie jest spójne z wynikami uzyskanymi wcześniej (*Pharmacol Rep 2020*<sup>221</sup>) i tłumaczy dłacze XCL1 w warunkach *in vitro* nie powoduje aktywacji pierwotnych hodowli mikrogleju i astrogleju. Nasza praca rzuca również nowe światło na spektrum działania minocykliny. Pokazaliśmy bowiem, że jej silny potencjał przeciwbólowy w neuropatii, może być spowodowany faktem, że substancja ta wpływa na więcej czynników immunologicznych niż wcześniej sądzono, w tym obniża poziom XCL1.

Przedstawione badania pokazują po raz pierwszy, że sygnalizacja XCL1/XCR1 i XCL1/ITGA9 przyczynia się do rozwoju nadwrażliwości bólowej. Spośród przebadanych receptorów, to atypowy ITGA9 wydaje się być lepszym punktem uchwytu dla terapii, jednak obydwa są godne uwagi w poszukiwaniu skutecznej strategii leczenia bólu neuropatycznego. Co ważne, zarówno blokada XCL1, jak i obu przebadanych receptorów wydaje się ciekawym podejściem ze względu na jej korzystny wpływ na efektywność leków opioidowych.

**Tabela 8.** Zmiany ekspresji białka XCL1 i jej receptorów w 7 dni po podwiązaniu nerwu kulszowego u myszy. Legenda: brak zmian  wzrost  spadek poziomu 

BADANA TKANKA:	BADANE CZYNNIKI					
	XCL1		XCR1		ITGA9	
	24 h	7 d	24 h	7 d	24 h	7 d
RDZEŃ KRĘGOWY						

## **5. PRACE ORYGINALNE**



Article

# Initiators of Classical and Lectin Complement Pathways Are Differently Engaged after Traumatic Brain Injury—Time-Dependent Changes in the Cortex, Striatum, Thalamus and Hippocampus in a Mouse Model

Agata Ciechanowska<sup>1</sup>, Katarzyna Ciapała<sup>1</sup>, Katarzyna Pawlik<sup>1</sup>, Marco Oggioni<sup>2</sup> , Domenico Mercurio<sup>2</sup> , Maria-Grazia De Simoni<sup>2</sup> and Joanna Mika<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, 31-343 Krakow, Poland; ciechan@if-pan.krakow.pl (A.C.); kat.ciapala@gmail.com (K.C.); pawlik@if-pan.krakow.pl (K.P.)

<sup>2</sup> Department of Neuroscience, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri-IRCCS, 20156 Milan, Italy; marco.oggioni@marionegri.it (M.O.); domenico.mercurio@marionegri.it (D.M.); mariagrazia.desimoni@marionegri.it (M.-G.D.S.)

\* Correspondence: joamika@if-pan.krakow.pl; Tel.: +48-12-6623240



**Citation:** Ciechanowska, A.; Ciapała, K.; Pawlik, K.; Oggioni, M.; Mercurio, D.; De Simoni, M.; Mika, J. Initiators of Classical and Lectin Complement Pathways Are Differently Engaged after Traumatic Brain Injury—Time-Dependent Changes in the Cortex, Striatum, Thalamus and Hippocampus in a Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 45. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22010045>

Received: 7 December 2020

Accepted: 19 December 2020

Published: 22 December 2020

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The complement system is involved in promoting secondary injury after traumatic brain injury (TBI), but the roles of the classical and lectin pathways leading to complement activation need to be clarified. To this end, we aimed to determine the ability of the brain to activate the synthesis of classical and lectin pathway initiators in response to TBI and to examine their expression in primary microglial cell cultures. We have modeled TBI in mice by controlled cortical impact (CCI), a clinically relevant experimental model. Using Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) we analyzed the expression of initiators of classical the complement component 1q, 1r and 1s (*C1q*, *C1r*, and *C1s*) and lectin (mannose binding lectin A, mannose binding lectin C, *collectin 11*, *ficolin A*, and *ficolin B*) complement pathways and other cellular markers in four brain areas (cortex, striatum, thalamus and hippocampus) of mice exposed to CCI from 24 h and up to 5 weeks. In all murine ipsilateral brain structures assessed, we detected long-lasting, time- and area-dependent significant increases in the mRNA levels of all classical (*C1q*, *C1s*, *C1r*) and some lectin (*collectin 11*, *ficolin A*, *ficolin B*) initiator molecules after TBI. In parallel, we observed significantly enhanced expression of cellular markers for neutrophils (*Cd177*), T cells (*Cd8*), astrocytes (glial fibrillary acidic protein—*GFAP*), microglia/macrophages (allograft inflammatory factor 1—*IBA-1*), and microglia (transmembrane protein 119—*TMEM119*); moreover, we detected astrocytes (*GFAP*) and microglia/macrophages (*IBA-1*) protein level strong upregulation in all analyzed brain areas. Further, the results obtained in primary microglial cell cultures suggested that these cells may be largely responsible for the biosynthesis of classical pathway initiators. However, microglia are unlikely to be responsible for the production of the lectin pathway initiators. Immunofluorescence analysis confirmed that at the site of brain injury, the *C1q* is localized in microglia/macrophages and neurons but not in astroglial cells. In sum, the brain strongly reacts to TBI by activating the local synthesis of classical and lectin complement pathway activators. Thus, the brain responds to TBI with a strong, widespread and persistent upregulation of complement components, the targeting of which may provide protection in TBI.

**Keywords:** complement component 1q (*C1q*); complement component 1s (*C1s*); complement component 1r (*C1r*); collectin 11; ficolin A; ficolin B; mannose binding lectin A (MBL-A); mannose binding lectin C (MBL-C); cortex; striatum; thalamus; hippocampus

## 1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) persists as a leading cause of disability and mortality affecting the worldwide community. TBI is known to be associated with primary mechanical damage that results in secondary pathogenic cellular cascades, activated within minutes following injury, that interacts in a complex network, which leads to cell death or recovery [1]. In patients surviving TBI, this secondary injury cascade, which is closely related to activation of the inflammatory response, is believed to be responsible for the evolution of the brain damage [2,3]. Not enough is known about the cellular and molecular changes occurring during the secondary damage, which evolves over days after the injury. Gaining knowledge about these changes will be very important for development of novel pharmacological and therapeutic interventions [4].

The complement system is a powerful effector tool of innate and adaptive immunity. In the brain, the complement system is known to subserve multiple functions, including regulation of synaptic pruning during development, control of homeostatic functions in the uninjured brain, and coordination of the inflammatory response following injury. There are three pathways leading to full activation of the complement cascade: the classical, the alternative, and the lectin pathway, each responding to specific danger signals and characterized by specific initiators and enzymes. The classical pathway is activated following the binding of the C1q-C1s-C1r complex to antigen-antibody complexes or directly to specific molecules (i.e., beta-amyloid, C reactive protein, DNA, and apoptotic bodies). The lectin pathway activator molecules include different pattern recognition molecules, such as mannose binding lectins (MBLs, found in rodents in two isoforms: A and C) and collectin-11, or by ficolins (found in rodents in two isoforms: A and B), which bind to high-density arrays of mannose, fucose, and N-acetylated sugars present on the surface of injured cells or pathogens. Spontaneous hydrolysis of circulating C3 (tick-over process) into C3 (H<sub>2</sub>O) on cellular surfaces acts as activator of the alternative pathway. The three pathways converge into a common pathway, resulting in the formation of the terminal C5b-9 complement complex the effector of cell lysis. A few fragments which are produced along the cascade, such as C3b, C4b, and C5b, possess direct inflammatory properties and act as opsonins, inducing an overactivation of the phagocytic response. In addition, the complement components coordinate an innate and adaptive immune reaction by interacting with multiple immune cells [5]. Complement activation results in the production of anaphylatoxins (C3a and C5a), powerful mediators of inflammation, which causes recruitment and activation of different cells, including neutrophils, T cells and macrophages. Neutrophils, which are the most abundant leukocytes in circulation, are also the first-line immune cells that reach the sites of injury [6,7]. Brain Cd8<sup>+</sup> T cells may impact prolonged motor deficits and myelin pathology. Moreover, TBI-related neuroinflammation is also characterized by changes in the morphology and number of oligodendrocytes, astrocytes and microglia/macrophages [6–9]. Recently, clinical studies have supported these data, showing the maintenance of sustained astrocytes and microglial activation in the brains of TBI patients [10,11].

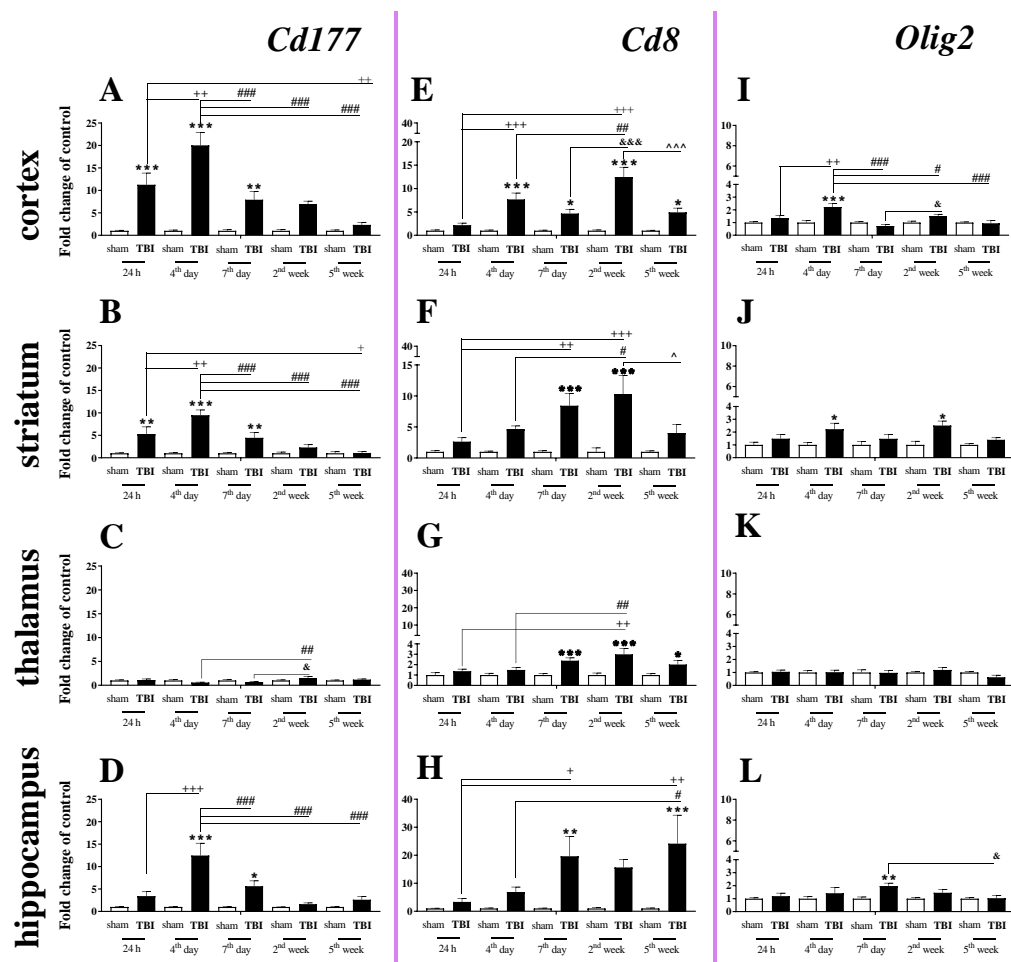
The complement system contributes to secondary injury in TBI [5,12], but while it is well established that injury activates the complement cascade as a systemic response and that circulating complement components get into the brain through the injured blood-brain barrier (BBB), little is known about local activation. Therefore, the purpose of our research was to determine the ability of the brain to activate the synthesis of classical and lectin pathway initiators in response to TBI and to examine their expression in different types of brain cells. Based on previous experiments, we performed controlled cortical impact (CCI) in mice, which is a clinically relevant experimental model of TBI that causes a large inflammatory response and drives the progression of brain injury [3,13,14]. We examined concomitant spatiotemporal changes occurring at the mRNA and/or protein levels of classical (C1q, C1s, and C1r) and lectin (MBL-A, MBL-C, collectin 11, ficolin A, and ficolin B) complement factors as well as cellular markers of neutrophils (Cd177), T cells (Cd8), oligodendrocytes (oligodendrocyte transcription factor 2—Olig2), astrocytes (GFAP), microglia/macrophages (IBA-1),

and microglia (TMEM119) in various brain structures (cortex, striatum, thalamus, and hippocampus) after TBI. Moreover, we used confocal microscopy to study the C1q cellular localization in the contused cortex after TBI. We also studied the effect of lipopolysaccharide (LPS), an inflammatory stimulus, on the levels of a few classical and lectin pathway components in primary microglial cell cultures.

## 2. Results

### 2.1. Time-Dependent Study of *Cd177*, *Cd8* and *Olig2* mRNA Expression in the Cortex, Striatum, Thalamus, and Hippocampus after TBI in Mice

The elevated mRNA expression of *Cd177* (a cellular marker of neutrophils) was observed in the cortex, striatum, and hippocampus (Figure 1A,B,D). In the cortex and striatum, *Cd177* upregulation began 24 h after TBI, was the highest on the 4th day and remained elevated until the 7th day after traumatic brain injury when compared to that of sham-operated animals (Figure 1A,B).



**Figure 1.** (A–L). The mRNA expression changes of *Cd177*, *Cd8*, and *Olig2* in the cortex, striatum, thalamus, and hippocampus of TBI compared to sham-injured animals at different time points (24 h–5 weeks). The data are given as fold changes relative to the control as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean) (sham groups,  $n = 5$ –8; TBI groups,  $n = 4$ –8). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant between the sham and TBI groups, +  $p < 0.05$ ; ++  $p < 0.01$ ; +++  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 24 h TBI group; #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 4th day TBI group; &  $p < 0.05$ ; &&&  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant when comparing to the 7th day TBI group; ^  $p < 0.05$ ; ^^^  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 2 weeks TBI group as estimated by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

In the hippocampus, *Cd177* upregulation began and reached a peak 4 days after brain injury and then decreased after day 7. We did not observe any changes in expression of *Cd177* in the thalamus (Figure 1C). For the mRNA expression of *Cd177*, the two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI for the cortex ( $F_{4,55} = 9.34$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 1A), striatum ( $F_{4,55} = 7.88$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 1B), and hippocampus ( $F_{4,52} = 7.47$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 1D).

Upregulation of *Cd8* mRNA expression (a cellular marker of T cells) was observed in all studied structures. The changes began in the cortex 4 days after injury and in the striatum and hippocampus on the 7th day. When comparing to the mRNA level of sham-operated animals, the highest value was observed 2 weeks after brain injury in cortex and striatum and 5 weeks after injury in the hippocampus. In the cortex and hippocampus, *Cd8* mRNA remained elevated until the 5th week, which was the last time point (Figure 1E,H). For the mRNA expression of *Cd8*, the two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the cortex ( $F_{4,55} = 8.76$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 1E), striatum ( $F_{4,55} = 3.52$ ;  $p = 0.0125$ ) (Figure 1F), and hippocampus ( $F_{4,53} = 2.76$ ;  $p = 0.0372$ ) (Figure 1H). Moreover, after TBI, we observed upregulation of *Cd8* in the thalamus (Figure 1G) between the 7th day and 5th week when compared to that in sham animals, according to Bonferroni's post hoc analysis.

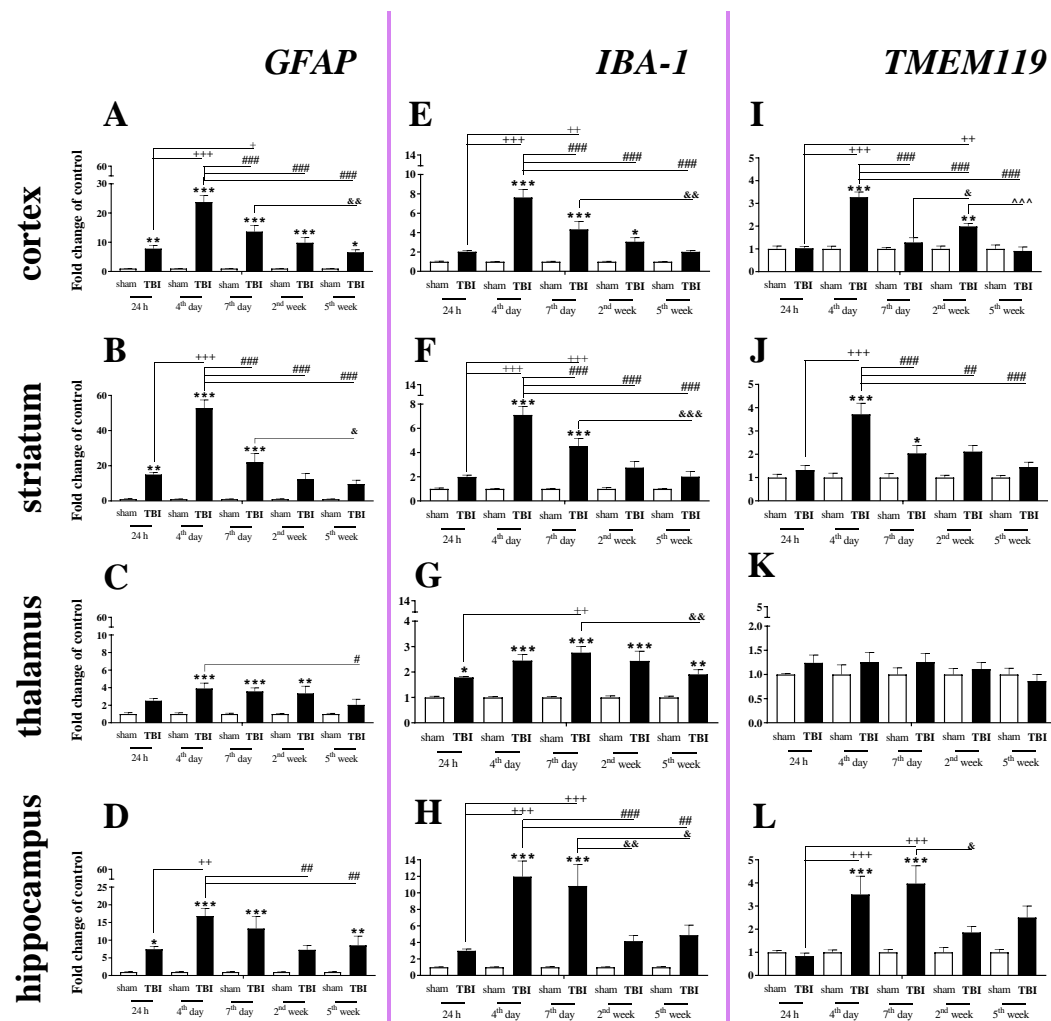
The expression of *Olig2* (a marker of oligodendrocytes) was significantly elevated in the cortex, and the upregulation was observed 4 days after injury. For the mRNA expression of *Olig2* in the cortex, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI ( $F_{4,54} = 7.06$ ;  $p = 0.0001$ ) (Figure 1I). Moreover, we observed upregulation of *Olig2* in the striatum (Figure 1J) on the 4th day and 2nd week and hippocampus on the day 7th after TBI when compared to that in sham animals, according to Bonferroni's post hoc analysis. No changes in mRNA expression were obtained in the thalamus.

## 2.2. Time-Dependent Study of GFAP, IBA-1 and TMEM119 mRNA Expression in the Cortex, Striatum, Thalamus, and Hippocampus after TBI in Mice

*GFAP* (a marker of astroglia) expression was elevated in all studied brain structures, and the strongest changes were observed in the cortex, striatum, and hippocampus 4–7 days after injury. In the cortex, the *GFAP* upregulation began 24 h after injury, reached the highest value on day 4 and then significantly declined until the 5th week following injury (Figure 2A). For the striatum and hippocampus, *GFAP* upregulation also started 24 h after TBI and reached a maximum on the same day. For the mRNA expression of *GFAP*, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the cortex ( $F_{4,56} = 15.34$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 2A), striatum ( $F_{4,54} = 21.30$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 2B), and hippocampus ( $F_{4,51} = 3.88$ ;  $p = 0.0080$ ) (Figure 2D). Moreover, we observed *GFAP* upregulation in the thalamus (Figure 2C) from the 4th day and 2nd week after TBI when comparing with that in sham animals, according to Bonferroni's post hoc analysis.

We observed a significant increase in *IBA-1* (a marker of microglia/macrophages) mRNA levels in all analyzed brain structures (cortex, striatum, thalamus, and hippocampus). The upregulation was observed in all analyzed brain areas on the 4th day after injury, except the thalamus where the mRNA increase was observed 24 h after TBI. The peak was observed on days 4–7 in the analyzed brain areas, and the level remained elevated in all cases at least to 7 days after brain injury compared to the level in sham-operated animals (Figure 2E–H). In the thalamus, the upregulation was maintained until 5 weeks after injury (Figure 2G). For mRNA expression of *IBA-1*, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI for the cortex ( $F_{4,56} = 13.64$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 2E), striatum ( $F_{4,56} = 14.77$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 2F), thalamus ( $F_{4,56} = 2.90$ ;  $p = 0.0299$ ) (Figure 2G), and hippocampus ( $F_{4,54} = 5.97$ ;  $p = 0.0005$ ) (Figure 2H).



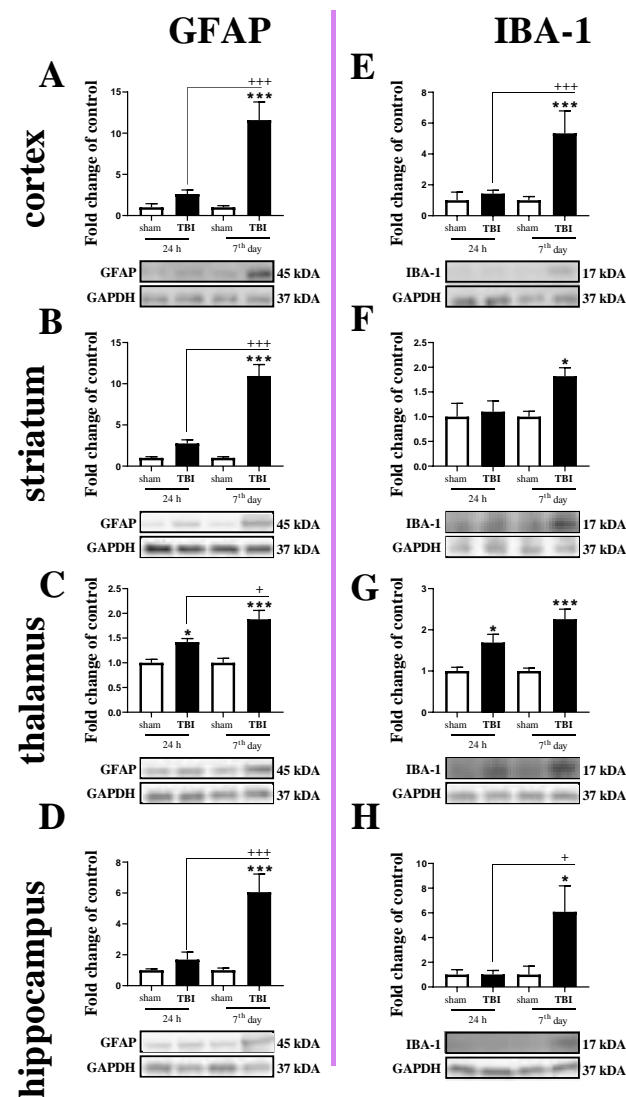


**Figure 2.** (A–L). The mRNA expression changes of *GFAP*, *IBA-1*, and *TMEM119* in the cortex, striatum, thalamus, and hippocampus of TBI compared to sham-injured animals at different time points (24 h–5 weeks). The data are given as fold changes relative to the control as mean  $\pm$  SEM (sham groups,  $n = 4$ –8; TBI groups,  $n = 5$ –8). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant between the sham and TBI groups, +  $p < 0.05$ ; ++  $p < 0.01$ ; +++  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 24 h TBI group; #  $p < 0.05$ ; ###  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 4th day TBI group; &  $p < 0.05$ ; &&  $p < 0.01$ ; &&&  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant when comparing to the 7th day TBI group; ^^  $p < 0.001$  shows differences considered statistically significant comparing to the 2 weeks TBI group as estimated by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

Elevated mRNA expression of *TMEM119* (a marker of microglia) was observed in the cortex, striatum, and hippocampus (Figure 2I,J,L). In the cortex and striatum, the up-regulation was first observed and it reached the highest level on the 4th day after injury (Figure 2I,J). In the hippocampus, mRNA upregulation also began 4 days after brain injury but reached a peak 4–7 days after injury, after which it decreased (Figure 2L). For mRNA expression of *TMEM119*, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the cortex ( $F_{4,56} = 20.89$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 2I), striatum ( $F_{4,55} = 6.84$ ;  $p = 0.0002$ ) (Figure 2J), and hippocampus ( $F_{4,53} = 4.51$ ;  $p = 0.0033$ ) (Figure 2L).

### 2.3. Study of GFAP and IBA-1 Protein Levels in the Cortex, Striatum, Thalamus, and Hippocampus of TBI or Sham-Injured Mice at Selected Time Points

The GFAP protein level was increased in all tested brain regions 7 days after TBI (Figure 3A–D). For GFAP protein expression, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the cortex ( $F_{1,16} = 15.13$ ;  $p = 0.0013$ ) (Figure 3A), striatum ( $F_{1,19} = 29.64$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 3B), and hippocampus ( $F_{1,20} = 11.65$ ;  $p = 0.0028$ ) (Figure 3D). Moreover, we observed elevated levels of GFAP in the thalamus (Figure 3C) 24 h and 7 days after TBI when comparing to the levels in sham animals, according to Bonferroni's post hoc analysis. The upregulation of GFAP protein was significantly higher on the 7th day after injury when compared to its level 24 h after injury in all subjected brain areas, as evaluated by Bonferroni's post hoc test.



**Figure 3.** (A–H). The protein expression changes of IBA-1 and GFAP in the cortex, striatum, thalamus, and hippocampus of TBI compared to sham-injured animals at different time points (24 h and 7th days). The data are given as fold changes relative to the control as mean  $\pm$  SEM (sham groups,  $n = 4-6$ ; TBI groups,  $n = 4-6$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant between the sham and TBI groups, +  $p < 0.05$ ; +++  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 24 h TBI group as estimated by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

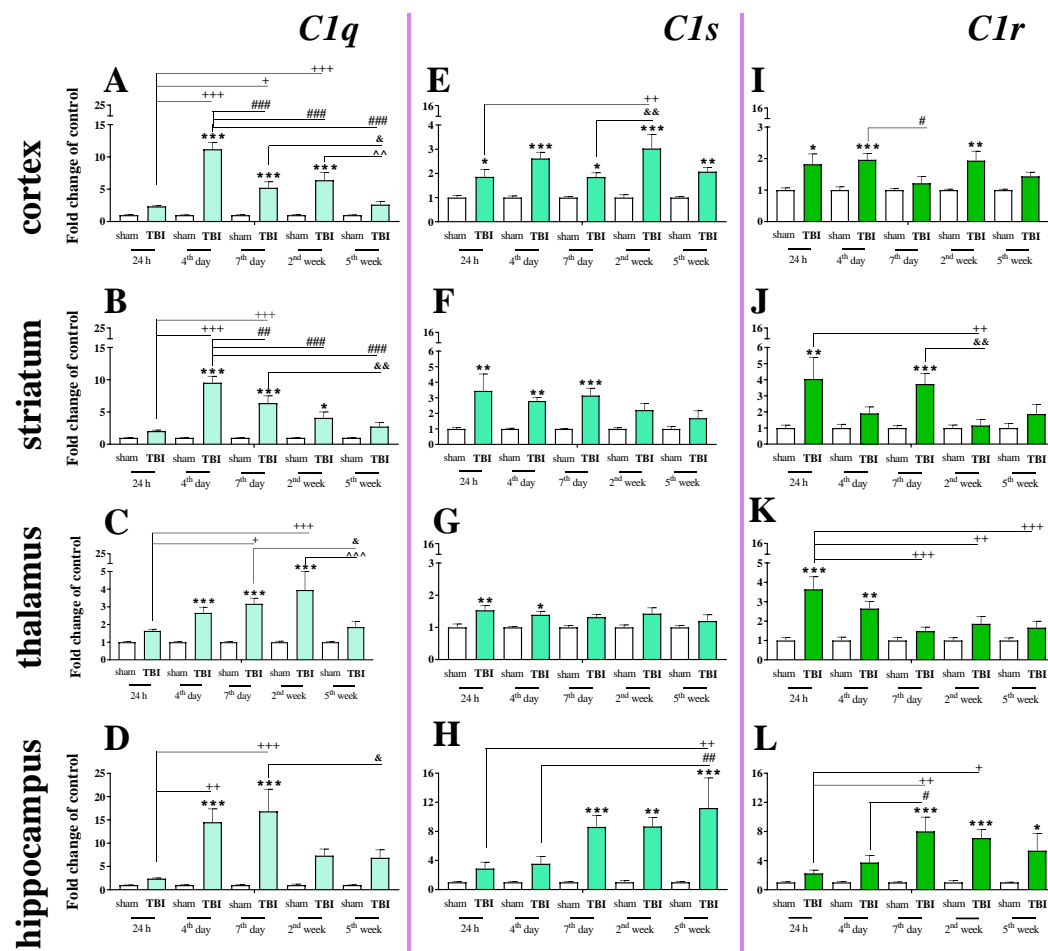
Similar to the GFAP, IBA-1 protein levels were elevated in all tested structures 7 days after TBI (Figure 3E–H). Moreover, upregulation of IBA-1 was observed in the thalamus 24 h after injury (Figure 3G). For IBA-1 protein expression, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the cortex ( $F_{1,14} = 10.30$ ;  $p = 0.0063$ ) (Figure 3E) and hippocampus ( $F_{1,19} = 4.56$ ;  $p = 0.0459$ ) (Figure 3H). Moreover, we observed elevated levels of IBA-1 in the striatum on the 7th day (Figure 3F) and thalamus (Figure 3G) 24 h and 7 days after injury when comparing with the levels in sham animals, according to Bonferroni's post hoc analysis.

#### *2.4. Time-Dependent Study of C1q, C1s, and C1r mRNA Expression in the Cortex, Striatum, Thalamus, and Hippocampus After TBI in Mice*

We observed a significant *C1q* mRNA increase in the cortex, striatum, and thalamus from 4 days to 2 weeks following injury and in the hippocampus from 4 to 7 days following injury. The highest level was observed on the 4th day in the cortex and striatum, on week 2nd in the thalamus and on days 4–7 in the hippocampus when comparing to sham-operated animals (Figure 4A–D). For *C1q* mRNA expression, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the cortex ( $F_{4,55} = 19.57$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 4A), striatum ( $F_{4,56} = 11.81$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 4B), thalamus ( $F_{4,55} = 3.74$ ;  $p = 0.0092$ ) (Figure 4C), and hippocampus ( $F_{4,56} = 3.67$ ;  $p = 0.0101$ ) (Figure 4D).

Elevated *C1s* mRNA expression was observed in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus. In the cortex, the upregulation began 24 h after TBI and remained elevated until 5 weeks (Figure 4E). In the hippocampus, the upregulation began 7 days after TBI and also remained elevated until 5 weeks. (Figure 4H). For *C1s* mRNA expression, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the cortex ( $F_{4,55} = 2.69$ ;  $p < 0.0406$ ) (Figure 4E) and hippocampus ( $F_{4,55} = 3.16$ ;  $p = 0.0206$ ) (Figure 4H). Moreover, according to Bonferroni's post hoc analysis, we observed elevated levels of *C1s* in the striatum (Figure 4F) and the thalamus (Figure 4G) after TBI compared with levels in sham animals. Increased *C1s* levels were observed between 24 h and 7 days after injury in the striatum and between 24 h and 4 days after injury in the thalamus.

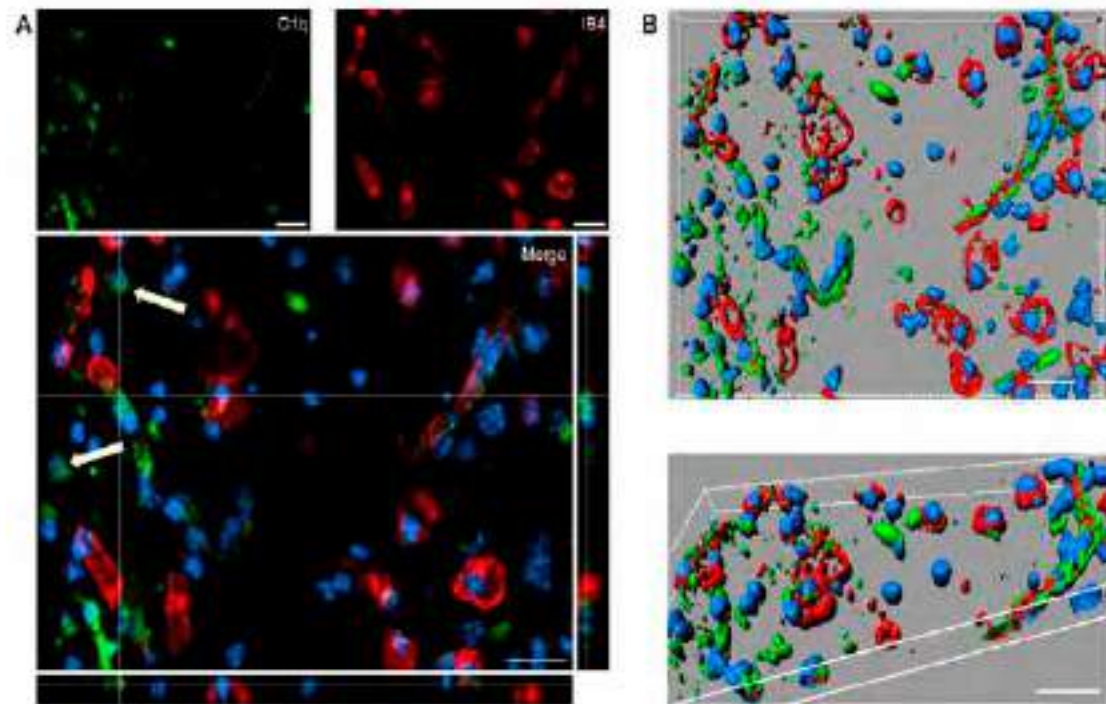
Elevated expression of *C1r* was observed in the striatum and thalamus 24 h after brain injury. In the hippocampus, *C1r* upregulation began 7 days after TBI and remained elevated until 5 weeks (Figure 4L). The highest levels of *C1r* upregulation were observed 24 h after injury in the striatum and thalamus and 7 days after injury in the hippocampus (Figure 4J–L). For *C1r* mRNA expression, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the striatum ( $F_{4,54} = 2.94$ ;  $p = 0.0285$ ) (Figure 4J), thalamus ( $F_{4,49} = 3.07$ ;  $p < 0.0246$ ) (Figure 4K), and hippocampus ( $F_{4,48} = 3.18$ ;  $p < 0.0214$ ). Moreover, according to Bonferroni's post hoc analysis, we observed elevated levels of *C1r* in the cortex (Figure 4I) 24 h, 4 days, and 2 weeks after TBI when compared with levels in sham animals.



**Figure 4.** (A–L). The mRNA expression changes of *C1q*, *C1s*, and *C1r* in the cortex, striatum, thalamus, and hippocampus of TBI compared to sham-injured animals at different time points (24 h–5 weeks). The data are given as fold changes relative to the control as mean  $\pm$  SEM (sham groups,  $n = 3$ –8; TBI groups,  $n = 4$ –8). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant between the sham and TBI groups, +  $p < 0.05$ ; ++  $p < 0.01$ ; +++  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 24 h TBI group; #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 4th day TBI group; &  $p < 0.05$ ; &&  $p < 0.01$  show differences considered statistically significant when comparing to the 7th day TBI group; ^^  $p < 0.01$ ; ^^  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 2 weeks TBI group as estimated by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

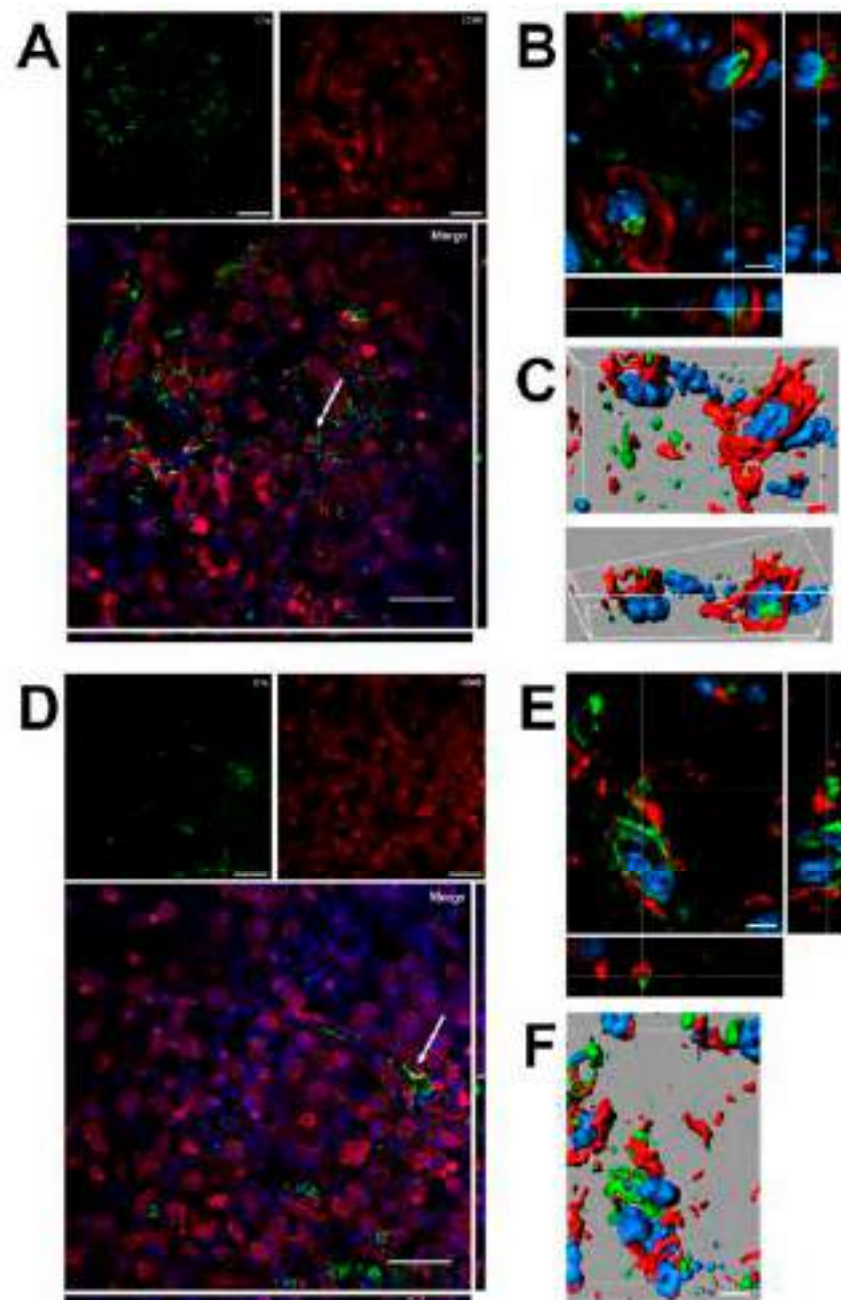
### 2.5. *C1q* Localization in the Contused Tissue

Immunofluorescence analysis confirmed the presence of *C1q* in the contused cortex 96 h after TBI. Interestingly, *C1q* localizes to brain vessels and cell-like structures (Figure 5A).



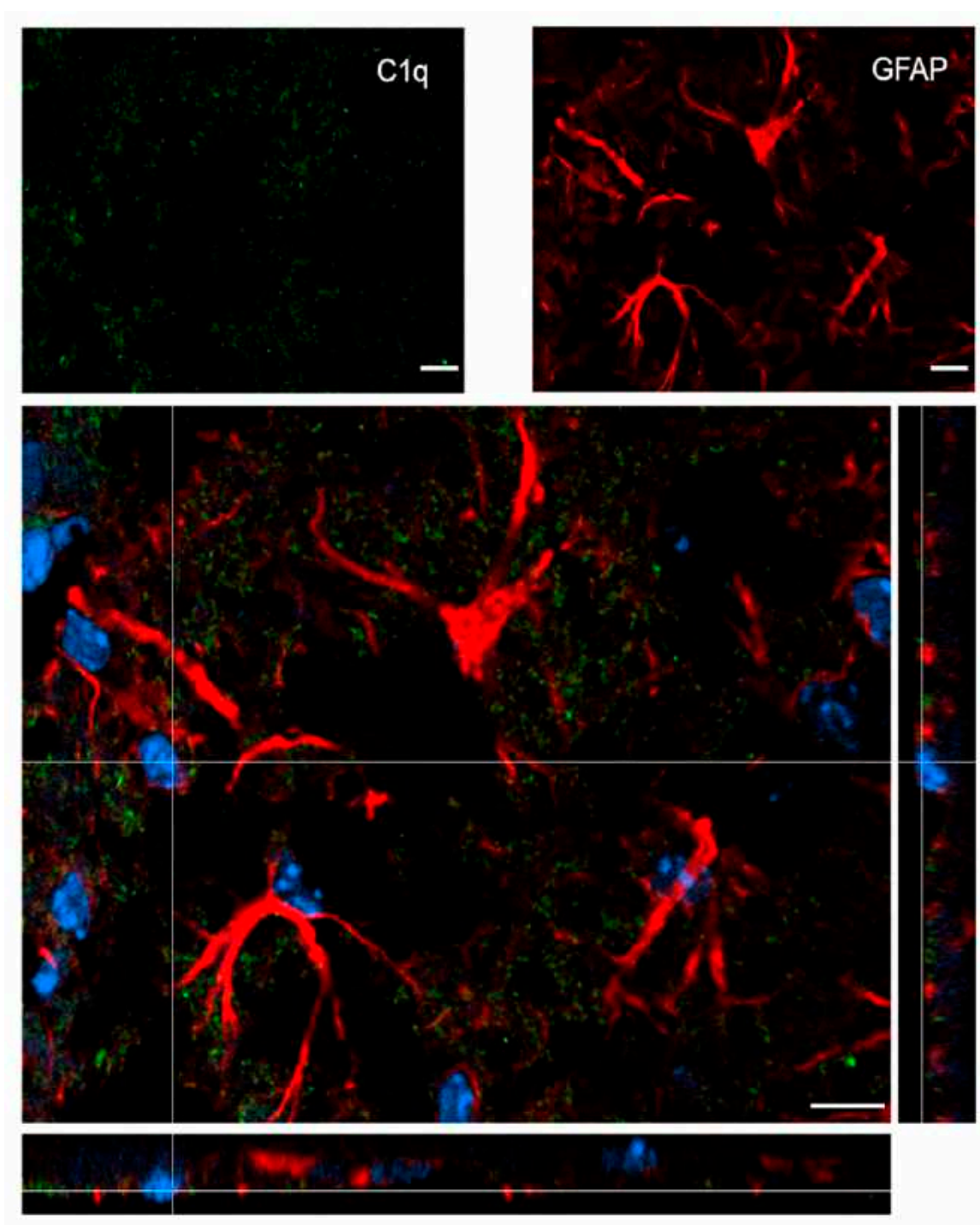
**Figure 5.** (A,B). Confocal analysis of C1q localization in the contused cortex 96 h after TBI. (A) C1q (green) is present on brain vessels (IB4, red) and in cell-like structures (arrows). Nuclei are in blue. (B) Three-dimensional image rendering shows C1q in vessels. Images are representative of at least two independent experiments. Scale bar = 20  $\mu$ m.

Confocal analysis was performed of C1q and microglia/macrophage localization in the contused cortex 96 h after TBI (Figure 6). Panels A and D show that C1q does not generally colocalize with microglia/macrophages, although it localizes in close proximity to them. Instead, C1q appears with vessel-like morphology, as shown in Figure 5. Panels B and C show the high magnification, three-dimensional image rendering of C1q inside Cd45 positive cells. Panels E and F show the high magnification, three-dimensional image rendering of C1q surrounded by microglia/macrophages. Images are representative of at least two independent experiments.



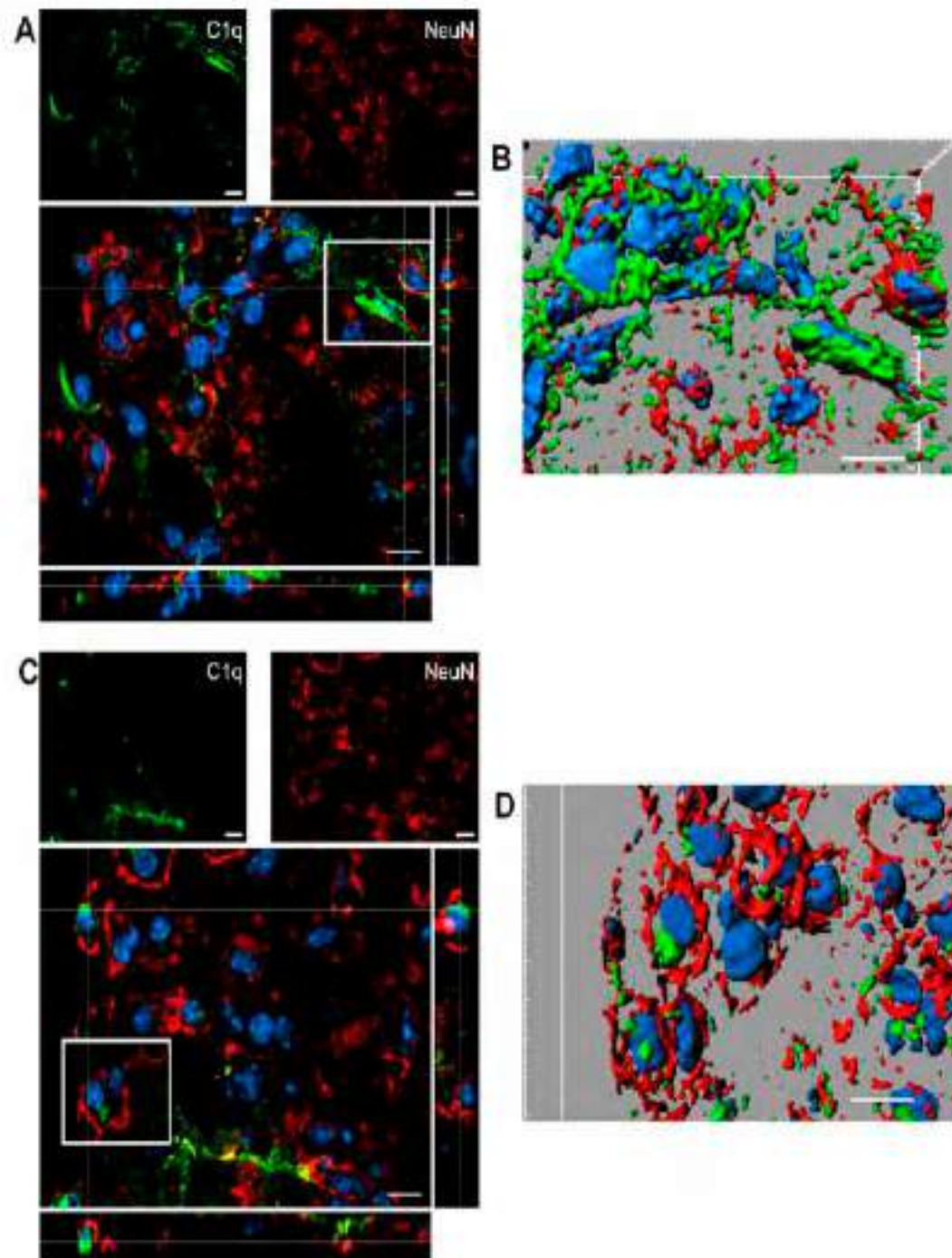
**Figure 6.** (A–F). Confocal analysis of C1q and microglia/macrophage reciprocal localization in the contused cortex 96 h after TBI. (A,D) C1q (green) does not generally colocalize with microglia/macrophages (Cd45, red) although it appears in close proximity to them (arrow in A). C1q appears with vessels-like morphology (arrow in D), as shown in Figure 5. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . (B,C). High magnification, three-dimensional image rendering shows C1q localization inside Cd45 positive cells. (E,F) High magnification, three-dimensional image rendering shows C1q surrounded by microglia/macrophages. Images are representative of at least two independent experiments. Nuclei are in blue. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ .

Figure 7 shows confocal analysis of C1q and astrocyte localization in the contused cortex 96 h after TBI. C1q is present along the border of the lesion, but it does not specifically co-localize with astrocytes.



**Figure 7.** Confocal analysis of C1q and astrocyte reciprocal localization in the contused cortex 96 h after TBI. A high magnification image shows that C1q (green) does not specifically colocalize with astrocytes (GFAP, red). Nuclei are in blue. Images are representative of at least two independent experiments. Scale bar = 10  $\mu$ m.

Figure 8 shows confocal analysis of C1q and neuronal localization in the contused cortex 96 h after TBI.

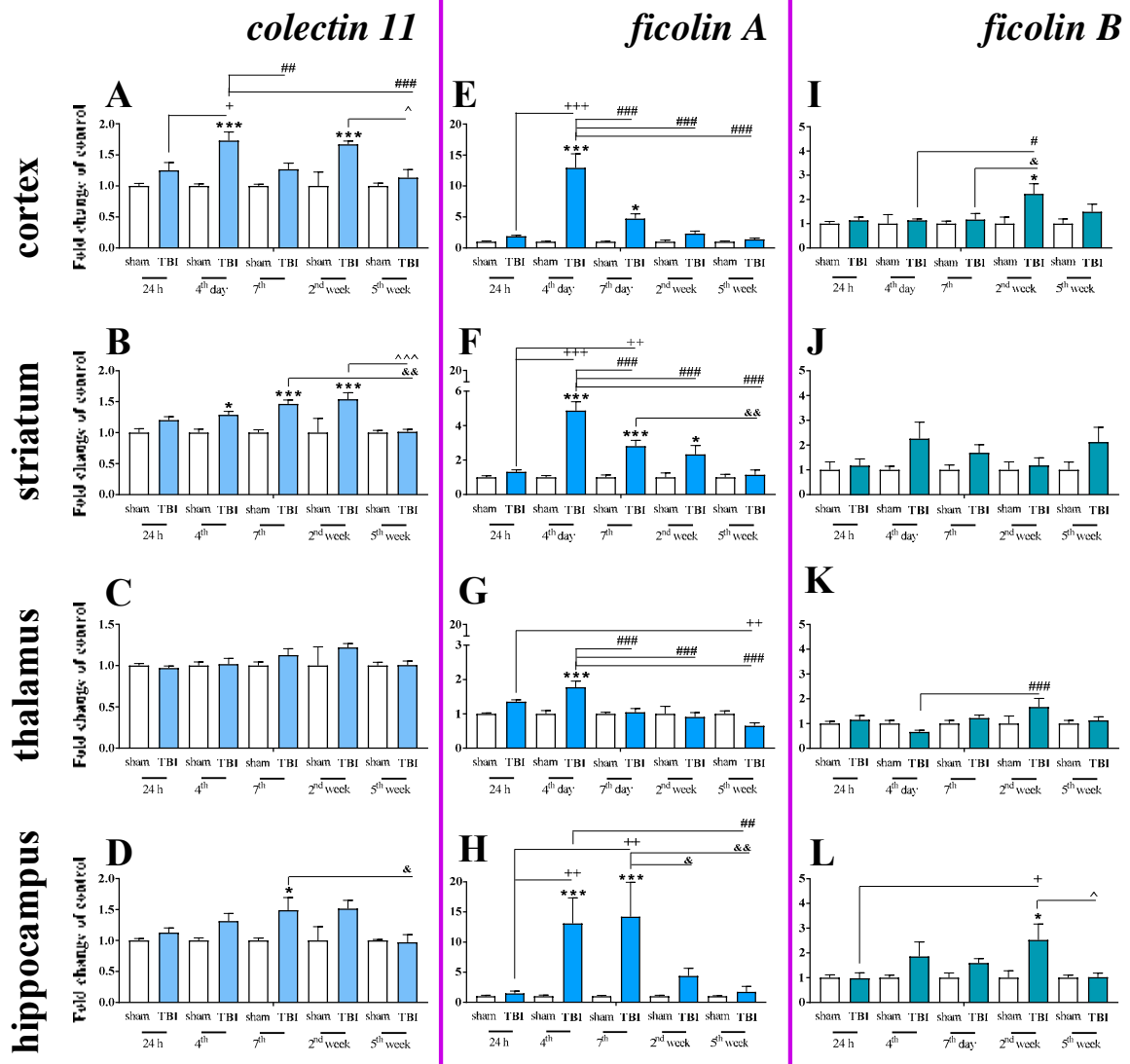


**Figure 8.** (A–D). Confocal analysis of C1q and neuron reciprocal localization in the contused cortex 96 h after TBI. (A,C) C1q (green) is present along the border of the lesion close to neurons (NeuN, red). C1q frequently localizes in close proximity to neurons. (B–D) Three-dimensional image rendering shows C1q colocalization with neurons, possibly driving apoptosis. Images are representative of at least two independent experiments. Nuclei are in blue. Scale bar = 10  $\mu$ m.

#### 2.6. Time-Dependent Study of Mannose Binding Lectin A and C, Collectin 11, Ficolin A and Ficolin B mRNA Expression in the Cortex, Striatum, Thalamus, and Hippocampus After TBI in Mice

Basal mRNA levels of *collectin 11* (Figure 9A–D), *ficolin A* (Figure 9E–H) and *ficolin B* (Figure 9I–L) were detected in the brains of control mice, but *mannose binding lectin A* and *mannose binding lectin C* mRNA were not detected (Table 1).





**Figure 9.** (A–L). The mRNA expression changes of *collectin 11*, *ficolin A*, and *ficolin B* in the cortex, striatum, thalamus, and hippocampus of TBI compared to sham-injured animals at different time points (24 h–5 weeks). The data are given as fold changes relative to the control as mean ± SEM (sham groups,  $n = 3–8$ ; TBI groups,  $n = 4–8$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant between the sham and TBI groups, +  $p < 0.05$ ; ++  $p < 0.01$ ; +++  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 24 h TBI group; #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 4th day TBI group; &  $p < 0.05$ ; &&  $p < 0.01$ ; show differences considered statistically significant when comparing to the 7th day TBI group; ^  $p < 0.05$ ; ^^  $p < 0.001$  show differences considered statistically significant comparing to the 2 weeks TBI group as estimated by two-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test.

**Table 1.** The *mannose binding lectin A (MBL-A)* and *mannose binding lectin C (MBL-C)* mRNA expression in brain structures (cortex, striatum, thalamus, and hippocampus) of sham/TBI-injured mice at selected time points (24 h, 4 days, 7 days, 2 weeks, 5 weeks) was not detected.

Brain Areas	MBL-A	MBL-C
cortex	not detected	not detected
striatum	not detected	not detected
thalamus	not detected	not detected
hippocampus	not detected	not detected

Moreover, changes in *collectin 11* (Figure 9A–D), *ficolin A* (Figure 9E–H) and *ficolin B* (Figure 9I–L) mRNAs were also detected after brain injury. Following TBI, elevated *collectin 11* mRNA levels were observed in the cortex and striatum, beginning on 4 days after TBI and were observed until 2 weeks following injury when compared to the levels observed in the sham group (Figure 9A,B). We did not observe any changes in expression of *collectin 11* in the thalamus (Figure 9C). For *collectin 11* mRNA expression, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the cortex ( $F_{4,56} = 3.54$ ;  $p = 0.0121$ ) (Figure 9A) and striatum ( $F_{4,56} = 3.24$ ;  $p = 0.0184$ ) (Figure 9B). Moreover, according to Bonferroni's post hoc analysis, we observed elevated *collectin 11* levels in the hippocampus (Figure 9D) on the 7th day after TBI when compared to the levels in sham animals.

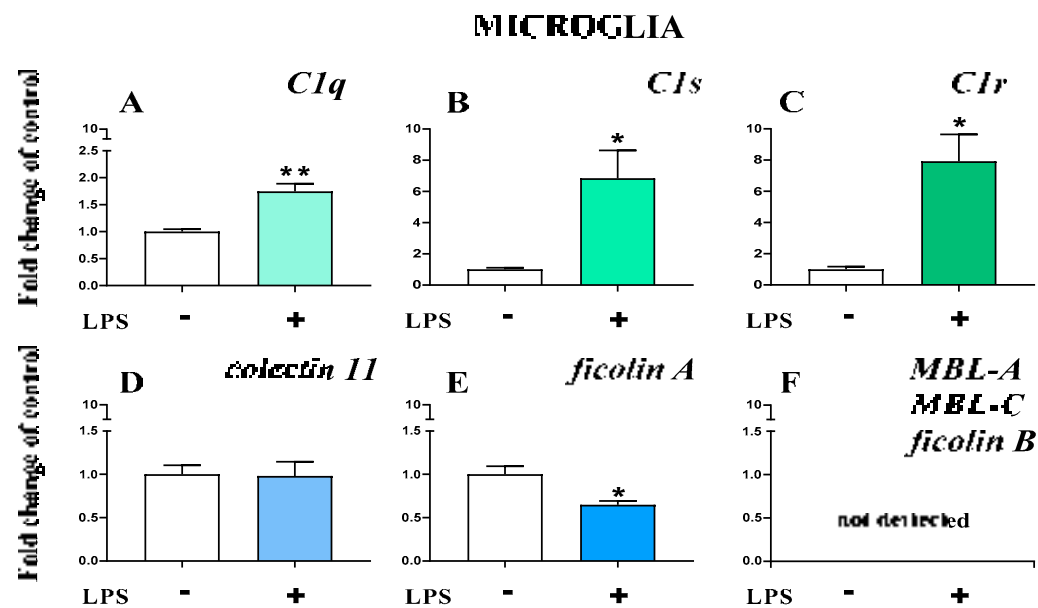
After TBI, *ficolin A* mRNA levels were significantly increased in all analyzed brain structures (the cortex, striatum, thalamus, and hippocampus) in comparison to the levels in sham-operated animals. The upregulation was observed in all brain structures on the 4th day after TBI and also peaked on the 4th day after injury in the cortex, striatum, and thalamus (Figure 9E–G). However, the highest hippocampal *ficolin A* mRNA levels were observed on days 4–7 after injury (Figure 9H). For *ficolin A* mRNA expression, two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI in the cortex ( $F_{4,56} = 14.38$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 9E), striatum ( $F_{4,56} = 13.41$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 9F), thalamus ( $F_{4,56} = 7.28$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 9G), and hippocampus ( $F_{4,52} = 4.04$ ;  $p = 0.0063$ ) (Figure 9H).

Moreover, according to Bonferroni's post hoc analysis, we observed elevated levels of *ficolin B* in the cortex and hippocampus after TBI (Figure 9I,K,L) when comparing to levels in sham animals.

### 2.7. Study of *C1q*, *C1s*, *C1r*, *Mannose Binding Lectin A*, *Mannose Binding Lectin C*, *Collectin 11*, *Ficolin A*, and *Ficolin B* mRNA Expression in Primary Microglial Cultures After LPS Treatment

The basal mRNA levels of *C1q* (Figure 10A), *C1s* (Figure 10B), and *C1r* (Figure 10C) were assessed in primary microglia cell cultures. After LPS stimulation, a significant increase in all the initiators of the classical pathway was observed (Figure 10A–C). In primary microglial cell cultures, after LPS stimulation, increased mRNA levels were observed for *C1q* ( $1.74 \pm 0.14$  ( $t_4 = 4.96$ ;  $p = 0.0077$ )) (Figure 10A), *C1s* ( $6.84 \pm 1.79$  ( $t_4 = 3.25$ ;  $p = 0.0314$ )) (Figure 10B), and *C1r* ( $7.92 \pm 1.72$  ( $t_4 = 4.01$ ;  $p = 0.0160$ )) (Figure 10C).

Further, the basal mRNA levels of *collectin 11* (Figure 10D) and *ficolin A* (Figure 10E) but not *ficolin B*, *mannose binding lectin A*, or *mannose binding lectin C* (Figure 10F) were assessed in primary microglial cell cultures. After LPS stimulation, a significant decrease in *ficolin A* ( $0.65 \pm 0.44$  ( $t_4 = 3.4$ ;  $p = 0.0273$ )) (Figure 10E) was observed.



**Figure 10.** (A–F). The changes in initiators of classical pathway [green]: *C1q*, *C1s*, *C1r*; lectin pathway [blue]: *mannose binding lectin A* and *C* (*MBL-A*, *MBL-C*), *collectin 11*, *ficolin A*, and *ficolin B* mRNA expression in primary microglial cultures. The data are the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  indicate significant differences between non-stimulated (-) and LPS-stimulated (+) cultures.

### 3. Discussion

The contribution of the complement system to acute brain injury is well known. While it is widely recognized that circulating complement cascade components enter the brain through a damaged blood-brain barrier, the possibility that the brain itself may respond to injury with a local synthesis of complement components has been scarcely explored. Herein, we have documented the ipsilateral spatiotemporal activation and mRNA expression of initiators of the classical (*C1q*, *C1s*, *C1r*) and lectin (*collectin-11*, *ficolin A*, *ficolin B*) complement pathways in murine brain structures after TBI. Importantly, our study has revealed, for the first time, that these complement changes are detected not only in the cortex but also in other brain regions, such as the striatum, hippocampus, and thalamus. In parallel, we have detected significant changes in the mRNA levels of a wide spectrum of cellular markers for neutrophils, Cd8+ T cells, astroglia, and microglia/macrophages. Our data added to the knowledge that *C1q*, *C1s* and *C1r* (the *C1q* complex), and *ficolin A* are important factors in the brain, and we assert that the roles of these proteins should be fully elucidated.

Interestingly, *C1q* and its complex components are detected in strongly activated microglial cells. Moreover, our in vitro experiments using primary cells cultures confirmed that microglial cells can synthesize classical pathway initiators but are unlikely to be responsible for elevated levels of lectin pathway initiators. Therefore, strategies that modulate microglial activation and/or blockade of the *C1q* complex may represent a promising opportunity for effective therapies in brain damage. It has been previously shown that *C1*-inhibitor protects from focal brain trauma in mice by reducing thromboinflammation and diminishing upregulation of proinflammatory factors, such as *CCL2*, *CCL3*, *IL-beta*, and tumor Necrosis Factor alpha (*TNF- $\alpha$* ) [15]. Previous studies also show that administration of *C1*-inhibitor shortly after TBI, attenuates cognitive deficits and histological damage [16]. Moreover, it was reported that *C1*-inhibitor attenuates neurobehavioral deficits and reduces contusion volume after TBI in mice [17]. Therefore, the role of the *C1q* complex requires in-depth pharmacological investigation.

Brain injury is known to evoke an inflammatory reaction that involves several interrelated mechanisms, including release of intracellular components from damaged cells to the

parenchyma, production of complement factors and cytokines, activation of brain-resident cells, and recruitment of peripheral immune cells into the brain [18,19]. Many of these processes influence each other, leading to complex interactions. Over the last years, because of heterogeneous changes observed in patients with TBI, different animal models have been developed with the aim of reproducing a complex clinical condition and to obtain tools to better recognize the underlying pathophysiology [20]. Among them, 3 models are widely used in particular: CCI [13,21,22], fluid percussion injury (FPI) [23] and impact acceleration model of diffuse traumatic brain injury (DTBI) [24]. CCI is a dynamic direct impact injury which replicates clinical brain injury with skull deformation and related cortical compression. It offers a very good control of injury parameters such as velocity of impact, depth, and angle, resulting in a highly reproducible impact [13,21,22], a potential advantage over other models such as FPI. A few changes measured in our study using CCI are similar to those observed by others in FPI model, for example after one week both injuries show enhanced cortical and/or hippocampal infiltration and/or activation of GFAP+, IBA-1+, and TMEM+ cells [7,25–27]. Importantly, CCI reproduces changes reported in clinical head injuries and documented in several studies such as: concussion, contusion, hemorrhage, traumatic axonal injury and cortical inflammatory changes, brain edema, elevated intracerebral pressure, reduced cortical perfusion, decreased cerebral blood flow, neuroendocrine, and both inflammatory and metabolic changes [10,20,28,29]. Therefore, learning about neuroimmune interactions from animal models of TBI may foster the development of future therapies. Knowledge about the brain regions affected by the cascade of events triggered by TBI is limited; therefore, we decided to expand our studies to other brain areas. The results demonstrated that cellular changes in CCI occurred not only in the cortex (which was the injury site corresponding to the most expected changes) but also in the striatum, hippocampus, and thalamus. We showed the spatiotemporal mRNA expression of cellular markers and complement initiators in different brain areas (cortex, striatum, thalamus, and hippocampus), which were previously suggested to be especially susceptible in TBI [30–32]. It was previously demonstrated in a closed head diffuse injury rat model that TBI leads to wide, long-lasting microstructural alterations in white and gray matter [33]. Moreover, the same brain areas we studied (cortex, striatum, thalamus, and hippocampus) appeared to be especially susceptible to ongoing post-TBI pathology in previous studies, which was confirmed by volumetric changes in these areas and/or significantly higher activation of microglia/macrophages when compared to the sham group (up to 30 days) [33]. Additionally, after TBI, positron emission tomography confirmed an increased level of inflammation in the thalamus [10].

One of the most important first-line players at the sites of injury are neutrophils [34]. Our results showed that the mRNA level of *Cd177* (a marker of neutrophils) is upregulated and peaks on the 4th day after brain damage in the cortex and also in the striatum and hippocampus to a lesser extent. This observation is in agreement with previous studies, which show that recruitment of neutrophils into the injured cortex occurs over a period of approximately 3 days [6]. In early stages of injury, activated neutrophils bind to the endothelium and platelets and as a consequence, hinder the blood flow through vessels [35]. Moreover, as a source of several inflammatory mediators, such as proinflammatory cytokines, reactive oxygen species (ROS) and matrix metalloproteinases (MMPs), neutrophils contribute to the development of severe complications after TBI [36,37]. Conversely, some studies have shown that neutrophils also affect nerve repair by releasing transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), nerve growth factor (NGF), IL-4, and IL-10 [6], and that is why the role of those cells is rather dualistic. Neutrophils are regarded as important short-lived players in brain injury, in contrast to Cd8+T cells [38–40]. After TBI in mice, an increase in Cd8+ T cells can be observed in the cortex up to 8 weeks after injury [41]. Additionally, it has been shown, in experimental stroke, that mice display improved behavioral function and decreased neuronal loss following the depletion of Cd8+T cells [42]. Our data confirm the presence of Cd8+ T cells in the cortex both during early and later phases; however, the maximal activation levels are reached at later time points. Importantly,

our results give evidence that the observed changes are not limited to the cortex but are also present in the striatum, thalamus, and hippocampus. Based on the literature [41], one may believe that after TBI, Cd8+ T cells promote secondary neuronal and myelin degeneration not only in the cortex but also in other brain regions. Oligodendrocytes are required for producing and maintaining myelin throughout the brain. Our data show that after TBI, *Olig2+*, which is a marker of immature oligodendrocytes, is only briefly and slightly upregulated in the cortex, striatum, and hippocampus after injury, which is in agreement with others [43]. After TBI, decreased activity of CC-1+, which is a marker of mature oligodendrocytes, has been reported in the literature [43], and this is in line with our results showing that new immature oligodendrocytes do not form after TBI, which contributes to the gradual degeneration of myelin. In contrast, TBI has been shown to evoke the activation of astrocytes, the most abundant cell type in the brain [44,45]. This is in agreement with our results showing the increased expression of *GFAP*, the astroglial activation marker, in the cortex, striatum, thalamus, and hippocampus. Therefore, the serum GFAP level appears to be a good prognostic marker of TBI [46]. The literature shows that astrocytes can have some protective functions in the injured brain, e.g., through the release of neurotrophic factors [47,48]. Homeostatic astrocytes are critical for maintaining normal function of the blood-brain barrier [49]; however, the major result of astrocyte activation is the formation of glial scars, which function as a barrier to axonal regeneration and extension [47,50]. Herein, we observed significant *GFAP* level changes in the brain starting early after injury and lasting up to 5 weeks. In a very recent study, it was shown that monitoring IBA-1 in serum might provide clinically relevant insights into the underlying TBI pathophysiology [51]. The IBA-1 is a monocytes/microglia/macrophages-specific calcium-binding protein that participates in membrane ruffling and phagocytosis of those cells. Among IBA-1 positive cells, activated monocytes infiltrate into the brain after injury and propagate breakdown of the BBB by secreting a variety of inflammatory mediators. Recently Ly6C<sup>lo</sup> non-classical monocytes were suggested to be necessary for the recruitment of neutrophils [52], while CD115<sup>+</sup>Ly6C<sup>-hi</sup>CD62<sup>+</sup>CCR2<sup>hi</sup> classical monocytes, infiltrate into the injured brain, and become tissue macrophages [53]. Macrophages and microglia are considered to be important players in maintaining brain homeostasis in the response to injury [54,55]. Long-term increased IBA-1 levels after brain injury indicate that those cells become activated and/or infiltrate to injured regions, both in early and late phases [56]. These processes may lead to neuroinflammation, which may have some protective functions but also may cause secondary brain injury and neurodegeneration [56,57]. Our current study indicates that the upregulated mRNA and protein levels of IBA-1 reflect long-term activation in the cortex and other brain regions, such as the striatum, hippocampus, and thalamus. The role of microglia in TBI may also be confirmed by the presence of transmembrane protein 119 (TMEM119), which is exclusively expressed on those cells [58–60]. Our data has revealed for the first time that following TBI, *TMEM119* is upregulated for up to 2 weeks in the cortex, what may be connected with loss of microglia homeostatic functions. Therefore, future studies are required to determine the exact role of microglia during TBI, including the role in complement activation. It has already been shown that C1q can be produced by microglia cells [61,62]; however, our data provide evidence that microglia are also a source of C1s and C1r. In sum, our results suggest that microglia possess the machinery for production of the C1q complex, which can be triggered after their activation. Whether or not this is related to activation of the complement cascade or if C1q possess independent actions is still to be clarified. This may be similar to what was recently shown for MBL, which can exert a direct deleterious effect on ischemic brain endothelial cells independently from complement activation [63].

C1q is a recognition and initiator molecule of the classical complement activation pathway, which binds to targets (immune complexes), leading to serine protease C1r activation, which cleaves and activated C1s—its substrate. C1q is synthesized by brain macrophages and microglia [12,64,65] and is involved in the initiation of those cells activation in the extrinsic plasma, during the occurrence of central nervous system (CNS)

diseases characterized by BBB impairment [12]. Moreover, C1q is synthesized by activated microglia/macrophages and because of that, it is considered to be the marker of their activation [66], which is in agreement with the results of our IHC and in vitro analysis. A previous in vitro study has shown that C1q evokes calcium signaling in microglia/macrophages and triggers the release of cytokines [12]. Therefore, it appears that this defense protein complex is likely to contribute, in an autocrine/paracrine way, to microglia/macrophages homeostasis. Under physiological conditions, the level of C1q is low in the CNS, but it increases significantly after damage or during infections, which is evident in animal model studies of blood-brain barrier dysfunction [64], transient global cerebral ischemia [65], virus infections [67], and spinal cord injury [68]. Importantly, C1q upregulation has been reported in humans during neurodegenerative impairments, such as Alzheimer's disease, frontal temporal dementia, West Nile Virus infection, and schizophrenia [69–72]. Additionally, studies in C1q-deficient mice reveal that C1q has a detrimental effect on the development of CNS diseases, such as Alzheimer's [73] and prion [74] diseases. Further, it has been shown that C1q deficiency improves histological and functional locomotor outcomes after spinal cord injury [75]; however, motor function recovery has not been observed after brain injury [76]. It has been shown that accumulation of C1q on synapses within the hippocampus occur in parallel with synapse loss 30 days post TBI [77]. It was also demonstrated that C1q-dependent complement activation contributes to hypoxic-ischemic brain injury in mice, and deletion of the *C1q* gene confers significant and long-lasting neuroprotection [78]. However, C1q is not only the classical complement pathway initiator, but it has also been implicated in several functions that may be independent of the complement cascade, including the regulation of synaptic pruning, protection against neurotoxicity, and promotion of angiogenesis [79]. In the TBI model, we also observed a significant upregulation in *C1q* mRNA with major changes on days 4–7 and 2 weeks in the thalamus, and this enhancement was maintained up to 2 weeks after injury in all studied brain regions (except the hippocampus). Importantly, these changes occurred in parallel with the *IBA-1* mRNA upregulation, suggesting that microglia/macrophages are the source of C1q. This is confirmed by IHC results, showing the co-localization of C1q and Cd45. In 2017, Thielens et al. proposed that the role of C1q in the brain may not be related only to activation of the classical pathway [80]. There are different ways by which C1q can bind to the receptors and target the cells: by the collagen-like tail (cC1qR) and the globular head of the molecule (gC1qR), also by different ligands like heparan sulfate [80,81]. Therefore, C1q has also been reported to induce expression of adhesion molecules [82], enhance the release of proinflammatory cytokines [83], recognize apoptotic endothelial cells [84], and stimulate expression of genes in neurons that are associated with neuroprotection [85]. Interestingly, an in vitro study showed that C1q suppresses the LPS-evoked production of proinflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, suggesting its homeostatic and anti-inflammatory role in the CNS [86]. Importantly, in vitro studies show that C1q, in the absence of C1r and C1s, induces gene expression that is critical for neuronal survival and neurite outgrowth [85,87] and protects against oligomeric and fibrillar A $\beta$ -induced (amyloid beta induced) neuronal death [79]. However, after TBI, the mRNA levels of *C1q*, *C1r*, and *C1s* increase, which may be one of the reasons for secondary injury development after TBI. Moreover, these changes are not only observed in the cortex but are also observed in other brain regions, such as the striatum, hippocampus, and thalamus, and may contribute to the progression of neurodegeneration. Our results are in line with those obtained in FPI model in injured cortex and hippocampus [88]. In addition, our study provides the first evidence that strong changes appear in striatum, a structure involved in movement planning, as well as in cognition and reward processes and in the thalamus, an area important for consciousness, arousal, cognition, behavior, working memory, executive function, motor control, sustained, and vigilant attention [89]. Noticeable changes are also detected in the hippocampus, the brain region responsible for cognition, memory deficits, and epileptic seizures associated with TBI [31]. Thus, our data demonstrate that in these important areas of the brain, there is a strong activation of the

initiators of the classical complement activation pathway, paving the way to the development of novel effective pharmaceutical agents. It appears that C1q is neuroprotective only when acting independently (without C1r and C1s); however, during TBI, the entire C1q complex appears to be involved. Recently, the C1-inhibitor has been proposed as an attractive candidate for treatment of neurological disorders associated with inflammation [15], including stroke [90] and TBI [17]. In our opinion, because there are many diseases wherein C1q-complex targeting may be successful, further studies addressing the downstream consequences of activation of this multifunctional complex will be critical to develop therapy for TBI and other neuroinflammation-related diseases.

While the C1q-complex components may be synthesized in the brain, MBL is mainly produced by liver and is the typical source of complement proteins [91,92]. Our results give evidence for a lack of *MBL-A* and *MBL-C* mRNA in all studied brain structures, even after TBI. Further, our in vitro experiments confirm the lack of MBLs biosynthesis by primary microglia, even after their activation. However, it is conceivable that MBL can enter the brain from the blood through the injured blood-brain barrier and may act as a chemoattractant for immune cells [93]. Although MBL is not synthesized in the brain, it plays an important role after brain injury. Notably, MBL knockout mice or mice receiving an MBL inhibitor show attenuated motor deficits and reduced neuronal cell loss following injury [94]. Unlike MBL, collectin-11 shows cerebral synthesis and its mRNA expression is activated by TBI. It has been previously shown that expression of collectin 11 rapidly increases in the post-ischemic period and colocalizes with complement proteins deposited along the basolateral surface of the proximal renal tubule [95]. Our experimental results show, for the first time, that there is slight upregulation of *collectin-11* mRNA in the mouse cortex, hippocampus, and striatum after TBI. Moreover, since there is no upregulation of *collectin-11* mRNA in primary microglia after their activation, those cells may not be the main source of collectin-11 in the brain. Moreover, it has been recently reported that collectin-11 knock-out mice do not show an improved sensorimotor response compared to wild type mice [96], which suggests that this initiator of the lectin pathway is not crucial in TBI.

We have previously demonstrated that ficolin-1, -2, and -3 are present in the contused human brain; however, their role remains unclear. Therefore, ficolins were investigated in the murine model herein. In humans, ficolin-1 can be detected close to vasculature and in brain parenchyma, while ficolin-2 and -3 are predominately identified at low levels in proximity to brain vessels [29]. The levels of ficolin-2 and -3 increase (2.2 and 6.0 times) in brains after TBI [29], but ficolin-1 levels remain unchanged. In mice, only two types of ficolins, called ficolin A (related to human ficolin 2) and ficolin B (related to human ficolin 1), are present [97,98]. Our results indicate that after TBI in mice, *ficolin A* mRNA is upregulated in the early phase, and slight increases in *ficolin B* mRNA are observed later. The changes in ficolin B are very low in mice, so it may be biologically irrelevant, which fits well with the previous results obtained in humans [29]. The transcriptome database [99] reports that ficolin A is expressed almost exclusively in microglia and macrophages, in contrast to ficolin B, which can be produced by neutrophils [100]. This is in line with our in vitro results showing that ficolin A but not B can be produced by microglial cells. Moreover, the transcriptome database [99] supports our in vitro results showing the lack of *ficolin B* mRNA in microglia, even after their stimulation. Importantly, recently published findings give evidence that after TBI, ficolin A knockout mice have better outcome scores when compared to wild-type mice [96], suggesting that ficolin A may play a role in TBI.

Based on our results and available literature, we conclude that role of complement in TBI is greater than previously assumed, with long-term changes observed not only in the cortex, but also in the striatum, hippocampus, and thalamus. Especially interesting is a fact that not only C1q, but also C1s and C1r can be produced by activated microglial cells under TBI. Therefore, strategies that modulate microglia/macrophages activation and/or blockade of the C1q complex might represent a promising opportunity for novel, effective therapies in brain damage. As mentioned above, C1-inhibitor has been shown

to act as an important tool in reducing functional and neuropathological consequences of TBI [15,17]. Importantly, this molecule is already available for clinical use in patients suffering from hereditary angioedema [101]. In addition, other novel inhibitors are presently being designed to block C1q such as a functional C1q antibody that binds to the globular head domain of C1 and prevents activation of C1r/s. Preliminary research indicates that this antibody enters the brain and decreases synapse loss and cognitive dysfunction [72]. In light of our results, it seems that using such a functional C1q antibody in TBI models might contribute to a deeper understanding of pathomechanism and will bring us closer to developing more effective therapy. Currently developed C1r/s inhibitors could also hold promise in future research if brain penetrant compounds would be established. Moreover, our research highlights significant changes in ficolin A not only in the cortex but even in other brain areas following TBI. So far, ficolin A and ficolin 1 have been considered as plasma markers of severity after brain injury, including in clinic [102]. Ficolin 1 is considered as a target for autoimmune diseases therapy [103]. However, further more research is still required to prove the anti-inflammatory effect of anti-ficolin 1 monoclonal antibody in CNS, especially in the light of current results showing the interest of performing such studies in TBI models. Overall, a deeper understanding the role of complement factors and their spatial and temporal fluctuations will be pivotal for development of novel therapeutic strategies for TBI.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Animals

Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with institutional guidelines in compliance with national and international laws and policies (prot.9F5F5.81 authorization n° 753/2017-PR). All animals had free access to food and water and were maintained at a temperature of  $22 \pm 2$  °C and a relative humidity of  $55 \pm 10\%$  on a 12 h light/dark cycle. We used male 9 week old C57BL/6J mice weighing 22–28 g (purchased from Charles River, Calco, Italy). Pregnant C57BL/6J female mice (purchased from Charles River, Cologne, Germany) were used to obtain 1-day-old mouse pups for primary glial cell culture studies.

##### 4.2. Experimental Traumatic Brain Injury (TBI Model)

Inhalation anesthesia (isoflurane—induction, 3% and maintenance, 1.5%) in N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (70/30%) was used to anesthetize mice that were immobilized in a stereotaxic frame. Animals were exposed to a craniotomy on the left side of the skull and then to TBI through the controlled cortical impact using a previously established procedure [13,21,22]. The TBI was performed using a 3 mm diameter rigid impactor driven by a pneumatic piston rigidly mounted at an angle of 20° from the vertical plane and applied vertically to the exposed dura mater, between bregma and lambda, over the left parieto-temporal cortex. The impactor velocity of 5 m/s and depth of 1 mm were set, which resulted in severe brain injury. After CCI, craniotomy and scalp stitching were performed. Sham-injured mice were exposed to the same anesthesia and surgery without brain injury. No animals died after surgery. Typical TBI mice present a mean cortical lesion of 17 mm<sup>3</sup> 6 weeks after injury [3,96].

##### 4.3. Primary Microglial Cell Cultures

Primary microglial cell cultures (prepared from the cerebral cortex obtained from newborn C57BL/6J mice) were used to perform in vitro studies, as described in our previous papers [104,105]. The cells were plated in culture medium consisting of high-glucose GlutaMAX™ DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.1 mg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) on poly-L-lysine-coated 75-cm<sup>2</sup> culture flasks (at a seeding density of  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) and grown in an incubator with a humidified atmosphere (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in air). The culture medium was replaced with fresh medium every 4 days. The microglial cells, which were loosely attached



to the monolayer, were gently harvested by shaking at 70 revolutions per minute (RPM) for 1 h and then at 90 RPM for 15 min and then were centrifuged (800 RPM—10 min) on the 16th day of culture. The viability of cells in culture was determined using Trypan blue (Bio-Rad, Warsaw, Poland) exclusion method. The primary microglial cultures were treated with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 24 h. Cells were seeded at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well on 24 well plates and cultured for 24 h followed by analysis of the mRNA levels. IBA-1 (microglial marker) was used to assess cell specificity. A minimum essential number of newborn animals were used for culture generation. Although LPS stimulation does not directly imitate TBI-induced inflammation, we decided to use it since it is one of the most widely-used pro-inflammatory factor to study immune response of glial cells. As previously reported [106], some of the genes up-regulated by LPS are also strongly expressed by microglia after TBI, as shown in ex vivo studies. Additionally comparison of LPS stimulation with that obtained using interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) showed that both treatments increased numerous inflammatory genes, however the changes observed after LPS were most pronounced [107].

#### 4.4. Biochemical Analysis

##### 4.4.1. RT-qPCR

To assess gene expression, tissue obtained from selected brain ipsilateral areas, including cortex (with all the tissue above the rhinal fissure), striatum, thalamus, and hippocampus, and cell culture lysates were used. Samples from ex vivo experiments were dissected from sham and TBI mice at five time points (24 h, 4 days, 7 days, 2 weeks and 5 weeks), immersed in RNA-later (Ambion, Inc, Austin, TX, USA) and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  before use. For RT-qPCR, total RNA was extracted [108] with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as previously described [109]. The total RNA concentration was measured using a DeNovix DS-11 Spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA). Reverse transcription was performed on 1000 ng (for tissue) or 500 ng (for cultured cell) of total RNA using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen Inc., Hilden, Germany) at  $37^\circ\text{C}$  for 60 min. The resulting cDNA was diluted 1:10 with  $\text{H}_2\text{O}$ . RT-qPCR was performed using Assay-On-Demand TaqMan probes according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and was run on an iCycler device (BioRad, Hercules, Warsaw, Poland). The following TaqMan primers were used: Mm00446968\_m1 (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, *Hprt*), Mm00479862\_g1 (allograft inflammatory factor 1, *IBA-1*), Mm00525305\_m1 (transmembrane protein 119, *TMEM119*), Mm01253033\_m1 (glial fibrillary acidic protein, *GFAP*), Mm00503537\_m1 (*Cd177*), Mm01210556\_m1 (oligodendrocyte transcription factor 2, *Olig2*), Mm01182107\_g1 (*Cd8*), Mm00432142\_m1 (complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide, *C1qa*), Mm00663210\_mH (complement component 1, s subcomponent 1, *C1s1*), Mm04206253\_g1 (complement component 1, r subcomponent A, *C1ra*), Mm01289834\_m1 (*collectin 11*), Mm00484287\_m1 (*ficolin A*), Mm01332438\_m1 (*ficolin B*), Mm00495413\_m1 (*mannose binding lectin A*, *MBL-A*), and Mm00487623\_m1 (*mannose binding lectin C*, *MBL-C*). Expression of the *Hprt* transcript (a housekeeping gene) was quantified to control for variations in the amount of cDNA. The cycle threshold values were calculated automatically using iCycler IQ 3.0 software with the default parameters. The abundance of RNA was calculated as  $2^{-(\text{threshold cycle})}$ .

##### 4.4.2. Western Blotting

Ipsilateral cortical, striatal, thalamic, and hippocampal tissues harvested 24 h and 7 days after TBI or sham procedure were used for our study. The tissue was placed in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All the samples were cleared by  $14,000 \times g$  centrifugation for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . The total protein concentration was measured using the bicinchoninic acid method. Protein samples were heated for 8 min at  $98^\circ\text{C}$  in loading buffer ( $4 \times$  Laemmli Buffer, Bio-Rad, Warsaw, Poland). Samples were then

loaded on 4–15% Criterion TGX precast polyacrylamide gels (Bio-Rad, Warsaw, Poland) to carry out electrophoresis. Samples were then transferred to Immun-Blot polyvinylidene fluoride (PVDF) Membranes (Bio-Rad, Warsaw, Poland) by semidry transfer (30 min, 25 V). Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk (Bio-Rad, Warsaw, Poland) in TBST (Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20) for 1 h, washed with TBST buffer, and incubated with the following commercially available primary antibodies overnight at 4 °C: mouse anti-GAPDH (1:5000; Merck, Darmstadt, Germany), rabbit anti-IBA-1 (1:500; Novus Biologicals, Centennial, USA), and rabbit anti-GFAP (1:10,000; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA). The membranes were then placed in horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at a dilution of 1:5000 for 1 h at room temperature (RT). The primary and secondary antibodies were dissolved in SignalBoost Immunoreaction Enhancer Kit (Merck, Darmstadt, Germany) solutions. Membranes were washed in TBST. Immune complexes were detected by the Clarity Western enhanced chemiluminescence (ECL) Substrate (Bio-Rad, Warsaw, Poland) and visualized using a Fujifilm LAS-4000 Fluor Imager system. Quantification of the bands was performed using the Fujifilm Multi Gauge system. The membranes are available for review in the Supplementary Materials file (Supplementary 1).

#### 4.4.3. Immunofluorescence and Confocal Analysis

Immunofluorescence was performed on 20 µm coronal sections in the brain ipsilateral cortex. After thorough washing with 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), sections were incubated for 1 h at RT with blocking solution containing 10% normal goat serum (NGS) and 0.3% Triton X-100 and then with rabbit anti-mouse C1q (1.177 mg/mL, 1:500; Abcam, Cambridge, UK). Positive cells were stained with an Alexa 488-conjugated goat secondary antibody (4 µg/mL, Life Sciences, Hercules, CA, USA). Sections were then incubated for 1 h with the following primary antibodies: mouse anti-mouse NeuN (10 µg/mL, 1:250; Merck Millipore; Burlington; MA; USA), goat anti-mouse glial fibrillary acid protein (GFAP, 0.5 µg/mL, 1:2000; Chemicon), or biotin rat anti-mouse Cd45 (0.5 mg/mL; 1:800; BD Bioscience, San Jose, CA, USA) followed by incubation with the appropriate Alexa 546- or Alexa 555-conjugated goat secondary antibody (4 µg/mL, Life Sciences, Hercules, CA, USA). Vessels were stained with isolectin IB4-647 (IB-4; 1 mg/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA). Cell nuclei were stained with Hoechst (1 mg/mL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For negative control staining, the primary antibodies were omitted, and no staining was observed. Immunofluorescence images were acquired by an IX81 microscope equipped with a confocal scan unit FV500 with 4 laser lines: Ar-Kr (488 nm), He-Ne red (646 nm), He-Ne green (532 nm) (Olympus, Tokyo, Japan), and a ultraviolet (UV) diode, using the scanning sequential mode to avoid bleed-through effects. Three-dimensional volumes were acquired over 10 µm stacks, with 0.23 µm step sizes. Imaris v.6 (Bitplane) and GNU Image Manipulation Program (GIMP) were used to obtain three-dimensional renderings of the images.

#### 4.5. Statistical Analysis

Mice were randomly selected for surgery and were assigned across all cages and days. To minimize variability, all surgeries were performed by the same investigator. The results of the RT-qPCR analyses are presented as the normalized averages derived from the threshold cycle. For the tissue study (Figures 1–4 and 9) and the primary cell culture study (Figure 10), the RT-qPCR and western blot results are presented as fold changes relative to the control (sham group (Figures 1–4 and 9); unstimulated cells (Figure 10)). To determine the particular time points × TBI interaction (Figures 1–4 and 9), ex vivo results (mean ± SEM) were evaluated using two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. Additionally, the in vitro results (mean ± SEM) were evaluated using a t-test (Figure 10). All statistical analyses were performed with GraphPad Prism ver. 8.1.1 (330) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## 5. Conclusions

Depending on the elapsed time and brain regions, different cell types, such as neutrophils, Cd8+ cells, astroglia, macrophages, and microglia, play an essential role after TBI. Importantly, our results indicate that initiators of complement system activation in the ipsilateral brain structures may be responsible for cellular activation and chemotaxis. Among the complement initiators, it appears that the C1q/C1r/C1s complex plays an especially important role after brain damage in all studied brain structures (cortex, striatum, thalamus, and hippocampus). The primary microglial cell culture experiments herein suggest that those cells may be largely responsible for the biosynthesis of the initiators of the classical pathway but contributes very little to the production of lectin pathway initiators. In our opinion, selective targeting of microglia/macrophages and/or the C1q complex and ficolin A may be an effective strategy for human TBI therapy and in other neuroinflammation-related diseases; however, additional studies are required to investigate this hypothesis.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/45/s1>. Western blots details are presented as supplementary material 1 (Supplementary 1).

**Author Contributions:** Conceptualization, A.C., M.-G.D.S. and J.M.; investigation, A.C., K.C., K.P., M.O., D.M. and J.M.; data curation, A.C., K.C., K.P., M.O. and J.M.; formal analysis, A.C., K.C. and K.P.; methodology, A.C., K.C., K.P., M.O. and D.M.; supervision, M.-G.D.S. and J.M.; project administration, M.-G.D.S. and J.M.; resources, A.C., M.-G.D.S. and J.M.; visualization, A.C., K.C., K.P. and M.O.; funding acquisition, M.-G.D.S. and J.M.; writing—original draft, A.C., K.C., K.P., M.O. and J.M.; writing—review & editing; A.C., K.C., K.P., M.-G.D.S. and J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by ERA-NET-NEURON, JTC 2016: LEAP, NEURON9-FP-044 from the following national funding institutions: National Centre for Research and Development (Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, ERA-NET NEURON-Cofund/1/LEAP/15/17), Poland and the Italian Ministry of Health (Ministero della Salute), Italy. This work was also supported by statutory funds of the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences. Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences supported the open access publication.

**Institutional Review Board Statement:** Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Milano, Italy.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article and supplementary material.

**Ethics Statement:** The experimental procedures were conducted according to recommendations of the National Institutes of Health, and were approved by the Ethical Committee of the Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS in conformity with institutional guidelines and in compliance with national and international laws and policies (prot.9F5F5.81 authorization n° 753/2017-PR). According to the 3R policy, the number of animals was reduced to an essential minimum. All the procedures regarding the study design, animal experiments, statistical analysis, and data reporting fulfill the criteria of the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>).

**Acknowledgments:** We thank Katarzyna Popiolek-Barczyk for technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

A $\beta$	Amyloid beta
BBB	Blood-brain barrier
C1qa	Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide
C1ra	Complement component 1, r subcomponent A
C1s1	Complement component 1, s subcomponent 1
C3, C5b-9, C3b, C4b, C5b, C3a, C5a	Complement components
CC-1+	The oligodendrocyte-specific antibody
cC1qR	The collagen-like tail of C1q
CCI	Controlled cortical impact
CCL2	C-C motif chemokine 2
CCL3	C-C motif chemokine 3
Cd177	Cluster of Differentiation 177
Cd45	Cluster of differentiation 45
Cd8	Cluster of differentiation 8
cDNA	Complementary DNA
CNS	Central nervous system
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECL	Enhanced chemiluminescence
gC1qR	Globular head of the C1q
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GIMP	GNU Image Manipulation Program
Hprt	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
IBA-1	Allograft inflammatory factor 1
IL-6	Interleukin 6
IL-beta	Interleukin 1 beta
LPS	Lipopolysaccharide
MBL	Mannose-binding lectin
MBL-A	Mannose binding lectin A
MBL-C	Mannose binding lectin C
MMPs	Matrix metalloproteinases
mRNA	Messenger RNA
NGF	Nerve growth factor
NGS	Normal goat serum
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
PBS	Phosphate-buffered saline
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	Reactive oxygen species
RPM	Revolutions per minute
RT	Room temperature
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
SEM	Standard error of the mean
TBI	Traumatic brain injury
TBST	Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TMEM119	Transmembrane protein 119
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
UV	Ultraviolet

## References

1. Galgano, M.; Toshkezi, G.; Qiu, X.; Russell, T.; Chin, L.; Zhao, L.R. Traumatic brain injury: Current treatment strategies and future endeavors. *Cell Transplant.* **2017**, *26*, 1118–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bellander, B.-M.; Singhrao, S.K.; Ohlsson, M.; Mattsson, P.; Svensson, M. Complement Activation in the Human Brain after Traumatic Head Injury. *J. Neurotrauma* **2001**, *18*, 1295–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. De Blasio, D.; Fumagalli, S.; Longhi, L.; Orsini, F.; Palmioli, A.; Stravalaci, M.; Vegliante, G.; Zanier, E.R.; Bernardi, A.; Gobbi, M.; et al. Pharmacological inhibition of mannose-binding lectin ameliorates neurobehavioral dysfunction following experimental traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37*, 938–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ng, S.Y.; Lee, A.Y.W. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hammad, A.; Westacott, L.; Zaben, M. The role of the complement system in traumatic brain injury: A review. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*. [[CrossRef](#)]
6. Liu, Y.-W.; Li, S.; Dai, S.-S. Neutrophils in traumatic brain injury (TBI): Friend or foe? *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 146. [[CrossRef](#)]
7. Ciecchanowska, A.; Popiolek-Barczyk, K.; Pawlik, K.; Ciapała, K.; Oggioni, M.; Mercurio, D.; De Simoni, M.G.; Mika, J. Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice. *Immunobiology* **2020**, *225*, 1–11. [[CrossRef](#)]
8. Zanier, E.R.; Marchesi, F.; Ortolano, F.; Perego, C.; Arabian, M.; Zoerle, T.; Sammali, E.; Pischiutta, F.; De Simoni, M.G. Fractalkine receptor deficiency is associated with early protection but late worsening of outcome following brain trauma in mice. *J. Neurotrauma* **2016**, *33*, 1060–1072. [[CrossRef](#)]
9. Gao, H.; Han, Z.; Bai, R.; Huang, S.; Ge, X.; Chen, F.; Lei, P. The accumulation of brain injury leads to severe neuropathological and neurobehavioral changes after repetitive mild traumatic brain injury. *Brain Res.* **2017**, *1657*, 1–8. [[CrossRef](#)]
10. Ramlackhansingh, A.F.; Brooks, D.J.; Greenwood, R.J.; Bose, S.K.; Turkheimer, F.E.; Kinnunen, K.M.; Gentleman, S.; Heckemann, R.A.; Gunanayagam, K.; Gelsa, G.; et al. Inflammation after trauma: Microglial activation and traumatic brain injury. *Ann. Neurol.* **2011**, *70*, 374–383. [[CrossRef](#)]
11. Johnson, V.E.; Stewart, J.E.; Begbie, F.D.; Trojanowski, J.Q.; Smith, D.H.; Stewart, W. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain* **2013**, *136*, 28–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Färber, K.; Cheung, G.; Mitchell, D.; Wallis, R.; Weibe, E.; Schwaeble, W.; Kettenmann, H. C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87*, 644–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zanier, E.R.; Montinaro, M.; Vigano, M.; Villa, P.; Fumagalli, S.; Pischiutta, F.; Longhi, L.; Leoni, M.L.; Rebulli, P.; Stocchetti, N.; et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells protect mice brain after trauma. *Crit. Care Med.* **2011**, *39*, 2501–2510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Osier, N.; Dixon, C.E. The Controlled Cortical Impact Model of Experimental Brain Trauma: Overview, Research Applications, and Protocol. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1462*, 177–192. [[CrossRef](#)]
15. Albert-Weissenberger, C.; Mencl, S.; Schuhmann, M.K.; Salur, I.; Göb, E.; Langhauser, F.; Hopp, S.; Hennig, N.; Meuth, S.G.; Nolte, M.W.; et al. C1-Inhibitor protects from focal brain trauma in a cortical cryolesion mice model by reducing Thrombo-Inflammation. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*. [[CrossRef](#)]
16. Shaw, M.; Piper, I.; Daley, M. Relationship of a cerebral autoregulatory index with outcome in head injured patients. *Acta Neurochir. Suppl.* **2008**, *102*, 33–36. [[CrossRef](#)]
17. Longhi, L.; Perego, C.; Ortolano, F.; Zanier, E.R.; Bianchi, P.; Stocchetti, N.; McIntosh, T.K.; De Simoni, M.G. C1-inhibitor attenuates neurobehavioral deficits and reduces contusion volume after controlled cortical impact brain injury in mice. *Crit. Care Med.* **2009**, *37*, 659–665. [[CrossRef](#)]
18. Gyoneva, S.; Ransohoff, R.M. Inflammatory reaction after traumatic brain injury: Therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 471–480. [[CrossRef](#)]
19. Simon, D.W.; McGeachy, M.J.; Bayl, H.; Clark, R.S.B.; Loane, D.J.; Kochanek, P.M. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurol.* **2017**, *13*, 171–191. [[CrossRef](#)]
20. Xiong, Y.; Mahmood, A.; Chopp, M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 128–142. [[CrossRef](#)]
21. Pischiutta, F.; D’Amico, G.; Dander, E.; Biondi, A.; Biagi, E.; Citerio, G.; De Simoni, M.G.; Zanier, E.R. Immunosuppression does not affect human bone marrow mesenchymal stromal cell efficacy after transplantation in traumatized mice brain. *Neuropharmacology* **2014**, *79*, 119–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zanier, E.R.; Pischiutta, F.; Riganti, L.; Marchesi, F.; Turola, E.; Fumagalli, S.; Perego, C.; Parotto, E.; Vinci, P.; Veglianese, P.; et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells drive protective M2 microglia polarization after brain trauma. *Neurotherapeutics* **2014**, *11*, 679–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mao, H.; Lu, L.; Bian, K.; Clausen, F.; Colgan, N.; Gilchrist, M. Biomechanical analysis of fluid percussion model of brain injury. *J. Biomech.* **2018**, *77*, 228–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hellewell, S.C.; Ziebell, J.M.; Lifshitz, J.; Morganti-kossmann, M.C. Impact Acceleration Model of Diffuse Traumatic Brain Injury. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1462*, 253–266. [[CrossRef](#)]
25. Bao, F.; Shultz, S.R.; Hepburn, J.D.; Omana, V.; Weaver, L.C.; Cain, D.P.; Brown, A. A CD11d monoclonal antibody treatment reduces tissue injury and improves neurological outcome after fluid percussion brain injury in rats. *J. Neurotrauma* **2012**, *29*, 2375–2392. [[CrossRef](#)]
26. Aleem, M.; Goswami, N.; Kumar, M.; Manda, K. Low-pressure fluid percussion minimally adds to the sham craniectomy-induced neurobehavioral changes: Implication for experimental traumatic brain injury model. *Exp. Neurol.* **2020**, *329*. [[CrossRef](#)]
27. Smith, D.; Brooks, D.; Wohlgelegen, E.; Rau, T.; Poulsen, D. Temporal and Spatial Changes in the Pattern of Iba1 and CD68 Staining in the Rat Brain Following Severe Traumatic Brain Injury. *Mod. Res. Inflamm.* **2015**, *4*, 9–23. [[CrossRef](#)]

28. Dyhrfort, P.; Shen, Q.; Clausen, F.; Thulin, M.; Enblad, P.; Kamali-Moghaddam, M.; Lewén, A.; Hillered, L. Monitoring of Protein Biomarkers of Inflammation in Human Traumatic Brain Injury Using Microdialysis and Proximity Extension Assay Technology in Neurointensive Care. *J. Neurotrauma* **2019**. [[CrossRef](#)]
29. De Blasio, D.; Fumagalli, S.; Orsini, F.; Neglia, L.; Perego, C.; Ortolano, F.; Zanier, E.R.; Picetti, E.; Locatelli, M.; Stocchetti, N.; et al. Human brain trauma severity is associated with lectin complement pathway activation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2019**, *39*, 794–807. [[CrossRef](#)]
30. Colicos, M.A.; Dixon, C.E. Delayed, selective neuronal death following experimental cortical impact injury in rats: Possible role in memory deficits. *Brain Res.* **1996**, *739*, 111–119. [[CrossRef](#)]
31. Geddes, D.M.; LaPlaca, M.C.; Cargill, R.S. Susceptibility of hippocampal neurons to mechanically induced injury. *Exp. Neurol.* **2003**, *184*, 420–427. [[CrossRef](#)]
32. Sato, M.; Chang, E.; Igarashi, T.; Noble, L.J. Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: Time course and regional variability. *Brain Res.* **2001**, *917*, 45–54. [[CrossRef](#)]
33. Mohamed, A.Z.; Corrigan, F.; Collins-Praino, L.E.; Plummer, S.L.; Soni, N.; Nasrallah, F.A. Evaluating spatiotemporal microstructural alterations following diffuse traumatic brain injury. *NeuroImage Clin.* **2020**, *25*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 159–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhang, X.; Cheng, R.; Rowe, D.; Sethu, P.; Daugherty, A.; Yu, G.; Shin, H.Y. Shear-sensitive regulation of neutrophil flow behavior and its potential impact on microvascular blood flow dysregulation in hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 587–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pliyev, B.K.; Menshikov, M. Differential effects of the autophagy inhibitors 3-methyladenine and chloroquine on spontaneous and TNF- $\alpha$ -induced neutrophil apoptosis. *Apoptosis* **2012**, *17*, 1050–1065. [[CrossRef](#)]
37. Flygt, J.; Djupsjö, A.; Lenne, F.; Marklund, N. Myelin loss and oligodendrocyte pathology in white matter tracts following traumatic brain injury in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **2013**, *38*, 2153–2165. [[CrossRef](#)]
38. West, E.E.; Kolev, M.; Kemper, C. Complement and the Regulation of T Cell Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, *36*, 309–338. [[CrossRef](#)]
39. Kolev, M.; Dimeloe, S.; Le Friec, G.; Navarini, A.; Arbore, G.; Povoleri, G.A.; Fischer, M.; Belle, R.; Loeliger, J.; Develioglu, L.; et al. Complement Regulates Nutrient Influx and Metabolic Reprogramming during Th1 Cell Responses. *Immunity* **2015**, *42*, 1033–1047. [[CrossRef](#)]
40. West, E.E.; Kunz, N.; Kemper, C. Complement and human T cell metabolism: Location, location, location. *Immunol. Rev.* **2020**, *295*, 68–81. [[CrossRef](#)]
41. Daglas, M.; Draxler, D.F.; Ho, H.; McCutcheon, F.; Galle, A.; Au, A.E.; Larsson, P.; Gregory, J.; Alderuccio, F.; Sashindranath, M.; et al. Activated CD8+ T Cells Cause Long-Term Neurological Impairment after Traumatic Brain Injury in Mice. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 1178–1191.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mracsko, E.; Liesz, A.; Stojanovic, A.; Lou, W.P.K.; Osswald, M.; Zhou, W.; Karcher, S.; Winkler, F.; Martin-Villalba, A.; Cerwenka, A.; et al. Antigen dependently activated cluster of differentiation 8-positive T cells cause perforin-mediated neurotoxicity in experimental stroke. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 16784–16795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dent, K.A.; Christie, K.J.; Bye, N.; Basrai, H.S.; Turbic, A.; Habgood, M.; Cate, H.S.; Turnley, A.M. Oligodendrocyte birth and death following traumatic brain injury in adult mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*. [[CrossRef](#)]
44. Mayer, C.A.; Brunkhorst, R.; Niessner, M.; Pfeilschifter, W.; Steinmetz, H.; Foerch, C. Blood Levels of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Patients with Neurological Diseases. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yang, Z.; Wang, K.K.W. Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* **2015**, *38*, 364–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Honda, M.; Tsuruta, R.; Kaneko, T.; Kasaoka, S.; Yagi, T.; Todani, M.; Fujita, M.; Izumi, T.; Maekawa, T. Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* **2010**, *69*, 104–109. [[CrossRef](#)]
47. Kumar, A.; Loane, D.J. Neuroinflammation after traumatic brain injury: Opportunities for therapeutic intervention. *Brain. Behav. Immun.* **2012**, *26*, 1191–1201. [[CrossRef](#)]
48. Shlosberg, D.; Benifla, M.; Kaufer, D.; Friedman, A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, *6*, 393–403. [[CrossRef](#)]
49. Herndon, J.M.; Tome, M.E.; Davis, T.P. Development and Maintenance of the Blood-Brain Barrier. In *Primer on Cerebrovascular Diseases: Second Edition*; Elsevier Inc.: New York, NY, USA, 2017; pp. 51–56. ISBN 9780128030585.
50. Pearn, M.L.; Niesman, I.R.; Egawa, J.; Sawada, A.; Almenar-Queralt, A.; Shah, S.B.; Duckworth, J.L.; Head, B.P. Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2017**, *37*, 571–585. [[CrossRef](#)]
51. Lafrenaye, A.D.; Mondello, S.; Wang, K.K.; Yang, Z.; Povlishock, J.T.; Gorse, K.; Walker, S.; Hayes, R.L.; Kochanek, P.M. Circulating GFAP and Iba-1 levels are associated with pathophysiological sequelae in the thalamus in a pig model of mild TBI. *Sci. Rep.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]

52. Makinde, H.M.; Cuda, C.M.; Just, T.B.; Perlman, H.R.; Schwulst, S.J. Nonclassical Monocytes Mediate Secondary Injury, Neurocognitive Outcome, and Neutrophil Infiltration after Traumatic Brain Injury. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 3583–3591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ziegler-Heitbrock, L.; Ancuta, P.; Crowe, S.; Dalod, M.; Grau, V.; Hart, D.N.; Leenen, P.J.M.; Liu, Y.J.; MacPherson, G.; Randolph, G.J.; et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **2010**, *116*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Li, Q.; Barres, B.A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 225–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yin, J.; Valin, K.L.; Dixon, M.L.; Leavenworth, J.W. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *J. Immunol. Res.* **2017**, *2017*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Donat, C.K.; Scott, G.; Gentleman, S.M.; Sastre, M. Microglial activation in traumatic brain injury. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 1–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Loane, D.J.; Kumar, A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp. Neurol.* **2016**, *275*, 316–327. [[CrossRef](#)]
58. Bennett, M.L.; Bennett, F.C.; Liddel, S.A.; Ajami, B.; Zamanian, J.L.; Fernhoff, N.B.; Mulinyawe, S.B.; Bohlen, C.J.; Adil, A.; Tucker, A.; et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E1738–E1746. [[CrossRef](#)]
59. Van Wageningen, T.A.; Vlaar, E.; Kooij, G.; Jongenelen, C.A.M.; Geurts, J.J.G.; Van Dam, A.M. Regulation of microglial TMEM119 and P2RY12 immunoreactivity in multiple sclerosis white and grey matter lesions is dependent on their inflammatory environment. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7*, 1–16. [[CrossRef](#)]
60. Satoh, J.I.; Kino, Y.; Asahina, N.; Takitani, M.; Miyoshi, J.; Ishida, T.; Saito, Y. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology* **2016**, *36*, 39–49. [[CrossRef](#)]
61. Mulder, S.D.; Nielsen, H.M.; Blankenstein, M.A.; Eikelenboom, P.; Veerhuis, R. Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia* **2014**, *62*, 493–503. [[CrossRef](#)]
62. Morgan, T.E.; Rozovsky, I.; Sarkar, D.K.; Young-Chan, C.S.; Nichols, N.R.; Laping, N.J.; Finch, C.E. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces transforming growth factor- $\beta$ 1 and transforming growth factor- $\beta$  receptor messenger RNAs and reduces complement C1qB messenger RNA in rat brain microglia. *Neuroscience* **2000**, *101*, 313–321. [[CrossRef](#)]
63. Neglia, L.; Fumagalli, S.; Orsini, F.; Zanetti, A.; Perego, C.; De Simoni, M.G. Mannose-binding lectin has a direct deleterious effect on ischemic brain microvascular endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2019**, *40*, 1608–1620. [[CrossRef](#)]
64. Lynch, N.J.; Willis, C.L.; Nolan, C.C.; Roscher, S.; Fowler, M.J.; Weihe, E.; Ray, D.E.; Schwaeble, W.J. Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats. *Mol. Immunol.* **2004**, *40*, 709–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Schäfer, M.K.; Schwaeble, W.J.; Post, C.; Salvati, P.; Calabresi, M.; Sim, R.B.; Petry, F.; Loos, M.; Weihe, E. Complement C1q Is Dramatically Up-Regulated in Brain Microglia in Response to Transient Global Cerebral Ischemia. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 5446–5452. [[CrossRef](#)]
66. Fonseca, M.I.; Chu, S.H.; Hernandez, M.X.; Fang, M.J.; Modarresi, L.; Selvan, P.; MacGregor, G.R.; Tenner, A.J. Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *J. Neuroinflamm.* **2017**, *14*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Depboylu, C.; Schäfer, M.K.H.; Schwaeble, W.J.; Reinhart, T.A.; Maeda, H.; Mitsuya, H.; Damadzic, R.; Rausch, D.M.; Eiden, L.E.; Weihe, E. Increase of C1q biosynthesis in brain microglia and macrophages during lentivirus infection in the rhesus macaque is sensitive to antiretroviral treatment with 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 12–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Peterson, S.L.; Nguyen, H.X.; Mendez, O.A.; Anderson, A.J. Complement protein C1q modulates neurite outgrowth in vitro and spinal cord axon regeneration in vivo. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 4332–4349. [[CrossRef](#)]
69. Lui, H.; Zhang, J.; Makinson, S.R.; Cahill, M.K.; Kelley, K.W.; Huang, H.Y.; Shang, Y.; Oldham, M.C.; Martens, L.H.; Gao, F.; et al. Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. *Cell* **2016**, *165*, 921–935. [[CrossRef](#)]
70. Sekar, A.; Bialas, A.R.; De Rivera, H.; Davis, A.; Hammond, T.R.; Kamitaki, N.; Tooley, K.; Presumey, J.; Baum, M.; Van Doren, V.; et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* **2016**, *530*, 177–183. [[CrossRef](#)]
71. Vasek, M.J.; Garber, C.; Dorsey, D.; Durrant, D.M.; Bollman, B.; Soung, A.; Yu, J.; Perez-Torres, C.; Frouin, A.; Wilton, D.K.; et al. A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* **2016**, *534*, 538–543. [[CrossRef](#)]
72. Hong, S.; Beja-Glasser, V.F.; Nfonoyim, B.M.; Frouin, A.; Li, S.; Ramakrishnan, S.; Merry, K.M.; Shi, Q.; Rosenthal, A.; Barres, B.A.; et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* **2016**, *352*. [[CrossRef](#)]
73. Fonseca, M.I.; Kawas, C.H.; Troncoso, J.C.; Tenner, A.J. Neuronal localization of C1q in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *15*, 40–46. [[CrossRef](#)]
74. Klein, M.A.; Kaeser, P.S.; Schwarz, P.; Weyd, H.; Xenarios, I.; Zinkernagel, R.M.; Carroll, M.C.; Verbeek, J.S.; Botto, M.; Walport, M.J.; et al. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 488–492. [[CrossRef](#)]
75. Galvan, M.D.; Luchetti, S.; Burgos, A.M.; Nguyen, H.X.; Hooshmand, M.J.; Hamers, F.P.T.; Anderson, A.J. Deficiency in complement C1q improves histological and functional locomotor outcome after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 13876–13888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. You, Z.; Yang, J.; Takahashi, K.; Yager, P.H.; Kim, H.H.; Qin, T.; Stahl, G.L.; Ezekowitz, R.A.B.; Carroll, M.C.; Whalen, M.J. Reduced tissue damage and improved recovery of motor function after traumatic brain injury in mice deficient in complement component C4. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2007**, *27*, 1954–1964. [[CrossRef](#)]
77. Krukowski, K.; Chou, A.; Feng, X.; Tired, B.; Paladini, M.S.; Riparip, L.K.; Chaumeil, M.M.; Lemere, C.; Rosi, S. Traumatic brain injury in aged mice induces chronic microglia activation, synapse loss, and complement-dependent memory deficits. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Ten, V.S.; Sosunov, S.A.; Mazer, S.P.; Stark, R.L.; Caspersen, C.; Sughrue, M.E.; Botto, M.; Connolly, E.S.; Pinsky, D.J. C1q-deficiency is neuroprotective against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Stroke* **2005**, *36*, 2244–2250. [[CrossRef](#)]
79. Benoit, M.E.; Hernandez, M.X.; Dinh, M.L.; Benavente, F.; Vasquez, O.; Tenner, A.J. C1q-induced LRP1B and GPR6 proteins expressed early in Alzheimer disease mouse models, are essential for the C1q-mediated protection against amyloid- $\beta$  neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 654–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Thielens, N.M.; Tedesco, F.; Bohlson, S.S.; Gaboriaud, C.; Tenner, A.J. C1q: A fresh look upon an old molecule. *Mol. Immunol.* **2017**, *89*, 73–83. [[CrossRef](#)]
81. Bossi, F.; Tripodo, C.; Rizzi, L.; Bulla, R.; Agostinis, C.; Guarnotta, C.; Munaut, C.; Baldassarre, G.; Papa, G.; Zorzet, S.; et al. C1q as a unique player in angiogenesis with therapeutic implication in wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4209–4214. [[CrossRef](#)]
82. Feng, X.; Tonnesen, M.G.; Peerschke, E.I.B.; Ghebrehiwet, B. Cooperation of C1q Receptors and Integrins in C1q-Mediated Endothelial Cell Adhesion and Spreading. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 2441–2448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Van Den Berg, R.H.; Faber-Krol, M.C.; Sim, R.B.; Dana, M.R. The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 6924–6930. [[PubMed](#)]
84. Navratil, J.S.; Watkins, S.C.; Wisnieski, J.J.; Ahearn, J.M. The Globular Heads of C1q Specifically Recognize Surface Blebs of Apoptotic Vascular Endothelial Cells. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 3231–3239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Benoit, M.E.; Tenner, A.J. Complement protein C1q-mediated neuroprotection is correlated with regulation of neuronal gene and microRNA expression. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 3459–3469. [[CrossRef](#)]
86. Fraser, D.A.; Pisalyaput, K.; Tenner, A.J. C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J. Neurochem.* **2010**, *112*, 733–743. [[CrossRef](#)]
87. Pisalyaput, K.; Tenner, A.J. Complement component C1q inhibits  $\beta$ -amyloid- and serum amyloid P-induced neurotoxicity via caspase- and calpain-independent mechanisms. *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 696–707. [[CrossRef](#)]
88. Boone, D.R.; Weisz, H.A.; Willey, H.E.; Torres, K.E.O.; Falduto, M.T.; Sinha, M.; Spratt, H.; Bolding, I.J.; Johnson, K.M.; Parsley, M.A.; et al. Traumatic brain injury induces long-lasting changes in immune and regenerative signaling. *PLoS ONE* **2019**, *14*, 1–27. [[CrossRef](#)]
89. Munivenkatappa, A.; Agrawal, A. Role of thalamus in recovery of traumatic brain injury. *J. Neurosci. Rural Pract.* **2016**, *7*, S76–S79. [[CrossRef](#)]
90. Gesuete, R.; Storini, C.; Fantin, A.; Stravalaci, M.; Zanier, E.R.; Orsini, F.; Vietsch, H.; Mannesse, M.L.M.; Ziere, B.; Gobbi, M.; et al. Recombinant C1 inhibitor in brain ischemic injury. *Ann. Neurol.* **2009**, *66*, 332–342. [[CrossRef](#)]
91. Wagner, S.; Lynch, N.J.; Walter, W.; Schwaeble, W.J.; Loos, M. Differential Expression of the Murine Mannose-Binding Lectins A and C in Lymphoid and Nonlymphoid Organs and Tissues. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 1462–1465. [[CrossRef](#)]
92. Lu, J.; Wu, X.; Teh, B.K. The regulatory roles of C1q. *Immunobiology* **2007**, *212*, 245–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Vegh, Z.; Kew, R.R.; Gruber, B.L.; Ghebrehiwet, B. Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR. *Mol. Immunol.* **2006**, *43*, 1402–1407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Longhi, L.; Orsini, F.; De Blasio, D.; Fumagalli, S.; Ortolano, F.; Locatelli, M.; Stocchetti, N.; De Simoni, M.G. Mannose-binding lectin is expressed after clinical and experimental traumatic brain injury and its deletion is protective. *Crit. Care Med.* **2014**, *42*, 1910–1918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Farrar, C.A.; Tran, D.; Li, K.; Wu, W.; Peng, Q.; Schwaeble, W.; Zhou, W.; Sacks, S.H. Collectin-11 detects stress-induced L-fucose pattern to trigger renal epithelial injury. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*. [[CrossRef](#)]
96. Mercurio, D.; Oggioni, M.; Fumagalli, S.; Lynch, N.J.; Roscher, S.; Minuta, D.; Perego, C.; Ippati, S.; Wallis, R.; Schwaeble, W.J.; et al. Targeted deletions of complement lectin pathway genes improve outcome in traumatic brain injury, with MASP-2 playing a major role. *Acta Neuropathol. Commun.* **2020**, *8*, 1–13. [[CrossRef](#)]
97. Endo, Y.; Liu, Y.; Kanno, K.; Takahashi, M.; Matsushita, M.; Fujita, T. Identification of the mouse H-ficolin gene as a pseudogene and orthology between mouse ficolins A/B and human L-/M-ficolins. *Genomics* **2004**, *84*, 737–744. [[CrossRef](#)]
98. Kwon, S.; Kim, M.S.; Kim, D.; Lee, K.W.; Choi, S.Y.; Park, J.; Yeon, H.K.; Lee, Y.; Kwon, H.J. Identification of a functionally relevant signal peptide of mouse ficolin A. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *40*, 532–538. [[CrossRef](#)]
99. Zhang, Y.; Chen, K.; Sloan, S.A.; Bennett, M.L.; Scholze, A.R.; O’Keeffe, S.; Phatnani, H.P.; Guarnieri, P.; Caneda, C.; Ruderisch, N.; et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 11929–11947. [[CrossRef](#)]
100. Hunold, K.; Weber-Steffens, D.; Runza, V.L.; Jensenius, J.C.; Männel, D.N. Functional analysis of mouse ficolin-B and detection in neutrophils. *Immunobiology* **2012**, *217*, 982–985. [[CrossRef](#)]



101. Riedl, M.A.; Grivcheva-Panovska, V.; Moldovan, D.; Baker, J.; Yang, W.H.; Giannetti, B.M.; Reshef, A.; Andrejevic, S.; Lockey, R.F.; Hakl, R.; et al. Recombinant human C1 esterase inhibitor for prophylaxis of hereditary angio-oedema: A phase 2, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *Lancet* **2017**, *390*, 1595–1602. [[CrossRef](#)]
102. Llull, L.; Thiel, S.; Amaro, S.; Cervera, Á.; Planas, A.M.; Chamorro, Á. Ficolin-1 Levels in Patients Developing Vasospasm and Cerebral Ischemia After Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 6572–6580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Katayama, M.; Ota, K.; Nagi-Miura, N.; Ohno, N.; Yabuta, N.; Nojima, H.; Kumanogoh, A.; Hirano, T. Ficolin-1 is a promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Int Immunol.* **2019**, *31*, 23–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Rojewska, E.; Zychowska, M.; Piotrowska, A.; Kreiner, G.; Nalepa, I.; Mika, J. Involvement of Macrophage Inflammatory Protein-1 Family Members in the Development of Diabetic Neuropathy and Their Contribution to Effectiveness of Morphine. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Piotrowska, A.; Kwiatkowski, K.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Mika, J. Maraviroc reduces neuropathic pain through polarization of microglia and astroglia—Evidence from in vivo and in vitro studies. *Neuropharmacology* **2016**, *108*, 207–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Morganti, J.M.; Riparip, L.K.; Chou, A.; Liu, S.; Gupta, N.; Rosi, S. Age exacerbates the CCR2/5-mediated neuroinflammatory response to traumatic brain injury. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*. [[CrossRef](#)]
107. Lively, S.; Schlichter, L.C. Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ ) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10). *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*. [[CrossRef](#)]
108. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156–159. [[CrossRef](#)]
109. Kwiatkowski, K.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Mika, J. The RS504393 Influences the Level of Nociceptive Factors and Enhances Opioid Analgesic Potency in Neuropathic Rats. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2017**, *12*, 402–419. [[CrossRef](#)]



## Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice

Agata Ciechanowska<sup>a</sup>, Katarzyna Popiolek-Barczyk<sup>a</sup>, Katarzyna Pawlik<sup>a</sup>, Katarzyna Ciapała<sup>a</sup>, Marco Oggioni<sup>b</sup>, Domenico Mercurio<sup>b</sup>, Maria-Grazia De Simoni<sup>b</sup>, Joanna Mika<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland

<sup>b</sup> Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Department of Neuroscience, Milan, Italy

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

CCL3  
CCL4  
CCL9  
CCR1  
CCR5  
Chemokine

### ABSTRACT

A deep knowledge of the profound immunological response induced by traumatic brain injury (TBI) raises the possibility of novel therapeutic interventions. Existing studies have highlighted the important roles of C-C motif ligands in the development of neuroinflammation after brain injury; however, the participation of macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members in this phenomenon is still undefined. Therefore, the goal of our study was to evaluate changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members (CCL3, CCL4, and CCL9) and their receptors (CCR1 and CCR5) in a mouse model of TBI (induced by controlled cortical impact (CCI)). We also investigated the pattern of activation of immunological cells (such as neutrophils, microglia and astroglia), which on one hand express CCR1/CCR5, and on the other hand might be a source of the tested chemokines in the injured brain. We investigated changes in mRNA (RT-qPCR) and/or protein (ELISA and Western blot) expression in brain structures (the cortex, hippocampus, thalamus, and striatum) at different time points (24 h, 4 days, 7 days, 2 weeks, and/or 5 weeks) after trauma. Our time-course studies revealed the upregulation of the mRNA expression of all members of the MIP-1 family (CCL3, CCL4, and CCL9) in all tested brain structures, mainly in the early stages after injury. A similar pattern of activation was observed at the protein level in the cortex and thalamus, where the strongest activation was observed 1 day after CCI; however, we did not observe any change in CCL3 in the thalamus. Analyses of CCR1 and CCR5 demonstrated the upregulation of the mRNA expression of both receptors in all tested cerebral structures, mainly in the early phases post injury (24 h, 4 days and 7 days). Protein analysis showed the upregulation of CCR1 and CCR5 in the thalamus 24 h after TBI, but we did not detect any change in the cortex. We also observed the upregulation of neutrophil marker (MPO) at the early time points (24 h and 7 days) in the cortex, while the profound activation of microglia (IBA-1) and astroglia (GFAP) was observed mainly on day 7. Our findings highlight for the first time that CCL3, CCL4, CCL9 and their receptors offer promising targets for influencing secondary neuronal injury and improving TBI therapy. The results suggest that the MIP-1 family is an important target for pharmacological intervention for brain injury.

### 1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is caused by the rapid impact on the brain during an accident, a violence, a sporting activity or other incidents (Iverson et al., 2019; Risling et al., 2019) and may be considered one of the most serious issues worldwide because of its critical localization on the body, dangerous outcomes, and complicated and heterogeneous course. Additionally, TBI is a growing public health problem that generates large medical and social costs. Therapeutic strategies based on targeting pathological mechanisms induced by brain

injury are essential to improve its prognosis. Injury-induced inflammation perpetuates the initial trauma and leads to secondary injury, which is caused by the activation of a variety of pathological events. Targeting secondary injury represents an opportunity to therapeutically interfere with brain damage. Major players of inflammation after brain injury include infiltrated peripheral blood immune cells [such as neutrophils] (Das et al., 2012; Witcher et al., 2015) as well as native immune cells [such as macrophages and microglia] (Faden, 2011; Hsieh et al., 2013; Ramlackhansingh et al., 2011). All these cells are able to produce proinflammatory factors, including chemokines,

\* Corresponding author at: Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Department of Pain Pharmacology, 12 Smetna St. 31-343 Krakow, Poland.  
E-mail address: [joamika@if-pan.krakow.pl](mailto:joamika@if-pan.krakow.pl) (J. Mika).

whose pivotal role in brain injury has been clearly established (Gao et al., 2017; Gyoneva and Ransohoff, 2015; Xu et al., 2017). Therefore, identifying changes in C-C motif chemokine ligands of the MIP-1 family in the development of neuroinflammation after brain injury is highly important.

Chemokines are low-molecular-weight chemotactic cytokines that mediate the accumulation of cells at the site of injury (Charo and Ransohoff, 2006), including TBI (Gyoneva and Ransohoff, 2015). CCL3, also known as macrophage inflammatory protein-1-alpha (MIP-1-alpha), belongs to the MIP-1 family, which, in mice, includes two additional chemokines: CCL4 (MIP-1-beta) and CCL9 (MIP-1-gamma). In kainic acid-induced status epilepticus (Zhu et al., 2019), lipopolysaccharide-induced brain injury (Zhu et al., 2016) and TBI (Clausen et al., 2019; Förstner et al., 2018) CCL3 levels are highly elevated. To the best of our knowledge, the mRNA and protein levels of other members of the MIP-1 family have not been studied in detail thus far. The upregulation of CCL3 and CCL4 has been reported in patients with posttraumatic cerebral contusion (Stefini et al., 2008), suggesting their role in brain damage. MIP-1 family chemokines exert their biological effects through G-protein-coupled receptors, namely, CCR1 and CCR5 (Maurer and von Stebut, 2004). Recently, Joy et al. (Joy et al., 2019) suggested that CCR5 is upregulated in neurons after stroke and that its knockdown induces motor recovery. Accordingly, we recently showed that maraviroc, a CCR5 antagonist, diminishes the neuroimmunological response observed in the central nervous system (CNS) after peripheral nerve injury (Kwiatkowski et al., 2016; Piotrowska et al., 2016). Thus far, the time-dependent changes in CCR1 and CCR5 mRNA and protein levels after TBI have not been studied. Results from the past year have highlighted the close association between TBI neuropathology and inflammation (Das et al., 2019; Zeng et al., 2019), the latter emerging as an important therapeutic target. Therefore, the aim of our study was to examine the possible changes in the mRNA and/or protein levels of MIP-1 family members and their most important receptors (selected by their degree of affinity for CCL3 [CCR1 and CCR5], CCL4 [CCR5], or CCL9 [CCR1]) (Maurer and von Stebut, 2004) in various brain structures (the cortex, thalamus, striatum, and hippocampus) after TBI. TBI was induced by controlled cortical impact (CCI), a well-established and clinically relevant animal model (Chen et al., 2014; Clark et al., 1994; Lee et al., 2019), that reproduces not only the physical injury leading to brain tissue destruction but also the inflammatory response, a serious pathological process that aggravates injury progression. In later experiments, we analyzed the cortical pattern of the activation of immunological cells that may contribute to the effects of MIP-1 family members, namely, neutrophils (*CD177* and MPO), microglia (IBA-1) and astroglia (GFAP). Looking at the pro-inflammatory chemokines involved in the immune response after injury is a very innovative approach to the issue of TBI development and treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male C57BL/6 J mice (9–11 weeks old, weighing 22–27 g) (Charles River, Italy) were used in this study. The animals were housed 4/5 per cage at a temperature of  $22 \pm 2$  °C and a relative humidity  $55 \pm 10$  % on a 12-h light/dark cycle with free access to food and water. All procedures involving animals and their care were conducted in conformity with institutional guidelines in compliance with national and international laws and policies.

### 2.2. Induction of the traumatic brain injury model

Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane (induction, 3 %; maintenance, 1.5 %) in  $N_2O/O_2$  (70/30 %) and placed in a stereotaxic frame. They were subjected to craniotomy on the left side and then to TBI by controlled cortical impact, as previously described (De Blasio

et al., 2017). The injury model used a rigid 3-mm impactor driven by a pneumatic piston stably mounted at an angle of 20° from the vertical plane and applied perpendicularly to the exposed dura mater over the left parietotemporal cortex at a velocity of 5 m/s and a depth of 1 mm. The craniotomy was then covered with a cranioplasty, and the scalp was sutured. Sham-injured mice received identical anesthesia and surgery without brain injury. No animals died after surgery.

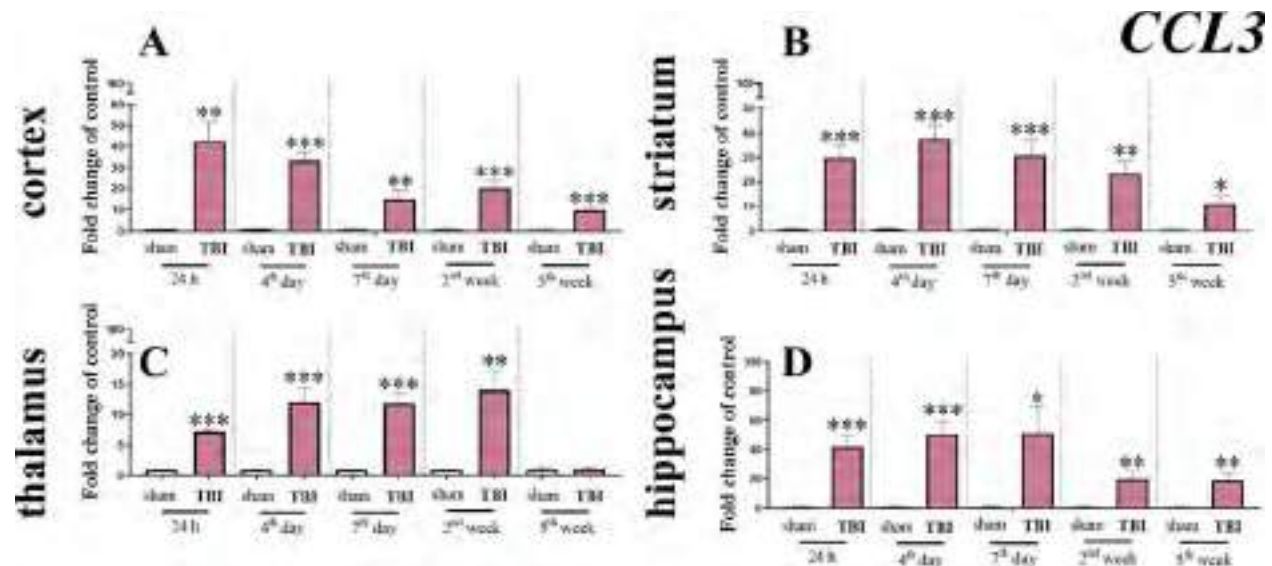
### 2.3. Primary microglial and astroglial cell cultures

*In vitro* studies were performed using primary microglial and astroglial cell cultures prepared from the cerebral cortex obtained from new born C57BL/6 J mice, similarly as described in our previous papers (Piotrowska et al., 2016; Rojewska et al., 2018). The cells were plated at a seeding density of  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in culture medium consisting of high-glucose GlutaMAX™ DMEM supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 0.1 mg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin (Gibco, New York, USA), on poly-L-lysine-coated 75-cm<sup>2</sup> culture flasks and grown in a 37 °C incubator with a humidified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> in air. The culture medium was replaced after 4 days. On day 16, the microglial cells, loosely attached to the monolayer, were harvested by gentle shaking (70 rpm for 1 h and 90 rpm for 15 min.) and centrifugation (800 rpm for 10 min.), cell viability was determined using trypan blue (Bio-Rad, Warsaw, Poland) exclusion method. Then the fresh medium was added to the same culture bottles. After few days, the astroglia cells were prepared by shaking the flasks for 4 h and trypsinization using 0.05 % trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). For protein analysis both, microglia and astroglia were seeded in density of  $1.2 \times 10^6$  cells/well on 6-well plates and incubated for 24 h. IBA-1 and GFAP markers were used to assess the cells specificity. Only the minimal essential number of animals was used, and all of the procedures were performed according to the recommendations of NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.4. Biochemical tests

#### 2.4.1. Analysis of gene expression by RT-qPCR

For biochemical studies, selected brain areas were collected from sham and TBI mice, sacrificed at the following time points: 24 h, 4 days and 7 days, 2 weeks and 5 weeks. Tissues from the ipsilateral cortex (including all the tissue above the rhinal fissure), striatum, hippocampus and from the thalamus were dissected out, rapidly loaded into RNA-later (Ambion, Inc, Austin, USA), frozen and stored at  $-80$  °C until use. For RT-qPCR, total RNA was extracted according to Chomczynski and Sacchi (1987) (Chomczynski and Sacchi, 1987) with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) as previously described (Kwiatkowski et al., 2017). The RNA concentration was measured using a DeNovix DS-11 Spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, USA). Reverse transcription was performed on 1000 ng of total RNA using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen Inc., Hilden, Germany) at 37 °C for 60 min. The resulting cDNA was diluted 1:10 with H<sub>2</sub>O. RT-qPCR was performed using Assay-On-Demand TaqMan probes according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, USA) and was run on an iCycler device (BioRad, Hercules, Warsaw, Poland). The following TaqMan primers were used: Mm00446968\_m1 (*Hprt*), Mm00441259\_g1 (*CCL3*), Mm00443111\_m1 (*CCL4*), Mm00441260\_m1 (*CCL9*), Mm00438260\_s1 (*CCR1*), Mm01963251\_s1 (*CCR5*), Mm00503537\_m1 (*Cd177*), Mm00479862\_g1 (*IBA-1*) and Mm01253033\_m1 (*GFAP*). The expression of the *Hprt* transcript (a housekeeping gene) was quantified to control for variations in the amount of cDNA. The cycle threshold values were calculated automatically using iCycler IQ 3.0 software with the default parameters. The abundance of RNA was calculated as  $2^{-(\text{threshold cycle})}$ .



**Fig. 1.** Time-dependent changes in *CCL3* mRNA expression in the cortex (A), striatum (B), thalamus (C) and hippocampus (D) of TBI or sham-injured mice at selected time points. The data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5-8$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point evaluated by *t*-test.

#### 2.4.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis

Cortical and thalamic tissues obtained at two time points (24 h and 7 days) after TBI or sham procedure were used for enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) according to the manufacturer's recommendations. First, lysates from the tissues were fixed in RIPA buffer. The levels of *CCL3* (Mouse *CCL3*/MIP-1 Alpha ELISA Kit; Sandwich ELISA, User Manual, LifeSpan Biosciences, Seattle, USA); *CCL4* (Mouse *CCL4*/MIP-1 Beta ELISA Kit; Sandwich ELISA, User Manual, LifeSpan Biosciences, Seattle, USA); *CCL9* (Mouse *CCL9*/MIP-1 Gamma ELISA Kit; Sandwich ELISA, User Manual, LifeSpan Biosciences, Seattle, USA) were measured in the cortical and thalamic homogenates. The detection ranges were as follows: *CCL3*: 31.2–2000 pg/ml; *CCL4*: 4–500 pg/ml; and *CCL9*: 7.8–500 pg/ml. Positive controls for each assay were provided by the manufacturer.

#### 2.4.3. Western blot protein analysis

Cortical and thalamic tissues obtained at two time points (24 h and 7 days) after TBI or sham procedure and the cell lysates from primary microglial and astroglial cultures were collected and used for study. The tissue/cell lysates were placed in RIPA buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail. Then the samples cleared by 14,000  $\times$ g centrifugation for 30 min at 4  $^{\circ}$ C. The total protein concentration was measured using the bicinchoninic acid (BCA) method. Protein samples (20  $\mu$ g and 8  $\mu$ g from the tissues and cells, respectively) were heated for 8 min at 98  $^{\circ}$ C in loading buffer (4  $\times$  Laemmli Buffer, Bio-Rad, Warsaw, Poland). In the next step, the samples were loaded on 4–15 % Criterion TGX precast polyacrylamide gels (Bio-Rad, Warsaw, Poland) and, through the use of a semidry transfer system (30 min, 25 V), transferred to Immune-Blot PVDF membranes (Bio-Rad, Warsaw, Poland). Then, the membranes were blocked with dry milk (5 %, nonfat, Bio-Rad, Warsaw, Poland) in Tris-buffered saline with TBST (0.1 % Tween 20) for 1 h, washed with TBST, and incubated with the following commercially available primary antibodies overnight at 4  $^{\circ}$ C: mouse anti-GAPDH (1:5000; Merck, Darmstadt, Germany), rabbit anti-CCR1 (1:500; Novus Biologicals, Centennial, USA), rabbit anti-CCR5 (1:500; Novus Biologicals, Centennial, USA), rabbit anti-GFAP (1:10,000; Novus Biologicals, Centennial, USA), rabbit anti-IBA1 (1:250; Proteintech, Rosemont, USA), and rabbit anti-MPO (1:1000; Abcam, Cambridge, Great Britain). Then, the membranes were incubated in horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies with dilutions 1:5000 for 1 h at room temperature. The

primary and secondary antibodies were dissolved in a SignalBoost Immunoreaction Enhancer Kit (Merck, Darmstadt, Germany) solutions. Membrane washes were performed in TBST. Immune complexes were detected by the Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Warsaw, Poland) and visualized using a Fujifilm LAS-4000 Fluor Imager system. The quantification of the relative levels of the immunoreactive bands was performed using Fujifilm Multi Gauge.

#### 2.5. Statistical analysis

The data are presented as fold changes relative to the control (sham group)  $\pm$  the S.E.M. of 5–8 mice per group. The results of the RT-qPCR analyses are presented as the normalized averages derived from the threshold cycle. The results were statistically evaluated using *t*-test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . All statistical analyses mentioned above were performed with GraphPad Prism ver. 8.1.1 (330) [GraphPad Software, Inc., San Diego, USA].

### 3. Results

#### 3.1. Time-dependent changes in *CCL3*, *CCL4* and *CCL9* mRNA expression in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus of mice after TBI

We observed a strong and significant increase in *CCL3* mRNA levels at every time point tested (24 h, 4 days, 7 days, 2 weeks and 5 weeks) postinjury in all brain structures analyzed (the cortex, thalamus, striatum and hippocampus) compared to the level in sham-operated animals, except for at week 5 in the thalamus (Fig. 1). In the cortex, the highest upregulation was detected 24 h after trauma ( $42.45 \pm 9.04$ ) (Fig. 1A), after which the effect started to decrease through week 5, when the level reached  $9.64 \pm 1.29$ . In the striatum (Fig. 1B), we also noticed a significant and robust increase in chemokine expression (the highest on day 4:  $37.56 \pm 5.78$ ), which was maintained through week 5 ( $11.14 \pm 3.48$ ). In the thalamus (Fig. 1C), increased *CCL3* mRNA levels were also apparent 24 h after injury ( $7.32 \pm 0.33$ ) and were similar to the levels attended in the following days (ranging from 11.87 to 14.12). Strong activation of *CCL3* was noted in the hippocampus (Fig. 1D) on day 7 ( $51.43 \pm 17.28$ ), and the level subsequently started to decrease from week 2–5 ( $19.21 \pm 5.03$ ).

Analysis of the second chemokine, *CCL4*, similarly revealed its upregulation after TBI in all tested brain structures (Fig. 2A–D). Cortical

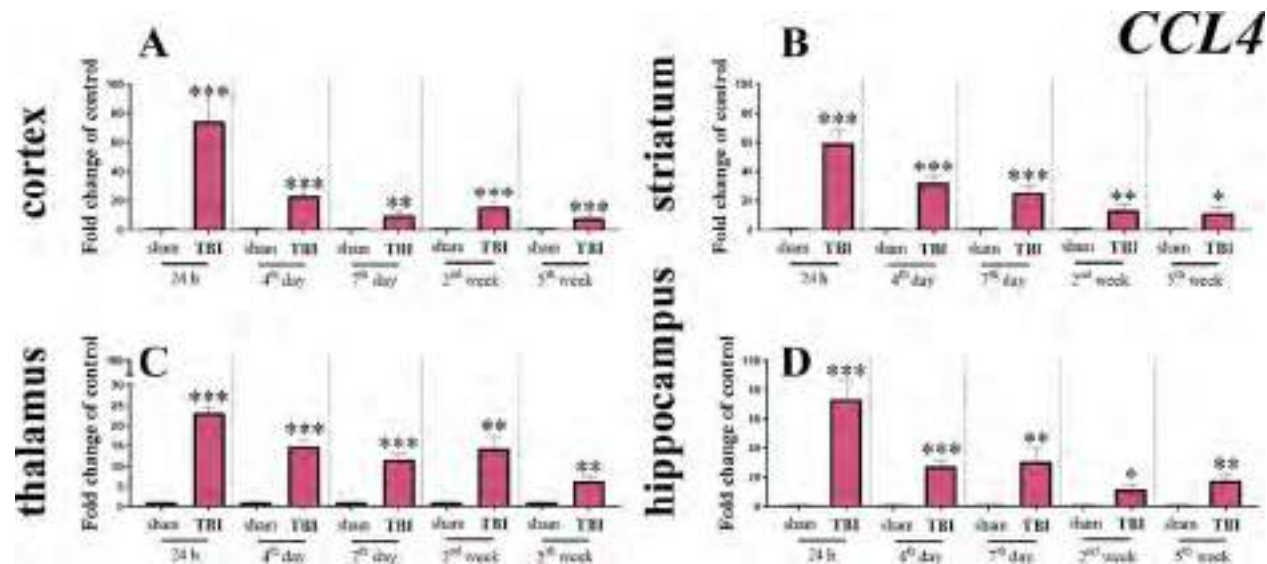


Fig. 2. Time-dependent changes in *CCL4* mRNA expression in the cortex (A), striatum (B), thalamus (C) and hippocampus (D) of TBI or sham-injured mice at selected time points. The data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5-8$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point evaluated by *t*-test.

level of *CCL4* (Fig. 2A) started to grow 24 h after TBI, at which point the level reached its highest value ( $74.72 \pm 14.38$ ); its expression progressively decreased but remained significantly elevated through week 5 ( $8.66 \pm 1.08$ ). In the striatum, the pattern of changes was similar; the strongest activation was observed 24 h after injury ( $59.45 \pm 9.84$ ), and then the level decreased until week 5 ( $11.85 \pm 4.04$ ) (Fig. 2B). The alterations in *CCL4* mRNA levels in the thalamus reached the highest value 24 h after TBI ( $23.07 \pm 1.72$ ) and then remained at a similar level from day 4 to week 2 ( $11.73-14.80$ ). The lowest, but still significant, degree of activation was observed 5 weeks postinjury ( $6.30 \pm 1.9$ ) (Fig. 2C). Similarly, the highest level of *CCL4* in the hippocampus was observed 24 h after injury ( $73.77 \pm 13.04$ ), after which it subsequently started to decline.

The mRNA expression of last chemokine studied, *CCL9*, was weakly increased in all selected brain areas (Fig. 3A–D). In the cortex (Fig. 3A), the highest activation was reached at 24 h ( $7.32 \pm 1.64$ ), and the level then decreased in the following days, although it remained significantly elevated. In the striatum (Fig. 3B), a similar increase was evident from 24 h after TBI ( $4.88 \pm 0.55$ ) through day 4, day 7 and week 2 (ranging from 4.32 to 6.71). The lowest but still significant activation was observed at week 5 postinjury ( $2.26 \pm 0.49$ ). A similar pattern of activation was observed in the thalamus (Fig. 3C), where, starting at 24 h ( $3.18 \pm 0.31$ ), the level of this chemokine was significantly elevated through week 2 (ranging from 3.42 to 6.14). After that time, the significant upregulation diminished. The maximal upregulation of *CCL9* in the hippocampus (Fig. 3D) was observed 24 h after trauma ( $11.94 \pm 3.99$ ), and the expression persisted at a similar level through day 7 ( $8.70 \pm 2.06$ ). At weeks 2 and 5, the activation was lower.

### 3.2. Time-dependent changes in *CCL3*, *CCL4* and *CCL9* protein levels in the cortex and thalamus of mice after TBI

Here, we performed protein (ELISA) analysis of *CCL3*, *CCL4* and *CCL9* at two selected time points after TBI (24 h and 7 days) in the cortex and thalamus. *CCL3* levels in the cortex (Fig. 4A) were higher 24 h after injury ( $2.59 \pm 0.18$ ) than on day 7, when the level of this chemokine was decreased but remained significantly higher than that in sham animals ( $1.42 \pm 0.05$ ). No statistically significant changes in *CCL3* protein levels were observed in the thalamus (Fig. 4D).

The second chemokine studied, *CCL4*, showed changes at the protein level in both tested brain areas (the cortex and thalamus) (Fig. 4B,

E). Cortical increases (Fig. 4B) were statistically significant 24 h ( $2.11 \pm 0.21$ ) and 7 days ( $1.75 \pm 0.11$ ) after injury. In the thalamus, we only noticed a significant elevation 24 h after TBI ( $2.07 \pm 0.2$ ) (Fig. 4E).

The *CCL9* protein level (Fig. 4C) was upregulated in the cortex at 24 h ( $1.54 \pm 0.15$ ) but not on day 7. Similarly, in the thalamus (Fig. 4F), a significant increase was observed 24 h after TBI ( $1.22 \pm 0.08$ ), with no activation on day 7.

### 3.3. Time-dependent changes in *CCR1* and *CCR5* mRNA expression in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus of mice after TBI

We observed significant upregulation of the expression of *CCR1* in all tested brain areas from 24 h after injury (Fig. 5A–D). In the cortex (Fig. 5A), the highest level of *CCR1* was detected early after injury, at 24 h and on day 4 ( $12.61 \pm 2.5$ ,  $16.45 \pm 2.73$ , respectively), and statistical significance was maintained until week 2 after TBI ( $4.73 \pm 1.48$ ). In the striatum (Fig. 5B), the highest mRNA activation was reached at the first time point, 24 h after injury ( $20.79 \pm 2.46$ ), and the level remained significantly increased until day 7 ( $7.33 \pm 2.35$ ). A similar pattern of activation was noticed in the thalamus (Fig. 5C), where activation was first noted 24 h after injury ( $5.95 \pm 0.58$ ) and lasted until days 4 and 7 ( $2.38 \pm 0.35$ ,  $1.90 \pm 0.2$ , respectively). Hippocampal (Fig. 5D) *CCR1* expression was also strongly elevated 24 h after injury ( $40.95 \pm 14.94$ ) and was then declined at weeks 2 and 5. On day 7, we also observed an increase in *CCR1* mRNA expression; however, this increase was not statistically significant.

The expression of *CCR5* (a second MIP-1 receptor) was upregulated in the analyzed brain structures (Fig. 6A–D); however, the pattern of activation differed from that of *CCR1*. Here, we detected the strongest activation in the cortex on day 4 ( $6.60 \pm 0.71$ ); at other tested time points, the mRNA level of this receptor was also significantly increased. A similar pattern was noted in the striatum, where the most profound changes were noticed on day 4 ( $4.83 \pm 0.32$ ); these changes were still significant on day 7 ( $3.22 \pm 0.51$ ) and at week 2 ( $2.64 \pm 0.2$ ). In the thalamus (Fig. 6C), *CCR5* mRNA was elevated to approximately the same extent at all tested time points (ranging from 1.64 to 2.25). Elevation of *CCR5* in the hippocampus (Fig. 6D) was observed as soon as 24 h after injury; however, the highest levels of activation were reached on days 4 ( $8.17 \pm 1.19$ ) and 7 ( $7.54 \pm 1.92$ ). An increase in *CCR5* transcript levels was still maintained at weeks 2 and 5, although the levels were lower than those observed at the earlier time points.

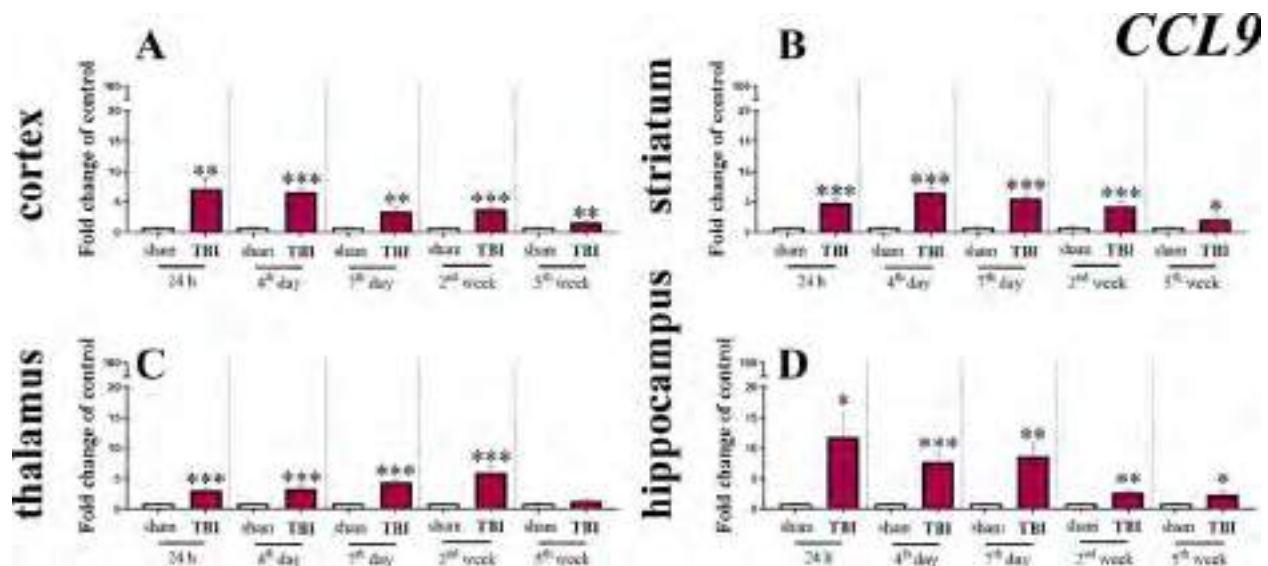


Fig. 3. Time-dependent changes in *CCL9* mRNA expression in the cortex (A), striatum (B), thalamus (C) and hippocampus (D) of TBI or sham-injured mice at selected time points. The data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 5–8). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point evaluated by *t*-test.

#### 3.4. Time-dependent changes in *CCR1* and *CCR5* protein levels in the cortex and thalamus of mice after TBI

Here, we performed protein (Western blot) analysis of *CCR1* and *CCR5* at two selected time points after TBI (24 h and 7 days) in the cortex and thalamus. We did not observe any changes in *CCR1* protein levels within the cortex (Fig. 7A) at the selected time points; however,

we noticed significant upregulation in the level of the receptor in the thalamus at 24 h ( $1.52 \pm 0.18$ ) (Fig. 7C). This elevated level was decreased on day 7.

The second receptor, *CCR5*, was also not changed in the cortex (Fig. 7B). Our analysis revealed a slight but significant rise in expression in the thalamus (Fig. 7D), but similar to *CCR1*, the change was only noted 24 h ( $1.28 \pm 0.6$ ) after trauma Fig. 7C.

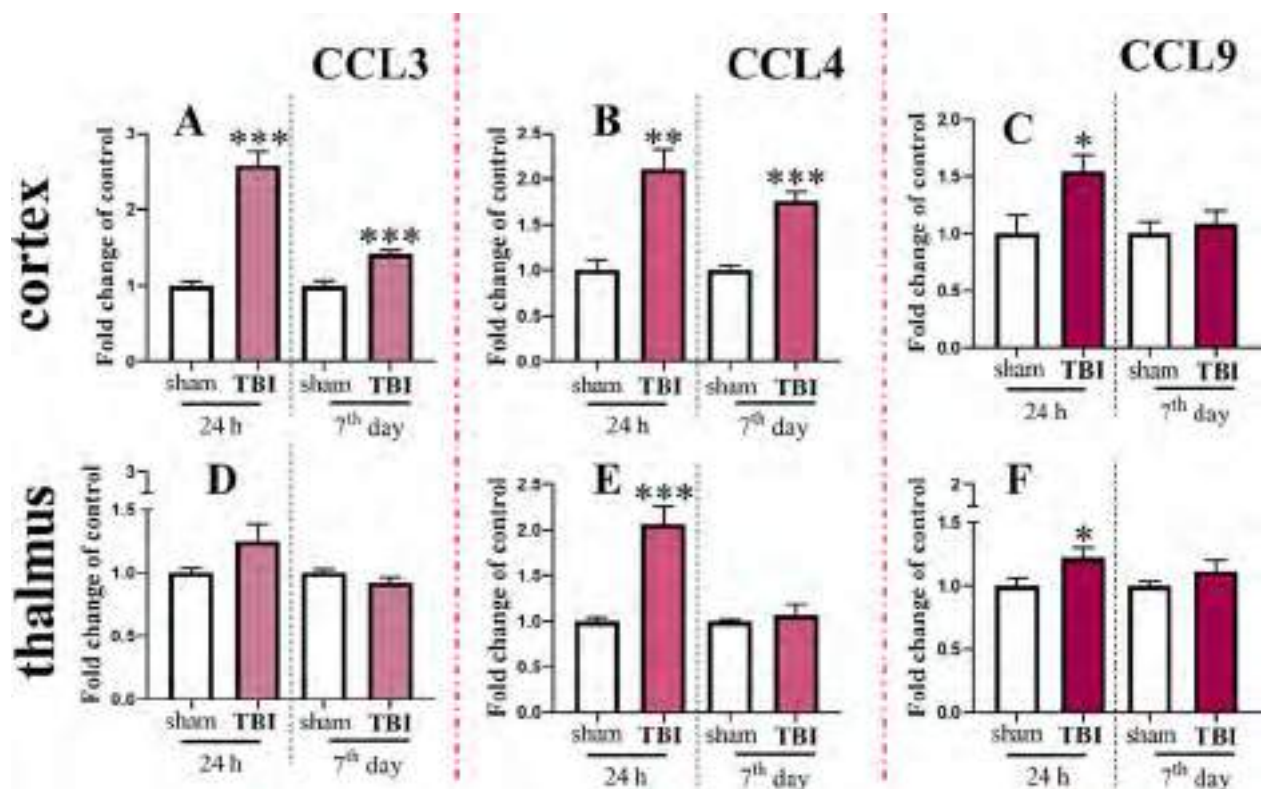


Fig. 4. Time-dependent changes in *CCL3* (A, D), *CCL4* (B, E) and *CCL9* (C, F) protein levels in the cortex (A–C) and thalamus (D–F) of TBI or sham-injured mice at selected time points. The data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 6). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point evaluated by *t*-test.

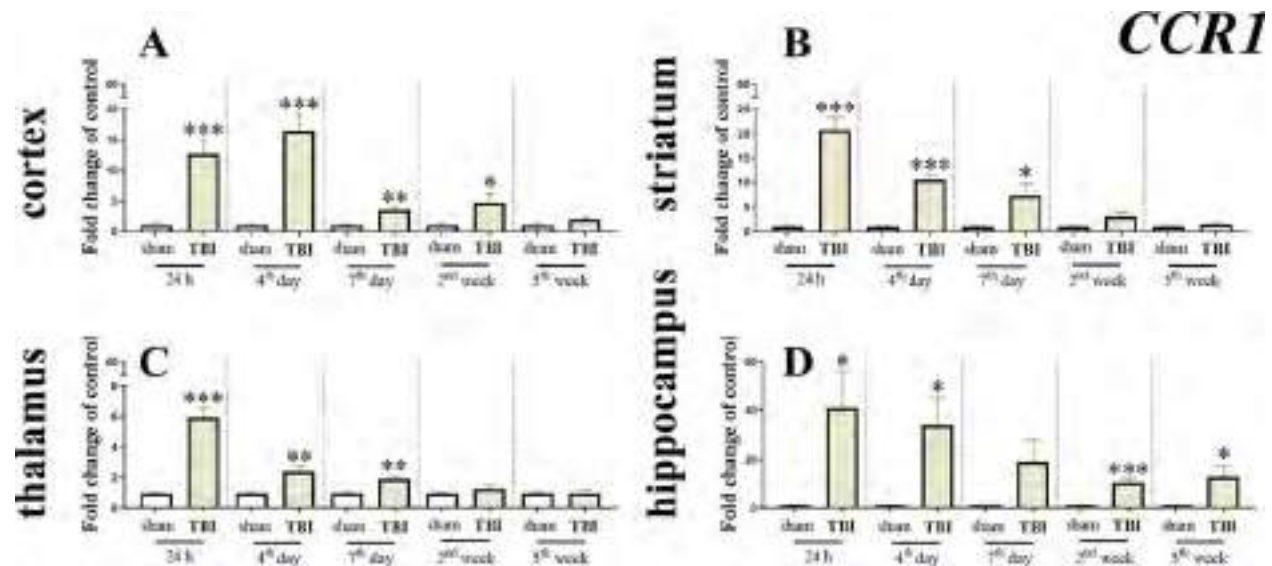


Fig. 5. Time-dependent changes in *CCR1* mRNA expression in the cortex (A), striatum (B), thalamus (C) and hippocampus (D) of TBI or sham-injured mice at selected time points. The data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 5–8). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point evaluated by *t*-test.

### 3.5. *CCR1* and *CCR5* protein levels in the microglial and astroglial cell cultures

Using the Western blot analysis we confirmed the presence of *CCR1* and *CCR5* on microglia and astroglia by *in vitro* studies in primary mouse brain cell cultures (Table 1).

### 3.6. Time-dependent changes in the mRNA and protein levels of neutrophil (*Cd177* and *MPO*), microglial (*IBA-1*) and astroglial (*GFAP*) markers in the cortex of mice after TBI

We performed mRNA (RT-qPCR) and protein (Western blot) analysis of markers of cells involved in the immune or inflammatory response in the area most affected by TBI, namely the cortex. The levels of markers of neutrophils (*Cd177* and *MPO*), microglia (*IBA-1*) and astroglia (*GFAP*) were studied at two selected time points after TBI (24 h and 7 days). In the cortex, we observed strong and significant increase of both (the mRNA and protein levels) of the neutrophil markers *Cd177* (Fig. 8A) and *MPO* (Fig. 8D). Changes in *Cd177* mRNA were present to a similar extent at both time points tested (24 h:  $11.27 \pm 2.61$ ; 7 days:  $7.94 \pm 1.83$ ); however, 24 h after injury, we noticed profound activation of the *MPO* protein ( $7.9 \pm 1.18$ ), which was decreased on day 7 ( $3.52 \pm 0.36$ ). The upregulation of glial cell (microglial and astroglial) markers exhibited a similar pattern at both the mRNA (Fig. 8B, C) and protein (Fig. 8E, F) levels. We observed significant elevation of *IBA-1* and *GFAP* mRNA 24 h after injury ( $2.03 \pm 0.13$ ,  $7.83 \pm 1.1$ , respectively), and the levels were further increased on day 7 ( $4.33 \pm 0.81$ ;  $13.64 \pm 2.13$ , respectively). The corresponding protein levels were significantly higher only on day 7 (microglia:  $2.6 \pm 0.31$ , astroglia:  $5.38 \pm 0.18$ ).

## 4. Discussion

The results of the present study show that MIP-1 family members (*CCL3*, *CCL4* and *CCL9*) are strongly enhanced at the mRNA and/or protein levels in different brain structures after TBI. Additionally, their receptors, which are present in all studied brain structures, are highly upregulated at the mRNA level; however, their protein levels in the cortex remain unchanged after brain trauma, with the only exception of a slight but significant change in the thalamus. Based on our results, we suggest that this chemokine system deserves further study with the aim

of characterizing potential therapeutic targets for TBI treatment.

The members of the MIP-1 family were previously thought to exclusively mediate chemotaxis of mononuclear cells (macrophages and microglia) (Kataoka et al., 2009; Ravindran et al., 2010; Simpson et al., 1998); however, more recent research has suggested that they are also responsible for the recruitment of neutrophils (Johnson et al., 2011; Reichel et al., 2012). In 2018, our immunohistochemical analysis showed that *CCL3* can be produced by neurons (Rojewska et al., 2018). A subsequent study revealed the expression of *CCL3* in neurons and microglia (Kuijpers et al., 2010). Therefore, we hypothesize that, in the early phases of TBI, neuronal cells are the cellular source of *CCL3*. Consequently, first neutrophils, then microglia/macrophages and astroglial cells are recruited/activated, in agreement with several studies (Faden, 2011; Hsieh et al., 2013; Piotrowska et al., 2016; Ramlackhansingh et al., 2011; Xue et al., 2010). In the later phases of neuroinflammation, *CCL3* can also be produced by neurons (Kalkonde et al., 2007; Rojewska et al., 2018), neutrophils (Bennouna et al., 2003; Charmoy et al., 2010), macrophages and microglia (Kataoka et al., 2009; Rojewska et al., 2018; Simpson et al., 1998) and astroglia (Kalkonde et al., 2007). It seems that *CCL3* can evoke effects in a paracrine and autocrine manner. Moreover, *CCL3* not only activates neutrophils and glia but may also affect neuronal  $Ca^{2+}$  signaling (Meucci et al., 1998) and neuronal network activity, according to *in vitro* data (Kuijpers et al., 2010). Furthermore, *CCL3* has been found to be associated with temporal lobe epilepsy (Guzik-Kornacka et al., 2011) and Alzheimer's disease (Liu et al., 2014; Xia et al., 1998). Recently, it was proven that *CCL3* is a hippocampal neuromodulator that is able to regulate synaptic plasticity mechanisms involved in learning and memory functions (Marciniak et al., 2015). Therefore, *CCL3* signaling may be an interesting target for the development of new therapeutic strategies.

*CCL4* is only weakly expressed in healthy brains; however, its levels are enhanced in several chronic inflammatory diseases, including Alzheimer's disease (Xia et al., 1998; Zhu et al., 2014), type 1 diabetes (Hanifi-Moghaddam et al., 2006), osteoarthritis (Koch et al., 1995), and chronic bronchitis (Capelli et al., 1999). A strong increase in *CCL4* is observed in a mouse model of cerebral amyloid deposition and is significantly correlated with age- and sex-dependent neurodegeneration progression (Kang et al., 2018; Zhu et al., 2014). The important role of this chemokine in host tissue damage was revealed by studies using neutralizing antibodies against it (Bless et al., 2000; Manczak et al.,

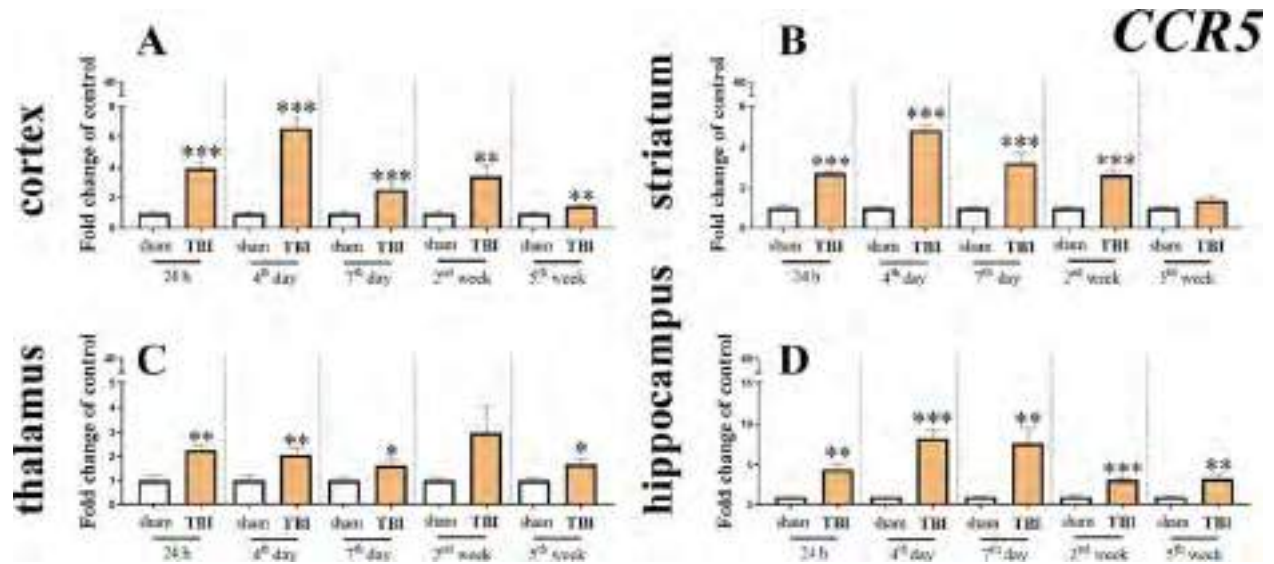


Fig. 6. Time-dependent changes in *CCR5* mRNA expression in the cortex (A), striatum (B), thalamus (C) and hippocampus (D) of TBI or sham-injured mice at selected time points. The data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 5–8). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point evaluated by *t*-test.

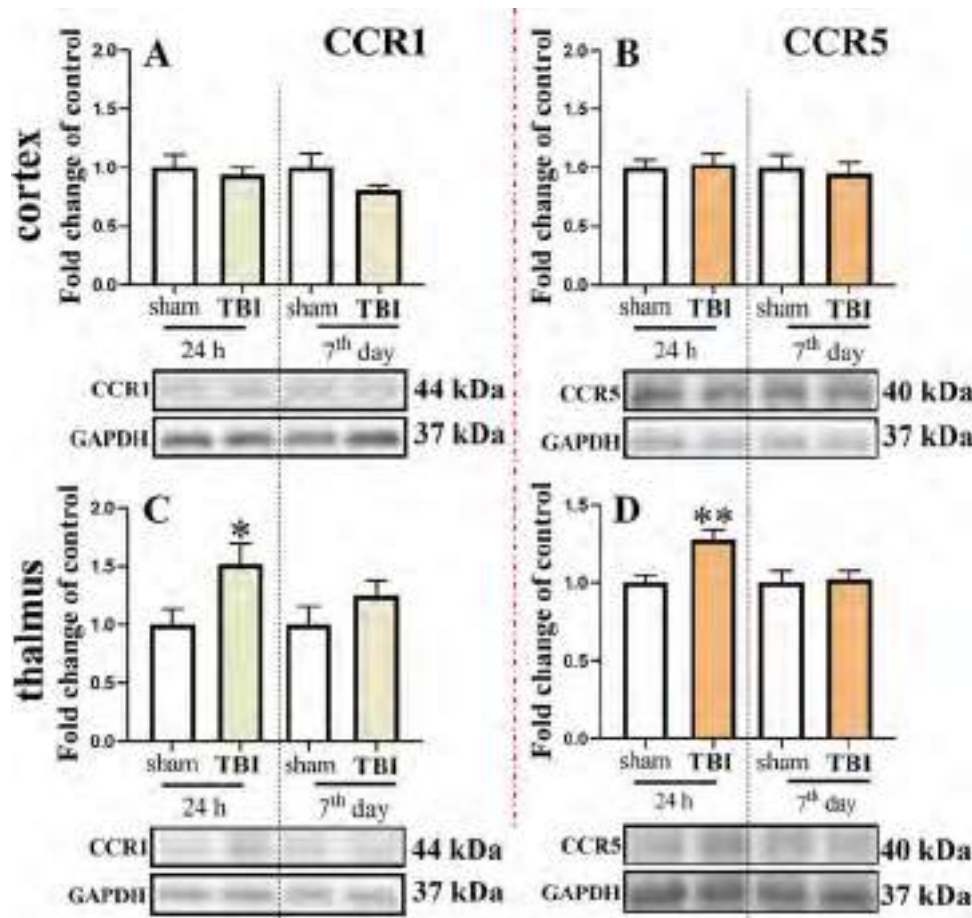


Fig. 7. Time-dependent changes in CCR1 (A, C) and CCR5 (B, D) protein levels in the cortex (A–B) and thalamus (C–D) of TBI or sham-injured mice at 24 h and on day 7. The data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 6). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point evaluated by *t*-test.



**Table 1**

The protein levels of CCR1 and CCR5 in primary microglial and astroglial cell cultures were evaluated by Western blot analysis. The biochemical data are presented as a relative protein level (means  $\pm$  SEM).

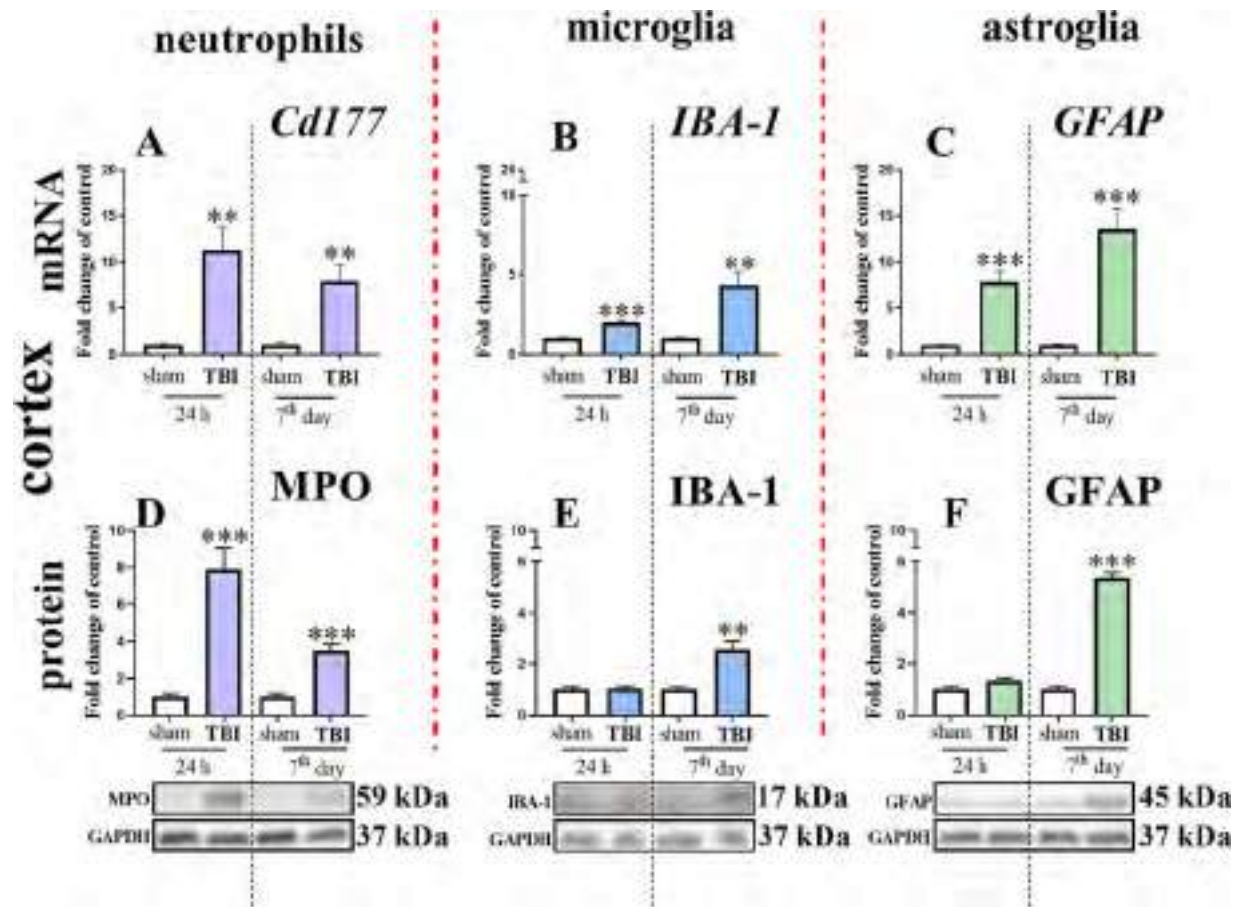
	CCR1	CCR5
<b>microglia</b>	<b>0.41 <math>\pm</math> 0.06</b> CCR1 44 kDa GAPDH 37 kDa	<b>0.13 <math>\pm</math> 0.01</b> CCR5 40 kDa GAPDH 37 kDa
<b>astroglia</b>	<b>0.49 <math>\pm</math> 0.03</b> CCR1 44 kDa GAPDH 37 kDa	<b>0.30 <math>\pm</math> 0.04</b> CCR5 40 kDa GAPDH 37 kDa

2002). Our results support the hypothesis that, after TBI, CCL4 plays a very important role in the onset of neuroinflammation. CCL4 is one of the main brain microvascular endothelial chemokines that acts as an attractant for neutrophils in brain tissue (Yang et al., 2017). These chemokine is also released by neurons (MacNair et al., 2016), neutrophils (Bennouna et al., 2003; Charmoy et al., 2010) and glia

(Rojewska et al., 2018). The immunohistochemical staining has shown that it is expressed on reactive astroglia near the lesion site after brain trauma (Ghirnikar et al., 1996). In the later stages of neuroinflammation, both glial cell types, microglia and astroglia, which are known to be able to produce CCL4 (Ghirnikar et al., 1996; Rojewska et al., 2018; Xia et al., 1998) become importantly activated. Since the strongest changes in MIP family components are observed in CCL4 protein levels in both the cortex and thalamus, it seems that this chemokine may be a particularly interesting target for future therapeutic strategies.

Here, we also observed significant upregulation of CCL9 expression after TBI at both the mRNA and protein levels. According to immunohistochemical results (Baba et al., 2019; Rojewska et al., 2018) CCL9 colocalizes with a neuronal marker, but not with IBA-1 or GFAP, pointing to neurons as the main source of this chemokine. It is also known as a neutrophils attractant (Sadik et al., 2011). Therefore, the CCL9 seems to be important in neuronal-glia and neuronal-neutrophil crosstalk in the initial stage of neuroinflammation. Moreover, the intrathecal administration of a CCL9 neutralizing antibody effectively diminishes spinal neurodegeneration in a diabetic model of neuropathic pain (Rojewska et al., 2018). In the present study, we reported significant changes in CCL9 mRNA and protein expression, although they are far lower than those of CCL3 and CCL4. Therefore, we suggest that, among MIP-1 family members, CCL9 is probably a minor target for future therapeutic strategies, especially because it is not observed in humans (Alliance of Genome Resources, 2020).

The distinctive feature of chemokines is their ability to interact with more than one G-protein-coupled chemokine receptor. MIP-1 family members interact with CCR1, CCR5, or both (Maurer and von Stebut,



**Fig. 8.** Time-dependent changes in the mRNA expression and protein levels of neutrophil, microglial and astroglial markers in the cortex of TBI or sham-injured mice at 24 h and on day 7. The data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 5–8). \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point evaluated by *t*-test.

2004). In the CNS, these receptors are expressed on neurons (Rojewska et al., 2018; Rottman et al., 1997; Zhang et al., 2005), neutrophils (Rudd et al., 2019), microglia (Eltayeb et al., 2007; Rottman et al., 1997; Xia et al., 1998) and astroglia (Knerlich-Lukoschus, 2015; Rottman et al., 1997). Our *in vitro* results confirm presence of CCR1 and CCR5 in primary microglia and astroglia cells obtained from brain. Recently, published results, including data from our group, has increased interest in the potential role of CCR1 and CCR5 in the pathology of many diseases characterized by profound neuroinflammation (Eltayeb et al., 2007; Kwiatkowski et al., 2016; Piotrowska et al., 2016). Here we found that, during the development of brain neuroinflammation, similar to diabetic neuropathy, the mRNA levels of *CCR1* and *CCR5* are highly upregulated, but protein changes are weak. Therefore, we can assume that the exposure of these receptors to their agonists from the MIP-1 family leads to a rapid decrease in the number of cell-surface binding sites. Accordingly, since we observed the most marked changes in MIP-1 family chemokines in the cortex, we did not detect significant changes in their receptor proteins. The situation was different in the thalamus, where we detected a slight upregulation of both receptors at 24 h. As reported by Lee et al. (Lee et al., 2005) in scrapie-infected mice, *CCR1* and *CCR5* transcripts are increased in the thalamus, but not in the cortex, of infected mice. Based on the literature, we can assume that CCR1 and CCR5 play important roles in many neurodegenerative processes, including those evoked by brain injury (Cowell et al., 2002; Li et al., 2017; Xia et al., 1998). The results of our study suggest that, in the early phase of brain injury, chemokines from the MIP-1 family can enhance the infiltration of immune cells into the place of injury. Our recent data revealed that the intrathecal administration of J113863 (a CCR1 antagonist) diminishes pain-related behavior in neuropathy, although the level of this receptor in the spinal cord remains unchanged (*unpublished observation*). Previous studies have reported that two different CCR5 antagonists (maraviroc and DAPTA) attenuate the development of neuropathic pain symptoms in rats after nerve injury (Kwiatkowski et al., 2016; Piotrowska et al., 2016; Saika et al., 2012). Moreover, the latest work of Joy and colleagues (Joy et al., 2019) demonstrated CCR5 as a valid target for stroke and TBI recovery. The authors revealed that maraviroc improves learning and cognition in TBI animals. Our and others results indicate that it is important to further investigate the role of chemokine receptors in neuroinflammation since they can be used as very important drug targets to treat neuroimmunological disorders of different etiologies.

Advances in the understanding of the pathology of TBI have revealed the great complexity of cellular and molecular events. However, knowledge of the brain regions affected by the cascade of events triggered by TBI is still limited. In the present work, we provide evidence of the profound neuroinflammatory response that occurs in different brain structures (the cortex, striatum, thalamus and hippocampus). Part of our studies were performed in the cortex and thalamus, two brain regions that are deeply involved in brain damage in the CCI model and are targets for recovery. The cortex is the site of the impact; therefore, as expected, the most significant changes in the tested factors were observed in this region. Several lines of evidence have shown that the thalamus is particularly susceptible to the progression of secondary injury after brain trauma (Ramlackhansingh et al., 2011; Scott et al., 2015). Positron emission tomography (PET) studies have demonstrated increased inflammation within the thalamus after severe TBI (Ramlackhansingh et al., 2011). Moreover, Scott and colleagues demonstrated that inflammation in the thalamus is associated with thalamocortical white matter damage and profound microglial cell activation, which colocalize with axonal abnormalities (Scott et al., 2015). In the present study, we observed a profound involvement of MIP-1 family members as well as their receptors in this brain region. In agreement with others, our data suggest that the thalamus should be emphasized as an important brain region in TBI pathology.

TBI therapy is a major medical need, and therefore, new approaches based on new potential therapeutic targets are urgently needed to

address the consequences of TBI. Our study proposes new, innovative and pivotal role for all MIP-1 family chemokines in neuroinflammation elicited by brain injury and suggests CCR1 and CCR5 as drug targets. The results of our research are valuable since this novel approach may pave the way for the pharmacological modulation of neuroinflammation in TBI. In particular, recent data and the availability of a pharmacological antagonist of CCR5 (maraviroc), which is already used in the clinic, point to this receptor as a promising molecular target for future clinical trials for brain injury. We think that this original approach to discussed issue will contribute to a breakthrough in patient management and treatment.

## Ethics Statement

The experimental procedures were conducted according to recommendations of the National Institutes of Health and were approved by Ethical Committee of the Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS. According to the 3R policy the number of animals was reduced to essential minimum. All procedures regarding the study design, animal experiments, statistical analysis, and data reporting fulfil the criteria of the Animal Research: Reporting of *in vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>) and were conducted according to recommendations of the National Institutes of Health (NIH).

## Funding

This work was supported by ERA-NET-NEURON, JTC 2016: LEAP, NEURON9-FP-044 with the following national co-found institutions: National Centre for Research and Development (*Narodowe Centrum Badań i Rozwoju*, ERA-NET NEURON-Cofund/1/LEAP/15/17), Poland and the Italian Ministry of Health (Ministero della Salute), Italy. This work was also supported by statutory funds of the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences.

## Declaration of Competing Interest

None.

## Acknowledgments

The English language was corrected by American Journal Experts.

## References

- Alliance of Genome Resources [WWW Document], n.d. URL <https://www.alliance-genome.org/gene/MGI:104533>.
- Baba, N., Wang, F., Iizuka, M., Shen, Y., Yamashita, T., Takaishi, K., Tsuru, E., Matsushima, S., Miyamura, M., Fujieda, M., Tsuda, M., Sagara, Y., Maeda, N., 2019. Induction of regional chemokine expression in response to human umbilical cord blood cell infusion in the neonatal mouse ischemia-reperfusion brain injury model. *PLoS One* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221111>.
- Bennouna, S., Bliss, S.K., Curiel, T.J., Denkers, E.Y., 2003. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* 171, 6052–6058. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6052>.
- Bless, N.M., Huber-Lang, M., Guo, R.-F., Warner, R.L., Schmal, H., Czermak, B.J., Shanley, T.P., Crouch, L.D., Lentsch, A.B., Sarma, V., Mulligan, M.S., Friedl, H.P., Ward, P.A., 2000. Role of CC chemokines (Macrophage inflammatory Protein-1 $\beta$ , monocyte chemoattractant Protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *J. Immunol.* 164, 2650–2659. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2650>.
- Capelli, A., Di Stefano, A., Gnemmi, I., Balbo, P., Cerutti, C.G., Balbi, B., Lusuardi, M., Donner, C.F., 1999. Increased MCP-1 and MIP-1 $\beta$  in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* 14, 160–165. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14a27.x>.
- Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A.E.L., Tacchini-Cottier, F., 2010. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000755>.
- Charo, I.F., Ransohoff, R.M., 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610–621. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052723>.



- 1271–1280. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2012.00146.x>.
- Scott, G., Hellyer, P.J., Ramackhansingh, A.F., Brooks, D.J., Matthews, P.M., Sharp, D.J., 2015. Thalamic inflammation after brain trauma is associated with thalamo-cortical white matter damage. *J. Neuroinflammation* 12. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0445-y>.
- Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., Woodroffe, M.N., 1998. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other  $\beta$ -chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 84, 238–249. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00208-7).
- Stefini, R., Catenacci, E., Piva, S., Sozzani, S., Valerio, A., Bergomi, R., Cenzato, M., Mortini, P., Latronico, N., 2008. Chemokine detection in the cerebral tissue of patients with posttraumatic brain contusions. *J. Neurosurg.* 108, 958–962. <https://doi.org/10.3171/jns.2008.108.5.958>.
- Witcher, K.G., Eiferman, D.S., Godbout, J.P., 2015. Priming the inflammatory pump of the CNS after traumatic brain injury. *Trends Neurosci.* 38, 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.08.002>.
- Xia, M.Q., Qin, S.X., Wu, L.J., Mackay, C.R., Hyman, B.T., 1998. Immunohistochemical study of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimer's disease brains. *Am. J. Pathol.* 153, 31–37. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65542-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65542-3).
- Xu, X., Gao, W., Cheng, S., Yin, D., Li, F., Wu, Y., Sun, D., Zhou, S., Wang, D., Zhang, Y., Jiang, R., Zhang, J., 2017. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation* 14. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0934-2>.
- Xue, Q.S., Yang, C., Hoffman, P.M., Streit, W.J., 2010. Microglial response to murine leukemia virus-induced encephalopathy is a good indicator of neuronal perturbations. *Brain Res.* 1319, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.12.089>.
- Yang, T., Liu, Y.W., Zhao, L., Wang, H., Yang, N., Dai, S.S., He, F., 2017. Metabotropic glutamate receptor 5 deficiency inhibits neutrophil infiltration after traumatic brain injury in mice. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10201-8>.
- Zeng, Z., Zhang, Y., Jiang, W., He, L., Qu, H., 2019. Modulation of autophagy in traumatic brain injury. *J. Cell. Physiol.* <https://doi.org/10.1002/jcp.29173>.
- Zhang, N., Inan, S., Cowan, A., Sun, R., Wang, J.M., Rogers, T.J., Caterina, M., Oppenheim, J.J., 2005. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 4536–4541. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406030102>.
- Zhu, M., Allard, J.S., Zhang, Y., Perez, E., Spangler, E.L., Becker, K.G., Rapp, P.R., 2014. Age-related brain expression and regulation of the chemokine CCL4/MIP-1 $\beta$  in APP/PS1 double-transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 362–374. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000060>.
- Zhu, X., Wei, D., Chen, O., Zhang, Z., Xue, J., Huang, S., Zhu, W., Wang, Y., 2016. Upregulation of CCL3/MIP-1 $\alpha$  regulated by MAPKs and NF- $\kappa$ B mediates microglial inflammatory response in LPS-induced brain injury. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 76, 304–317. <https://doi.org/10.21307/ane-2017-029>.
- Zhu, X., Liu, J., Chen, O., Xue, J., Huang, S., Zhu, W., Wang, Y., 2019. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of isoliquiritigenin in kainic acid-induced epileptic rats via the TLR4/MYD88 signaling pathway. *Inflammopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00592-7>.



# Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes

Agata Ciechanowska<sup>1</sup> · Katarzyna Popiolek-Barczyk<sup>1</sup> · Katarzyna Ciapała<sup>1</sup> · Katarzyna Pawlik<sup>1</sup> · Marco Oggioni<sup>2</sup> · Domenico Mercurio<sup>2</sup> · Maria-Grazia de Simoni<sup>2</sup> · Joanna Mika<sup>1</sup>

Received: 29 July 2020 / Revised: 23 October 2020 / Accepted: 27 October 2020 / Published online: 13 November 2020  
 © The Author(s) 2020

## Abstract

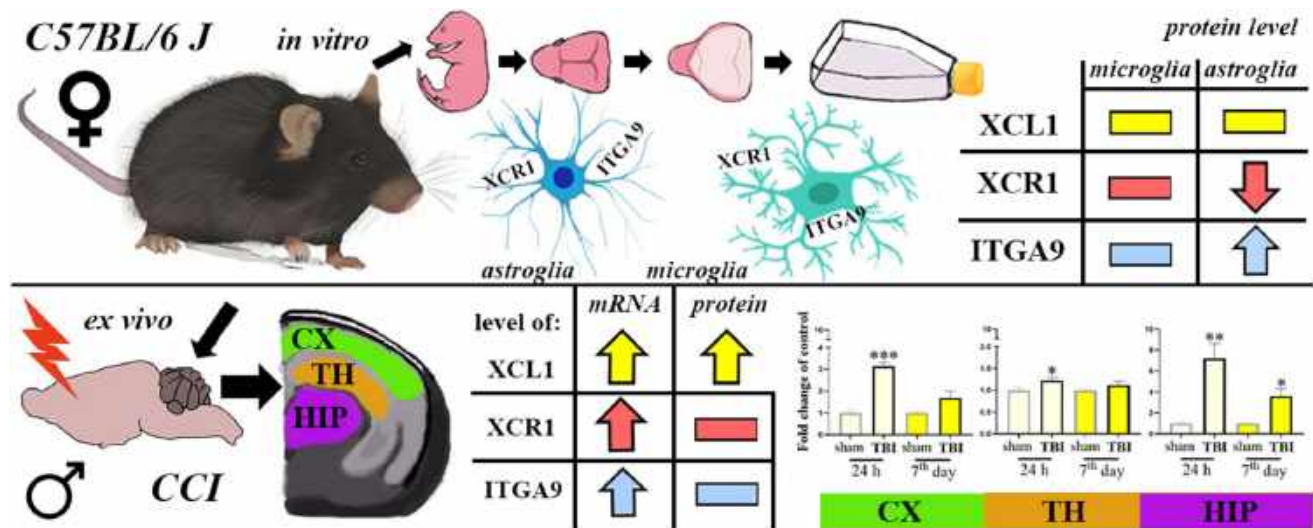
**Background** Every year, millions of people suffer from various forms of traumatic brain injury (TBI), and new approaches with therapeutic potential are required. Although chemokines are known to be involved in brain injury, the importance of X-C motif chemokine ligand 1 (XCL1) and its receptors, X-C motif chemokine receptor 1 (XCR1) and alpha-9 integrin (ITGA9), in the progression of TBI remain unknown.

**Methods** Using RT-qPCR/Western blot/ELISA techniques, changes in the mRNA/protein levels of XCL1 and its two receptors, in brain areas at different time points were measured in a mouse model of TBI. Moreover, their cellular origin and possible changes in expression were evaluated in primary glial cell cultures.

**Results** Studies revealed the spatiotemporal upregulation of the mRNA expression of *XCL1*, *XCR1* and *ITGA9* in all the examined brain areas (cortex, thalamus, and hippocampus) and at most of the evaluated stages after brain injury (24 h; 4, 7 days; 2, 5 weeks), except for *ITGA9* in the thalamus. Moreover, changes in XCL1 protein levels occurred in all the studied brain structures; the strongest upregulation was observed 24 h after trauma. Our in vitro experiments proved that primary murine microglial and astroglial cells expressed XCR1 and ITGA9, however they seemed not to be a main source of XCL1.

**Conclusions** These findings indicate that the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes may participate in the development of TBI. The XCL1 can be considered as one of the triggers of secondary injury, therefore XCR1 and ITGA9 may be important targets for pharmacological intervention after traumatic brain injury.

## Graphic abstract



**Keywords** TBI · Chemokine · XCL1 · XCR1 · ITGA9 · Microglia · Astroglia

Extended author information available on the last page of the article

## Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a condition that is caused by sudden damage to the central nervous system (CNS) due to accidents, violence, or sport activity and is a major urgent medical need. TBI is extremely difficult to treat, since it leads to secondary injury as a consequence of blood–brain barrier (BBB) disruption, cell death, ischemia, and hemorrhage [1]. Because the commonly used therapies are insufficient and complicated, new approaches that are based on the identification of new, potential therapeutic targets could help us develop more accurate reactions in an effort to address the consequences of TBI. Neuronal damage in brain structures leads to primary cell death, which is induced directly by the trauma, and to the subsequent death of neurons caused by secondary cascades [2]. The complexity of the neuroimmunological responses that appear after TBI still needs to be understood. It is well established that cytokines play a key role in homeostasis [3]. It is known that many interleukins (e.g., IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18) are sharply upregulated in TBI patients [4–6]. Similar results were obtained in rodent models of TBI, and recent experimental studies have shown significant changes in some chemokines, e.g., CCL2, CCL3, CCL4, CCL9, CCL11, CX3CL1, and CXCL5 [1, 7, 8], however, there is still a lack of knowledge about X-C motif chemokine ligand 1 (XCL1, also known as lymphotactin and SCM-1 $\alpha$ ). XCL1 acts through X-C motif chemokine receptor 1 (XCR1), which is a G-protein coupled receptor [9] that has been detected in neurons [10, 11]. It was shown that after mental nerve damage the XCR1 is upregulated at the site of the injury—the authors proposed XCL1 as an excitability factor in orofacial pain [11]. Importantly, XCL1 is produced not only by immune cells [12], but also by neurons [10, 11, 13, 14]. Therefore, the role of XCL1 in TBI is particularly interesting. However, XCR1 is not the only receptor for XCL1. Interestingly, in 2017 Matsumoto et al. showed that XCL1 affects fibroblast migration through alpha-9 integrin (ITGA9) [15]. This receptor has been already detected in some cell types, including endothelial cells, epithelial cells, muscle cells, neutrophils and neural precursor cells [16–19]. However, the expression of ITGA9 on microglial and astroglial cells has not been studied thus far. *In vitro* studies showed that the neuronal expression of ITGA9 enhanced the ability of axons to regenerate [20]. On the other hand, it was suggested that blocking ITGA9 can be used as a therapeutic strategy in autoimmune diseases [21]. However, in the current literature, there is still a lack of knowledge about the roles of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes in TBI.

Therefore, the aim of our study was to examine, using RT-qPCR, Western blot and ELISA techniques, the possible temporal changes in the mRNA and protein levels of

XCL1 and its two receptors, XCR1 and ITGA9, in different brain structures (cortex, thalamus, and hippocampus) after TBI. The injury was induced in mice by controlled cortical impact (CCI), which is a clinically relevant model of human TBI [22]. This model induces local responses in the brain tissue, leading to neuronal loss, BBB disruption and subsequent inflammatory response induction, including chemokine release [2]. Moreover, the goal of the study was to identify the cellular origin of XCL1 and to demonstrate the expression of XCR1 and ITGA9 in LPS-stimulated primary cultures of microglia and astrocytes using RT-qPCR, Western blot and ELISA techniques. Additionally, the influence of XCL1 on primary cell cultures of microglia and astrocytes was tested.

## Materials and methods

### Animals

In this study, the C57BL/6J mice from the Charles River, Italy, Germany were used, as follows (1) adult males for the TBI model (9–11 weeks old, weighing 22–27 g); (2) 1-day-old mice pups for primary glial cell cultures studies. The mice were housed at a temperature of  $22 \pm 2$  °C and a relative humidity  $55 \pm 10\%$  with a 12-h light/dark cycle. The mice were housed 4–5 per cage and were given *ad libitum* access to food and water. All the procedures using animals were performed in agreement with institutional guidelines and in compliance with national and international laws and policies.

### Induction of the traumatic brain injury model

The animals were anesthetized with inhalation anesthesia (isoflurane—induction, 3%; maintenance, 1.5%) in N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (70/30%) and immobilized in a stereotaxic frame. Next, the mice were subjected to craniotomy on the left side and then to TBI by CCI, according to a previously described procedure [23]. This model reliably causes TBI, which was confirmed by many studies performed in The IRCCS-Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri [23, 24]. This model of severe TBI is typically associated with minimal/no mortality [23]. The assessment of sensorimotor deficits was confirmed as a rule after CCI with the use of composite neurosurgery and the beam walk test weekly for 4 weeks [23]. Contusion volume after these TBI model was observed and calculated in perfused, frozen and cryosected brains stained with cresyl violet as previously described [24]. The TBI model used a pneumatic piston stably mounted at an angle of 20° from the vertical plane. This piston drove a rigid 3-mm impactor that applied force perpendicularly to the exposed dura mater over the left parietotemporal cortex

at a velocity of 5 m/s and a depth of 1 mm. Cranioplasty was performed after craniotomy, and the scalp was sutured. The sham-injured mice were subjected to identical anesthesia and surgery but were not subjected to brain injury. There was no loss in the number of animals after surgery.

### Primary microglial and astroglial cell cultures

The in vitro studies were performed using primary microglial and astroglial cell cultures prepared from the cerebral cortex obtained from newborn C57BL/6J mice, as described in our previous paper [8]. The cells were seeded at a density of  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in culture medium consisting of high-glucose GlutaMAX™ DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.1 mg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin (Gibco, New York, USA) in poly-L-lysine-coated 75-cm<sup>2</sup> culture flasks. The cells were grown in a 37 °C incubator with a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The culture medium was replaced after 4 days. On day 16, the microglial cells, which were loosely attached to the monolayer, were harvested by gentle shaking (70 rpm for 1 h and 90 rpm for 15 min) and centrifugation (800 rpm for 10 min), and the cell viability was determined using the trypan blue (Bio-Rad, Warsaw, Poland) exclusion method. Then, fresh medium was added to the same culture bottles. After a few days, the astroglial cells were prepared by shaking the flasks for 4 h and trypsinization using a 0.05% trypsin–EDTA solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). For the protein analysis, both microglia and astroglia were seeded at a density of  $1.2 \times 10^6$  cells/well in 6-well plates and incubated for 48 h before further experiments. The IBA-1 and GFAP markers were used to assess cell purity. Only the minimal essential number of animals was used, and all of the procedures were performed according to the recommendations of the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The cells were treated with LPS (lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111:B4; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), which is causing the oxidative stress and inflammatory status [25, 26]. The dose (100 ng/ml) of LPS and time point (24 h) was chosen based on our previous studies [8, 27]. Moreover, cells were treated with XCL1 (recombinant mouse XCL1 Protein; R&D Systems, Minneapolis, USA) (200 ng/ml) or vehicle (0.2% BSA in PBS). The dose was selected according to previously reported studies [28].

### Biochemical tests

#### Analysis of gene expression by RT-qPCR

For the RT-qPCR studies, selected brain areas were collected from the sham and TBI mice sacrificed at the following time points: 24 h, 4 days and 7 days, 2 weeks and

5 weeks. In addition, cell lysates from the primary microglial and astroglial cultures were collected and used for the study. Tissues from the ipsilateral cortex, hippocampus and thalamus were dissected, rapidly placed into RNAlater (Ambion, Inc., Austin, USA), frozen and stored at – 80 °C until use. For RT-qPCR, total RNA was extracted according to Chomczynski and Sacchi [29] with the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) as previously described [30]. The cell lysates were directly treated with the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). The RNA concentration was measured using the DeNovix DS-11 Spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, USA). Reverse transcription was performed with 1000 ng or 300 ng in case of primary glial cell cultures, of total RNA using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen Inc., Hilden, Germany) at 37 °C for 60 min. The resulting cDNA was diluted 1:10 with H<sub>2</sub>O. RT-qPCR was performed using Assay-On-Demand TaqMan probes according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, USA) with an iCycler device (Bio-Rad, Hercules, Warsaw, Poland). The following TaqMan primers were used: Mm00446968\_m1 (*Hprt*), Mm00434772\_m1 (*Xcl1*), Mm00442206\_s1 (*Xcr1*), Mm00519317\_m1 (*Itga9*), Mm00434228\_m1 (*IL1β*), Mm00446190\_m1 (*IL-6*), Mm00434225\_m1 (*IL-18*), Mm00441259\_g1 (*CCL3*), Mm00443111\_m1 (*CCL4*), Mm00441260\_m1 (*CCL9*), Mm01288386\_m1 (*IL-10*), and Mm01274147\_g1 (*IL-18BP*). The expression of the *Hprt* transcript (a housekeeping gene) was quantified to control for variations in the amounts of cDNA. The cycle threshold values were automatically calculated using iCycler IQ 3.0 software with the default parameters. The abundance of RNA was calculated as  $2^{-(\text{threshold cycle})}$ .

#### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis

The cortical, thalamic and hippocampal tissues obtained at two time points (24 h and 7 days) after TBI or sham procedure and the cell culture lysates were used for enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) according to the manufacturer's recommendations. The tissue/cell lysates were fixed in RIPA buffer with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The level of XCL1 was measured in the tissue homogenates using the Mouse XCL1/Lymphotactin ELISA Kit (Sandwich ELISA, LS-F53223, LifeSpan Biosciences, Seattle, USA). The samples obtained from the cell cultures were measured by the Mouse XCL1/Lymphotactin ELISA Kit (Sandwich ELISA, LS-F39783, LifeSpan Biosciences, Seattle, USA). The detection ranges were as follows: LS-F53223: 6.25–400 pg/ml and LS-F39783: 62.5–4000 pg/ml. Positive controls for each assay were provided by the manufacturer.

## Western blot analysis

The cortical, thalamic and hippocampal tissues obtained at two time points (24 h and 7 days) after TBI or sham procedure and the cell lysates from the primary microglial and astroglial cultures were collected and used for the study. The tissue/cell lysates were placed in RIPA buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Then, the samples were cleared by 14,000×g centrifugation for 30 min at 4 °C. The total protein concentration was measured using the bicinchoninic acid (BCA) method. The protein samples (20 µg and 8 µg from the tissues and cells, respectively) were heated for 8 min at 98 °C in loading buffer (4×Laemmli Buffer, Bio-Rad, Warsaw, Poland). Then, the samples were loaded in 4–15% Criterion TGX precast polyacrylamide gels (Bio-Rad, Warsaw, Poland) and, through the use of a semidry transfer system (30 min, 25 V), transferred to Immune-Blot PVDF membranes (Bio-Rad, Warsaw, Poland). Then, the membranes were blocked with dry milk (5%, nonfat, Bio-Rad, Warsaw, Poland) in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) for 1 h, washed with TBST (4×5 min), and incubated overnight at 4 °C with the following commercially available primary antibodies: mouse anti-GAPDH (1:5000; Merck, Darmstadt, Germany), rabbit anti-XCL1 (1:150; Novus Biologicals, Centennial, USA), rabbit anti-XCR1 (1:5000; Lifespan Biosciences, Seattle, USA), and rabbit anti-ITGA9 (1:3000; Abcam, Cambridge, Great Britain). Then, the membranes were incubated in horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Vector Laboratories, Burlingame, USA) at dilutions of 1:5000 for 1 h at room temperature. The primary and secondary antibodies were dissolved in solutions from the SignalBoost Immunoreaction Enhancer Kit (Merck, Darmstadt, Germany). The membranes were washed in TBST (4×5 min). The immune complexes were detected by the Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Warsaw, Poland) and visualized using the Fujifilm LAS-4000 Fluor Imager system. The quantification of the relative levels of the immunoreactive bands was performed using Fujifilm Multi Gauge.

## Statistical analysis

The RT-qPCR results are presented as the normalized averages derived from the threshold cycle. For the tissue study (Figs. 1, 2, 3) and the primary cell culture study (Figs. 4, 5), the RT-qPCR/Western blot/ELISA results are presented as fold changes relative to the control [sham group (Figs. 1, 2, 3); unstimulated cells (Figs. 4, 5)]. All the results (mean ± SEM) were statistically evaluated using a *t* test (Figs. 1, 2, 3, 4, 5). Additionally, to determine the particular

time points × TBI interaction, some results were evaluated using two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons post hoc test (Figs. 1, 2, 3). All the statistical analyses mentioned above were performed with GraphPad Prism ver. 8.1.1 (330) (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

## Results

### Time-dependent changes in *XCL1* mRNA expression in the cortex, thalamus and hippocampus of mice after TBI

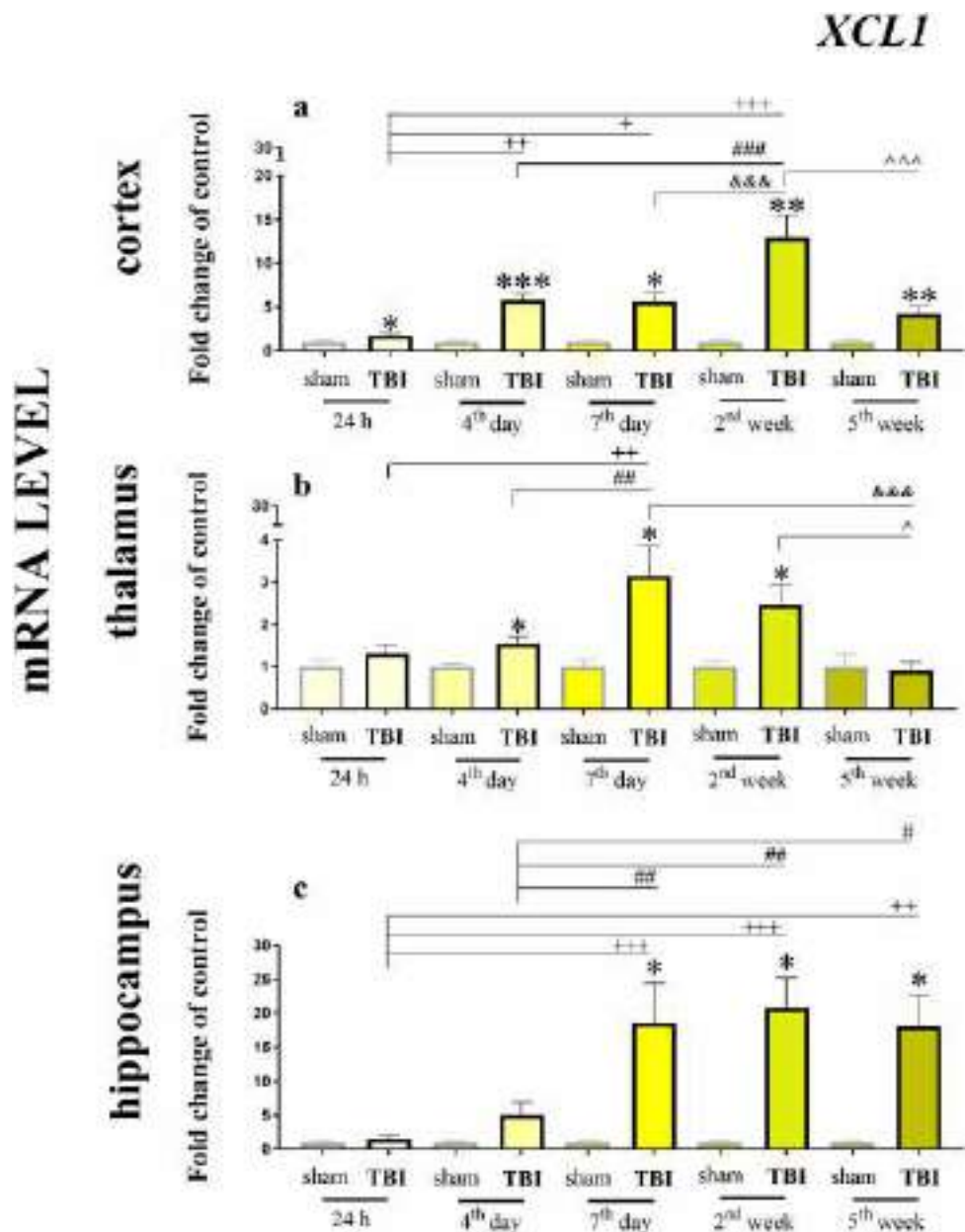
We observed a strong and significant increase in *XCL1* mRNA expression in all the analyzed brain structures (cortex, thalamus and hippocampus; Fig. 1). The level of *XCL1* mRNA after TBI was significantly increased at every tested time point (24 h, 4 days, 7 days, 2 weeks and 5 weeks) compared to the level after the sham operation, except for the 24 h and 5 weeks in the thalamus and 24 h and 4 days in hippocampus. In the cortex, the highest upregulation was detected 2 weeks after trauma [ $12.99 \pm 2.53$  ( $t_8 = 4.74$ ;  $p = 0.0089$ )], after which the effect started to decrease through week 5 [ $4.26 \pm 0.79$  ( $t_{10} = 4.03$ ;  $p = 0.0087$ )]. The two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI procedure ( $F_{4,55} = 12.42$ ;  $p < 0.0001$ ) (Fig. 1a). In the thalamus (Fig. 1b), we also noticed an increase in *XCL1* mRNA expression—the highest value was observed at 7 days after injury [ $3.15 \pm 0.7$  ( $t_{14} = 2.94$ ;  $p = 0.0181$ )]. The two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI procedure ( $F_{4,56} = 3.88$ ;  $p = 0.0075$ ). The strongest upregulation of the chemokine, which was maintained at a high level from day 7 [ $18.6 \pm 5.86$  ( $t_{14} = 3.00$ ;  $p = 0.0199$ )] until week 5 [ $18.05 \pm 4.7$  ( $t_9 = 3.62$ ;  $p = 0.0223$ )], was observed in the hippocampus. The two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI procedure ( $F_{4,55} = 4.56$ ;  $p = 0.0030$ ) (Fig. 1c).

### Time-dependent changes in *XCR1* and *ITGA9* mRNA expression in the cortex, thalamus and hippocampus of mice after TBI

Analysis of mRNA levels of the XCL1 receptor *XCR1* similarly revealed its upregulation after TBI in all the tested brain structures (Fig. 2a–c). In the cortex, the level of *XCR1* was elevated at every tested time point (24 h, 4 days, 7 days, 2 weeks and 5 weeks). The cortical level of *XCR1* (Fig. 2a) started to increase 24 h after TBI and reached its highest value at day 4 [ $7.89 \pm 0.97$  ( $t_{12} = 7.05$ ;  $p < 0.008$ )];



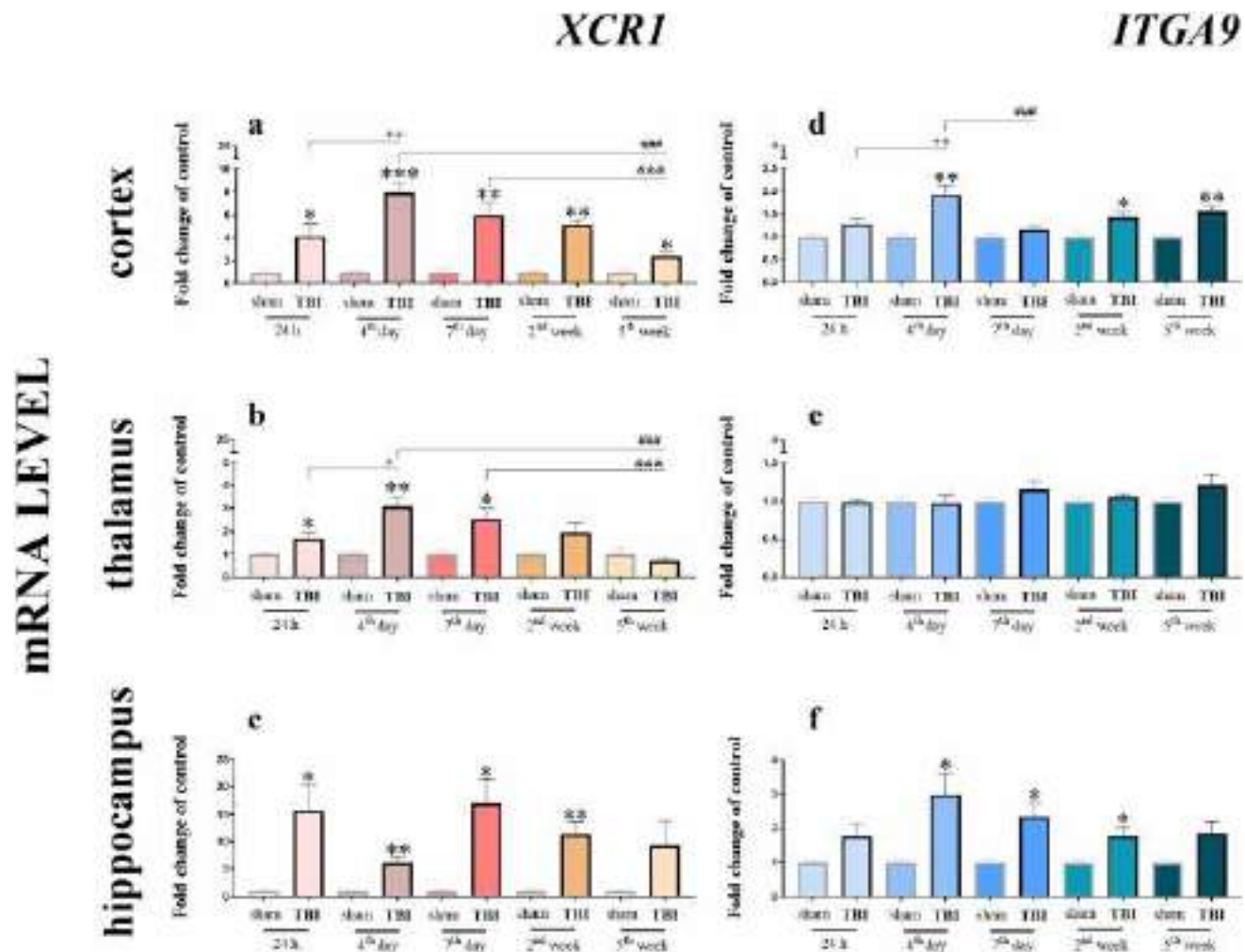
**Fig. 1** Time-dependent changes in *XCL1* mRNA expression in the cortex (a), thalamus (b) and hippocampus (c) of TBI or sham-injured mice at the selected time points. The data are presented as fold changes relative to the control (means  $\pm$  SEMs.; sham groups  $n=5-8$ ; TBI groups  $n=5-8$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point as evaluated by *t* test. + $p < 0.05$ ; ++ $p < 0.01$ ; +++ $p < 0.001$  shows significant differences comparing to the 24 h TBI group; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$  shows significant differences comparing to the 4th day TBI group; &&& $p < 0.001$  shows significant differences comparing to the 7th day TBI group; ^^ $p < 0.05$ ; ^^^ $p < 0.001$  shows significant differences comparing to the 2 weeks TBI group; as evaluated by two-way Anova



the expression of *XCR1* progressively decreased but remained significantly elevated at week 5. The two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI procedure ( $F_{4,50} = 5.23$ ;  $p = 0.0013$ ) (Fig. 2a). The *XCR1* mRNA level in the thalamus started to grow 24 h after TBI [ $1.71 \pm 0.25$  ( $t_{10} = 2.57$ ;  $p = 0.0380$ )] and reached its highest value 4 days after TBI [ $3.08 \pm 0.43$  ( $t_{12} = 4.53$ ;  $p = 0.0038$ )] but remained significantly elevated until 7 days (Fig. 2b). After that time point, the level decreased. The two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI procedure ( $F_{4,53} = 4.84$ ;  $p = 0.0021$ ) (Fig. 2b). The elevated level of *XCR1* mRNA in the hippocampus was observed 24 h and 7 days after injury [ $16.98 \pm 4.36$

( $t_{12} = 3.66$ ;  $p = 0.0145$ ), after which it began to decline but remained significantly elevated until 2 weeks after injury (Fig. 2c).

The mRNA expression of the second receptor that was studied (Fig. 2d–f), the *ITGA9*, was increased in two of the selected brain areas. In the cortex (Fig. 2d), the increase started 4 days after brain injury [ $1.91 \pm 0.22$  ( $t_{14} = 3.88$ ;  $p = 0.0034$ )], and remained at a significant level until week 5. The two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI procedure ( $F_{4,58} = 3.35$ ;  $p = 0.0155$ ) (Fig. 2d). The maximal expression of *ITGA9* in the hippocampus (Fig. 2f) was also observed at 4 days after trauma [ $2.98 \pm 0.64$  ( $t_{12} = 3.04$ ;  $p = 0.0269$ )], and the level of *ITGA9* remained at a significant level until week 2. We did



**Fig. 2** Time-dependent changes in *XCR1* and *ITGA9* mRNA expression in the cortex (**a, d**), thalamus (**b, e**) and hippocampus (**c, f**) of TBI or sham-injured mice at the selected time points. The data are presented as fold changes relative to the control (means  $\pm$  SEMs; sham groups  $n=5-8$ ; TBI groups  $n=5-8$ ). \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$  indicate significant differences between the sham

and TBI groups at each selected time point as evaluated by  $t$  test. + $p<0.05$ ; ++ $p<0.01$  shows significant differences comparing to the 24 h TBI group; ### $p<0.001$  shows significant differences comparing to the 4th day TBI group; &&& $p<0.001$  shows significant differences comparing to the 7th day TBI group; as evaluated by two-way Anova

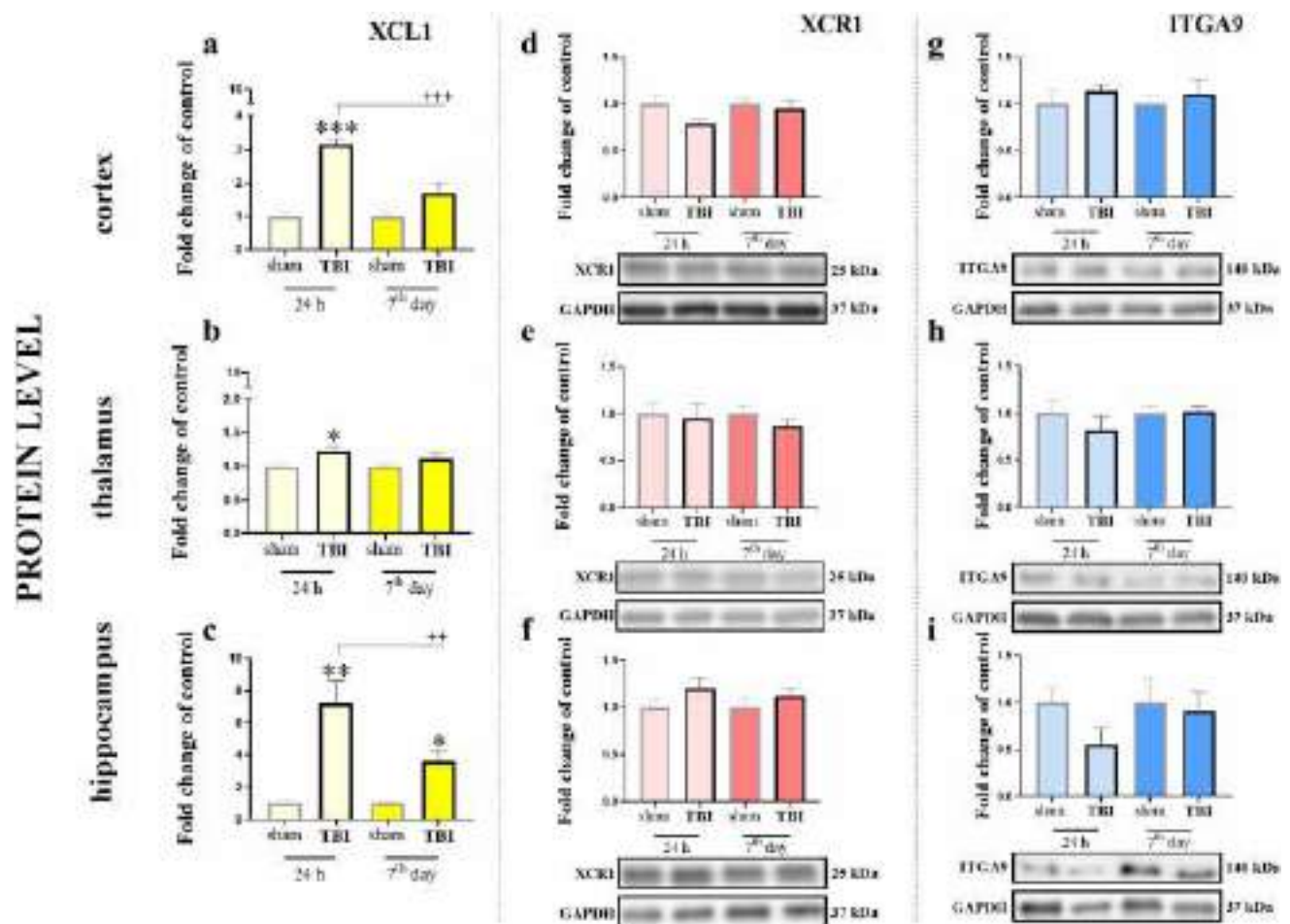
not notice any changes in the mRNA of this receptor in the thalamus (Fig. 2e).

### Time-dependent changes in the XCL1, XCR1 and ITGA9 protein levels in the cortex, thalamus and hippocampus of mice after TBI

Here, we analyzed the XCL1 protein using ELISA at two selected time points after TBI (24 h and 7 days) in the cortex, thalamus and hippocampus. The XCL1 level in the cortex (Fig. 3a) were significantly elevated at 24 h [ $3.15 \pm 0.18$  ( $t_9=9.67$ ;  $p<0.0001$ )]. The two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI procedure ( $F_{1,19}=13.48$ ;  $p=0.0016$ )

(Fig. 3a). In the thalamus, there was a significant increase in the chemokine levels only at the 24 h time point [ $1.22 \pm 0.08$  ( $t_{10}=2.31$ ;  $p=0.0452$ )] (Fig. 3b). The hippocampal activation of XCL1 was significantly increased at both the selected time points, namely 24 h [ $7.2 \pm 1.44$  ( $t_{10}=4.29$ ;  $p=0.0074$ )] and 7 days [ $3.61 \pm 0.7$  ( $t_{10}=3.71$ ;  $p=0.0138$ )], after TBI. The two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the considered time points and TBI procedure ( $F_{1,20}=4.99$ ;  $p=0.0369$ ) (Fig. 3c).

Moreover, we performed Western blot analysis of both the XCL1 receptors, namely, XCR1 and ITGA9, at two selected time points after TBI (24 h and 7 days) in the same brain structures. XCR1 showed no changes at the protein level in the cortex (Fig. 3d), thalamus (Fig. 3e), and hippocampus (Fig. 3f). Similar results were obtain



**Fig. 3** Time-dependent changes in the XCL1 (a–c), XCR1 (d–f) and ITGA9 (g–i) protein levels in the cortex (a, d, g), thalamus (b, e, h) and hippocampus (c, f, i) of TBI or sham-injured mice at the selected time points. The Elisa (a–c) and Western blot (d–i) data are presented as fold changes relative to the control (means  $\pm$  SEMs; Elisa sham groups  $n=6$ ; TBI groups  $n=5-6$ ; Western blot sham groups  $n=5-6$ ;

TBI groups  $n=5-6$ ). \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$  indicate significant differences between the sham and TBI groups at each selected time point as evaluated by  $t$  test. ++ $p<0.01$ ; +++ $p<0.001$  shows significant differences comparing to the 24 h TBI group; as evaluated by two-way Anova

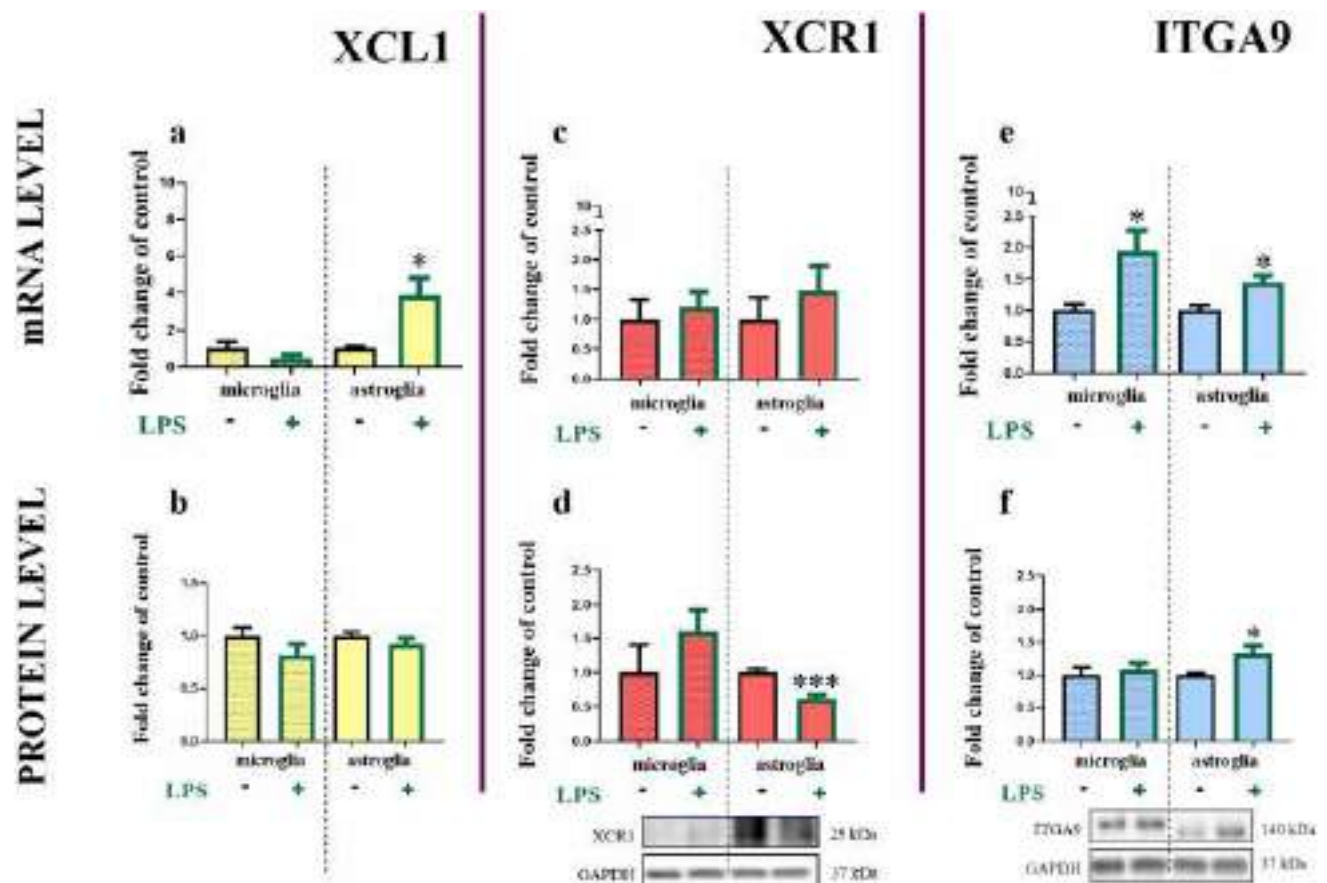
for ITGA9 in the cortex (Fig. 3g), thalamus (Fig. 3h), and hippocampus (Fig. 3i).

### XCL1, XCR1 and ITGA9 mRNA and protein levels in primary glial cell cultures

In murine primary microglial and astroglial cell cultures, we detected the basal expression of XCL1 mRNA and protein (ELISA) (Fig. 4a, b). There are no significant changes in the protein (Fig. 4b) level of XCL1 24 h after LPS stimulation in the cultures of either cell type, however there is an upregulation of XCL1 in astroglial cells mRNA after LPS stimulation [ $3.90 \pm 0.93$  ( $t_6 = 3.09$ ;  $p = 0.0353$ )] (Fig. 4a).

We also detected the basal mRNA and protein levels (Western blot) of both receptors, XCR1 (Fig. 4c, d) and ITGA9 (Fig. 4e, f). In the primary microglial cell cultures, no changes were observed in the mRNA and protein level

of XCR1 24 h after LPS stimulation (Fig. 4c). In the primary astroglial cell cultures, there were no changes in the mRNA of XCR1; however, the protein level of this receptor was significantly decreased 24 h after LPS stimulation [ $0.62 \pm 0.05$  ( $t_9 = 5.37$ ;  $p = 0.0005$ )] (Fig. 4d). In the primary microglial and astroglial cell cultures, there was an increase in the ITGA9 mRNA levels after LPS treatment in both cell populations [microglia:  $1.95 \pm 0.33$  ( $t_{10} = 2.77$ ;  $p = 0.0276$ ), astroglia:  $1.45 \pm 0.11$  ( $t_{10} = 3.32$ ;  $p = 0.0110$ )] (Fig. 4e), the protein level of the ITGA9 increased 24 h after LPS stimulation in astroglial cells population [ $1.32 \pm 0.12$  ( $t_{10} = 2.61$ ;  $p = 0.0440$ )] (Fig. 4f).



**Fig. 4** Changes in the mRNA and protein levels of XCL1 (a, b), XCR1 (c, d) and ITGA9 (e, f) in primary mouse microglial and astroglial cell cultures. The RT-qPCR (a, c, e)/Western blot (d, f)/ELISA (b) results are presented as fold changes relative to the control (means  $\pm$  SEMs; RT-qPCR microglia group  $n=3-7$ ; astroglia

group  $n=3-7$ ; Western blot microglia group  $n=5-6$ ; astroglia group  $n=5-6$ ; Elisa microglia group  $n=6$ ; astroglia group  $n=5$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant differences between the unstimulated and LPS-stimulated microglial and astroglial cell cultures 24 h after treatment at the mRNA and protein levels as evaluated by  $t$  test

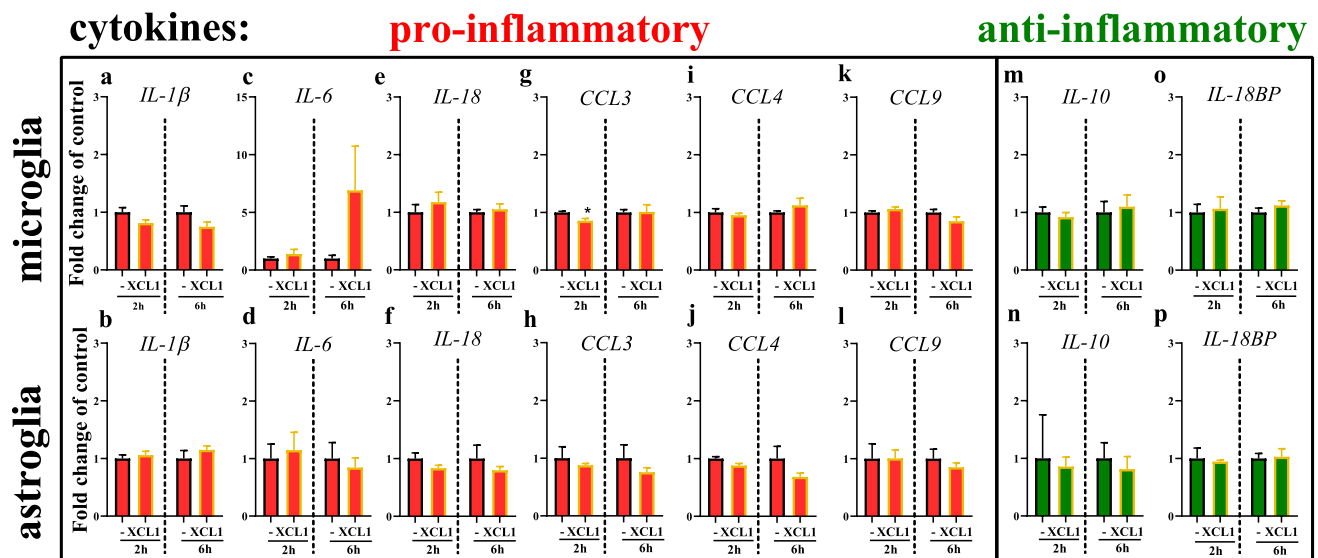
### The effect of XCL1 on the mRNA levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in primary glial cell cultures

Primary microglial and astroglial cell cultures were stimulated with XCL1 (200 ng/ml). Our further analysis performed at 2 and 6 h after XCL1 administration proved the presence of mRNAs encoding pro- (*IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *IL-6*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL9*) and anti- (*IL-10*, *IL-18BP*) inflammatory cytokines in both primary microglia and astroglial cell cultures. The mRNA expression of pro-inflammatory interleukins was not affected by XCL1 administration in microglial as well as astroglial cell cultures. The expression of *CCL4* and *CCL9* was unchanged by XCL1 administration in both cell cultures (Fig. 5i-l). The level of *CCL3* was slightly lowered 2 h after XCL1 administration

in microglia [ $0.85 \pm 0.04$  ( $t_6 = 3.25$ ;  $p = 0.0174$ )] (Fig. 5g), but it might be not biologically relevant. However, there was no changes in expression of *CCL3* mRNA after XCL1 in astrocytes (Fig. 5h). The mRNA levels of the anti-inflammatory cytokines *IL-18BP* and *IL-10* were unchanged after treatment with the XCL1 in both cell cultures (Fig. 5m-p).

### Discussion

The results of the present study show, for the first time, that XCL1 is highly spatiotemporally increased at the mRNA and/or protein levels in the cortex, thalamus and hippocampus after TBI. Additionally, the XCL1 receptors, XCR1 and ITGA9, which are present in the all studied



**Fig. 5** The effect of XCL1 on the mRNA levels (RT-qPCR) of pro- (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-18*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL9*) and anti- (*IL-10*, *IL-18BP*) inflammatory factors in microglial and astroglial cell cultures. The data are presented means  $\pm$  SEM ( $n=4$  each group). \* $p < 0.05$ ; indi-

cate significant differences between the untreated and XCL1-treated (200 ng/ml) microglial and astroglial cell cultures, 2 and 6 h after treatment. The mRNA level was evaluated by  $t$  test

brain structures, are highly upregulated at the mRNA level; however, their protein levels do not exhibit significant changes. Our in vitro studies revealed that murine primary microglial and astroglial cells expressed XCL1 and both its receptors, however this chemokine is not upregulated after cellular activation. Our findings indicate that XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 seem to be key signaling pairs that can participate in many aspects of secondary brain injury. Since the XCL1 can be one of the important triggers of secondary injury after TBI, therefore we proposed this chemokine as a good target for pharmacological intervention [31–34].

Initially, it was shown that in the periphery, XCL1 is produced by subsets of T and NK cells during inflammation and leads to chemotaxis of these cells by binding to XCR1 [12]. This is in line with our in vitro results showing that activated microglia and astroglia are not, as can be expected, the main source of XCL1 after brain injury. The strongly increased XCL1 level observed after nervous system injury may be due to the secretion of this chemokine by neurons, as already suggested [11]. It seems that XCL1 is an important player in many immune responses [35]. It has been already identified in patients with several inflammatory diseases, including Crohn's disease [36], HIV-1 infection [37] and rheumatoid arthritis [38, 39]. Importantly, also in a cerebral tissue of patients with posttraumatic brain contusions [40]. Some findings highlight the possible significance of the XCL1/XCR1 pathway in maintaining gut homeostasis, which can define this axis as an innovative potential therapeutic target for the treatment of human intestinal immune disorders [41].

The upregulation of XCL1 was also described in mice, first by Koedel et al. in the cortex 72 h after cold-induced cortical injury [42]. Moreover, Zychowska et al. showed that XCL1 is spinally upregulated in a mouse model of diabetic neuropathy and that its neutralization results in a reduction of hypersensitivity [10]. Recently, Matsumoto et al. [15] showed that XCL1- and ITGA9-neutralizing antibodies abrogated disease progression in experimental autoimmune encephalomyelitis and suggested XCL1/ITGA9 axis as an important signaling pair for homeostatic functions. We demonstrated the spatiotemporal upregulation of XCL1 expression in all the tested brain areas (cortex, thalamus, hippocampus), which begins shortly after TBI and, in some structures, persists until up to 5 weeks after injury. For our research, we selected brain structures that were previously suggested to be especially vulnerable to TBI [43–45]. In 2020, Mohamed et al. studied a rat model of closed head diffuse injury by diffusion tensor imaging and confirmed that TBI leads to widespread and persistent microstructural changes within the white and gray matter of the brain [46]. Moreover, like the cortex, also hippocampus and thalamus appear to be susceptible to ongoing post TBI pathology. The authors also confirmed volumetric changes in these two areas. Additionally, they observed increased microglial activation in the cortex, thalamus, and hippocampus, even up to 30 days [46, 47]. These results are consistent with those obtained using positron emission tomography, which verified increased inflammation in the thalamus after TBI [48]. Since the cortex is the site of the impact, as expected, significant changes in XCL1 were observed in this region.

However, we also provide the first evidence of the profound XCL1 response in the thalamus and hippocampus. Many studies have shown that within the first hours after TBI, increased neuronal excitability and reduced GABAergic inhibitory transmission are observed, which entail astroglia and microglia activation [49]. The microglia are approximately 5–20% of the total glial cell population [50, 51] and play an important immunological role in the CNS [51]. Astrocytes occupy 30% of the brain volume (region dependent) and constitute 30–65% of all the glial cells [50], which makes these cells, together with neurons, the largest population of cells in the brain [52, 53]. Published data provide evidence that the inflammation observed in TBI is associated with thalamocortical white matter damage and profound glial activation, which colocalize with axonal abnormalities [54]. Our results prove that XCL1 is strongly upregulated shortly (24 h) after TBI, therefore we hypothesize that neuronally produced XCL1 acts in an autocrine manner via neuronal XCR1 and ITGA9 to trigger neuronal activation, which in turn results in glial activation. This observation corresponds well with our previously published results showing that activation of microglia and astroglia starts on day 7 after TBI [8]. Although our results show that upon in vitro conditions XCL1 does not directly activate glial cells, there are evidences that in vivo the situation may differ. It was already shown that intrathecally administrated XCL1 induced microglia activation and proliferation [10], therefore there is still a need for more research focused on XCL1 role in TBI. Already is known that, the disruption of the homeostatic interactions of the CX3CL1 (produced mainly by neurons) and CX3CR1 (present mainly on microglia) axis in the context of neuron-microglia/astroglia communication is important during the pathogenesis of several diseases, including TBI [55–58]. In addition, CX3CL1, CCL2, CXCL8 in the CSF and/or plasma of TBI patients correlate with poorer outcome, therefore they have been proposed as biomarkers (reviewed in [59]). The level of XCL1 in the CSF and plasma in TBI patients remain to be study, however importantly in 2020 this chemokine was selected as biomarker for malignant transformation [60].

Recent data strongly support the idea that microglia play both beneficial and harmful roles [61, 62]. Microglia can prevent neuronal injury and restore tissue integrity by releasing anti-inflammatory/neurotrophic factors and removing cellular debris. On the other hand, the development of an uncontrolled and highly reactive microglial activation state after brain injury results in the release of pro-inflammatory factors that contribute to neuronal dysfunction and death [61, 62]. Similarly, reactive astrocytes are capable of producing pro-inflammatory factors and can degrade the extracellular matrix and cause further disrupt the BBB [53]; however, they are also capable of producing factors that promote

regeneration [63]. Our results provide evidence that XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes can participate in immune response after TBI. XCR1 was identified in 1995 as orphan receptor GPR5 [64] and, for the long time, was thought to be the only receptor for XCL1 in mice [65, 66]. It has been suggested that XCR1 is expressed in murine dendritic cells [67], T cells, B cells and neutrophils [68] but not in macrophages [69]. However, subsequent studies have proven that XCR1 is present on mononuclear cells [38, 70]. Our results obtained from primary cell cultures provide evidence that XCR1 is present on microglial and astroglial cells. After TBI, the mRNA level of *XCR1* is highly upregulated in all the studied brain structures; however, its protein level changes remain on undetectable level. Therefore, we can assume that the exposure of these receptors to XCL1 leads to a rapid decrease in the number of cell-surface binding sites. What is also important, XCL1 can also act through ITGA9 [15], so by one of the less studied integrins that facilitates accelerated cell migration [71]. It was already shown that blocking ITGA9 has beneficial effects in mouse models of arthritis [71] and experimental autoimmune encephalomyelitis [21]. Our studies indicate that in primary microglial and astroglial cell cultures, XCL1 does not induce production of pro-inflammatory cytokines such as CCL3, CCL4, CCL9, IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6 directly. Additionally, XCL1 administration does not influence the mRNA levels of an anti-inflammatory IL-1RA, IL-10 in both microglia and astrocytes. These findings are surprising but also extremely important as they highlight that XCL1 may acts through neuronally localized receptors. Considering that XCR1 in the CNS is located mainly on neurons [10] and similarly ITGA9 is also present in neurons [20] it seems to be even more likely. Current literature suggests that modulating chemokine signaling, especially CCL2/CCR2, CCL5/CCR5 CXCL8/CXCR2, CXCL10/CXCR3, CXCL12/CXCR4, and CX3CL1/CX3CR1, may be beneficial in TBI treatment [59]. Our results, for the first time, draw attention to the significant role of the XCL1/ITGA9 axis in the cortex, hippocampus and thalamus after brain injury. Interestingly, according to the literature data, we can hypothesize that XCL1 signaling via ITAG9 might be neuro-protective [19] while signaling via XCR1 neurotoxic [10]. However, there is still a lack of study to prove this hypothesis. If this is true, this data would mean that down-regulating XCL1-XCR1 signaling while simultaneously up-regulating XCL1-ITAG9 signaling is a very tempting therapeutic strategy. Still requires clarification which intracellular pathways are involved through signaling via XCL1-XCR1 and which through signaling via XCL1-ITAG9 in the CNS. So far, it was shown that XCL1-XCR1 evoked the induction of c-Fos, pERK and p38MAPK in brainstem [11]. In case of XCL1-ITGA9 axis there was shown, that ITGA9 was acting through FAK/Src-Rac1/RhoA signaling in human liver cell line [72]. It was also proved that that ITGA9 depletion

suppresses breast cancer tumor growth and metastasis by promoting  $\beta$ -catenin degradation through the ILK/PKA/GSK3 pathway [73]. The modulating of XCL1 activated pathways has the potential to result in therapeutic benefit not only in TBI, but also in other neuroinflammation-related diseases, however, this hypothesis requires additional, in-depth investigation.

## Conclusion

Treatments for brain injury are a major medical need, so new approaches based on innovative potential therapeutic targets are urgently needed. The results of our research provide the first evidence that in the early phases of TBI (24 h), XCL1 is highly upregulated not only in a cortex, but also in thalamus and hippocampus. Therefore, this chemokine can be one of the immune triggers of secondary injury after TBI, therefore should be considered as an important chemokine that may play a pivotal function during brain injury. Based on the available literature and our results, we suggest that XCL1 deserves further study, especially because XCR1 and ITGA9 seem to be important novel targets with beneficial properties for pharmacological intervention after brain injury.

**Author contributions** AC: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization, project administration. KP-B: methodology, validation, formal analysis, investigation, data curation. KC: methodology, formal analysis, resources, investigation, writing review and editing. KP: methodology, investigation, writing—review and editing. MO: methodology, investigation. DM: methodology, investigation. M-GS: conceptualization, methodology, validation, resources, data curation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization, supervision, funding acquisition. JM: conceptualization, methodology, validation, resources, data curation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization, supervision, funding acquisition. All authors contributed to and have approved the final version of the manuscript.

**Funding** This work was supported by ERA-NET-NEURON, JTC 2016: LEAP, NEURON9-FP-044 from the following national funding institutions: National Centre for Research and Development (Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, ERA-NET NEURON-Cofund/1/LEAP/15/17), Poland, and the Italian Ministry of Health (Ministero della Salute), Italy. This work was also supported by statutory funds of the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

**Ethics statement** The experimental procedures were conducted according to recommendations of the National Institutes of Health and were approved by the Ethical Committee of the Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS. According to the 3R policy, the number

of animals was reduced to an essential minimum. All the procedures regarding the study design, animal experiments, statistical analysis, and data reporting fulfil the criteria of the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>).

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Rowe RK, Ellis GI, Harrison JL, Bachstetter AD, Corder GF, Van Eldik LJ, et al. Diffuse traumatic brain injury induces prolonged immune dysregulation and potentiates hyperalgesia following a peripheral immune challenge. *Mol Pain*. 2016;12:1–12. <https://doi.org/10.1177/1744806916647055>.
- Das M, Mohapatra S, Mohapatra SS. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *J Neuroinflamm*. 2012;9:1–12. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-236>.
- Chen K, Bao Z, Tang P, Gong W, Yoshimura T, Wang JM. Chemokines in homeostasis and diseases. *Cell Mol Immunol*. 2018;15:324–34. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.134>.
- Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol*. 2013;4:1–18. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00018>.
- Sun Y, Bai L, Niu X, Wang Z, Yin B, Bai G, et al. Elevated serum levels of inflammation-related cytokines in mild traumatic brain injury are associated with cognitive performance. *Front Neurol*. 2019;10:1–9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01120>.
- Petrone AB, Gionis V, Giersch R, Barr TL. Immune biomarkers for the diagnosis of mild traumatic brain injury. *NeuroRehabilitation*. 2017;40:501–8. <https://doi.org/10.3233/NRE-171437>.
- Clausen F, Marklund N, Hillered L. Acute inflammatory biomarker responses to diffuse traumatic brain injury in the rat monitored by a novel microdialysis technique. *J Neurotrauma*. 2019;36:201–11. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5636>.
- Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciapała K, Oggioni M, Mercurio D, et al. Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice. *Immunobiology*. 2020;225:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151911>.
- Xu F, He D, Ning R, Zeng B, Thompson CW, Li Y, et al. Genetic diversity of chemokine XCL1 and its receptor XCR1 in murine rodents. *Dev Comp Immunol*. 2019;98:80–8. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.04.008>.
- Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, Kreiner G, Mika J. Microglial inhibition influences XCL1/XCR1 expression and causes analgesic effects in a mouse model of diabetic neuropathy. *Anesthesiology*. 2016;125:573–89. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001219>.
- Bird EV, Iannitti T, Christmas CR, Obara I, Andreev VI, King AE, et al. A novel role for lymphotactin (XCL1) signaling in the

- nervous system: XCL1 acts via its receptor XCR1 to increase trigeminal neuronal excitability. *Neuroscience*. 2018;379:334–49. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.03.030>.
12. Lei Y, Takahama Y. XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect*. 2012;14:262–7. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.10.003>.
  13. Kim BO, Liu Y, Zhou BY, He JJ. Induction of C chemokine XCL1 (lymphotactin/single C motif-1/activation-induced, T cell-derived and chemokine-related cytokine) expression by HIV-1 tat protein 1. *J Immunol*. 2004;172:1888–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1888>.
  14. Lisak RP, Nedelkoska L, Studzinski D, Bealmear B, Xu W, Benjamins JA. Cytokines regulate neuronal gene expression: differential effects of Th1, Th2 and monocyte/macrophage cytokines. *J Neuroimmunol*. 2011;238:19–33. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.06.010>.
  15. Matsumoto N, Kon S, Nakatsuru T, Miyashita T, Inui K, Saitoh K, et al. A novel  $\alpha 9$  integrin ligand, XCL1/lymphotactin, is involved in the development of murine models of autoimmune diseases. *J Immunol*. 2017;199:82–90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601329>.
  16. Palmer EL, Ruegg C, Ferrando R, Pytela R, Sheppard D. Sequence and tissue distribution of the integrin  $\alpha 9$  subunit, a novel partner of  $\beta 1$  that is widely distributed in epithelia and muscle. *J Cell Biol*. 1993;123:1289–97. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.5.1289>.
  17. Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, Sheppard D. The lymphangiogenic growth factors VEGF-C and D are ligands for the integrin  $\alpha 9\beta 1$ . *J Biol Chem*. 2004;280:4544–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412816200>.
  18. Staniszevska I, Zaveri S, Del VL, Oliva I, Rothman VL, Croul SE, et al. Interaction of  $\alpha 9\beta 1$  integrin with thrombospondin-1 promotes angiogenesis. *Circ Res*. 2007;100:1308–16. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000266662.98355.66>.
  19. Leiter O, Bernas SN, Seidemann S, Overall RW, Horenburg C, Kowal S, et al. The systemic exercise-released chemokine lymphotactin/XCL1 modulates in vitro adult hippocampal precursor cell proliferation and neuronal differentiation. *Sci Rep*. 2019;9:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48360-5>.
  20. Andrews MR, Czvitkovich S, Dasse E, Vogelaar CF, Faissner A, Blits B, et al.  $\alpha 9$  integrin promotes neurite outgrowth on tenascin-C and enhances sensory axon regeneration. *J Neurosci*. 2009;29:5546–57. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0759-09.2009>.
  21. Ito K, Morimoto J, Kihara A, Matsui Y, Kurotaki D, Kanayama M, et al. Integrin  $\alpha 9$  on lymphatic endothelial cells regulates lymphocyte egress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:3080–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311022111>.
  22. Osier ND, Korpon JR, Dixon CE. Controlled cortical impact model. *Brain Neurotrauma Mol Neuropsychol Rehabil Asp*. 2015. <https://doi.org/10.1201/b18126>.
  23. De Blasio D, Fumagalli S, Longhi L, Orsini F, Palmioli A, Stravalaci M, et al. Pharmacological inhibition of mannose-binding lectin ameliorates neurobehavioral dysfunction following experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37:938–50. <https://doi.org/10.1177/0271678X16647397>.
  24. Zanier ER, Montinaro M, Viganò M, Villa P, Fumagalli S, Pischiutta F, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells protect mice brain after trauma. *Crit Care Med*. 2011;39:2501–10. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31822629ba>.
  25. Rahim VB, Taghi Khammar M, Rakhshandeh H, Samzadeh-Kermani A, Hosseini A, Askari VR. Crocin protects cardiomyocytes against LPS-Induced inflammation. *Pharmacol Rep*. 2019;71:1228–34. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.07.007>.
  26. Basta-Kaim A, Ślusarczyk J, Szczepanowicz K, Warszyński P, Leśkiewicz M, Regulska M, et al. Protective effects of polydatin in free and nanocapsulated form on changes caused by lipopolysaccharide in hippocampal organotypic cultures. *Pharmacol Rep*. 2019;71:603–13. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.02.017>.
  27. Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, Makuch W, Mika J. Biphallin, a dimeric enkephalin, alleviates LPS-induced activation in rat primary microglial cultures in opioid receptor-dependent and receptor-independent manners. *Neural Plast*. 2017;2017:1–19. <https://doi.org/10.1155/2017/3829472>.
  28. Nguyen KD, Fohner A, Booker JD, Dong C, Krensky AM, Nadeau KC. XCL1 enhances regulatory activities of CD4+ CD25 high CD127 low/– T cells in human allergic asthma. *J Immunol*. 2008;181:5386–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5386>.
  29. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156–9. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.
  30. Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, Makuch W, Mika J. The RS504393 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in neuropathic rats. *J Neuroimmunol Pharmacol*. 2017;12:402–19. <https://doi.org/10.1007/s11481-017-9729-6>.
  31. Sajja VSSS, Hlavac N, VandeVord PJ. Role of glia in memory deficits following traumatic brain injury: biomarkers of glia dysfunction. *Front Integr Neurosci*. 2016;10:1–9. <https://doi.org/10.3389/fnint.2016.00007>.
  32. Gao C, Qian Y, Huang J, Wang D, Su W, Wang P, et al. A three-day consecutive fingolimod administration improves neurological functions and Modulates multiple immune responses of CCI mice. *Mol Neurobiol*. 2017;54:8348–60. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0318-0>.
  33. Witcher KG, Eiferman DS, Godbout JP. Priming the inflammatory pump of the CNS after traumatic brain injury. *Trends Neurosci*. 2015;38:609–20. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.08.002>.
  34. Xu X, Gao W, Cheng S, Yin D, Li F, Wu Y, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury. *J Neuroinflamm*. 2017;14:1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0934-2>.
  35. Rezende RM, Nakagaki BN, Moreira TG, Lopes JR, Kuhn C, Tatematsu BK, et al.  $\gamma \delta$  T cell-secreted XCL1 mediates anti-CD3-induced oral tolerance. *J Immunol*. 2019;203:2621–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900784>.
  36. Middel P, Thelen P, Blaschke S, Polzien F, Reich K, Blaschke V, et al. Expression of the T-cell chemoattractant chemokine lymphotactin in Crohn's disease. *Am J Pathol*. 2001;159:1751–61. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63022-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63022-2).
  37. Guzzo C, Fox J, Lin Y, Miao H, Cimbri R, Volkman BF, et al. The CD8-derived chemokine XCL1/lymphotactin is a conformation-dependent, broad-spectrum inhibitor of HIV-1. *PLoS Pathog*. 2013;9:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003852>.
  38. Blaschke S, Middel P, Dorner BG, Blaschke V, Hummel KM, Kroczeck RA, et al. Expression of activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related cytokine/lymphotactin and its functional role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:1858–72. <https://doi.org/10.1002/art.11171>.
  39. Wang CR, Liu MF, Huang YH, Chen HC. Up-regulation of XCR1 expression in rheumatoid joints. *Rheumatology*. 2004;43:569–73. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh147>.
  40. Stefani R, Catenacci E, Piva S, Sozzani S, Valerio A, Bergomi R, et al. Chemokine detection in the cerebral tissue of patients with posttraumatic brain contusions. *J Neurosurg*. 2008;108:958–62. <https://doi.org/10.3171/jns.2008.108.5.0958>.
  41. Ohta T, Sugiyama M, Hemmi H, Yamazaki C, Okura S, Sasaki I, et al. Crucial roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. *Sci Rep*. 2016;6:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep23505>.



42. Koedel U, Merbt UM, Schmidt C, Angele B, Popp B, Wagner H, et al. Acute brain injury triggers MyD88-dependent, TLR2/4-independent inflammatory responses. *Am J Pathol.* 2007;171:200–13. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060821>.
43. Colicos MA, Dixon CE. Delayed, selective neuronal death following experimental cortical impact injury in rats: possible role in memory deficits. *Brain Res.* 1996;739:111–9. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)00819-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)00819-0).
44. Geddes DM, LaPlaca MC, Cargill RS. Susceptibility of hippocampal neurons to mechanically induced injury. *Exp Neurol.* 2003;184:420–7. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00254-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00254-1).
45. Sato M, Chang E, Igarashi T, Noble LJ. Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability. *Brain Res.* 2001;917:45–54. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02905-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02905-5).
46. Mohamed AZ, Corrigan F, Collins-Praino LE, Plummer SL, Soni N, Nasrallah FA. Evaluating spatiotemporal microstructural alterations following diffuse traumatic brain injury. *NeuroImage Clin.* 2020;25:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.102136>.
47. Pischiutta F, Micotti E, Hay JR, Marongiu I, Sammali E, Tolomeo D, et al. Single severe traumatic brain injury produces progressive pathology with ongoing contralateral white matter damage one year after injury. *Exp Neurol.* 2018;300:167–78. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.11.003>.
48. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Neurol.* 2011;70:374–83. <https://doi.org/10.1002/ana.22455>.
49. Förstner P, Knöll B. Interference of neuronal activity-mediated gene expression through serum response factor deletion enhances mortality and hyperactivity after traumatic brain injury. *FASEB J.* 2020;34:3855–73. <https://doi.org/10.1096/fj.201902257RR>.
50. von Bartheld CS, Bahney J,erculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: a review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol.* 2016;524:3865–95. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>.
51. Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci.* 2010;17:6–10. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.05.006>.
52. Kimelberg HK, Nedergaard M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics.* 2010;7:338–53. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.006>.
53. Kimelberg HK. Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia.* 2005;50:389–97. <https://doi.org/10.1002/glia.20174>.
54. Scott G, Hellyer PJ, Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Matthews PM, Sharp DJ. Thalamic inflammation after brain trauma is associated with thalamo-cortical white matter damage. *J Neuroinflammation.* 2015. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0445-y>.
55. Lee S, Xu G, Jay TR, Ransohoff RM, Lamb BT, Bhatta S, et al. Opposing effects of membrane-anchored CX3CL1 on amyloid and tau pathologies via the p38 MAPK pathway. *J Neurosci.* 2014;34:12538–46. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0853-14.2014>.
56. Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Krawczyk M, Szukiewicz D, Gasik R, Kubaszewski Ł, et al. Analysis of the role of CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1 in traumatic brain and spinal cord injury: insight into recent advances in actions of neurochemokine agents. *Mol Neurobiol.* 2017;54:2167–88. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9787-4>.
57. Zanier ER, Marchesi F, Ortolano F, Perego C, Arabian M, Zoerle T, et al. Fractalkine receptor deficiency is associated with early protection but late worsening of outcome following brain trauma in mice. *J Neurotrauma.* 2016;33:1060–72. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4041>.
58. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Kotela A, Skoda M, Pyzlak M, Stangret A, et al. Comparative analysis of the occurrence and role of CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1 in hemophilic arthropathy and osteoarthritis. *J Immunol Res.* 2020;2020:1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/2932696>.
59. Gyoneva S, Ransohoff RM. Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36:471–80. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.003>.
60. Tamura R, Yoshihara K, Nakaoka H, Yachida N, Yamaguchi M, Suda K, et al. XCL1 expression correlates with CD8-positive T cells infiltration and PD-L1 expression in squamous cell carcinoma arising from mature cystic teratoma of the ovary. *Oncogene.* 2020;39:3541–54. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1237-0>.
61. David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12:388–99. <https://doi.org/10.1038/nrn3053>.
62. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: Opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun.* 2012;26:1191–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.008>.
63. Madathil SK, Carlson SW, Brelsfoard JM, Ye P, D'Ercole AJ, Saatman KE. Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-1 protects hippocampal neurons and reduces behavioral deficits following traumatic brain injury in mice. *PLoS ONE.* 2013;8:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067204>.
64. Heiber M, Docherty JM, Shah G, Nguyen T, Cheng R, Heng HHQ, et al. Isolation of Three Novel Human Genes Encoding G Protein-Coupled Receptors. *DNA Cell Biol.* 1995;14:25–35. <https://doi.org/10.1089/dna.1995.14.25>.
65. Fox JC, Nakayama T, Tyler RC, Sander TL, Yoshie O, Volkman BF. Structural and agonist properties of XCL2, the other member of the C-chemokine subfamily. *Cytokine.* 2015;71:302–11. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.11.010>.
66. Kwiatkowski K, Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, Rojewska E, Ciapała K, Makuch W, et al. Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. *Cytokine.* 2019;119:202–13. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.03.007>.
67. Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, et al. Selective Expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity.* 2009;31:823–33. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.027>.
68. Huang H, Li F, Cairns CM, Gordon JR, Xiang J. Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281:378–82. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4363>.
69. Yoshida T, Izawa D, Nakayama T, Nakahara K, Kakizaki M, Imai T, et al. Molecular cloning of mXCR1, the murine SCM-1/lymphotactin receptor. *FEBS Lett.* 1999;458:37–40. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01114-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01114-x).
70. Li P, Wang L, Zhou Y, Gan Y, Zhu W, Xia Y, et al. C–C chemokine receptor type 5 (CCR5)-mediated docking of transferred Tregs protects against early blood-brain barrier disruption after stroke. *J Am Heart Assoc.* 2017;6:1–22. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006387>.
71. Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Asano T, Matsui Y, Nakayama Y, et al.  $\alpha 9$  integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J Immunol.* 2009;182:8015–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900725>.
72. Zhang YL, Xing X, Cai LB, Zhu L, Yang XM, Wang YH, et al. Integrin  $\alpha 9$  suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by rho

- GTPase signaling. *J Immunol Res.* 2018;2018:1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/4602570>.
73. Wang Z, Li Y, Xiao Y, Lin HP, Yang P, Humphries B, et al. Integrin  $\alpha 9$  depletion promotes  $\beta$ -catenin degradation to suppress triple-negative breast cancer tumor growth and metastasis. *Int J Cancer.* 2019;145:2767–80. <https://doi.org/10.1002/ijc.32359>.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

Agata Ciechanowska<sup>1</sup> · Katarzyna Popiolek-Barczyk<sup>1</sup> · Katarzyna Ciapała<sup>1</sup> · Katarzyna Pawlik<sup>1</sup> · Marco Oggioni<sup>2</sup> · Domenico Mercurio<sup>2</sup> · Maria-Grazia de Simoni<sup>2</sup> · Joanna Mika<sup>1</sup>

✉ Joanna Mika  
joamika@if-pan.krakow.pl

<sup>2</sup> Department of Neuroscience, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, via Mario Negri, 2, 20156 Milan, Italy

<sup>1</sup> Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, 12 Smetna Str., 31-343 Kraków, Poland

## Article

# Pharmacological Modulation of the MIP-1 Family and Their Receptors Reduces Neuropathic Pain Symptoms and Influences Morphine Analgesia: Evidence from a Mouse Model

Agata Ciechanowska, Katarzyna Pawlik, Katarzyna Ciapała and Joanna Mika \* 

Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences, 12 Smetna Str., 31-343 Kraków, Poland; ciechan@if-pan.krakow.pl (A.C.); pawlik@if-pan.krakow.pl (K.P.); kat.ciapala@gmail.com (K.C.)

\* Correspondence: joamika@if-pan.krakow.pl; Tel.: +48-(12)-6623298; Fax: +48-(12)-6374500

**Abstract:** Neuropathic pain pathophysiology is not fully understood, but it was recently shown that MIP-1 family members (CCL3, CCL4, and CCL9) have strong pronociceptive properties. Our goal was to examine how pharmacological modulation of these chemokines and their receptors (CCR1 and CCR5) influence hypersensitivity after nerve injury in Albino Swiss male mice. The spinal changes in the mRNA/protein levels of the abovementioned chemokines and their receptors were measured using RT-qPCR and ELISA/Western blot techniques in a mouse model of chronic constriction injury of the sciatic nerve. Behavioral studies were performed using the von Frey and cold plate tests after pharmacological treatment with neutralizing antibodies (nAbs) against chemokines or antagonists (CCR1-J113863, CCR5-TAK-220/AZD-5672) alone and in coadministration with morphine on Day 7, when the hypersensitivity was fully developed. Our results showed enhanced protein levels of CCL3 and CCL9 1 and 7 days after nerve injury. The single intrathecal administration of CCL3 or CCL9 nAb, J113863, TAK-220, or AZD-5672 diminished neuropathic pain symptoms and enhanced morphine analgesia. These findings highlight the important roles of CCL3 and CCL9 in neuropathic pain and additionally indicate that these chemokines play essential roles in opioid analgesia. The obtained results suggest CCR1 and CCR5 as new, interesting targets in neuropathy treatment.

**Keywords:** CCL3; CCL4; CCL9; CCR1 antagonist (J113863); CCR5 antagonist (TAK-220; AZD-5672)



**Citation:** Ciechanowska, A.; Pawlik, K.; Ciapała, K.; Mika, J.

Pharmacological Modulation of the MIP-1 Family and Their Receptors Reduces Neuropathic Pain

Symptoms and Influences Morphine Analgesia: Evidence from a Mouse Model. *Brain Sci.* **2023**, *13*, 579.

<https://doi.org/10.3390/brainsci13040579>

Academic Editor: Shafiqur Rahman

Received: 8 March 2023

Revised: 23 March 2023

Accepted: 28 March 2023

Published: 29 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Neuropathy affects up to 10% of humans [1] and is induced by varied causes, including direct damage of the nerves. Even the most effective painkillers in general (opioid drugs) are often ineffective against painful neuropathy [2]. This issue requires further studies explaining neuro-immunological processes in order to improve the treatments [3]. Neuropathic pain states are distinguished by activation and/or an influx of immune and glial cells in the spinal cord. Within the central nervous system (CNS), three main types of glial cells are present under physiological conditions: oligodendrocytes, astrocytes, and microglia (being the least abundant) [4]. Microglial cells along with macrophages have an indisputable role in the preservation of CNS homeostasis and can take on many activation states leading to changes in morphology, gene expression and function [5]. Additionally, astroglia are crucial in maintaining the balanced functions of the CNS. Their activation has neurodegenerative properties, inter alia, in the case of neuropathic pain [6]. Recent studies have suggested that oligodendrocytes are activated in neuropathy and that they participate in nociceptive transmission [7]. After being activated, the abovementioned cells can release multiple factors, such as chemokines, which are especially important for nociception [3]. Chemokines have low molecular weight but strong chemotactic properties [8]. However, their roles go far beyond chemotaxis. Previous studies have suggested that the blockade of chemokines from different families (e.g., CCL1, CXCL3, or XCL1) by neutralizing antibodies

provides analgesic effects [9–12]. Likewise, the blockade of chemokine receptors was shown to be a promising therapeutic strategy in mouse models of neuropathic pain. For example, J113863 (CCR1), RS504393 (CCR2), C021 (CCR4), maraviroc (CCR5), and NVPCXCR2 20 (CXCR2) reduced hypersensitivity and enhanced the effectiveness of morphine [10,13–15].

In our previous studies, we showed that chemokines from the MIP-1 (macrophage inflammatory protein-1) family, including CCL3 (MIP-1-alpha), CCL4 (MIP-1-beta), and CCL9 (MIP-1-gamma), have strong pronociceptive properties [13,16] and are engaged in the development of neuropathic pain caused by diabetes [13], which is a metabolic polyneuropathy model. It has also been shown by some studies in mice and rats that CCL3 and CCL9 are upregulated in the spinal cord and/or DRG levels after mechanical damage to a single nerve [14,17,18]. However, the detailed participation of MIP-1 family ligands and receptors after chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI model) has not been studied in depth. This fact convinced us that there is still a lack of precise knowledge about the specific activity and function of this family of chemokines. Therefore, we decided to check, at the mRNA and protein levels, if there were any changes in the amount of chemokines from the MIP-1 family and their receptors (CCR1: CCL3, CCL4, CCL9, and CCR5: CCL3 and CCL4) in the lumbar spinal cord of mice after CCI. In addition, we simultaneously verified the changes in cell markers for oligodendrocytes, microglia, microglia/macrophages, and astroglia. Then, via the administration of CCL3 and CCL9 nAbs, we investigated the influence of these two chemokines on neuropathic pain symptoms (mechanical and thermal hypersensitivity). In the next experiment, we studied whether these specific antibodies coadministered with morphine acted better than morphine alone. Finally, we investigated whether a blockade of receptors of the MIP-1 family chemokines by J113863 (CCR1 antagonist), TAK-220 (CCR5 antagonist), or AZD-5672 (CCR5 antagonist) had any ability to relieve neuropathic pain symptoms that developed after CCI in comparison to simultaneous CCR1 and CCR5 blockade via the coadministration of J113863 with TAK-220 or AZD-5672. Additionally, we measured whether these antagonists coadministered with morphine had better analgesic potential than morphine alone.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Our experiments were performed on mice (Albino Swiss strain) from Charles River (Germany). We used adult male mice (9–11 weeks old, weighing 22–27 g). They were kept in the following conditions:  $22 \pm 2$  °C,  $55 \pm 10\%$  relative humidity, 12/12 h light/dark cycle. Animals had limitless access to nourishment and were kept in cages with an enriched environment (blocks of wood). The Ethics Committee of the Maj Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences supervised and permitted the procedures (LKE: permission numbers: 1277/2015, 301/2017, 75/2017, 305/2017, 235/2020, and 40/2023). According to the 3R policy, we used the minimal, essential number of animals. In the graphs with the results of behavioral tests, we have also included values for naive animals. In order to control the level of neuropathic pain symptoms in mice on Day 7, we performed calculations showing that the naive group differed significantly from animals after CCI at all time points examined, in both behavioral tests. The differences between the naive and vehicle-treated CCI-exposed mice and in all studied time points were significant in the von Frey test ( $p < 0.0001$ ) and in the cold plate test ( $p < 0.0001$ ) on Day 7, when mechanical and thermal hypersensitivity were fully developed.

### 2.2. Chronic Constriction Injury

According to the procedure by Bennet and Xie [19], chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve was performed as follows. Mice were anesthetized via the inhalation of isoflurane (induction and maintenance 3%). Next, an incision was made below the right hip bone. After exposure, the right sciatic nerve was loosely tied three times and hidden. In the next step, the skin was sutured, and animals were left to rest and regenerate. All

operated-on mice developed neuropathic-pain-related behaviors. Behavioral tests were performed 1, 4, 7, 14, and 35 days after the CCI procedure.

### 2.3. Biochemical Tests

The methods for mRNA and protein level measurements were those used in our lab for years [9,12,20].

#### 2.3.1. Analysis of Gene Expression via RT-qPCR

Immediately after decapitation, the spinal cords were removed from healthy (naive) and CCI-exposed mice on Days 1, 4, 7, 14, and 35. In the next step, the tissue was sectioned, and the lumbar (L4–L6) region of the spinal cord was isolated and placed into Eppendorf tubes<sup>®</sup> with RNAlater (Ambion Inc., Austin, TX, USA) and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total RNA was extracted according to Chomczynski and Sacchi [21] with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Next, the concentration of mRNA was measured using a spectrophotometer (DeNovix DS-11, DeNovix Inc., Wilmington, SA, USA). Reverse transcription was performed with 1000 ng of total RNA by applying Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen Inc., Hilden, Germany) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 60 min. In the next step, the obtained cDNA was diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  at a proportion of 1:10. Finally, the RT-qPCR was performed with the use of Assay-On-Demand TaqMan probes in agreement with the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an iCycler device (Bio-Rad, Hercules, Warsaw, Poland). The following TaqMan primers were used for this study: Mm00446968\_m1 (Hprt), Mm01210556\_m1 (Olig2), Mm00525305\_m1 (TMEM119), Mm00479862\_g1 (IBA1), Mm01253033\_m1 (GFAP), Mm00441259\_g1 (CCL3), Mm00443111\_m1 (CCL4), Mm00441260\_m1 (CCL9), Mm00438260\_s1 (CCR1), and Mm01963251\_s1 (CCR5). The housekeeping gene (the Hprt transcript) was quantified to control for variations in the amount of cDNA. The cycle threshold values were automatically calculated using the iCycler IQ 3.0 software with the default parameters. The abundance of RNA was calculated as  $2^{-(\text{threshold cycle})}$ .

#### 2.3.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Analysis

Immediately after decapitation, the spinal cords were removed from healthy (naive) and CCI-exposed mice on Days 1, 7, and 35. In the next step, the tissue was sectioned, and the lumbar (L4–L6) region of the spinal cord was isolated and placed into Eppendorf tubes<sup>®</sup> with RNAlater (Ambion Inc., Austin, TX, USA) and used for ELISAs according to the manufacturer's recommendations. The tissue homogenates were fixed in RIPA buffer with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Next, the samples were centrifuged (14,000 rpm, for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ). The concentration of total protein was measured using the bicinchoninic acid method. The level of protein was measured in the tissue homogenates using Mouse CCL3/MIP-1-Alpha, Sandwich ELISA, LS-F4952, LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, USA; Mouse CCL4/MIP-1 Beta, Sandwich ELISA, LS-F4954, LifeSpan Biosciences; and Mouse CCL9/MIP-1 Gamma, Sandwich ELISA, LS-F55161, LifeSpan Biosciences. The detection ranges were as follows: CCL3: 15.6–1000 pg/mL; CCL4: 62.5–4000 pg/mL; and CCL9: 7.8–500 pg/mL. The manufacturer provided positive controls for each assay.

#### 2.3.3. Western Blot Analysis

Immediately after decapitation, the spinal cords were removed from healthy (naive) and CCI-exposed mice on Days 1, 7, and 35. The tissue was sectioned, and the lumbar (L4–L6) region of the spinal cord was isolated and placed into Eppendorf tubes<sup>®</sup> with RIPA buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Next, the samples were centrifuged (14,000 rpm, for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ). The concentration of total protein was measured using the bicinchoninic acid method. Samples of 10  $\mu\text{g}$  protein were heated at  $98^{\circ}\text{C}$  for 8 min in loading buffer ( $4 \times$  Laemmli Buffer, Bio-Rad, Warsaw, Poland). The samples were loaded into precast polyacrylamide gels (4–15% Criterion TGX,

Bio-Rad) and transferred to Immune-Blot PVDF membranes (Bio-Rad) through a semidry transfer system (30 min, 25 V). The membranes were blocked for 1 h with dry milk (5%, nonfat, Bio-Rad) reconstituted in Tris-buffered saline with Tween 20 (0.1% in TBST). The membranes were washed with TBST (2 min, 3 × 5 min) and incubated overnight at 4 °C with the following commercially available primary antibodies: mouse anti- $\beta$ -actin (1:1000; Merck, Darmstadt, Germany), rabbit anti-IBA1 (1:500, Novus Biologicals; Centennial, CO, USA), rabbit anti-GFAP (1:10,000, Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), rabbit anti-CCR1 (1:500; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), and rabbit anti-CCR5 (1:500; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA). Then, the membranes were incubated in horseradish-peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies for 1 h at room temperature (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at a dilution of 1:5000. The SignalBoost Immunoreaction Enhancer Kit (Merck, Darmstadt, Germany) was used as a dissolvent for the primary and secondary antibodies. The membranes were washed again in TBST (2 min, 3 × 5 min). Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Warsaw, Poland) was used to detect the immune complexes, and they were visualized using the Fujifilm LAS-4000 Fluor Imager system. Fujifilm Multi Gauge was used for the quantification of relative levels of the immunoreactive bands.

#### 2.4. Single Intrathecal Drug Administration in the Mouse Model of Neuropathy

Substances were administered through lumbar puncture intrathecally (i.t.) in a volume of 5  $\mu$ L between the L5 and L6 vertebrae (Hylden and Wilcox 1980, with modifications by Fairbanks 2003) [18,19]. For injection, a Hamilton syringe with a thin needle (0.3 × 13 mm) was used. Half an hour before the administration of each pharmacological tool, we performed the pretest which is the first measurement of each animal during the course of an experiment. It is intended to show whether the animals used in the particular experiment have developed symptoms of hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli properly.

This is a standard procedure in our laboratory [9,12,20].

##### 2.4.1. Administration of CCL3 and CCL9 Neutralizing Antibodies

A single i.t. administration of CCL3 nAb (AF-450-NA, Mouse CCL3/MIP-1 alpha Antibody, R&D Systems; Minneapolis, MI, USA) or CCL9 nAb (AF463, Mouse CCL9/10/MIP-1 gamma Antibody, R&D Systems) was administered to CCI mice at the dose of 0.5, 2, or 4  $\mu$ g/5  $\mu$ L on Day 7, when mechanical and thermal hypersensitivity were fully developed. Behavioral testing was performed after 1, 4, and 24 h. CCL3 and CCL9 nAbs were dissolved in PBS (Merck; Darmstadt, Germany), and PBS was injected as the vehicle (V) in the control group. The details about using neutralizing antibodies are available on the manufacturer's pages: CCL3 nAb [22] and CCL9 nAb [23].

##### 2.4.2. Administration of CCL3 Neutralizing Antibody with Morphine

The i.t. administration of CCL3 neutralizing antibody (2  $\mu$ g/5  $\mu$ L) followed by the i.t. administration of morphine (TEVA; Krakow; Poland; 2.5  $\mu$ g/5  $\mu$ L) was performed 7 days after CCI. The dose of nAb was chosen based on the results obtained from the above experiment. The doses of opioid were chosen based on our previous study [24]. First, animals received V or CCL3 nAb. Next, after 3 h, there was a second injection of *aqua pro injectione* (W) or morphine (M). The von Frey and cold plate tests were performed 0.5 h after the second administration (W or M), which was 3.5 h after the first administration (V or CCL3 nAb)

##### 2.4.3. Administration of CCL9 Neutralizing Antibody with Morphine

The i.t. administration of CCL9 neutralizing antibody (2  $\mu$ g/5  $\mu$ L) followed by the i.t. administration of morphine was performed 7 days after CCI. The dose of nAb was chosen based on the results obtained above. First, animals received V or CCL9 nAb. After 1 h, there was a second injection of W or M. The von Frey and cold plate tests were performed 0.5 h

after the second administration (W or M), which was 1.5 h after the first administration (V or CCL9 nAb).

#### 2.4.4. Administration of CCR1 and CCR5 Antagonists

A single i.t. administration of J113863 (CCR1 antagonist, at doses of 1, 15, 30, and 60  $\mu\text{g}/5$ ;  $\mu\text{L}$  cat. #2595, Tocris, Bristol, UK), TAK-220 (CCR5 antagonist, at doses of 0.5, 2, 4, and 15  $\mu\text{g}/5$ ;  $\mu\text{L}$  cat. #HY-19974/CS-5579, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA), or AZD-5672 (CCR5 antagonist, at doses of 0.5, 2, 4, and 15  $\mu\text{g}/5$   $\mu\text{L}$  cat. #HY-119101/CS-0068004, MedChemExpress) were administered once to CCI-exposed mice on Day 7, when mechanical and thermal hypersensitivity were fully developed. Behavioral testing was performed after 1, 4, and 24 h. CCR1 and CCR5 antagonists were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, cat. #D8418, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA), and DMSO was used as the vehicle (V). The details about the agonists used are available on the manufacturer's pages: J113863 [25], TAK-220 [26], and AZD-5672 [27].

#### 2.4.5. Administration of CCR1 Antagonist with Morphine

The i.t. administration of J113863 (15  $\mu\text{g}/5$   $\mu\text{L}$ ) followed by the i.t. administration of morphine was performed 7 days after CCI. The dose of the antagonist was based on the obtained results. First, animals received V or J113863. Next, after 3 h, there was a second injection of W or M. The von Frey and cold plate tests were performed 0.5 h after the second administration (W or M) and 3.5 h after the first administration (V or J113863).

#### 2.4.6. Administration of CCR5 Antagonists with Morphine

The i.t. administration of TAK-220 or AZD-5672 followed by the i.t. administration of morphine was performed 7 days after CCI. The doses of antagonists were based on the obtained results. First, animals received V, TAK-220, or AZD-5672. After 1 h, there was a second injection of W or M. The von Frey and cold plate tests were performed 0.5 h after the second administration (W or M) and 1.5 h after the first administration (V, TAK-220, or AZD-5672).

#### 2.4.7. Coadministration of CCR1 and CCR5 Antagonists

The i.t. administration of J113863 (15  $\mu\text{g}/5$   $\mu\text{L}$ ) with the i.t. administration of TAK-220 or AZD-5672 (15  $\mu\text{g}/5$   $\mu\text{L}$ ) was performed 7 days after CCI, and the doses were based on the above experimental results. Animals received V, antagonist of CCR1 (J113863), antagonist of CCR5 (TAK-220 or AZD-5672), or their combination (J113863 + TAK-220 or J11 + AZD-5672). Behavioral testing was performed after 1 and 4 h.

### 2.5. Behavioral Tests

#### 2.5.1. Von Frey Test

For the measurement of tactile hypersensitivity, we used calibrated nylon monofilaments (ranging from 0.6–6 g, Stoelting, Wood Dale, IL, USA). First, the mice were put into plastic cages with a floor of wire mesh. After 5 min of adaptation, the reactions to mechanical stimuli were checked by the application of von Frey filaments. The measurement started with the thinnest filament (0.6 g) and continued until the hind paw was lifted. The pressure of the filament that caused the reaction was recorded as the result. If this reaction was not observed, filaments were applied to increase pressure (g) until the last filament used had a pressing force of 6 g, which was the cutoff latency [10]. The measurement with all filaments used was always based on three touches, which followed each other directly, of the midplantar surface of the hind paw. Each mouse (naive and CCI-exposed individuals) was measured once in every time point. Only the injured paw (right paw in naive) was measured and the result of the test was the value of the filament that caused the reaction of the tested mouse. These responses included paw withdrawal and shaking. If the outcome of the test was unclear, we repeated the measurements of individual mice after 5 min. This is a standard test used in our laboratory [9,12,20].

### 2.5.2. Cold Plate Test

For the measurement of thermal hypersensitivity, we used a cold plate/hot plate analgesia meter (Ugo Basile, Gemonio, Italy). The temperature of the plate surface was kept at 2 °C. The animals were placed on the chilled surface of the plate and observed until they lifted their hind paw, and the time of the reaction was recorded as described previously [10]. The maximal possible time for the animals to stand on the plate was 30 s, which was the cutoff latency. After CCI, the foot with the constricted nerve was always the first to react. This is a standard test used in our laboratory [9,12,20].

### 2.6. Statistical Analysis

The data obtained in the behavioral experiments (von Frey, cold plate tests) are presented as mean  $\pm$  SEM. The data obtained in biochemical experiments (RT-qPCR, Western blot, and ELISA analyses) are presented as fold change relative to the control group (naive mice)  $\pm$  SEM. The obtained results were statistically evaluated using one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons. Some of the results were evaluated using two-way ANOVA to detect time  $\times$  drug interaction. All of the statistical analyses were performed using Prism (ver. 8.1.1 (330), GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1. Temporal Changes in the mRNA and/or Protein Levels of *Olig2*, *TMEM119*, *IBA1*, and *GFAP* Measured in Parallel with Pain-Related Behavior after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve in Mice

Chronic constriction injury of the sciatic nerve led to the development of thermal hypersensitivity between Days 1 ( $p < 0.0001$ ) and 35 ( $p < 0.0001$ ) (Figure 1B). Over this time, we measured the mRNA and/or protein expression changes in cell markers (Figure 1D).

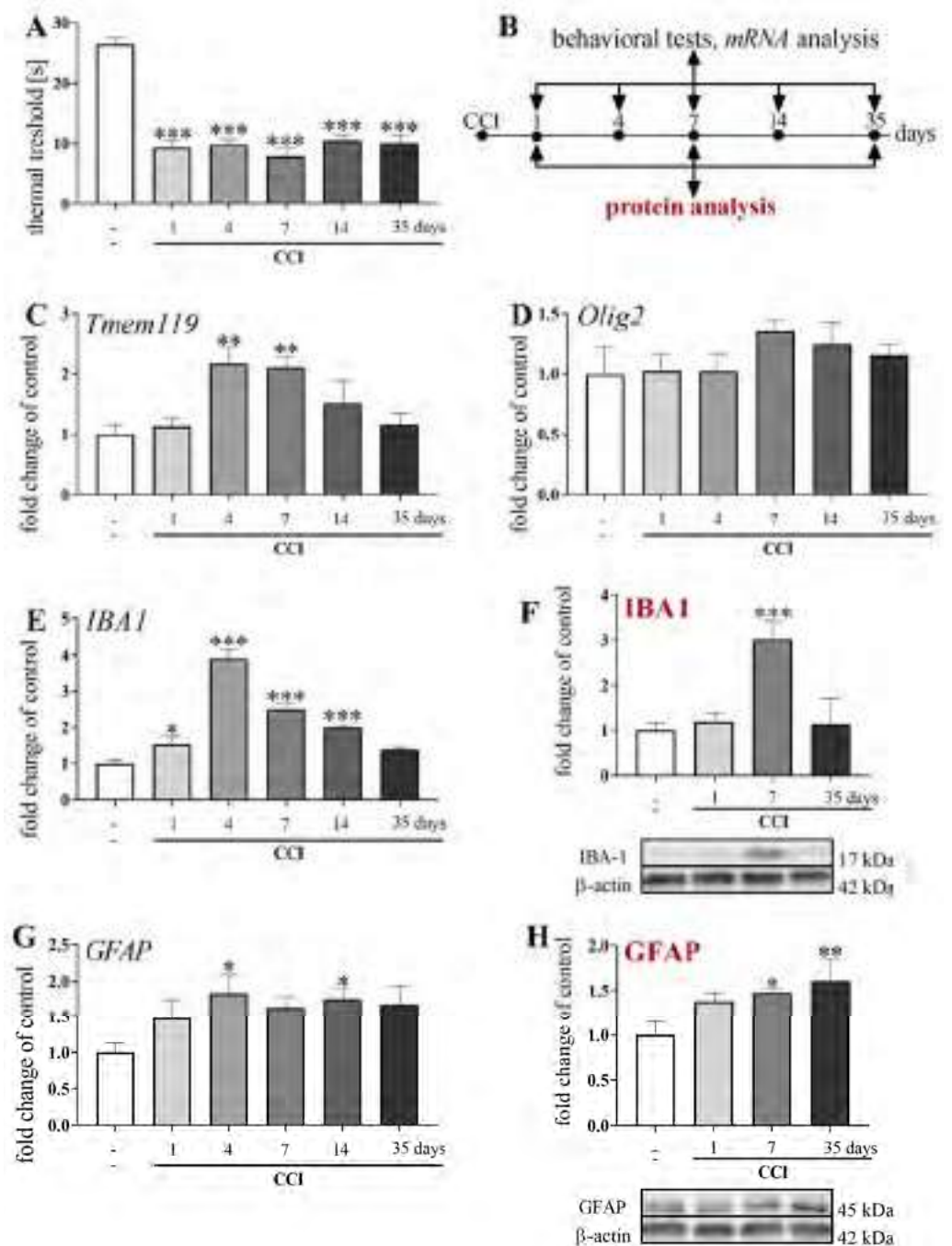
RT-qPCR analysis showed that the mRNA level of a marker for oligodendrocytes (*Olig2*) was not changed after CCI (Figure 1A). However, the mRNA level of the microglial marker (*TMEM119*) was strongly elevated between the 4th ( $p = 0.0011$ ) and 7th days ( $p = 0.0014$ ) after injury of the nerve (Figure 1C); similarly, the microglia/macrophage marker *IBA1* was elevated at the mRNA level from the 1st ( $p = 0.0442$ ) to the 14th day ( $p = 0.0003$ ) (Figure 1E). The astroglial marker (*GFAP*) was also elevated at the mRNA level, but only on the 4th ( $p = 0.0241$ ) and 14th days ( $p = 0.0351$ ) (Figure 1G).

Western blot analysis showed that the protein level of a microglia/macrophage marker (*IBA1*) was elevated on Day 7 after CCI ( $p = 0.0005$ ) (Figure 1F). The protein level of the astroglial marker (*GFAP*) was elevated on the 7th ( $p = 0.0367$ ) and 35th days ( $p = 0.0087$ ) (Figure 1H).

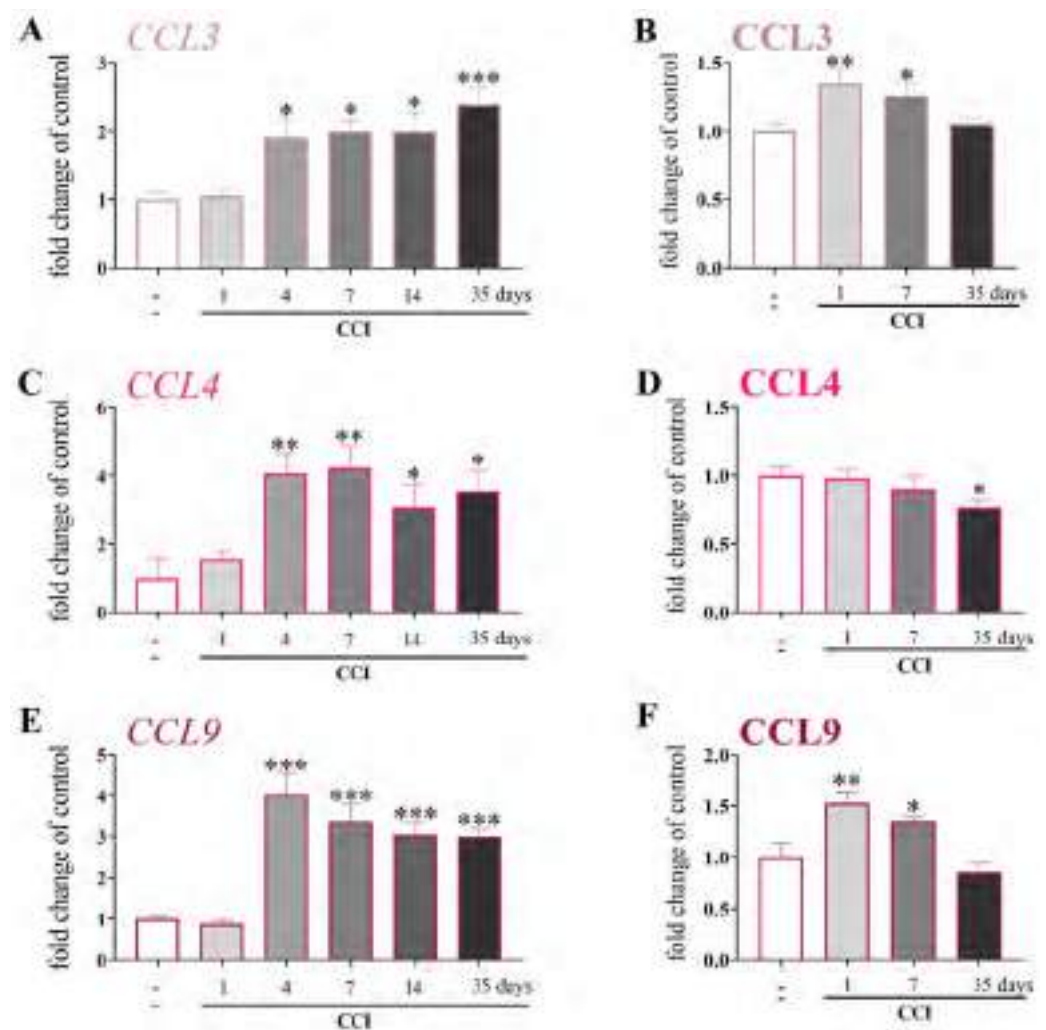
### 3.2. Temporal Changes in the mRNA and Protein Levels of *CCL3*, *CCL4*, and *CCL9* after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve in Mice

Chronic constriction injury evoked changes in the mRNA level of *CCL3*, which was upregulated between the 4th ( $p = 0.0246$ ) and 35th days ( $p = 0.0006$ ) (Figure 2A). *CCL4* was elevated from the 4th ( $p = 0.0043$ ) to the 35th day ( $p = 0.0105$ ) (Figure 2C), and similarly the level of *CCL9* grew significantly from the 4th ( $p < 0.0001$ ) to the 35th day ( $p = 0.0006$ ) (Figure 2E).





**Figure 1.** Development of thermal hypersensitivity in CCI-exposed mice (from 1 to 35 days) as measured via the cold plate test (**B**). Timeline of tissue collection at the indicated time points for behavioral and biochemical analyses (**D**). Time-dependent changes in the mRNA levels of *Olig2* (**A**), *TMEM119* (**C**), *IBA1* (**E**), and *GFAP* (**G**) measured via RT-qPCR, and in the protein levels of *IBA1* (**F**) and *GFAP* (**H**) measured via Western blot in the spinal cord of naive and CCI-exposed mice (from 1 to 35 days). The data (n = 5–10) are presented as the mean fold changes relative to the control  $\pm$  SEM for the biochemical assays and the mean  $\pm$  SEM for the behavioral tests. The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons of selected pairs. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. the naive group. Abbreviations: -: naive; CCI: chronic constriction injury of the sciatic nerve.

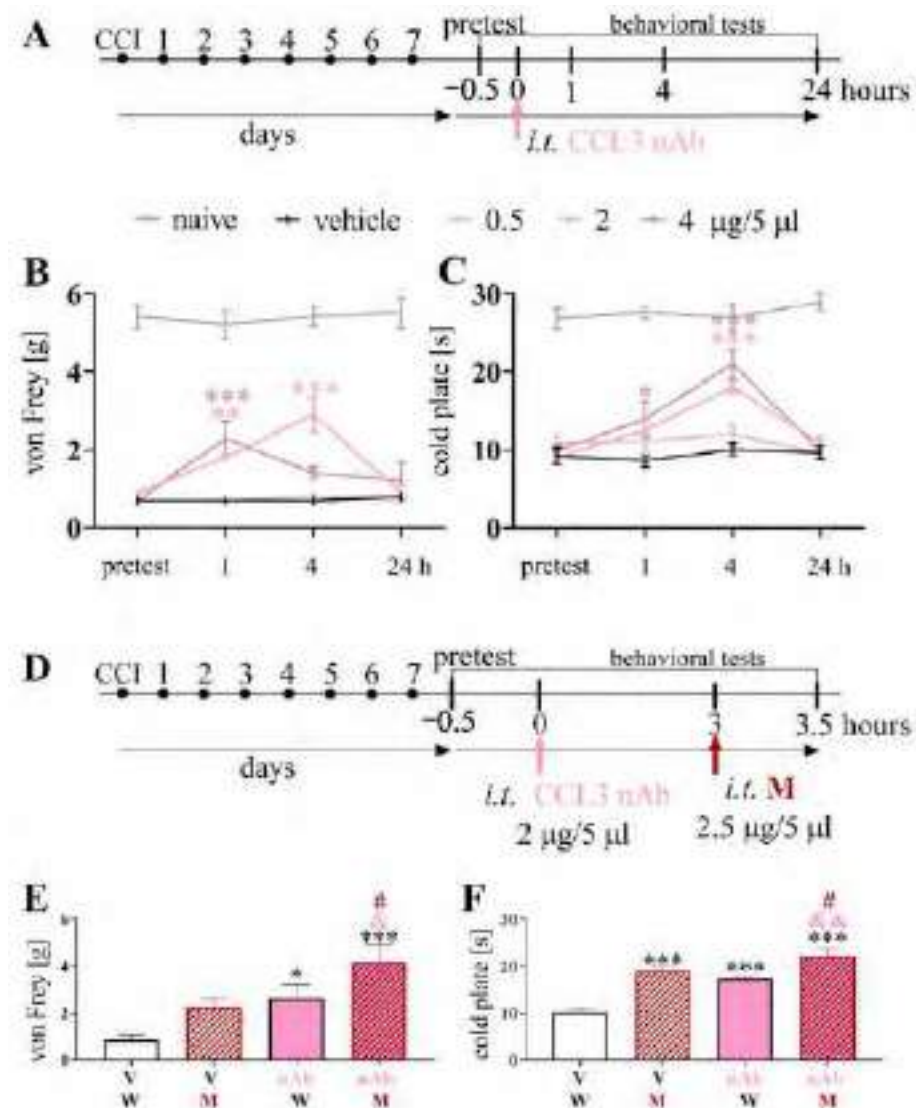


**Figure 2.** Time-dependent changes in the mRNA levels of CCL3 (A), CCL4 (C), and CCL9 (E) measured via RT-qPCR and changes in the protein levels of CCL3 (B), CCL4 (D), and CCL9 (F) measured using ELISA in the spinal cord of naive and CCI-exposed mice (from 1 to 35 days). The data are presented as the mean fold changes relative to the control  $\pm$  SEM ( $n = 4$ –10). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons of selected pairs. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. the naive group. Abbreviations: -: naive; CCI: chronic constriction injury of the sciatic nerve.

Changes in the protein level were significant in the case of CCL3 between the 1st ( $p = 0.0054$ ) and 7th days ( $p = 0.0307$ ) (Figure 2B), and likewise for CCL9 ( $p = 0.0019$  and  $p = 0.0295$ , respectively) (Figure 2F). A slight decrease in the CCL4 level was observed 35 days after CCI ( $p = 0.0346$ ).

### 3.3. Effects of a Single Intrathecal Administration of CCL3 nAb on Pain-Related Behavior and Morphine Analgesia 7 Days after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve in Mice

CCL3 nAb was administered at doses of 0.5, 2, and 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  (Figure 3A). In the von Frey test, a significant reduction in the mechanical hypersensitivity was observed 1 h after the two higher doses of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0018$ ) and 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ), and 4 h after the administration of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3B). In the cold plate test, there was also a significant reduction in the thermal hypersensitivity observed after 1 h, but only after the dose of 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0205$ ). At 4 h, an effect was observed after the two higher doses of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0002$ ) and 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3C). Two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the treatment and the analyzed time point (von Frey:  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $p < 0.0001$ ).

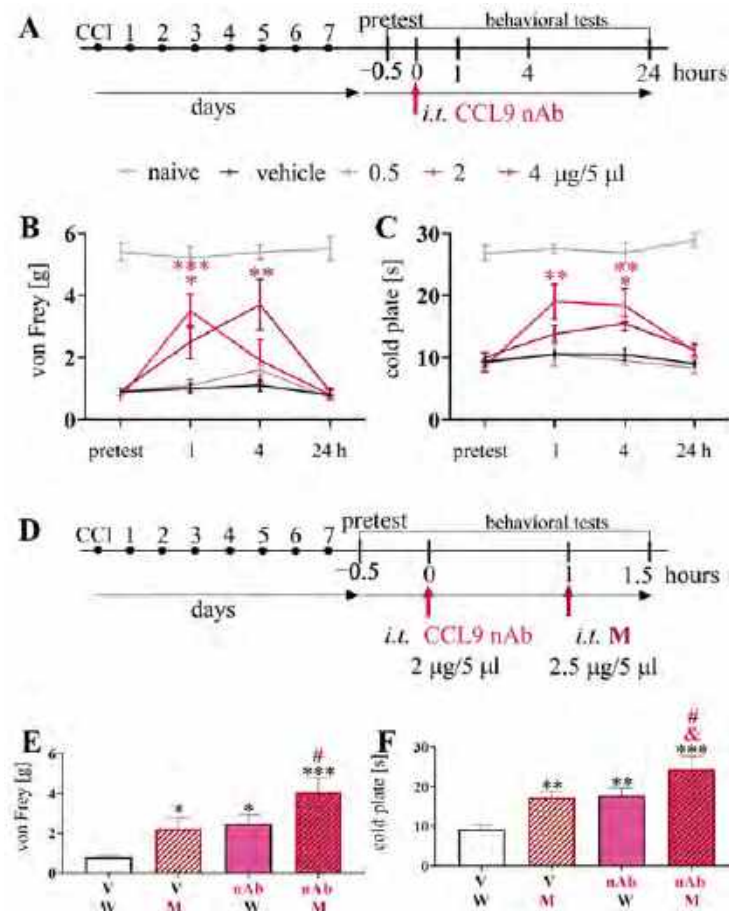


**Figure 3.** The effects of CCL3 neutralizing antibody administered intrathecally (i.t.) according to timeline (A), at doses of 0.5, 2, and 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  on mechanical (B) and thermal (C) hypersensitivity, and the influence of a CCL3 neutralizing antibody at a dose of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  plus morphine 2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  on mechanical (E) and thermal (F) hypersensitivity, administered according to timeline (D), 7 days after CCI in mice. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM (naive  $n = 5$ ; CCI  $n = 7$ –8). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons of selected pairs. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V-treated group at each of the investigated time points: 1, 4, and 24 h for (B,C) graphs; \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V + W-treated group for (E,F) graphs; #  $p < 0.05$  indicates significant differences between the V + M- and nAb + M-treated groups for (E,F) graphs; and &  $p < 0.05$  and &&  $p < 0.01$  indicate significant differences between the nAb + W- and nAb + M-treated groups. Abbreviations: V: vehicle (PBS); W: vehicle (*aqua pro injectione*); nAb: neutralizing antibody; M: morphine; CCI: chronic constriction injury of the sciatic nerve.

Additionally, we measured the influence of CCL3 nAb on analgesia evoked by morphine at a dose of 2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  (Figure 3D). Morphine alone significantly reduced thermal hypersensitivity ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3F). The observed outcome of CCL3 nAb with morphine coadministration strongly reduced both mechanical (Figure 3E) and thermal (Figure 3F) hypersensitivity compared to morphine and CCL3 nAb administered alone.

### 3.4. Effects of a Single Intrathecal Administration of CCL9 nAb on Pain-Related Behavior and Morphine Analgesia 7 Days after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve in Mice

CCL9 nAb was administered at doses of 0.5, 2, and 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  (Figure 4A). The mechanical threshold measured using the von Frey test was significantly reduced observed after 1 h for the two higher doses of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0002$ ) and 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0141$ ), but 4 h after administration only for the dose of 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0026$ ) (Figure 4B). At the same time, in the case of the thermal threshold (cold plate test), a significant reduction was observed 1 h after the dose of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0036$ ) and 4 h after the two higher doses of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0019$ ) and 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0371$ ) (Figure 4C). Two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the treatment and the analyzed time point (von Frey:  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $p = 0.0089$ ).

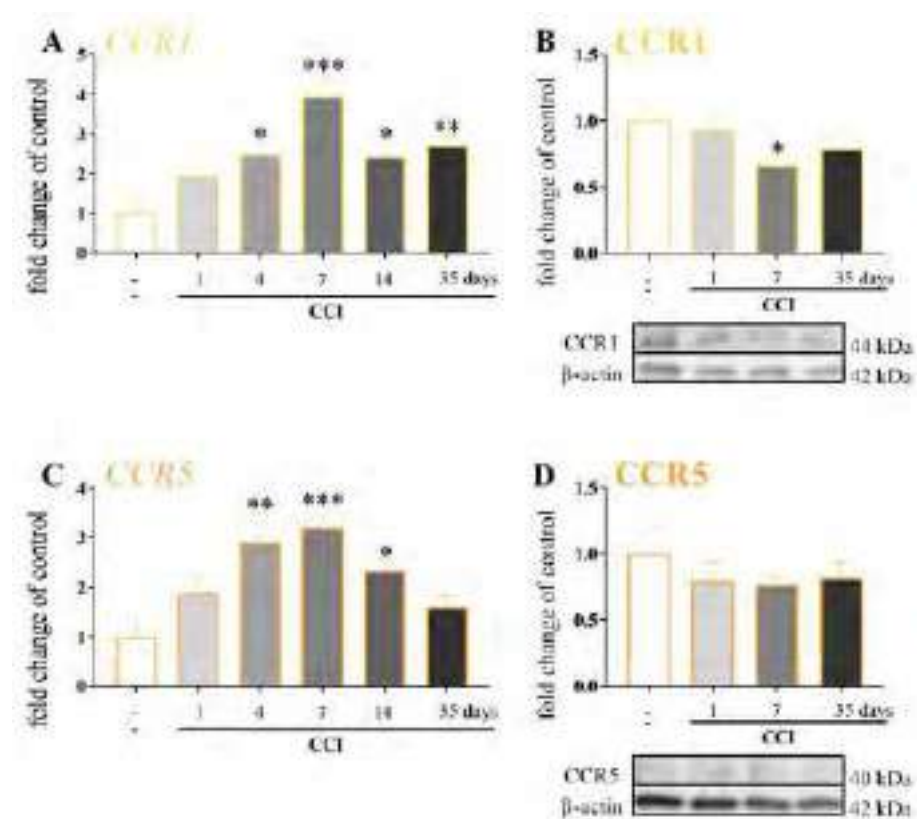


**Figure 4.** The effects of CCL9 neutralizing antibody administered intrathecally (i.t.) according to timeline (A), at doses of 0.5, 2, and 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  on mechanical (B) and thermal (C) hypersensitivity, and the influence of a CCL9 neutralizing antibody at a dose of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  plus morphine 2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  on mechanical (E) and thermal (F) hypersensitivity, administered according to timeline (D), 7 days CCI in mice. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM (naive  $n = 5$ ; CCI  $n = 5$ –8). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons of selected pairs. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V-treated group at each of the investigated time points: 1, 4, and 24 h for (B,C) graphs; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V + W-treated group for (E,F) graphs; #  $p < 0.05$  indicates significant differences between the V + M- and nAb + M-treated groups for (E,F) graphs; and &  $p < 0.05$  indicates significant differences between the nAb + W- and nAb + M-treated groups. Abbreviations: V: vehicle (PBS); W: vehicle (*aqua pro injectione*); nAb: neutralizing antibody; M: morphine; CCI: chronic constriction injury of the sciatic nerve.

Furthermore, we measured the influence of CCL9 nAb on morphine analgesia (Figure 4D). Morphine administration alone significantly reduced mechanical ( $p = 0.0466$ ) and thermal ( $p = 0.0052$ ) (Figure 4E,F) hypersensitivity. However, the CCL9 nAb and morphine coadministration strongly reduced both mechanical (Figure 4E) and thermal (Figure 4F) hypersensitivity and was more effective than morphine and/or CCL9 nAb administered alone.

### 3.5. Temporal Changes in the mRNA and Protein Levels of CCR1 and CCR5 after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve in Mice

Chronic constriction injury evoked changes in the mRNA level of CCR1, which increased between the 4th ( $p = 0.0251$ ) and 35th days ( $p = 0.0065$ ) (Figure 5A). For the mRNA level of CCR5, we also observed a significant increase, but only between the 4th ( $p = 0.0032$ ) and 14th days ( $p = 0.0208$ ) (Figure 5C).



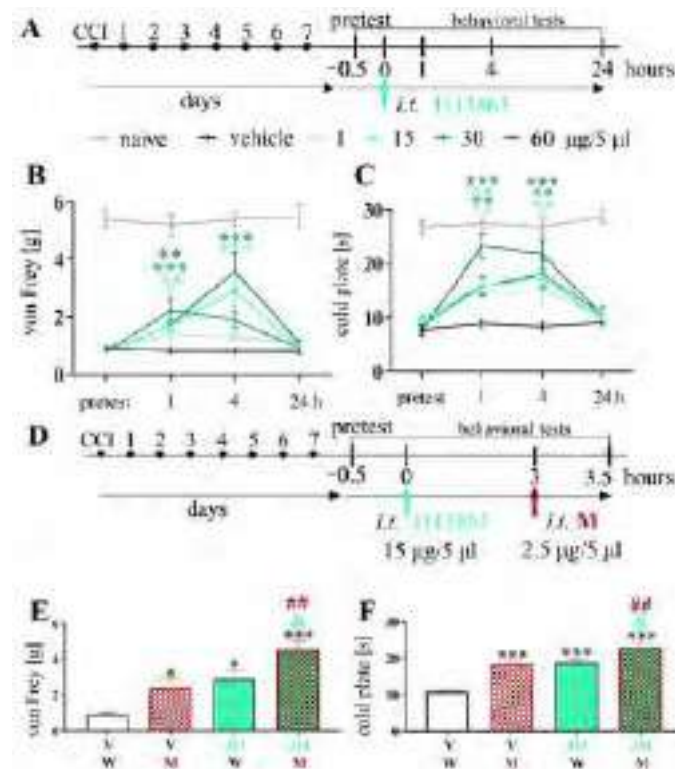
**Figure 5.** Time-dependent changes in the mRNA levels of CCR1 (A) and CCR5 (C) measured via RT-qPCR and changes in the protein levels of CCR1 (B) and CCR5 (D) measured using Western blot in the spinal cord of naive and chronic CCI-exposed mice (from 1 to 35 days). The data are presented as the mean fold changes relative to the control  $\pm$  SEM ( $n = 4-9$ ). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons of selected pairs. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. the naive group. Abbreviations: -: naive; CCI: chronic constriction injury of the sciatic nerve.

At the protein level, there were no changes in CCR5 (Figure 5D). There was a slight decrease in the protein level of CCR1 7 days after CCI ( $p = 0.0182$ ) (Figure 5B).

### 3.6. Effects of a Single Intrathecal J113863 Administration on Pain-Related Behavior and Morphine Analgesia 7 Days after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve in Mice

J113863 was administered at doses of 1, 15, 30, and 60  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  (Figure 6A). In the von Frey test, a significant reduction in mechanical hypersensitivity was observed 1 h after the doses of 1  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0400$ ), 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0041$ ), 30  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ), and

60  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0056$ ). J113863 was even more effective 4 h after administration at doses of 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0004$ ) and 60  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ) (Figure 6B). In the cold plate test, the highest reduction in thermal hypersensitivity was observed 1 h after doses of 1  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0038$ ), 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0014$ ), 30  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0023$ ), and 60  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ). Similarly, a reduction in thermal hypersensitivity was observed 4 h after doses of 1  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0192$ ), 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0031$ ), 30  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0022$ ), and 60  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ) (Figure 6C). Two-way ANOVA found a significant interaction between treatment and time (von Frey:  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $p < 0.0001$ ).

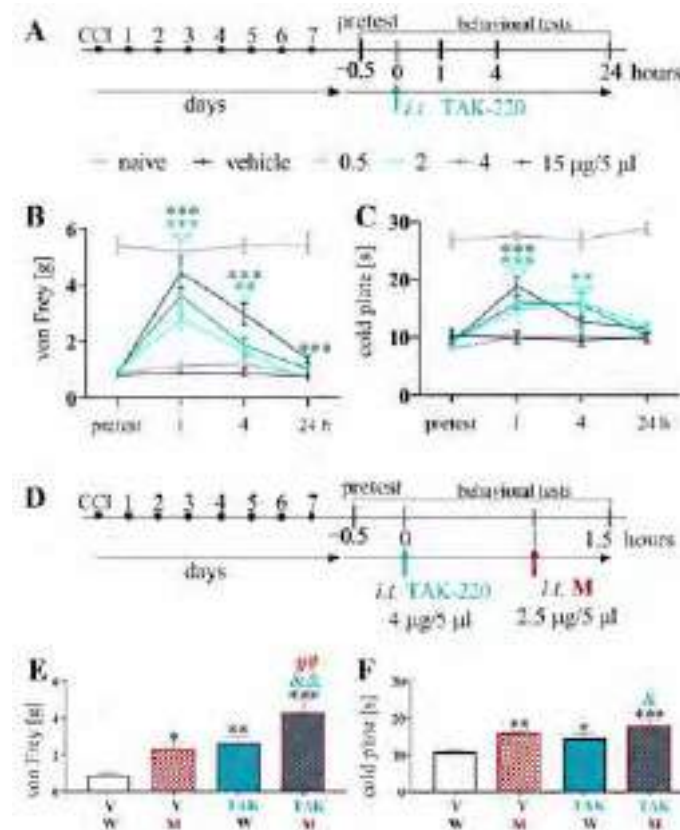


**Figure 6.** The effects of a CCR1 antagonist (J113863) administered intrathecally (i.t.) according to timeline (A), at doses of 1, 15, 30, and 60  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  on mechanical (B) and thermal (C) hypersensitivity and the influence of J113863 at a dose of 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  plus morphine 2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  on mechanical (E) and thermal (F) hypersensitivity, administered according to timeline (D), 7 days after CCI in mice. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM (naive  $n = 5$ ; CCI  $n = 5-8$ ). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons of selected pairs. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V-treated group at each of the investigated time points: 1, 4, and 24 h for (B,C) graphs; \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V + W-treated group for (E,F) graphs; ##  $p < 0.01$  indicates significant differences between the V + M- and J11 + M-treated groups for (E,F) graphs; and &  $p < 0.05$  indicates significant differences between the J11 + W- and J11 + M-treated groups. Abbreviations: V: vehicle (DMSO); W: vehicle (*aqua pro injectione*); M: morphine, J11: J113863; CCI: chronic constriction injury of the sciatic nerve.

Subsequently, we measured the influence of J113863 on morphine analgesia (Figure 6D). Morphine alone (2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ ) significantly reduced mechanical ( $p = 0.0347$ ) and thermal ( $p < 0.0001$ ) (Figure 6E,F) hypersensitivity. Even so, the effect of J113863 and morphine coadministration significantly reduced both mechanical (Figure 6E) and thermal (Figure 6F) hypersensitivity and was more potent than morphine and J113863 administered alone.

### 3.7. Effects of a Single Intrathecal TAK-220 Administration on Pain-Related Behavior and Morphine Analgesia 7 Days after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve in Mice

First, the CCR5 antagonist TAK-220 was administered at doses of 0.5, 2, 4, and 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  (Figure 7A). In the test for mechanical hypersensitivity after 1 h, the significant reduction in pain symptoms was induced by the doses of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0054$ ), 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ), and 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ). After 4 h, there was also a significant effect of the same doses of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0358$ ), 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0067$ ), and 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ) (Figure 7B). In the test for thermal hypersensitivity, there was a similar pattern of efficacy, and the most potent reduction was observed 1 h after doses of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0042$ ), 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0004$ ), and 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p < 0.0001$ ). The effect was also significant 4 h after doses of 2  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0014$ ) and 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  ( $p = 0.0026$ ) (Figure 7C). Two-way ANOVA found a significant interaction between treatment and time (von Frey:  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $p < 0.0001$ ).

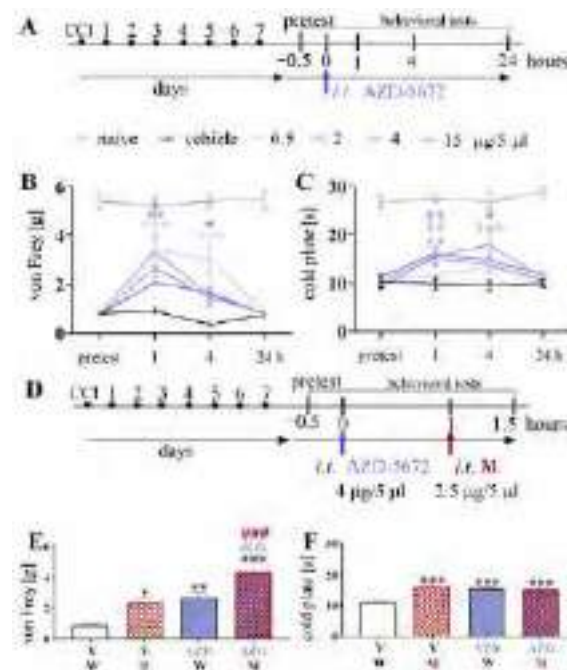


**Figure 7.** The effects of CCR5 antagonists (TAK-220) administered intrathecally (i.t.) according to timeline (A), at doses of 0.5, 2, 4, and 15  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  on mechanical (B) and thermal (C) hypersensitivity and the influence of TAK-220 at a dose of 4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  plus morphine 2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  on mechanical (E) and thermal (F) hypersensitivity, administered according to timeline (D), 7 days after CCI in mice. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM (naive  $n = 5$ ; CCI  $n = 8$ –10). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons of selected pairs. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V-treated group at each of the investigated time points: 1, 4, and 24 h for (B,C) graphs; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V + W-treated group for (E,F) graphs; ##  $p < 0.01$  indicates significant differences between the V + M- and TAK + M-treated groups for (E,F) graphs; and &  $p < 0.05$  and &&  $p < 0.01$  indicate significant differences between the TAK + W- and TAK-220 + M-treated groups. Abbreviations: V: vehicle (DMSO); W: vehicle (*aqua pro injectione*); M: morphine, TAK: TAK-220; CCI: chronic constriction injury of the sciatic nerve.

In the next step, we measured the influence of TAK-220 on morphine analgesia (Figure 7D). Morphine alone (2.5 µg/5 µL) significantly reduced mechanical ( $p = 0.0209$ ) and thermal ( $p = 0.0018$ ) (Figure 7E,F) hypersensitivity. Even so, the potentiation of morphine analgesia by the use of TAK-220 was substantial in the test of mechanical ( $p = 0.0093$ ) (Figure 7E) hypersensitivity. Nevertheless, the effect of TAK-220 and morphine coadministration reduced both mechanical (Figure 7E) and thermal (Figure 7F) hypersensitivity and was more effective than morphine and/or TAK-220 administered alone

### 3.8. Effects of a Single Intrathecal AZD-5672 Administration on Pain-Related Behavior and Morphine Analgesia 7 Days after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve in Mice

The second CCR5 antagonist chosen for this study, AZD-5672, was also administered at doses of 0.5, 2, 4, and 15 µg/5 µL (Figure 8A). In the von Frey test (mechanical threshold), the significant reduction was observed 1 h after doses of 0.5 µg/5 µL ( $p = 0.0007$ ), 2 µg/5 µL ( $p = 0.0010$ ), and 4 µg/5 µL ( $p = 0.0140$ ), and 4 h after doses of 0.5 µg/5 µL ( $p = 0.0001$ ) and 15 µg/5 µL ( $p = 0.0488$ ) (Figure 8B). In the cold plate test (thermal threshold), there was also a significant reduction observed 1 h after doses of 2 µg/5 µL ( $p = 0.0041$ ), 4 µg/5 µL ( $p = 0.0024$ ), and 15 µg/5 µL ( $p = 0.0017$ ), and 4 h after doses of 4 µg/5 µL ( $p = 0.0010$ ) and 15 µg/5 µL ( $p = 0.0426$ ) (Figure 8C). Two-way ANOVA found a significant interaction between treatment and time (von Frey:  $p = 0.0006$ ; cold plate:  $p = 0.0445$ ).



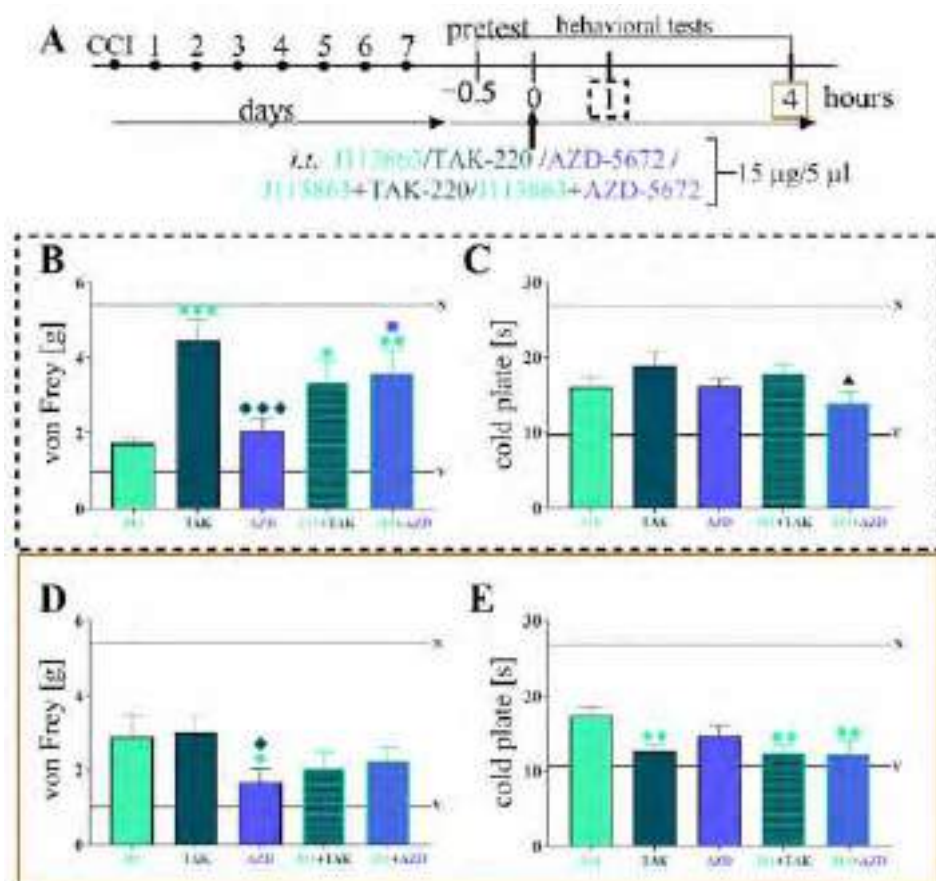
**Figure 8.** The effects of CCR5 antagonists (AZD-5672) administered intrathecally (i.t.) according to timeline (A), at doses of 0.5, 2, 4, and 15 µg/5 µL on mechanical (B) and thermal (C) hypersensitivity and the influence of AZD-5672 at a dose of 4 µg/5 µL plus morphine 2.5 µg/5 µL on mechanical (E) and thermal (F) hypersensitivity, administered according to timeline (D), 7 days after CCI in mice. The data are presented as the mean ± SEM (naive  $n = 5$ ; CCI  $n = 8$ –10). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons of selected pairs. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V-treated group at each of the investigated time points: 1, 4, and 24 h for (B,C) graphs; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. V + W-treated group for (E,F) graphs; ###  $p < 0.001$  and &&  $p < 0.01$  indicates significant differences between the V + M- and AZD + M-treated groups for (E,F) graphs; and  $p < 0.01$  indicates significant differences between the AZD + W- and AZD + M-treated groups. Abbreviations: V: vehicle (DMSO); W: vehicle (*aqua pro injectione*); M: morphine; AZD: AZD -5672; CCI: chronic constriction injury of the sciatic nerve.



Afterward, we measured the influence of AZD-5672 on morphine analgesia (Figure 8D). Compared to morphine administered alone (2.5 µg/5 µL), which significantly lowered mechanical ( $p = 0.0142$ ) and thermal ( $p < 0.0001$ ) (Figure 8E,F) hypersensitivity, coadministration with AZD-5672 was better than morphine and AZD-5672 administered alone but only for reducing mechanical (Figure 8E) hypersensitivity.

### 3.9. Comparison of the Effects of Intrathecal Administration of Substances Targeting CCR1 (J113863), CCR5 (TAK-220/AZD-5672), and Their Combination (J11 + TAK-220 or J11 + AZD-5672) on Pain-Related Behavior 7 Days after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve in Mice

We next measured the influence of a single i.t. coadministrations of CCR1 (J113863) and CCR5 (TAK-220/AZD-5672) antagonists at 1 and 4 h (Figure 9A); the times were selected according to the above results. After 1 h, there was greater analgesia by TAK-220 (Figure 7) and AZD-5672 (Figure 8), but after 4 h, there was a higher analgesia by J113863 (Figure 6) (at least in one behavioral test).



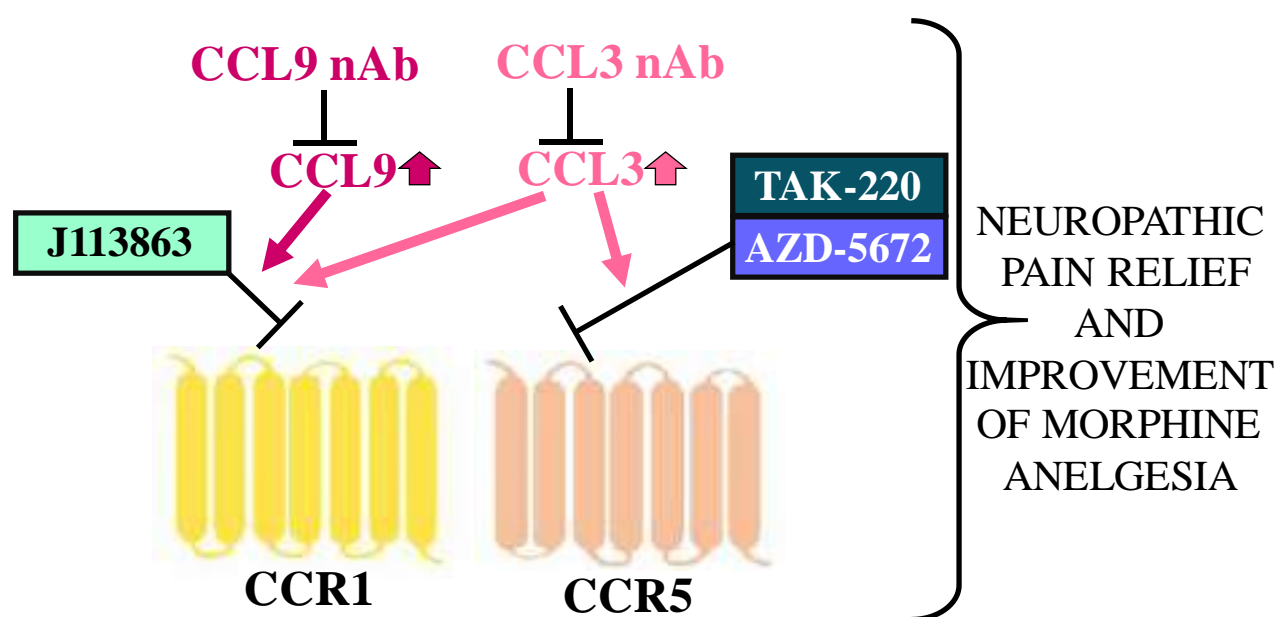
**Figure 9.** Comparison of the effects of intrathecal (i.t.) administration of substances targeting CCR1 (J113863), CCR5 (TAK-220 or AZD-5672), and their combination (J11 + TAK-220 or J11 + AZD-5672) at a dose of 15 µg/5 µL (timeline (A)) on mechanical and thermal hypersensitivity measured after 1 h (B,C) and after 4 h (D,E), 7 days after chronic CCI in mice. The data are presented as the mean ± SEM (naive  $n = 5$ ; CCI  $n = 7-8$ ). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons of selected pairs. ●  $p < 0.05$ , ●●  $p < 0.01$ , and ●●●  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. J11-treated group; ◆  $p < 0.05$  and ◆◆◆  $p < 0.001$  indicate significant differences vs. TAK-treated group; ■  $p < 0.05$  indicates significant differences vs. AZD-treated group; and ▲  $p < 0.05$  indicates significant differences vs. J11 + TAK-treated group. Abbreviations: N: naive; V: vehicle (DMSO); J11: J113863; TAK: TAK-220; AZD: AZD-5672; CCI: chronic constriction injury of the sciatic nerve.

After 1 h, in the von Frey test, when the substances were administered alone, there was a far weaker analgesic effect observed for J113863 ( $p < 0.0001$ ) and AZD-5672 ( $p = 0.0004$ ) than for TAK-220 (Figure 9B). Moreover, the coadministration of J113863 + TAK-220 ( $p = 0.0168$ ) and J113863 + AZD-5672 ( $p = 0.0066$ ) was more effective than J113863 alone. The injections of J113863 + AZD-5672 were also more effective than single AZD-5672 ( $p = 0.0196$ ) (Figure 9B). However, in the case of the cold plate test, there were no differences between groups, with the exception that the double blockade by J113863 + TAK-220 was slightly more successful than that by J113863 + AZD-5672 ( $p = 0.0440$ ) (Figure 9C).

After 4 h, in the von Frey test, AZD-5672 was less analgesic than J113863 ( $p = 0.0465$ ) and TAK-220 ( $p = 0.0251$ ) (Figure 9D). However, in the cold plate test, J113863 alone was more effective than TAK-220 ( $p = 0.0082$ ), J113863 + TAK-220 ( $p = 0.0062$ ), and J113863 + AZD-5672 ( $p = 0.0039$ ). There was no improvement in analgesia in groups receiving coadministration compared to single administration in the von Frey or cold plate test (Figure 9D,E).

#### 4. Discussion

Our results indicated that in the CCI-induced neuropathic pain model, strong thermal hypersensitivity developed in parallel with the activation of macrophages, microglia, and astroglia, and in parallel we also observed enhanced protein levels of CCL3 and CCL9. These results correlate well with those obtained in behavioral studies, in which we showed for the first time that the administration of neutralizing antibodies for CCL3 and CCL9 showed analgesic effects on Day 7 in CCI-evoked neuropathy. Importantly, we obtained similar analgesic properties after a single intrathecal administration of J113863 (CCR1 antagonist), TAK-220, or AZD-5672 (CCR5 antagonists). Furthermore, blocking CCL3 or CCL9 and CCR1 or CCR5 led to the augmentation of the effectiveness of morphine, but CCR5 antagonists were only effective against mechanical hypersensitivity. Surprisingly, the coadministration of J113863 with TAK-220 or AZD-5672 was in general not far more effective against symptoms of neuropathic pain than either one alone. Our research emphasizes the important function of CCL3 and CCL9 and their receptors in the pathology of neuropathy and suggest their crucial role in opioid analgesia (Scheme 1).



**Scheme 1.** Pharmacological modulation of chemokines from MIP-1 family (CCL3 and CCL9) via neutralizing antibodies and their receptors (CCR1 by J113863, CCR5 by TAK-220 or AZD-5672) reduces neuropathic pain symptoms and influences morphine analgesia—evidence from mice model evoked by chronic constriction injury of the sciatic nerve.

Neuropathic pain resulting from nerve injury is a highly impairing type of pain, which is often resistant to available treatments [28]. Chemokines have indisputable homeostatic functions based on attracting target cells to the place of their secretion, and what is especially important is that they can be produced not only by glial and immune cells, as originally thought, but also by neurons [29,30]. Data from recent years have confirmed that chemokines of the CC family, such as CCL2/3/4/5/7/8/9, have prominent pronociceptive properties after their intrathecal administration to naive mice [13,16]. We were interested in three of the abovementioned chemokines with strong algescic potential belonging to the MIP-1 family: CCL3, CCL4, and CCL9. In the lumbar spinal cord of mice with CCI-induced neuropathic pain, only two of them were highly upregulated at the protein level: CCL3 and CCL9. There was no upregulation in the protein level of CCL4, which conforms with the statements of Rojewska et al. [13] in a model of diabetic neuropathy. The results of our study indicate that changes in mRNA and protein levels of chemokines differ significantly, which is consistent with the latest literature [31]. It is well known that genetic information is converted from DNA to mRNA and then to proteins, but this does not necessarily involve translation. Determining the protein level of chemokines is very difficult because of their low molecular weight, and it has been attempted in very few studies. However, it is important, as our research shows, because it allows us to draw more accurate conclusions. Moreover, nerve injury results in a disruption of the blood–spinal cord barrier allowing for the time-dependent influx of peripheral immune cells [32]. Our research results show that among the MIP-1 family members, CCL3 and CCL9 play important roles in nociceptive pain transmission in neuropathy. Data from immunohistochemical analysis showed that CCL3 can be released by both neurons [13] and microglia [33]. Microglia were shown to produce CCL3 in primary cell cultures after ATP stimulation [34]. Therefore, we assume that shortly after CCI, neuronal cells secrete CCL3, which activates and attracts macrophages/microglia [13,34,35]. Later, microglia can also produce this chemokine, which can possibly act both in an autocrine and paracrine manner. However, this hypothesis needs further research. Our results demonstrated that neutralizing antibodies against CCL3 not only raised the nociceptive threshold but also enhanced the potency of morphine. Similar results were obtained in a model of diabetic neuropathy [13]. In our opinion, an understanding of the CCL3 role seems to be highly important in neurodegenerative processes, especially due to its changes being associated with TBI [36], temporal lobe epilepsy [37], Alzheimer’s disease [38,39], and neuropathy [13,18]. Moreover, auto-antibodies to CCL3 have been proposed as biomarkers for an advancement in human type 1 diabetes [40]. Therefore, CCL3 signaling is probably a new, important target for the development of therapeutic strategies.

In the CCI-induced neuropathic pain model, we also described an enhanced level of CCL9 (both mRNA and protein). In accordance with the immunohistochemical results from 2018 [13], CCL9 colocalizes with the NeuN marker, not with GFAP or IBA1, indicating neurons as being the main source. The neuronal origin suggests an important role of CCL9, especially in the initial stage of neuropathy. What is more, i.t. administration of a CCL9 nAb significantly diminished tactile and thermal hypersensitivity after nerve injury, which corresponds well with the results obtained earlier in the diabetic neuropathy model [13]. Taking into consideration the abovementioned results, we believe that CCL9, similar to CCL3, is a key pronociceptive factor. Although CCL9 is expressed only in rodents, the chemokine has a human ortholog, CCL23, whose upregulation was observed in the cerebrospinal fluid of patients with neuropathic pain [41]. Therefore, we consider CCL23 to be a good target for future therapeutic strategies; although, this requires further research.

Since CCL3 and CCL9 play pivotal roles in mouse neuropathic pain development, we focused our attention on the G-protein-coupled receptors of the MIP-1 family named CCR1 and CCR5. Importantly, they are present on neurons [13,42,43], microglia [39,42,44], and astrocytes [42,45]. Their presence in the neuronal cells of the spinal cord enables the important role in nociceptive transmission and explains why CCL3, CCL4, and CCL9 have strong and quick pronociceptive effects after their intrathecal administration [13,16].

Recently, a number of papers have described the involvement of CCR1 and CCR5 in the pathology of many diseases characterized by severe neuro-inflammation associated with pain [44,46,47]. The protein levels of CCR1 and CCR5 did not increase in the spinal cord after nerve injury, which is not surprising since it has also been observed in the case of other CC, e.g., CCR1, CCR5, and CCR4 in STZ- [13,48] and CCR1 and CCR3 in CCI-induced [16] neuropathic pain in mice. Many studies have indicated that both CCR1 and CCR5 have key roles in neurodegeneration [39,49,50]. Moreover, recently it was shown that CCR5 is a valid target for stroke and traumatic brain injury recovery, and the authors revealed that maraviroc improves the learning and cognition of affected animals [51]. The results of our research are especially valuable since the availability of an antagonist of CCR5, maraviroc, which is already used in the clinic, points to this receptor as a promising molecular target for future clinical trials for neuropathies of different etiologies.

Our results showed for the first time that the single intrathecal administration of a CCR1 antagonist (J113863) and CCR5 antagonists (TAK-220 and AZD-5672) dose-dependently diminished pain-related behavior after CCI. Similarly, J113863 reduces hypersensitivity in complete Freund's [52] and diabetic [13] mouse models and maraviroc in CCI models [14,46,47]. The other CCR5 antagonist (DAPTA) was shown to be effective in the case of partial sciatic-nerve-ligation-induced hypersensitivity [53], but it was ineffective in STZ-induced [13] and CCI-induced (own unpublished data) neuropathy. This was the reason why we used the other antagonists, which are known to be strong and selective blockers of CCR5 (TAK-220 and AZD-5672). It is worth emphasizing that such good analgesic effects of the antagonists of both receptors are probably caused by the fact that numerous pleiotropic chemokines act through them. The CCR1 has ten ligands, including five with strong pronociceptive properties and well-documented spinal changes in a CCI mice model, such as CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, and CCL9 [16,54]. The CCR5 has six ligands, including four with strong pronociceptive properties and well-documented spinal changes in a CCI model, such as CCL3, CCL5, CCL7, and CCL8 [16,54]. Importantly, these two receptors have six common ligands, which by acting through these receptors are probably seriously engaged in the formation of neuropathic pain symptoms. Therefore, our results and the available literature gave us the motivation to verify whether a simultaneous CCR1/CCR5 blockade will be more effective than blocking CCR1 or CCR5 alone. Few studies have been performed with the use of double antagonists of chemokine receptors against neuropathic pain symptoms. Kwiatkowski et al. [14] revealed that dual (cenicriviroc—CCR2/CCR5) and selective (RS504393—CCR2, maraviroc—CCR5) antagonists prevent hypersensitivity to similar degrees after repeated intrathecal injections in CCI-exposed rats. However, cenicriviroc, which blocks both receptors simultaneously, exhibited a combination of the properties of the selective antagonists (RS504393, maraviroc), which meant that, in this case, the lowered expression of the most examined pronociceptive chemokines, CCR2 and CCR5, was at the mRNA level in the spinal cord and DRGs [14]. Moreover, after single intrathecal and intraperitoneal injections in mice, cenicriviroc had the strongest analgesic properties in comparison to RS504393/maraviroc [14]. Recently, Pawlik et al. [16] showed the analgesic effectiveness of a dual CCR1/CCR3 antagonist (UCB35625). Therefore, we also wanted to check whether a simultaneous CCR1 and CCR5 blockade would be more effective than blocking each of them separately. Since no dual CCR1/CCR5 antagonist was available, we decided to use a drug combination. Our findings show that the coadministration of CCR1 and CCR5 antagonists has analgesic properties on mechanical and thermal hypersensitivity but, in general, it did not work better than selective injections. Comparable results were obtained after the coadministration of J113863 with SB328437 (CCR3 antagonist), where the common blockade did not work better on pain-related behaviors than a selective blockade [16]. It is worth remembering that after the coadministration of substances, we cannot completely rule out an interaction between them, which can impact the pharmacological effect. Moreover, we do not know how these substances mutually affect the activation of receptors and consequently the cellular response [55].

Recent animal studies have suggested that chemokines, which are important pronociceptive mediators, may also evoke a loss of the analgesic effects of opioids [56,57]; however, the exact mechanisms are still poorly understood. The results of our study clearly indicate that the neutralization of CCL3 and CCL9 improved morphine analgesia in a CCI model, which was also shown after the blockade of CCL1, CCL2, and CCL7 [9,54]. From the other groups of chemokines, we have recently shown that the neutralizing antibody against XCL1 significantly potentiates the morphine analgesia [12]. Additionally, it was also proven that blocking CXCL10 enhanced morphine antinociception in cancer-induced bone pain [58] and, from another chemokine family, CX3CL1 plays an important role in regulating morphine analgesia in naive animals [59]. Moreover, it was shown that CCL2 contributes to the development of morphine antinociceptive tolerance in rats [60]. The concept of using chemokine receptor antagonists in combination with morphine was derived from experiments conducted by our team in rodent models of neuropathic pain, e.g., RS504393 (CCR2) [61], SB328437 (CCR3) [24], C021 (CCR4) [15,48], maraviroc (CCR5) [14], and NBI-74330 (CXCR3) [62], and confirmed by others, e.g., maraviroc in inflammatory pain models [63,64]. Considering the fact that monotherapy has low effectiveness against neuropathy [65], we decided to check whether the new selective pharmacological tools can increase the effectiveness of morphine after combined administration. It is well known that apart from increasing therapeutic effectiveness, drug coadministration also reduces the risk of side effects because of the possibility of lower dose usage [66]. In our opinion, combined pharmacotherapy based on two analgesics is reasonable if the drugs used have different mechanisms of action, as in the case of modulators of opioid and chemokine system coadministration. Morphine acts selectively through all opioid receptors and is a strong mu opioid receptor (MOR) agonist and weak agonist of delta (DOR) and kappa opioid receptors (KORs) [67]. As an analgesic drug, morphine is often used in the perioperative period and in cancer therapy [68]. However, in neuropathy, this drug loses its effectiveness [2]. This results in the need for gradually increased doses, which is intrinsically linked with the increased risk of side effects [28,69,70]. The mechanisms include desensitization and internalization of opioid receptors [71–74]. There is a dependency between chemokine and opioid receptors, caused by a cross-desensitization phenomenon made possible by similarities in structure between these receptors [63]. A growing body of evidence indicates that the combination of chemokine receptor antagonists with morphine potentiates morphine's analgesic effect in animal inflammatory [63] and neuropathic pain models [14,15,24,48,61,62]. The numerous results suggest that the interaction between opioid and chemokine receptors can be the reason for better analgesic effects. The *in vitro* data provide evidence that there is functional crosstalk between MOR and CCR5, whereby both of which belong to the G-protein-coupled receptor superfamily [75]. It was reported that MOR and CCR5 crosstalk is mediated by the possible creation of heterodimers of them [72,73,76–78]. Moreover, accumulating *in vitro* studies suggest that heterologous desensitization, described already for CCR5-MOR, might be responsible for better opioid efficacy [79]. In our research, we have shown that a CCR1 antagonist improves the analgesic properties of morphine, which is in agreement with results obtained in mice with diabetic neuropathy [13] and in rats in a CCI model [18]. Based on the available data, we hypothesize that the stronger analgesia of morphine in coadministration with J113863 is associated with the fact that CCR1 present on neuronal cells is coexpressed with MOR. However, it is known that the activation of CCR1 leads to the internalization of MORs, which clearly changes their function [80]. Nevertheless, this phenomenon is even more complicated because it is known that CCR1 is able to heterodimerize with CCR5 [81,82]. This fact may explain why both CCR1 (J113863) and CCR5 (TAK-220 and AZD-5672) antagonists improve the analgesic effects of morphine. In our current research, we used very selective CCR5 antagonists, and importantly, the results after their single administration in mice are consistent with those obtained after *i.t.* repeated administration of maraviroc in CCI-exposed rats [46]. In our study, both CCR5 antagonists coadministered with morphine were more potent than morphine alone, but only in reversing mechanical hypersensitivity.

Importantly, primary pain sensations are conducted by dissimilar nerve fibers [83] and chemokines may stimulate them differently, leading to pain initiation [84,85]. This may suggest that the coadministration of CCR5 antagonists with morphine may have a stronger impact on A $\beta$  fibers, which are responsible for a mechanical sensation [86], with less effect on A $\delta$  and C fibers, which are responsible for feeling low temperatures [87]. This issue leads to the hypothesis that functional crosstalk between MOR and CCR5 mainly affects A $\beta$  fibers.

Our and others' results undoubtedly suggest that chemokine system ligands and receptors are involved in opioid analgesia in nociceptive transmission [18,24,54,63]. Given that opioid receptors can probably form heterodimers with CCR1 and CCR5, the combined administration of opioid agonists with chemokine antagonists appears to be a new, interesting strategy for the relief of chronic pain. This is particularly important because it has been shown that such drug combinations allow for the use of lower doses of opioids and consequently result in less respiratory depression [66].

## 5. Conclusions

Neuropathic pain therapy is a critical need in medicine, meaning that investigations focused on novel therapeutic targets are essential. The results show that CCL3 and CCL9, based on their spinal upregulation and the potent antinociceptive effects of their neutralizing antibodies, are probably strongly engaged in the development of neuropathic pain symptoms. Their direct neutralization not only facilitates symptoms of neuropathy but also positively affects the efficacy of morphine, which may be pivotal for making future advancements in therapy. Our results propose CCR1 and CCR5 as being targets for novel polytherapy for neuropathy. Finally, our and others' results indicate that it is important to further investigate the role of these two chemokine receptors, since they can be key drug targets for the treatment of neuro-immunological disorders of different etiologies.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.C. and J.M.; methodology, A.C., K.P. and K.C.; validation, A.C., K.P., K.C. and J.M.; formal analysis, K.P. and A.C.; investigation, A.C., K.P., K.C. and J.M.; resources, J.M. and A.C.; data curation, A.C., K.P., K.C. and J.M.; writing—original draft preparation, A.C., K.P., K.C. and J.M.; writing—review and editing, A.C., K.P., K.C. and J.M.; visualization A.C., K.P., K.C. and J.M.; supervision, J.M.; project administration, J.M.; funding acquisition, J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Science Centre, Poland grants, OPUS 22 2021/43/B/NZ7/00230, and statutory funds from the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences.

**Institutional Review Board Statement:** The number of animals was limited to the necessary minimum. Experiments were carried out according to the recommendations and standards of the International Association for the Study of Pain and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and they were approved by the Ethics Committee of the Maj Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences (permission numbers: 1277/2015, 301/2017, 75/2017, 305/2017, 235/2020, and 40/2023).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The English language was corrected by American Journal Experts (certificate no. F18-1762-D9AD-9CAB-F9FC).

**Conflicts of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential conflict of interest.

## References

1. Van Hecke, O.; Austin, S.K.; Khan, R.A.; Smith, B.H.; Torrance, N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain* **2014**, *155*, 654–662. [CrossRef]
2. Martin, T.J.; Eisenach, J.C. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 811–817.
3. Finnerup, N.B.; Kuner, R.; Jensen, T.S. Neuropathic pain: From mechanisms to treatment. *Physiol. Rev.* **2021**, *101*, 259–301. [CrossRef]
4. von Bartheld, C.S.; Bahney, J.; Herculano-Houzel, S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* **2016**, *524*, 3865–3895. [CrossRef]
5. Mika, J.; Zychowska, M.; Popiolek-Barczyk, K.; Rojewska, E.; Przewlocka, B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *716*, 106–119. [CrossRef]
6. Ji, R.R.; Donnelly, C.R.; Nedergaard, M. Astrocytes in chronic pain and itch. *Nat. Rev. Neurosci.* **2019**, *20*, 667–685. [CrossRef]
7. Zarpelon, A.C.; Rodrigues, F.C.; Lopes, A.H.; Souza, G.R.; Carvalho, T.T.; Pinto, L.G.; Xu, D.; Ferreira, S.H.; Alves-Filho, J.C.; McInnes, I.B.; et al. Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. *FASEB J.* **2016**, *30*, 54–65. [CrossRef]
8. Charo, I.F.; Ransohoff, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 610–621. [CrossRef]
9. Zychowska, M.; Rojewska, E.; Piotrowska, A.; Kreiner, G.; Nalepa, I.; Mika, J. Spinal CCL1/CCR8 signaling interplay as a potential therapeutic target—Evidence from a mouse diabetic neuropathy model. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *52*, 261–271. [CrossRef]
10. Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Pawlik, K.; Kreiner, G.; Ciechanowska, A.; Makuch, W.; Nalepa, I.; Mika, J. Pharmacological blockade of spinal CXCL3/CXCR2 signaling by NVP CXCR2 20, a selective CXCR2 antagonist, reduces neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2198. [CrossRef]
11. Zychowska, M.; Rojewska, E.; Piotrowska, A.; Kreiner, G.; Mika, J. Microglial inhibition influences XCL1/XCR1 expression and cause analgesic effects in a mouse model of diabetic neuropathy. *Anesthesiology* **2016**, *125*, 573–589. [CrossRef]
12. Ciechanowska, A.; Rojewska, E.; Piotrowska, A.; Barut, J.; Pawlik, K.; Ciapała, K.; Kreiner, G.; Mika, J. New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions—Evidence from animal studies. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1058204. [CrossRef]
13. Rojewska, E.; Zychowska, M.; Piotrowska, A.; Kreiner, G.; Nalepa, I.; Mika, J. Involvement of Macrophage Inflammatory Protein-1 Family Members in the Development of Diabetic Neuropathy and Their Contribution to Effectiveness of Morphine. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 494. [CrossRef]
14. Kwiatkowski, K.; Ciapała, K.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Mika, J. Comparison of the beneficial effects of RS504393, maraviroc and cenicriviroc on neuropathic pain-related symptoms in rodents: Behavioral and biochemical analyses. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *84*, 106540. [CrossRef]
15. Bogacka, J.; Ciapała, K.; Pawlik, K.; Kwiatkowski, K.; Dobrogowski, J.; Przeklasa-Muszynska, A.; Mika, J. CCR4 Antagonist (C021) Administration Diminishes Hypersensitivity and Enhances the Analgesic Potency of Morphine and Buprenorphine in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1241. [CrossRef]
16. Pawlik, K.; Ciapała, K.; Ciechanowska, A.; Kwiatkowski, K.; Mika, J. Pharmacological Evidence of the Important Roles of CCR1 and CCR3 and Their Endogenous Ligands CCL2/7/8 in Hypersensitivity Based on a Murine Model of Neuropathic Pain. *Cells* **2022**, *12*, 98. [CrossRef]
17. Sun, S.; Chen, D.; Lin, F.; Chen, M.; Yu, H.; Hou, L.; Li, C. Role of interleukin-4, the chemokine CCL3 and its receptor CCR5 in neuropathic pain. *Mol. Immunol.* **2016**, *77*, 184–192. [CrossRef]
18. Pawlik, K.; Piotrowska, A.; Kwiatkowski, K.; Ciapała, K.; Popiolek-Barczyk, K.; Makuch, W.; Mika, J. The blockade of CC chemokine receptor type 1 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in a rat model of neuropathic pain. *Immunology* **2020**, *159*, 413–428. [CrossRef]
19. Bennett, G.J.; Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **1988**, *33*, 87–107. [CrossRef]
20. Piotrowska, A.; Ciapała, K.; Pawlik, K.; Kwiatkowski, K.; Rojewska, E.; Mika, J. Comparison of the effects of chemokine receptors CXCR2 and CXCR3 pharmacological modulation in neuropathic pain model—In vivo and in vitro study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11074. [CrossRef]
21. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156–159. [CrossRef]
22. CCL3 Antibody. Available online: [https://www.rndsystems.com/products/mouse-ccl3-mip-1alpha-antibody\\_af-450-na](https://www.rndsystems.com/products/mouse-ccl3-mip-1alpha-antibody_af-450-na) (accessed on 7 March 2023).
23. CCL9 Antibody. Available online: [https://www.rndsystems.com/products/mouse-ccl9-10-mip-1gamma-antibody\\_af463](https://www.rndsystems.com/products/mouse-ccl9-10-mip-1gamma-antibody_af463) (accessed on 7 March 2023).
24. Pawlik, K.; Ciechanowska, A.; Ciapała, K.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Mika, J. Blockade of CC Chemokine Receptor Type 3 Diminishes Pain and Enhances Opioid Analgesic Potency in a Model of Neuropathic Pain. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 781310. [CrossRef]

25. J 113863. Available online: [https://www.tocris.com/products/j-113863\\_2595](https://www.tocris.com/products/j-113863_2595) (accessed on 7 March 2023).
26. TAK-220. Available online: <https://www.medchemexpress.com/TAK-220.html> (accessed on 7 March 2023).
27. AZD-5672. Available online: <https://www.medchemexpress.com/azd-5672.html> (accessed on 7 March 2023).
28. Colloca, L.; Ludman, T.; Bouhassira, D.; Baron, R.; Dickenson, A.H.; Yarnitsky, D.; Freeman, R.; Truini, A.; Attal, N.; Finnerup, N.B.; et al. Neuropathic Pain. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17002. [[CrossRef](#)]
29. Gao, Y.J.; Ji, R.R. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol. Ther.* **2010**, *126*, 56–68. [[CrossRef](#)]
30. Biber, K.; Boddeke, E. Neuronal CC chemokines: The distinct roles of CCL21 and CCL2 in neuropathic pain. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 210. [[CrossRef](#)]
31. Brion, C.; Lutz, S.M.; Albert, F.W. Simultaneous quantification of mRNA and protein in single cells reveals post-transcriptional effects of genetic variation. *eLife* **2020**, *9*, 60645. [[CrossRef](#)]
32. Ellis, A.; Bennett, D.L.H. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *Br. J. Anaesth.* **2013**, *111*, 128. [[CrossRef](#)]
33. Kohno, H.; Maeda, T.; Perusek, L.; Pearlman, E.; Maeda, A. CCL3 Production by Microglial Cells Modulates Disease Severity in Murine Models of Retinal Degeneration. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 3816–3827. [[CrossRef](#)]
34. Kataoka, A.; Tozaki-Saitoh, H.; Koga, Y.; Tsuda, M.; Inoue, K. Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT. *J. Neurochem.* **2009**, *108*, 115–125. [[CrossRef](#)]
35. Simpson, J.E.; Newcombe, J.; Cuzner, M.L.; Woodroffe, M.N. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* **1998**, *84*, 238–249. [[CrossRef](#)]
36. Ciecchanowska, A.; Popiolek-Barczyk, K.; Pawlik, K.; Ciapała, K.; Oggioni, M.; Mercurio, D.; De Simoni, M.G.; Mika, J. Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice. *Immunobiology* **2020**, *225*, 151911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Guzik-Kornacka, A.; Sliwa, A.; Plucinska, G.; Lukasiuk, K. Status epilepticus evokes prolonged increase in the expression of CCL3 and CCL4 mRNA and protein in the rat brain. *Acta Neurobiol. Exp.* **2011**, *71*, 193–207.
38. Liu, C.; Cui, G.; Zhu, M.; Kang, X.; Guo, H. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 8342–8355. [[PubMed](#)]
39. Xia, M.Q.; Qin, S.X.; Wu, L.J.; Mackay, C.R.; Hyman, B.T. Immunohistochemical study of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimer's disease brains. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 31–37. [[CrossRef](#)]
40. Shehadeh, N.; Pollack, S.; Wildbaum, G.; Zohar, Y.; Shafat, I.; Makhoul, R.; Daod, E.; Hakim, F.; Perlman, R.; Karin, N. Selective Autoantibody Production against CCL3 Is Associated with Human Type 1 Diabetes Mellitus and Serves As a Novel Biomarker for Its Diagnosis. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 8104–8109. [[CrossRef](#)]
41. Bäckryd, E.; Lind, A.-L.; Thulin, M.; Larsson, A.; Gerdle, B.; Gordh, T. High levels of cerebrospinal fluid chemokines point to the presence of neuroinflammation in peripheral neuropathic pain: A cross-sectional study of 2 cohorts of patients compared with healthy controls. *Pain* **2017**, *158*, 2487–2495. [[CrossRef](#)]
42. Rottman, J.B.; Ganley, K.P.; Williams, K.; Wu, L.; Mackay, C.R.; Ringler, D.J. Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am. J. Pathol.* **1997**, *151*, 1341–1351.
43. Zhang, N.; Inan, S.; Cowan, A.; Sun, R.; Wang, J.M.; Rogers, T.J.; Caterina, M.; Oppenheim, J.J. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4536–4541. [[CrossRef](#)]
44. Eltayeb, S.; Berg, A.L.; Lassmann, H.; Wallström, E.; Nilsson, M.; Olsson, T.; Ericsson-Dahlstrand, A.; Sunnemark, D. Temporal expression and cellular origin of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR5 in the central nervous system: Insight into mechanisms of MOG-induced EAE. *J. Neuroinflamm.* **2007**, *4*, 14. [[CrossRef](#)]
45. Knerlich-Lukoschus, F. Chemokines and their receptors: Important mediators to be aware of in neuroregenerative approaches for spinal cord injury. *Neural Regen. Res.* **2015**, *10*, 562–564. [[CrossRef](#)]
46. Kwiatkowski, K.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Jurga, A.; Slusarczyk, J.; Trojan, E.; Basta-Kaim, A.; Mika, J. Beneficial properties of maraviroc on neuropathic pain development and opioid effectiveness in rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2016**, *64*, 68–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Piotrowska, A.; Kwiatkowski, K.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Mika, J. Maraviroc reduces neuropathic pain through polarization of microglia and astroglia—Evidence from in vivo and in vitro studies. *Neuropharmacology* **2016**, *108*, 207–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bogacka, J.; Ciapała, K.; Pawlik, K.; Dobrogowski, J.; Przeklasa-Muszynska, A.; Mika, J. Blockade of CCR4 Diminishes Hypersensitivity and Enhances Opioid Analgesia—Evidence from a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *Neuroscience* **2020**, *441*, 77–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Cowell, R.M.; Xu, H.; Galasso, J.M.; Silverstein, F.S. Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1alpha expression in immature rat brain. *Stroke* **2002**, *33*, 795–801. [[CrossRef](#)]
50. Li, P.; Wang, L.; Zhou, Y.; Gan, Y.; Zhu, W.; Xia, Y.; Jiang, X.; Watkins, S.; Vazquez, A.; Thomson, A.W.; et al. C-C chemokine receptor type 5 (CCR5)-mediated docking of transferred Tregs protects against early blood-brain barrier disruption after stroke. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e006387. [[CrossRef](#)]
51. Joy, M.T.; Ben Assayag, E.; Shabashov-Stone, D.; Liraz-Zaltsman, S.; Mazzitelli, J.; Arenas, M.; Abduljawad, N.; Kliper, E.; Korczyn, A.D.; Thareja, N.S.; et al. CCR5 Is a Therapeutic Target for Recovery after Stroke and Traumatic Brain Injury. *Cell* **2019**, *176*, 1143–1157.e13. [[CrossRef](#)]



52. Llorián-Salvador, M.; González-Rodríguez, S.; Lastra, A.; Fernández-García, M.T.; Hidalgo, A.; Menéndez, L.; Baamonde, A. Involvement of CC Chemokine Receptor 1 and CCL3 in Acute and Chronic Inflammatory Pain in Mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *119*, 12543. [CrossRef]
53. Saika, F.; Kiguchi, N.; Kobayashi, Y.; Fukazawa, Y.; Kishioka, S. CC-chemokine ligand 4/macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  participates in the induction of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Eur. J. Pain* **2012**, *16*, 1271–1280. [CrossRef]
54. Kwiatkowski, K.; Popiolek-Barczyk, K.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Ciapała, K.; Makuch, W.; Mika, J. Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. *Cytokine* **2019**, *119*, 202–213. [CrossRef]
55. Pharmacodynamics: Molecular Mechanisms of Drug Action | Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e | AccessMedicine | McGraw Hill Medical. Available online: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2189&sectionid=170349571> (accessed on 7 February 2023).
56. Kwiatkowski, K.; Mika, J. The importance of chemokines in neuropathic pain development and opioid analgesic potency. *Pharmacol. Rep.* **2018**, *70*, 821–830. [CrossRef]
57. Rogers, T.J. Bidirectional Regulation of Opioid and Chemokine Function. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 94. [CrossRef] [PubMed]
58. Ye, D.; Bu, H.; Guo, G.; Shu, B.; Wang, W.; Guan, X.; Yang, H.; Tian, X.; Xiang, H.; Gao, F. Activation of CXCL10/CXCR3 Signaling Attenuates Morphine Analgesia: Involvement of Gi Protein. *J. Mol. Neurosci.* **2014**, *53*, 571–579. [CrossRef] [PubMed]
59. Johnston, I.N.; Milligan, E.D.; Wieseler-Frank, J.; Frank, M.G.; Zapata, V.; Campisi, J.; Langer, S.; Martin, D.; Green, P.; Fleshner, M.; et al. A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 7353–7365. [CrossRef]
60. Zhao, C.; Guo, R.X.; Hu, F.; Meng, J.L.; Mo, L.Q.; Chen, P.X.; Liao, X.X.; Cui, Y.; Feng, J.Q. Spinal MCP-1 contributes to the development of morphine antinociceptive tolerance in rats. *Am. J. Med. Sci.* **2012**, *344*, 473–479. [CrossRef] [PubMed]
61. Kwiatkowski, K.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Mika, J. The RS504393 Influences the Level of Nociceptive Factors and Enhances Opioid Analgesic Potency in Neuropathic Rats. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2017**, *12*, 402–419. [CrossRef] [PubMed]
62. Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Pawlik, K.; Kreiner, G.; Ciechanowska, A.; Makuch, W.; Zychowska, M.; Mika, J. Pharmacological blockade of CXCR3 by ( $\pm$ )-NBI-74330 reduces neuropathic pain and enhances opioid effectiveness—Evidence from in vivo and in vitro studies. *BBA Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 3418–3437. [CrossRef]
63. Inan, S.; Eisenstein, T.K.; Watson, M.N.; Doura, M.; Meissler, J.J.; Tallarida, C.S.; Chen, X.; Geller, E.B.; Rawls, S.M.; Cowan, A.; et al. Coadministration of chemokine receptor antagonists with morphine potentiates morphine's analgesic effect on incisional pain in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2018**, *367*, 433–441. [CrossRef]
64. Eisenstein, T.K.; Chen, X.; Inan, S.; Meissler, J.J.; Tallarida, C.S.; Geller, E.B.; Rawls, S.M.; Cowan, A.; Adler, M.W. Chemokine Receptor Antagonists in Combination with Morphine as a Novel Strategy for Opioid Dose Reduction in Pain Management. *Mil. Med.* **2020**, *185*, 130–135. [CrossRef]
65. Afonso, A.S.; Carnaval, T.; Cés, S.V. Combination therapy for neuropathic pain: A review of recent evidence. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3533. [CrossRef]
66. Inan, S.; Chen, X.; Eisenstein, E.M.; Meissler, J.J.; Geller, E.B.; Tallarida, C.; Watson, M.; Doura, M.; Barrett, J.E.; Cowan, A.; et al. Chemokine receptor antagonists enhance morphine's antinociceptive effect but not respiratory depression. *Life Sci.* **2021**, *285*, 120014. [CrossRef]
67. Pathan, H.; Williams, J. Basic opioid pharmacology: An update. *Br. J. Pain* **2012**, *6*, 11–16. [CrossRef] [PubMed]
68. Afsharimani, B.; Cabot, P.J.; Parat, M.O. Morphine use in cancer surgery. *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*, 46. [CrossRef] [PubMed]
69. Dworkin, R.H.; Backonja, M.; Rowbotham, M.C.; Allen, R.R.; Argoff, C.R.; Bennett, G.J.; Bushnell, M.C.; Farrar, J.T.; Galer, B.S.; Haythornthwaite, J.A.; et al. Advances in Neuropathic Pain: Diagnosis, Mechanisms, and Treatment Recommendations. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 1524. [CrossRef] [PubMed]
70. Fornasari, D. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. *Pain Ther.* **2017**, *6*, 25–33. [CrossRef] [PubMed]
71. Chen, X.; Geller, E.B.; Rogers, T.J.; Adler, M.W. Rapid heterologous desensitization of antinociceptive activity between mu or delta opioid receptors and chemokine receptors in rats. *Drug Alcohol Depend.* **2007**, *88*, 36–41. [CrossRef]
72. Szabo, I.; Chen, X.H.; Xin, L.; Adler, M.W.; Howard, O.M.Z.; Oppenheim, J.J.; Rogers, T.J. Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10276–10281. [CrossRef]
73. Chen, C.; Li, J.; Bot, G.; Szabo, I.; Rogers, T.J.; Liu-Chen, L.Y. Heterodimerization and cross-desensitization between the  $\mu$ -opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *483*, 175–186. [CrossRef]
74. Ferré, S.; Casadó, V.; Devi, L.A.; Filizola, M.; Jockers, R.; Lohse, M.J.; Milligan, G.; Pin, J.P.; Guitart, X. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: Functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 413–434. [CrossRef]
75. Gaborit, M.; Massotte, D. Therapeutic potential of opioid receptor heteromers in chronic pain and associated comorbidities. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *180*, 994–1013. [CrossRef]
76. Suzuki, S.; Chuang, L.F.; Yau, P.; Doi, R.H.; Chuang, R.Y. Interactions of opioid and chemokine receptors: Oligomerization of mu, kappa, and delta with CCR5 on immune cells. *Exp. Cell Res.* **2002**, *280*, 192–200. [CrossRef]
77. Szabo, I.; Wetzell, M.A.; Zhang, N.; Steele, A.D.; Kaminsky, D.E.; Chen, C.; Liu-Chen, L.-Y.; Bednar, F.; Henderson, E.E.; Howard, O.M.Z.; et al. Selective inactivation of CCR5 and decreased infectivity of R5 HIV-1 strains mediated by opioid-induced heterologous desensitization. *J. Leukoc. Biol.* **2003**, *74*, 1074–1082. [CrossRef] [PubMed]

78. Song, C.; Rahim, R.T.; Davey, P.C.; Bednar, F.; Bardi, G.; Zhang, L.; Zhang, N.; Oppenheim, J.J.; Rogers, T.J. Protein kinase C $\zeta$  mediates  $\mu$ -opioid receptor-induced cross-desensitization of chemokine receptor CCR5. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 20354–20365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Arnatt, C.K.; Falls, B.A.; Yuan, Y.; Raborg, T.J.; Masvekar, R.R.; El-Hage, N.; Selley, D.E.; Nicola, A.V.; Knapp, P.E.; Hauser, K.F.; et al. Exploration of bivalent ligands targeting putative mu opioid receptor and chemokine receptor CCR5 dimerization. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24*, 5969–5987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Zhang, N.; Rogers, T.J.; Caterina, M.; Oppenheim, J.J. Proinflammatory chemokines, such as C-C chemokine ligand 3, desensitize mu-opioid receptors on dorsal root ganglia neurons. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 594–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Di Prisco, S.; Summa, M.; Chellakudam, V.; Rossi, P.I.A.; Pittaluga, A. RANTES-mediated control of excitatory amino acid release in mouse spinal cord. *J. Neurochem.* **2012**, *121*, 428–437. [[CrossRef](#)]
82. Kramp, B.K.; Megens, R.T.A.; Sarabi, A.; Winkler, S.; Projahn, D.; Weber, C.; Koenen, R.R.; von Hundelshausen, P. Exchange of extracellular domains of CCR1 and CCR5 reveals confined functions in CCL5-mediated cell recruitment. *Thromb. Haemost.* **2013**, *110*, 795–806. [[CrossRef](#)]
83. Eliav, E.; Gracely, R.H. Measuring and assessing pain. In *Orofacial Pain and Headache*; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2008.
84. Gonçalves dos Santos, G.; Delay, L.; Yaksh, T.L.; Corr, M. Neuraxial Cytokines in Pain States. *Front. Immunol.* **2020**, *10*, 3061. [[CrossRef](#)]
85. Steinberg, B.E.; Silverman, H.A.; Robbiati, S.; Gunasekaran, M.K.; Tsaava, T.; Battinelli, E.; Stiegler, A.; Bouton, C.E.; Chavan, S.S.; Tracey, K.J.; et al. Cytokine-specific Neurograms in the Sensory Vagus Nerve. *Bioelectron. Med.* **2016**, *3*, 7–17. [[CrossRef](#)]
86. Ji, G.; Zhou, S.; Kochukov, M.Y.; Westlund, K.N.; Carlton, S.M. Plasticity in intact A $\delta$ - and C-fibers contributes to cold hypersensitivity in neuropathic rats. *Neuroscience* **2007**, *150*, 182–193. [[CrossRef](#)]
87. Kania, B.F.; Bracha, U.; Lonc, G.; Wojnar, T. Rola antagonistów glutaminianergiczných receptorów metabotropowych w eksperymentalnym bólu neuropatycznym u zwierząt. *Med. Weter* **2020**, *76*, 564–571. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Vadim Gaponenko,  
University of Illinois at Chicago,  
United States

## REVIEWED BY

Giovane Galdino,  
Federal University of Alfnas, Brazil  
Guy Henri Hans,  
Antwerp University Hospital, Belgium

## \*CORRESPONDENCE

Joanna Mika

✉ joamika@if-pan.krakow.pl  
✉ joasia272@onet.eu

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Cytokines and Soluble  
Mediators in Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 30 September 2022

ACCEPTED 05 December 2022

PUBLISHED 22 December 2022

## CITATION

Ciechanowska A, Rojewska E,  
Piotrowska A, Barut J, Pawlik K,  
Ciapata K, Kreiner G and Mika J (2022)  
New insights into the analgesic  
properties of the XCL1/XCR1 and  
XCL1/ITGA9 axes modulation under  
neuropathic pain conditions -  
evidence from animal studies.  
*Front. Immunol.* 13:1058204.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.1058204

## COPYRIGHT

© 2022 Ciechanowska, Rojewska,  
Piotrowska, Barut, Pawlik, Ciapata,  
Kreiner and Mika. This is an open-  
access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use,  
distribution or reproduction is  
permitted which does not comply with  
these terms.

# New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies

Agata Ciechanowska<sup>1</sup>, Ewelina Rojewska<sup>1</sup>, Anna Piotrowska<sup>1</sup>, Justyna Barut<sup>2</sup>, Katarzyna Pawlik<sup>1</sup>, Katarzyna Ciapata<sup>1</sup>, Grzegorz Kreiner<sup>2</sup> and Joanna Mika<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland, <sup>2</sup>Department of Brain Biochemistry, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland

Recent studies have indicated the involvement of chemokine-C-motif ligand 1 (XCL1) in nociceptive transmission; however, the participation of its two receptors, canonical chemokine-C-motif receptor 1 (XCR1) and integrin alpha-9 (ITGA9), recently recognized as a second receptor, has not been clarified to date. The aim was to explore by which of these receptors XCL1 reveals its pronociceptive properties and how the XCL1-XCR1 and XCL1-ITGA9 axes blockade/neutralization influence on pain-related behavior and opioid analgesia in the model of neuropathic pain. In our studies we used Albino Swiss mice which were exposed to the unilateral sciatic nerve chronic constriction injury (CCI) as a neuropathic pain model. Animals received single intrathecal (*i.t.*) injection of XCL1, XCL1 neutralizing antibodies, antagonist of XCR1 (vMIP-II) and neutralizing antibodies of ITGA9 (YA4), using lumbar puncture technique. Additionally we performed *i.t.* co-administration of abovementioned neutralizing antibodies and antagonists with single dose of morphine/buprenorphine. To assess pain-related behavior the von Frey and cold plate tests were used. To measure mRNA and protein level the RT-qPCR and Western Blot/Elisa/immunofluorescence techniques were performed, respectively. Statistical analysis was conducted using ANOVA with a Bonferroni correction. Presented studies have shown time-dependent upregulation of the mRNA and/or protein expression of XCL1 in the spinal cord after nerve injury as measured on day 1, 4, 7, 14, and 35. Our immunofluorescence study showed that XCL1 is released by astroglial cells located in the spinal cord, despite the neural localization of its receptors. Our results also provided the first evidence that the blockade/neutralization of both receptors, XCR1 and ITGA9, reversed hypersensitivity after intrathecal XCL1 administration in naive mice; however, neutralization of ITGA9 was more effective. In addition, the results proved that the XCL1 neutralizing antibody

and, similarly, the blockade of XCR1 and neutralization of ITGA9 diminished thermal and mechanical hypersensitivity in nerve injury-exposed mice after 7 days. Additionally, neutralization of XCL1 improves morphine analgesia. Moreover, blockade of XCR1 positively influences buprenorphine effectiveness, and neutralization of ITGA9 enhances not only buprenorphine but also morphine analgesia. Therefore, blockade of the XCL1-ITGA9 interaction may serve as an innovative strategy for the polypharmacotherapy of neuropathic pain in combination with opioids.

#### KEYWORDS

XCL1, XCR1, ITGA9, CCI, astroglia, chemokine, opioid, microglia

## 1 Introduction

Neuropathic pain affects 10% of the world's population (1) and is caused by many factors, including mechanical injury to the peripheral or central nervous system. The related complaints require better understanding, diagnosis and treatment because the current therapy is unsatisfactory. Unfortunately, patients with neuropathic pain are less sensitive to opioid drugs, which are the most powerful painkillers currently available in clinics (2). This makes the development of new strategies for pharmacotherapy toward painful neuropathies an urgent need. Such progress requires an extensive understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in the development of chronic pain originating from peripheral nerve injury (3). Glia have an undeniable role in the maintenance of homeostasis in the nervous system. Depending on the nature of the stimulus, glial cells can take on a number of activation states, which consequently causes altered gene expression and changes in morphology and function (4). Microglia represent resident immune cells of the central nervous system (CNS), revealing a classically activated phenotype associated with the release of proinflammatory molecules after chronic activation, contributing to neurodegeneration (5). Additionally, astroglia are a population of cells that play an integral role in maintaining CNS homeostasis. Their activation may result in the development of neurodegenerative disorders and is important in the modulation of neuropathic pain (6). This is why the pharmacological modulation of the abovementioned interactions is very effective in relieving painful symptoms in a neuropathic pain model (7). Minocycline (MC), which is one of the most potent substances causing inhibitory effects on the release of pronociceptive factors by glia (8), has the potential to treat the symptoms of neuropathic pain of different etiologies, e.g., in animal models such as streptozotocin (STZ)-induced diabetes (7) and chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve (9–12). MC was also shown to influence important pain-related intracellular pathways, especially what was well studied, it beneficially influences

p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) in an animal model of inflammatory and neuropathic pain (13, 14). Moreover, MC suppresses the increased gene expression of CXCL13, CXCL1, CCL2, CXCL11, and CCL7 after CCI (15). The release of chemokines by neuronal and nonneuronal cells such as microglia/astroglia is an important factor underlying neuroimmune crosstalk during neuropathic pain development and maintenance (4, 16, 17). Our previous studies showed that the neutralization of some chemokines [e.g., CCL1 (18), CCL2 (19), CCL3 (20), CCL7 (19), and CCL9 (20)] and blockade of several receptors [e.g., CCR1 (21), CCR2 (22), CCR3 (23), CCR4 (24), CCR5 (25), CXCR2 and CXCR3 (26)] in animal models of neuropathic pain diminish the development of symptoms; however, the role of XCL1 and its receptors is still unknown.

In our previous study, we demonstrated the spatiotemporal upregulation of XCL1 in several areas of the murine brain (cortex, thalamus, and hippocampus), which began shortly after traumatic brain injury model induction and persisted until up to 5 weeks in the cortex (27). This finding indicates that this chemokine may play a key role in neurodegenerative processes. In 2016, we showed for the first time the important role of XCL1 in diabetic neuropathy (7). To date, it was known that XCL1 is released by some immune cells (28) and it was shown that there is an elevated level of XCL1 protein in primary murine astroglial cells after LPS treatment (27). XCL1 acts through a G-protein coupled receptor, XCR1 (29). For a long time, XCR1 was the only known receptor for XCL1. Recently, Matsumoto et al. showed that XCL1 affects fibroblast migration through the heterodimeric ( $\alpha\beta$ ) transmembrane receptor ITGA9 (30), which opened new research horizons in this field. ITGA9 was proposed as a therapeutic target in autoimmune diseases (31). It remains unknown how XCR1 and ITGA9 are involved in nociceptive transmission; however, their role seems to be extremely important in neuropathy, as our previous research proved the strong pronociceptive properties of their ligand, XCL1, in naive animals (7).

We hypothesized that XCL1 may be significant in neuropathic pain development, acting both through XCR1 and ITGA9. For this purpose, we measured spinal mRNA/protein time-course changes in XCL1, XCR1 and ITGA9 in mice after CCI. Moreover, we performed behavioral tests to evaluate the influence of XCL1 neutralizing antibody (nAb) on mechanical and thermal hypersensitivity and morphine analgesia in CCI-exposed mice. Additionally, we determined the impact of consecutive MC treatment (twice daily, 7 days) on hypersensitivity and the levels of IBA1, GFAP, XCL1, XCR1 and ITGA9 after CCI. An additional aim of this study was to determine whether and how XCR1 and ITGA9 blockade/neutralization influence thermal and mechanical hypersensitivity evoked by intrathecally administered XCL1. We also examined the abovementioned receptor blockade/neutralization effects on hypersensitivity development and opioid analgesia 7 days after CCI. To explain the source of XCL1 and the localization of its receptors in the spinal cord, we performed thorough immunofluorescence studies to determine the cellular localization of XCL1/XCR1/ITGA9 in the spinal cord 7 days after CCI.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Animals

For our experiments, we used male Albino Swiss adult mice (Charles River, Göttingen, Germany; 9–11 weeks old, weighing 20–25 g). The housing conditions were as follows: 6–10 mice per cage; free access to food and water; temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; relative humidity  $55 \pm 10\%$ ; 12-h light/dark cycle. All performed procedures were accomplished with the recommendations of the International Association for the Study of Pain (IASP) and the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethical Committee of the Maj Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences (permission numbers: 75/2017, 305/2017, 235/2020, 236/2021, 297/2021, 89/2021, 98/2022). The number of animals was reduced to the essential minimum according to the 3R policy.

### 2.2 Chronic constriction injury

We performed chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve as a neuropathic pain model, in accordance with Bennett and Xie (1988) (32), modified by Mika et al. (2007) (33). The animals were anesthetized by inhalation of isoflurane (induction, 3%; maintenance, 3%). In brief, there was an incision made below the right hip bone, parallel to the sciatic nerve. The exposed sciatic nerve was loosely tied around the nerve with three ligatures (4/0 silk). The strength of the first knot

was dictated by the occurrence of a short contraction in the corresponding hind limb, and the subsequent contractions were performed similarly. All mice developed neuropathic pain-related behaviors (tactile and thermal hypersensitivity).

## 2.3 Pharmacological studies

### 2.3.1 Intrathecal and intraperitoneal drug administrations

The intrathecal (*i.t.*) injection was performed according to the method described by Hylden and Wilcox (34) and is a standard procedure in our laboratory (18, 26). A Hamilton syringe with a thin needle (0.3 x 13 mm) was used for administration. The substances used in the experiments were injected in a volume of 5  $\mu\text{l}$  between the L5 and L6 vertebrae (the lumbar region of the spinal cord) until symptoms of correct administration (the tail reflex) were observed. The intraperitoneal (*i.p.*) administered substances were injected with a needle size of 0.45 x 12 mm in terms of body weight and were supposed to be located in the peritoneal cavity.

### 2.3.2 Single intrathecal administration of an XCL1 neutralizing antibody in mice with chronic constriction injury-induced neuropathy

A single *i.t.* administrations of XCL1 nAb (Mouse XCL1/ Lymphotactin Antibody; AF486, R&D Systems; Minneapolis, United States) at doses of 1, 4, 8 and 16  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  were performed 7 days after CCI, when mechanical and thermal hypersensitivity had been fully developed. The effect of XCL1 nAb administration on the development of tactile hypersensitivity was measured using the von Frey test, while thermal hypersensitivity was measured using the cold plate test after 1, 4, 24, 48 and 96 hours. XCL1 nAb was dissolved in PBS (Merck; Darmstadt, Germany), and PBS was used as a vehicle (V).

### 2.3.3 Single intrathecal administration of an XCL1 neutralizing antibody with morphine or buprenorphine in mice with chronic constriction injury-induced neuropathy

The *i.t.* administration of XCL1 nAb (8  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ) followed by *i.t.* administration of morphine (M, TEVA; Krakow, Poland) or buprenorphine (B, Polfa S. A; Warsaw, Poland) (2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ) was performed 7 days after CCI, when we observed the highest level of XCL1 in the spinal cord and fully developed mechanical and thermal hypersensitivity. XCL1 nAb was administered once, at the dose set up based on previously obtained results. The doses of opioids used for the experiment were set up based on our previous studies (23). First, groups of tested animals received *i.t.* administration of vehicle (PBS) or XCL1 nAb. Next, 2 h after V or XCL1 nAb administration, there was a second *i.t.* injection of vehicle (W, water for injections), M or B. Von Frey and cold

plate tests were performed 0.5 hours after the second administration (of W, M or B) and 2.5 hours after the first administration (of PBS or XCL1 nAb).

### 2.3.4 Chronic intraperitoneal administration of minocycline in mice with chronic constriction injury-induced neuropathy

Minocycline hydrochloride (MC; Merck) was dissolved in water for injections (W); therefore, the control mice received W according to the same schedule. The MC was first preemptively administered 16 h and 1 h *i.p.* before CCI surgery and then twice daily for 7 days at a dose of 30 mg/kg. The behavioral tests were conducted 30 min after the last MC administration and 7 days after CCI.

### 2.3.5 Single intrathecal administration of YA4 or vMIP-II preceded by pronociceptive *i.t.* injection of XCL1 in naive mice

Recombinant mouse chemokine-C-motif ligand 1/lymphotactin protein (XCL1; R&D Systems), recombinant Viral MIP-II protein (vMIP-II, XCR1 antagonist; R&D Systems) and anti-integrin  $\alpha 9$  monoclonal antibody (YA4; Fujifilm, Tokyo, Japan) were dissolved in PBS. First, groups of tested animals received *i.t.* administration of vehicle (V; PBS) or XCL1 (X) at a dose of 100 ng/5  $\mu$ l, which is known to be pronociceptive (7). Next, 2 h after V or XCL1 administration, there was a second *i.t.* administration of V, vMIP-II or YA4 (0.05, 0.5, 1  $\mu$ g/5  $\mu$ l). Von Frey and cold plate tests were performed 1, 4, 24, 96 hours after the second administration (V, vMIP-II or YA4), which represents 3, 6, 26 and 98 hours after the first administration (V or XCL1).

### 2.3.6 Single intrathecal administration of YA4 and vMIP-II in mice with chronic constriction injury-induced neuropathy

vMIP-II and YA4 were dissolved in PBS and administered to mice 7 days after CCI, while the control group received PBS. A single dose of vMIP-II (1  $\mu$ g/5  $\mu$ l) or YA4 (1  $\mu$ g/5  $\mu$ l), established during the aforementioned experiment, was administered, and behavioral tests were performed after 1, 4, 24, and 96 hours.

### 2.3.7 Single intrathecal administration of YA4 or vMIP-II with morphine or buprenorphine in mice with chronic constriction injury-induced neuropathy

The experiment aimed to establish the influence of vMIP-II and YA4 on morphine and buprenorphine analgesia 7 days after CCI. First, groups of tested animals received *i.t.* administration of vehicle (V; PBS), vMIP-II or YA4 (1  $\mu$ g/5  $\mu$ l, respectively). Next, 3 h after V, vMIP-II or YA4 administration, there was a second *i.t.* administration of vehicle (W; water for injections), M or B (2.5  $\mu$ g/5  $\mu$ l). Von Frey and cold plate tests were performed

0.5 hours after the second administration (of W, M or B) and 3.5 hours after the first administration (of V, vMIP-II or YA4).

## 2.4 Behavioral tests

### 2.4.1 von frey test

Tactile hypersensitivity was measured using calibrated nylon monofilaments (ranging from 0.6 to 6 g; Stoelting, Wood Dale, USA) to observe reactions to mechanical stimuli as previously described (33). The mice were placed in plastic cages with a wire mesh floor before the experiment. After 5 min of adaptation, von Frey filaments were used in order of increasing pressure [g], and they were applied to the midplantar surface of the ipsilateral (right) hind paw (or both hind paws in case of naive mice) until it was lifted. Control mice were tested in the same way.

### 2.4.2 Cold plate test

Thermal hypersensitivity was measured using a cold plate/hot plate analgesia meter (Ugo Basile; Gemonio, Italy). The temperature of the plate surface was kept at 2°C, and the maximal time (cutoff) possible for the mouse to be kept on the plate surface was 30 seconds. The animals were placed on a cold plate until the (right) hind paw (or both hind paws in case of naive mice) was lifted as previously described (33). The latency was recorded, and the animals were immediately removed from the plate. In every animal exposed to CCI, the injured foot was the first one to react. Control mice were tested in the same way.

## 2.5 Biochemical tests

### 2.5.1 Analysis of gene expression by RT-qPCR

The lumbar (L4–L6) region of the spinal cord was removed from CCI- and naive mice (sacrificed at 1, 4, 7, 14, 35 days). After decapitation, the tissue was dissected, placed into 1.5 ml plastic Eppendorf tubes with RNAlater (Invitrogen; Waltham, USA), frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For the synthesis of cDNA, 1000 ng of total RNA was reverse transcribed in a total reaction volume of 20  $\mu$ l with oligo(dT) primer (Fermentas; Warsaw, Poland) using an Omniscript RT Kit (Qiagen; Hilden, Germany). The cDNA was diluted 1:10 with H<sub>2</sub>O. For each reaction, 50 ng of cDNA was synthesized from the total RNA template of each individual animal and used for quantitative real-time PCR (RT-qPCR). RT-qPCR was run on a Real-Time PCR iCycler (Bio-Rad; Hercules, USA) using Assay-On-Demand TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA). The amplification efficiency for each assay was determined by running a standard dilution curve. The following TaqMan primer was used: Mm00434772\_m1 (*Xcl1*). The expression of the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*, Mm00446968\_m1) transcript was quantified to control for variation in cDNA amounts. The cycle threshold values were

automatically calculated using iCycler IQ 3.0 software with the default parameters. The abundance of RNA was calculated as  $2^{-(\text{threshold cycle})}$ .

### 2.5.2 Western blot analysis

The lumbar (L4–L6) regions of the spinal cord were removed from CCI- and naive mice (sacrificed at 1, 7, 35 days) and used for the study. Selected time points represent different phases in injury development – very early, developed and fully established, basing on mRNA analysis. The tissues were placed into 2 ml plastic Eppendorf tubes with RIPA buffer with a protease inhibitor cocktail (inhibitors with broad specificity for various proteases; Merck) and homogenized. Then, the samples were centrifuged (14,000 rpm) for 30 min at 4°C (in the case of time course studies). In the case of the tissue collected from animals chronically treated with minocycline, the lumbar (L4–L6) regions of the spinal cord were placed in tubes with RIPA buffer with protease inhibitor cocktail, homogenized and fractionated in accordance with available protocols, slightly modified by us (35–37). Firstly, the nuclear fraction was separated by centrifugation (2750 rpm) for 5 min at 4°C. The obtained supernatant was then re-centrifuged (8900 rpm) for 5 min at 4°C, after that the pellet contained mitochondria. The supernatant was then centrifuged once again in an ultracentrifuge (28,700 rpm) for 60 min at 4°C resulting in the separation of the membrane (pellet) and cytosolic (supernatant) fractions, which were used for further analyses. The study conducted on two fractions of protein homogenates aimed to differentiate the presence of receptors inside the membrane, which may be changed by the possible internalization - a rapid decrease in the number of cell-surface binding sites in activated cells. The bicinchoninic acid (BCA) method was used to measure the total protein concentration. The samples of protein (10 µg) were then heated for 8 min at 98°C with the addition of loading buffer (4 × Laemmli Buffer; Bio-Rad). Then, the samples were loaded in 4–15% Criterion TGX precast polyacrylamide gels (Bio-Rad) and transferred to Immune-Blot PVDF membranes (Bio-Rad) with the semidry transfer system (30 min, 25 V). Then, the membranes were blocked (5% bovine serum albumin; Merck) in TBST (Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20) for 1 h, washed with TBST (4 × 5 min), and incubated overnight with the following commercially available primary antibodies: rabbit anti-XCR1 (1:5000, Lifespan Biosciences; Seattle, USA), rabbit anti-ITGA9 (1:3000, Abcam; Cambridge, Great Britain), mouse anti-β-actin (1:1000; Merck), rabbit anti-IBA1 (1:500, Novus Biologicals; Centennial, USA), and rabbit anti-GFAP (1:10000, Novus Biologicals) at 4°C. Then, the membranes were incubated in anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Vector Laboratories; Burlingame, USA) conjugated with horseradish peroxidase at dilutions of 1:5000 for 1 h at room temperature. The primary and secondary antibodies were dissolved in a SignalBoost Immunoreaction Enhancer Kit (Merck). Then, the membranes were washed in TBST (again 4 × 5 min). The detection of immune complexes was attained by the Clarity Western ECL

Substrate (Bio-Rad) and visualized with the Fujifilm LAS-4000 Fluor Imager system. The immunoreactive bands obtained in Western blot analysis were quantified using Fujifilm Multi Gauge software.

### 2.5.3 Enzyme-linked immunosorbent assay analysis

The lumbar (L4–L6) regions of the spinal cord were removed from naive and CCI-exposed mice (sacrificed at 1, 7, 35 days) and used for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) as stated in the manufacturer's protocol. The tissue homogenates were fixed in RIPA buffer with a protease inhibitor cocktail (Merck) and incubated at -20°C. The level of XCL1 was measured in the tissue homogenates using the Mouse XCL1/Lymphotoxin ELISA Kit (Sandwich ELISA, LS-F53223; LifeSpan Biosciences) with the following detection ranges: 6.25–400 pg/ml. The manufacturer provided the positive controls for each assay.

### 2.5.4 Immunofluorescence analysis by confocal microscopy

Seven days after CCI, the mice were sacrificed, and their spinal cords were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4°C. After dehydration, the tissues were paraffin embedded and sectioned (7 µM) on a microtome (Leica, RM45). Adjacent coronal sections from corresponding regions of the lumbar (L4 to L6) spinal cords of naive and CCI mice were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit anti-XCL1 (1:50, Novus Biologicals), rabbit anti-ITGA9 (1:50, Abcam), rabbit anti-XCR1 (1:50, Lifespan Biosciences), mouse anti-NeuN (1:250, Merck), rat anti-IBA1 (1:1000, Abcam), and chicken anti-GFAP (1:10000, Merck). Antigen-bound primary antibodies were visualized with appropriate Alexa Fluor 488/594-conjugated donkey secondary antibodies (1:100, Invitrogen). Hoechst 33342 (Invitrogen) was used to stain cell nuclei. Stained sections were examined and acquired under a high-class confocal microscope (Leica TCS SP8 WLL) equipped with HyD, PMT and TLD detectors. The ipsilateral part of the lumbar spinal cord was visualized on representative images.

### 2.5.5 Statistical analysis

The behavioral studies (*in vivo*) are presented as the means ± SEMs. The biochemical studies (*ex vivo*) are presented as fold changes relative to the controls (naive) ± SEM. The RT-qPCR results are presented as the normalized averages derived from the threshold cycle. The results of i.t. administration of YA4/vMIP-II in CCI-induced neuropathy (mean ± SEM) were statistically evaluated using a t test with Welsh correction. The other results (mean ± SEM) were evaluated using one-way ANOVA (F value) followed by Bonferroni's *post hoc* test for comparison of intergroup differences (p value). Additionally, the results were evaluated using two-way ANOVA (F value) to determine the time × drug interaction. All of the statistical analyses mentioned above were

performed with GraphPad Prism ver. 8.1.1 (330) (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

### 3 Results

#### 3.1 Spatiotemporal changes in the mRNA and/or protein levels of XCL1, its receptors and pain-related behavior after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice

Chronic constriction injury led to the development of mechanical [F = 70.90; p < 0.0001] (Figures 1A, B)

hypersensitivity. These pain-related changes were observed until the last time point tested, as shown using the von Frey test. The mRNA level of *XCL1* was significantly elevated 4 days after CCI [F = 9.492; p < 0.0001], and this elevated level was maintained until the 35th day after nerve injury [F = 9.492; p = 0.0033] (Figure 1C). In the protein study, the elevated level of XCL1 protein was maintained from 1 day after CCI [F = 70.26; p = 0.0011] up to day 35 [F = 70.26; p < 0.0001] (Figure 1D). The protein level of XCR1 increased significantly 1 day after surgery [F = 9.88; p = 0.0031] and remained elevated until day 7 in the spinal cord [F = 9.88; p = 0.0102] (Figure 1E). The protein level of ITGA9 was significantly reduced compared to that in naive animals on day 7 after damage to the sciatic nerve [F = 2.37; p = 0.0153] (Figure 1F).

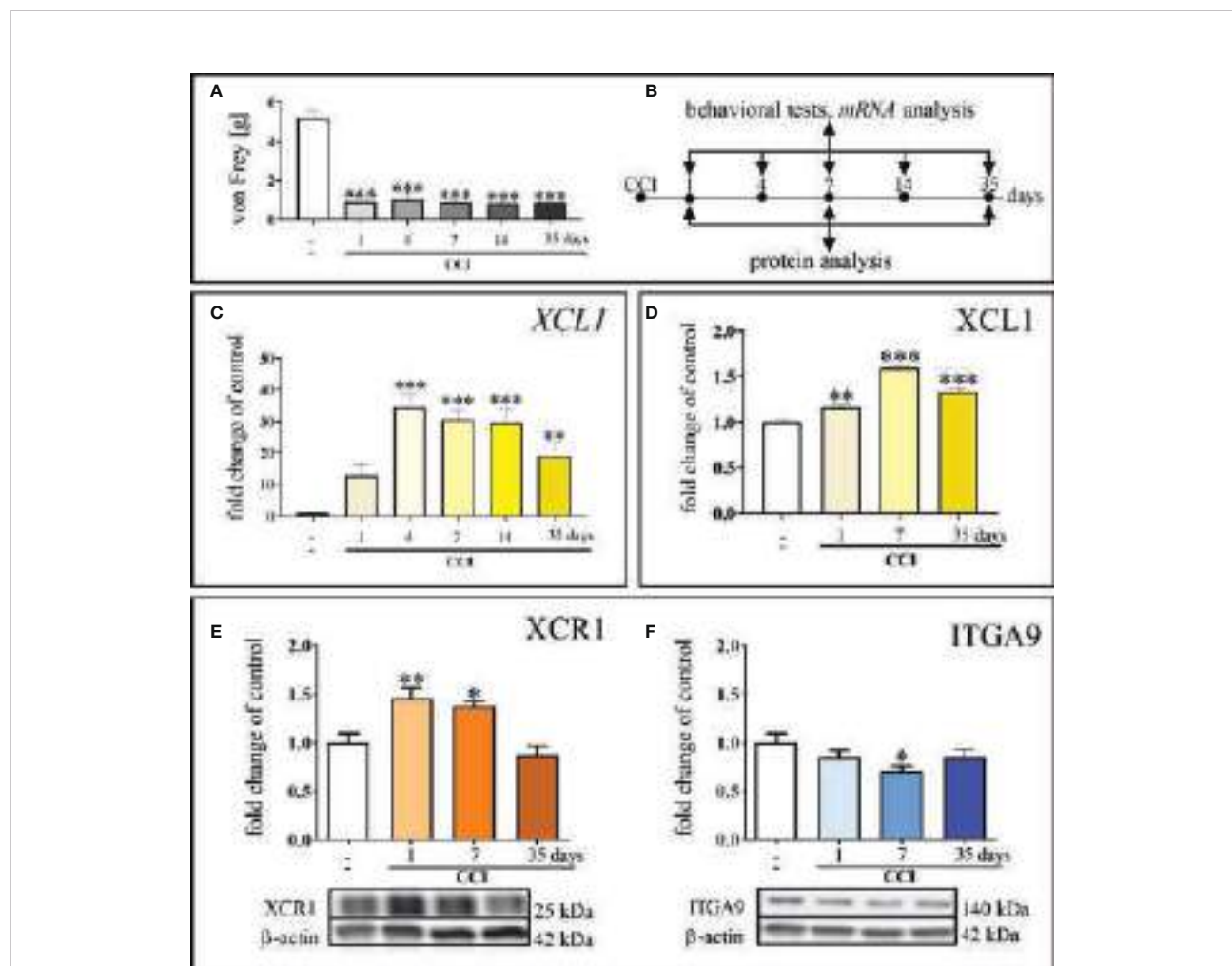


FIGURE 1

Development of mechanical hypersensitivity after chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in mice (1, 4, 7, 14, 35 days) (A). Scheme of tissue collection at the indicated time points for behavioral tests and mRNA/protein analyses (B). Time-dependent changes in the expression of *XCL1* mRNA by RT-qPCR (C) and protein by ELISA (D); XCR1 protein by Western blot (E) and ITGA9 protein by Western blot (F) in the spinal cord of naive and chronic constriction injury-exposed mice (1, 4, 7, 14 and/or 35 days). The data are presented as the mean fold changes relative to the control  $\pm$  SEM (n = 5–10). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for comparisons of selected pairs. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 indicate significant differences between the naive vs. CCI-exposed groups at each of the investigated time points: 1, 4, 7, 14, 35 days. "-" – naive.



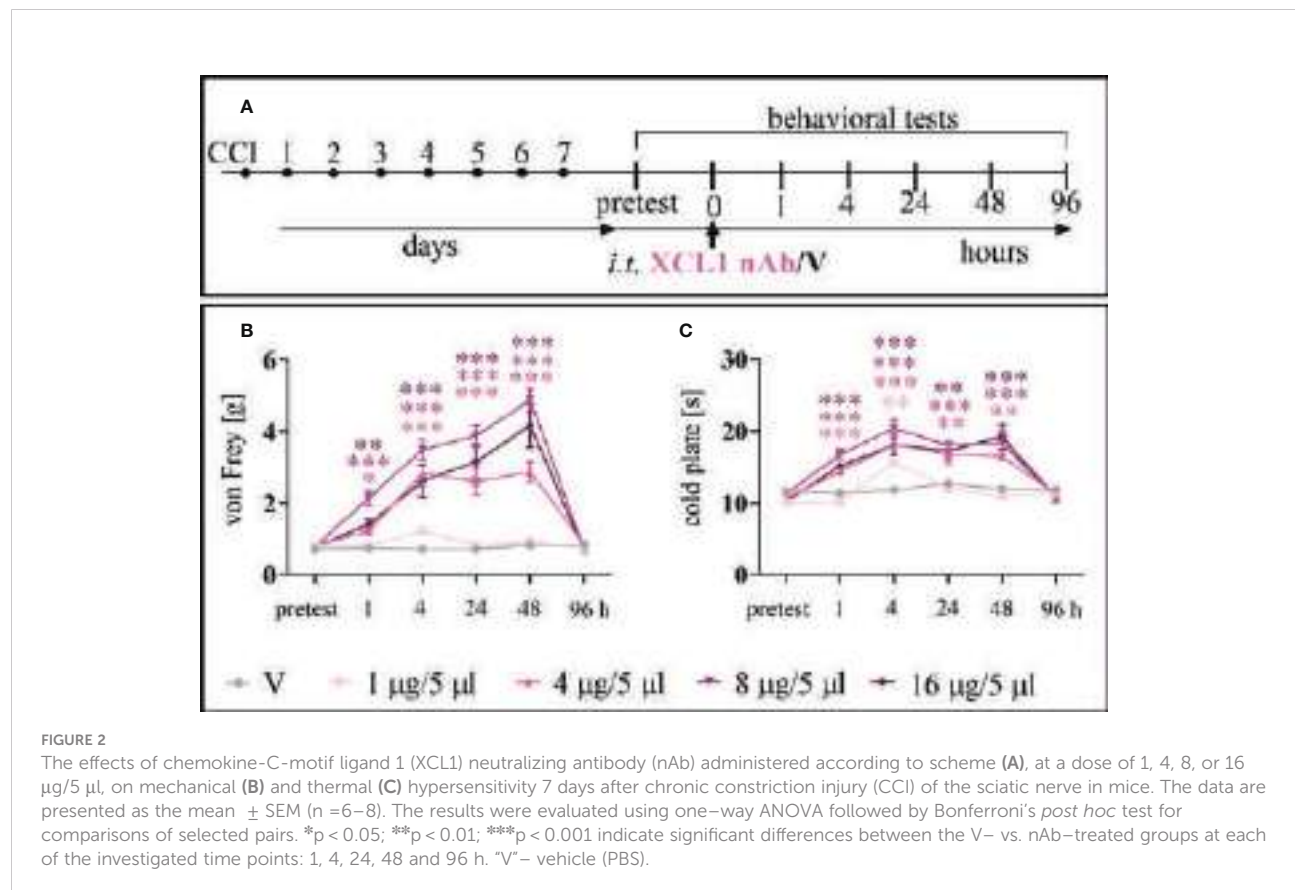
### 3.2 Effects of a single intrathecal XCL1 nAb administration on pain-related behavior measured 7 days after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice

The analgesic effect of XCL1 nAb administration (Figure 2A) in CCI-exposed mice was observed for doses of 1, 4, 8, and 16  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  in the von Frey (Figure 2B) and/or cold plate (Figure 2C) tests. The dose of 1  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  was effective 4 hours after administration [cold plate:  $F = 15.04$ ;  $p = 0.0025$ ]. The doses of 4, 8, 16  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  showed their analgesic properties 1 hour after administration (4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  [von Frey:  $F = 20.93$ ;  $p = 0.0117$ ; cold plate:  $F = 26.51$ ;  $p = 0.0003$ ], 8  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  [von Frey:  $F = 20.93$ ;  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $F = 26.51$   $p < 0.0001$ ], 16  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  [von Frey:  $F = 20.93$ ;  $p = 0.0015$ ; cold plate:  $F = 26.51$   $p < 0.0001$ ]), and their effects were elevated until 48 hours (4  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  [von Frey:  $F = 40.02$ ;  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $F = 14.47$ ;  $p = 0.0019$ ], 8  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  [von Frey:  $F = 40.02$   $p < 0.0001$ ; cold plate:  $F = 14.47$ ;  $p < 0.0001$ ], 16  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  [von Frey:  $F = 40.02$   $p < 0.0001$ ; cold plate:  $F = 14.47$ ;  $p < 0.0001$ ]). Two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the treatment and the analyzed time points [von Frey:  $F = 14.39$ ; cold plate:  $F = 6.56$ ].

### 3.3 Effects of a single intrathecal XCL1 nAb administration on morphine and buprenorphine analgesia 7 days after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice

For the co-administration with opioids (Figure 3A) we have chosen the dose of 8  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ , basing on its effectiveness as shown in time-/dose- dependency study (Figure 2). Selected dose of XCL1 nAb (8  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ) and morphine (2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ) similarly significantly reduced mechanical [ $F = 20.02$ ;  $p = 0.0004$ ] (Figure 3B) and thermal [ $F = 66.85$ ;  $p < 0.0001$ ] hypersensitivity (Figure 3C). Buprenorphine at a dose of 2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  also diminished both mechanical [ $F = 13.07$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figure 3D) and thermal [ $F = 31.43$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figure 3E) hypersensitivity in CCI-exposed mice.

The influence of XCL1 nAb on morphine analgesia was significant and reduced both mechanical [ $F = 20.02$ ;  $p = 0.0020$ ] (Figure 3B) and thermal [ $F = 66.85$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figure 3C) hypersensitivity compared to morphine administered alone. Otherwise, there was no observable impact of the XCL1 nAb on buprenorphine analgesia (Figures 3D, E).



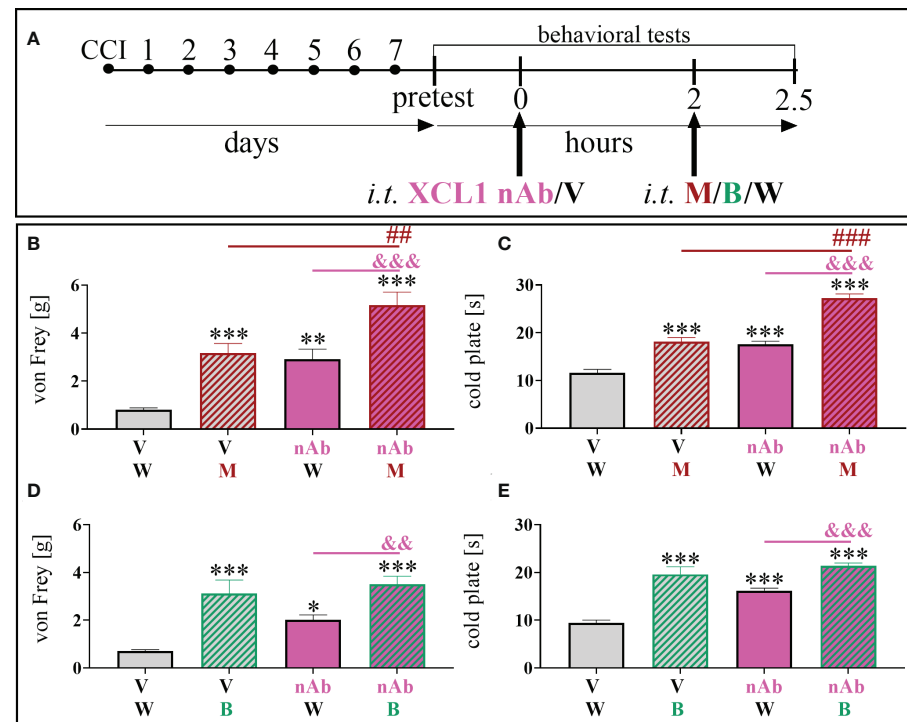


FIGURE 3

The influence of a chemokine-C-motif ligand 1 (XCL1) neutralizing antibody (nAb) (B–E) at a dose of 8 µg/5 µl on morphine (M) 2.5 µg/5 µl (B, C) and buprenorphine (B) 2.5 µg/5 µl (D, E) effectiveness, administered according to scheme (A), 7 days after chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in mice. The data are presented as the mean ± SEM (n = 6). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for comparisons of selected pairs. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant differences between the V + W- and M-/B-/nAb-treated groups; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$  indicate significant differences between the M- and M+nAb-treated groups; && $p < 0.01$ ; &&& $p < 0.001$  indicate significant differences between the nAb- and M+nAb-/B+nAb-treated groups. "V" – vehicle (PBS); "W" – vehicle (water for injections).

### 3.4 Effects of chronic intraperitoneal minocycline administration on mechanical hypersensitivity and changes in the protein levels of XCL1-, XCR-1-, ITGA9-, IBA1-, and GFAP-positive cells 7 days after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice

Chronic minocycline administration (Figure 4A) significantly reduced mechanical hypersensitivity, which had been fully developed in W-treated animals 7 days after CCI [F = 87.26;  $p < 0.0001$ ] (Figure 4B). The study revealed that after chronic MC treatment, there was a significant reduction in the protein levels of XCL1 [F = 6.43;  $p = 0.0326$ ] (Figure 4C) and IBA1 [F = 31.09;  $p = 0.0082$ ] (Figure 4D) compared to CCI-exposed mice. There were no changes in the level of GFAP (Figure 4E).

The level of the XCR1 protein in the cytoplasmic fraction was diminished [F = 3.37;  $p = 0.0252$ ] in the W-treated group, and MC did not influence this effect (Figure 4F). The protein level of XCR1 in the membrane fraction was significantly elevated (Figure 4G) in the W-treated group [F = 3.63;  $p = 0.0159$ ]. It was different in the group receiving MC, where the level of the XCR1 protein in the membrane fraction was not changed compared to naive animals (Figure 4G). Regarding the ITGA9 protein, the expression levels were not changed between the W- and MC-treated groups in the cytoplasmic fraction (Figure 4H). The protein level of ITGA9 in the membrane fraction in the CCI-exposed group was significantly diminished [F = 3.96;  $p = 0.0115$ ] (Figure 4I). This was not the case in the group receiving MC, in which the level of the ITGA9 protein in the membrane fraction was not changed compared to that in naive animals (Figure 4I). Additionally, the minocycline treatment diminished the levels of p38, ERK, JNK and AKT (Supplementary File – Figure 1).

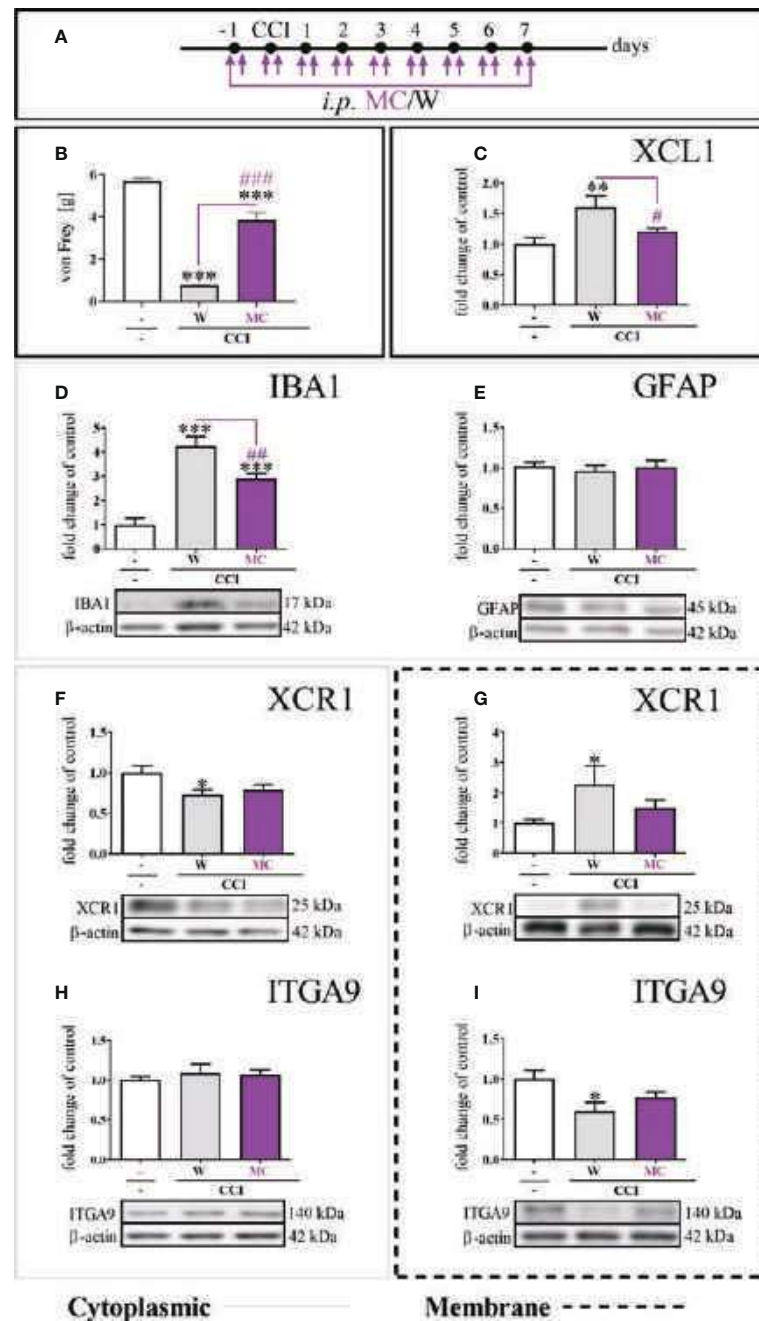


FIGURE 4

The influence of repeated (preemptive and then twice daily for 7 days) minocycline (MC) administration (A), at a dose of 30 mg/kg, on mechanical hypersensitivity (B); XCL1 protein level in the cytoplasmic fraction by ELISA (C), IBA1 (D), GFAP (E), XCR1 (F), and ITGA9 (H) protein levels in the cytoplasmic fraction by Western blot; XCR1 (G) and ITGA9 (I) protein levels in the membrane fraction by Western blot, seven days after chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in mice. The data are presented as the mean fold changes relative to the control  $\pm$  SEM (n = 5–14). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for comparisons of selected pairs; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant differences between the naive vs. W-/MC-treated groups, # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$  indicate significant differences between the W- vs. MC-treated groups. "-" – naive; "W" – vehicle (water for injections).

### 3.5 Effects of a single intrathecal ITGA9 nAb (YA4) and XCR1 antagonist (vMIP-II) administration preceded by XCL1 injection in naive mice on mechanical and thermal hypersensitivity

ITGA9 neutralization by YA4 diminished mechanical (Figure 5B) and thermal (Figure 5C) hypersensitivity developed after pronociceptive XCL1 administration (XCL1 was injected 2 hours before YA4) in naive animals (Figure 5A). The effect was observed for the XCL1+YA4-treated groups compared to the XCL1+V-treated group in both behavioral tests since 1 hour (3 hours after XCL1 administration) for doses of 0.05 µg/5 µl [von Frey:  $F = 9.94$ ;  $p = 0.0018$ ; cold plate:  $F = 5.90$ ;  $p = 0.0298$ ], 0.5 µg/5 µl [von Frey:  $F = 9.94$ ;  $p = 0.0402$ ; cold plate:  $F = 5.90$ ;  $p = 0.0011$ ], and 1 µg/5 µl [von Frey  $F = 9.94$ ;  $p = 0.0002$ ]. It was still effective until the 4th hour (6th hour after XCL1 administration) for doses of 0.05 µg/5 µl [von Frey:  $F = 11.95$ ;  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $F = 6.85$ ;  $p < 0.0001$ ], 0.5 µg/5 µl [von Frey:  $F = 11.95$ ;  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $F = 6.85$ ;  $p = 0.0041$ ], and 1 µg/5 µl [von Frey:  $F = 11.95$ ;  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $F = 6.85$ ;  $p = 0.0135$ ]. Twenty-four hours after administration of YA4 (26 hours after XCL1 administration), there was still an observable antinociceptive effect in the cold plate test [dose of 0.05 µg/5 µl:  $F = 3.82$ ;  $p = 0.0164$ ] (Figures 5B, C).

The analgesic effect of XCR1 blockade by vMIP-II injection was more dose-dependent and diminished mechanical (Figure 5D) and thermal (Figure 5E) hypersensitivity - the pronociceptive effect of XCL1 administration (XCL1 was administered 2 hours before vMIP-II) in naive animals (Figure 5A). The effect was observed for the XCL1+ vMIP-II-treated groups compared to the XCL1+V-treated group in both behavioral tests after 1 hour (3 hours after XCL1 administration) for doses of 0.05 µg/5 µl [cold plate:  $F = 12.10$ ;  $p = 0.0046$ ], 0.5 µg/5 µl [von Frey:  $F = 13.72$ ;  $p = 0.0139$ ; cold plate:  $F = 12.10$ ;  $p < 0.0001$ ], and 1 µg/5 µl [von Frey:  $F = 13.72$ ;  $p < 0.0001$ ; cold plate:  $F = 12.10$ ;  $p < 0.0001$ ]. It was still effective until the 4th hour (6th hour after XCL1 administration) for doses of 0.05 µg/5 µl [cold plate:  $F = 6.72$ ;  $p = 0.0494$ ], 0.5 µg/5 µl [von Frey:  $F = 5.59$ ;  $p = 0.0293$ ; cold plate:  $F = 6.72$ ;  $p = 0.0119$ ], and 1 µg/5 µl [von Frey:  $F = 5.59$ ;  $p = 0.0051$ ; cold plate:  $F = 6.72$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figures 5D, E).

### 3.6 Effects of a single intrathecal ITGA9 nAb (YA4) and XCR1 antagonist (vMIP-II) administration on mechanical and thermal hypersensitivity 7 days after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice

The neutralization of ITGA9 by YA4 (Figure 6A) at a dose of 1 µg/5 µl started to influence mechanical hypersensitivity and simultaneously was the most effective 4 hours after administration [ $t = 5.58$ ;  $p = 0.0006$ ] and lasted until 24 hours [ $t = 3.22$ ;  $p = 0.0097$ ] (Figure 6B). Similarly, in the case of thermal hypersensitivity,

neutralization started to be effective 1 hour after administration [ $t = 2.72$ ;  $p = 0.0190$ ], was the most powerful 4 hours after administration [ $t = 6.17$ ;  $p < 0.0001$ ], and similarly ceased but was still effective at 24 hours [ $t = 2.35$ ;  $p = 0.0366$ ] (Figure 6C).

The blockade of XCR1 by vMIP-II injection (Figure 6A) at a dose of 1 µg/5 µl also effectively diminished mechanical and thermal hypersensitivity in the CCI model, but only 4 hours after administration, as revealed both by the von Frey test [ $t = 3.06$ ;  $p = 0.0207$ ] (Figure 6D) and the cold plate test [ $t = 3.56$ ;  $p = 0.0042$ ] (Figure 6E).

### 3.7 Effects of a single intrathecal ITGA9 nAb (YA4) and XCR1 antagonist (vMIP-II) administration on morphine and buprenorphine analgesia 7 days after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice

The influence of YA4 on morphine analgesia (Figure 7A) was significant and more effectively reduced both mechanical [ $F = 13.27$ ;  $p = 0.0239$ ] (Figure 7B) and thermal [ $F = 15.54$ ;  $p = 0.0025$ ] (Figure 7C) hypersensitivity compared to the administration of substances alone. The influence of YA4 on buprenorphine effectiveness (Figure 7A) was also observable. Strong reduction of both mechanical [ $F = 50.06$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figure 7D) and thermal [ $F = 23.16$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figure 7E) hypersensitivity was demonstrated compared to separately injected compounds.

After administration of vMIP-II with buprenorphine (Figure 7A), attenuation of thermal [ $F = 24.00$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figure 7I) and mechanical [ $F = 42.60$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figure 7H) hypersensitivity was observed and was the strongest compared to single substance action. Otherwise, there was no observable impact of vMIP-II on morphine analgesia in either behavioral test (Figures 7F, G).

### 3.8 The cellular localization of XCL1, XCR1 and ITGA9 in the spinal cord 7 days after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice revealed by immunofluorescence staining

Results of the immunofluorescence analysis from CCI-exposed mice are shown in Figures: 8A-Z, 9A-Z, 10A-Z and from naive animals in the Supplementary File: Figures 2A-Z, 3A-Z, 4A-Z. For robustness of the visualization, two independent corresponding regions of the spinal cord of each section were compared, as shown in Figures 8a-c, Figures 9a-c and Figures 10a-c.

Fluorescence immunohistochemical staining revealed clear colocalization of XCL1 with GFAP-positive cells (Figures 8D, H). No colocalization was observed between XCL1 and IBA1 (microglia marker) or NeuN (neuronal marker) (Figures 8L, P, U, Z; respectively).

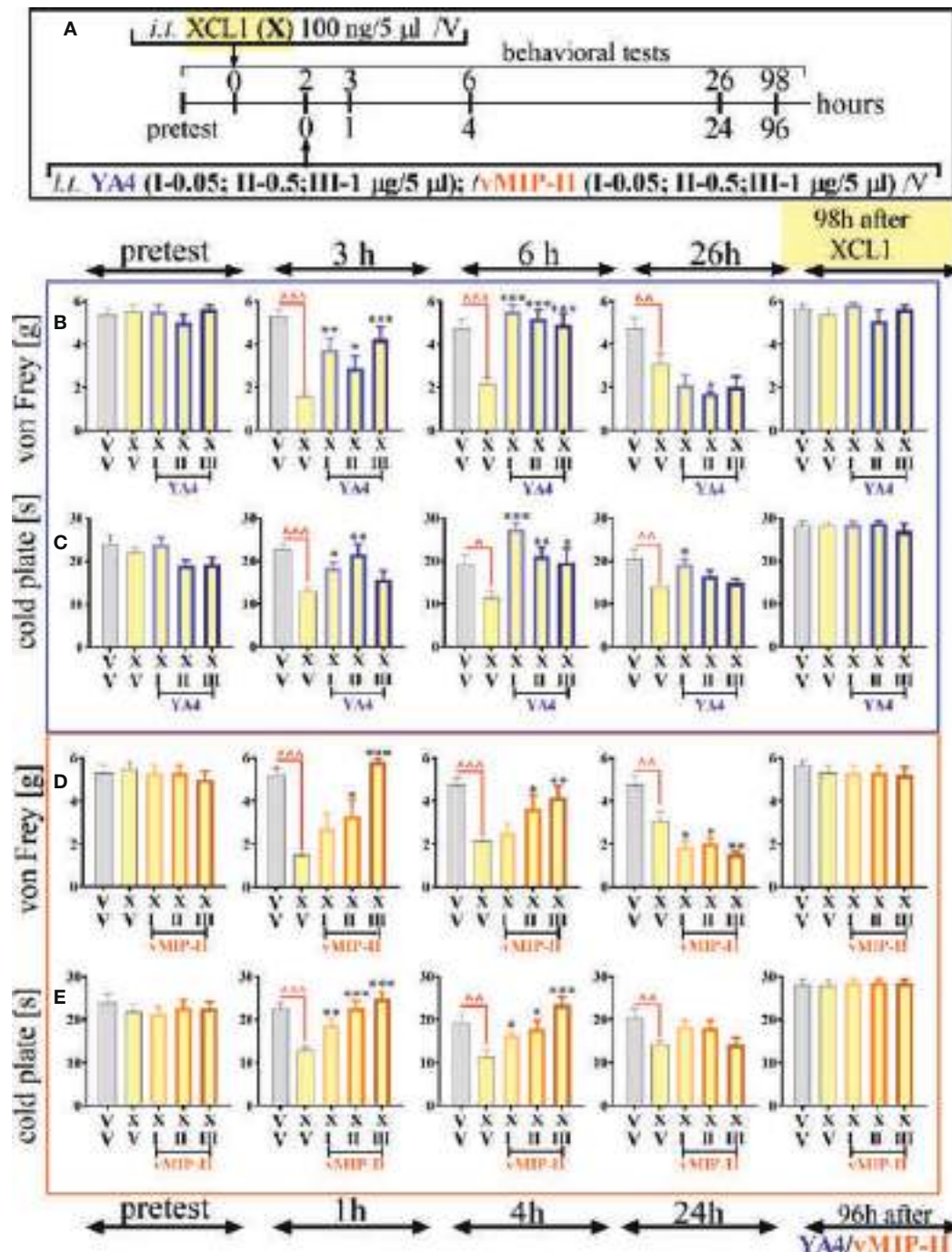
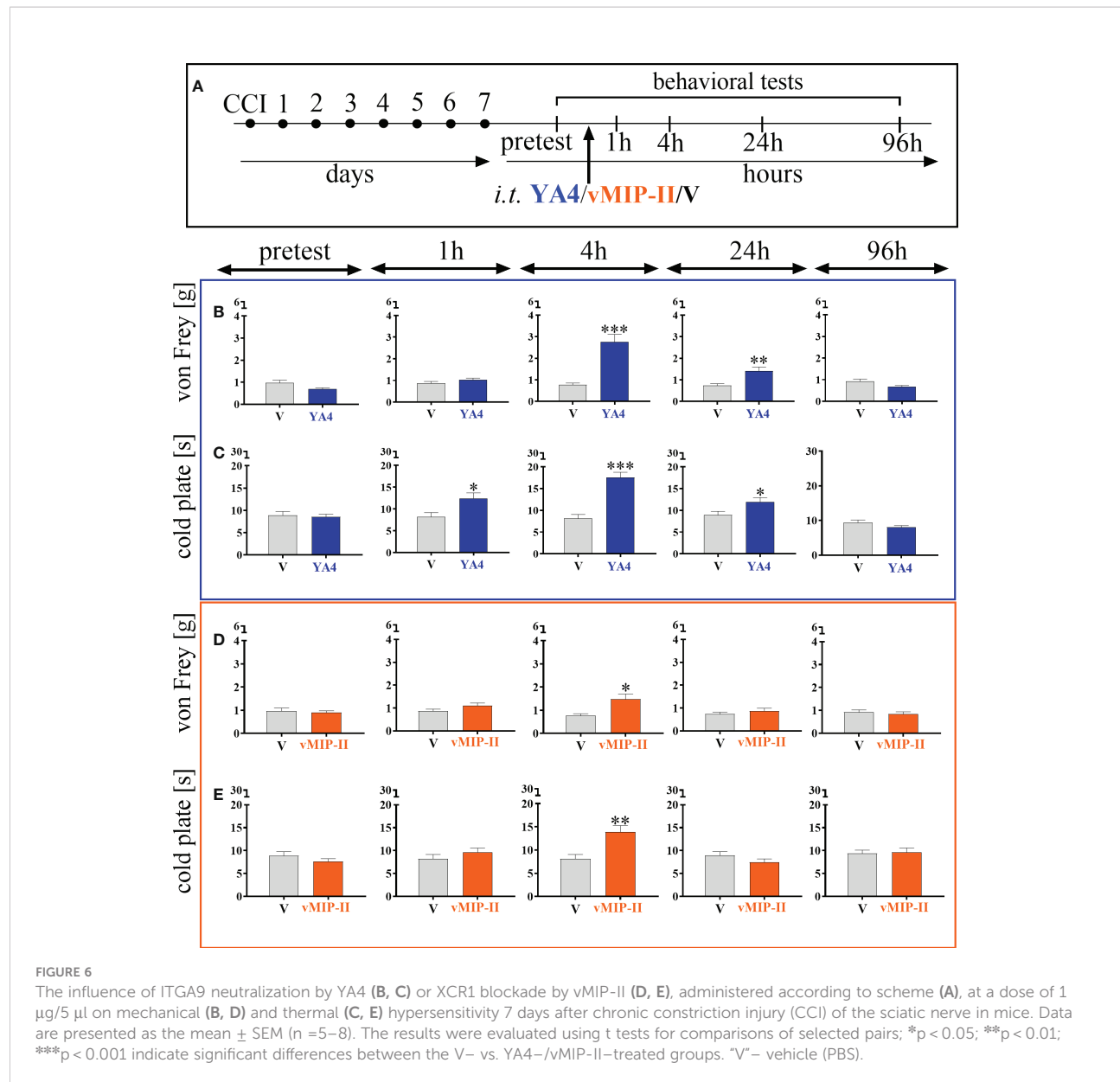


FIGURE 5

The influence of ITGA9 neutralization by YA4 (B, C) or XCR1 blockade by vMIP-II (D, E), according to scheme (A), at a dose of 0.05 (I), 0.5 (II), 1 (III) µg/5 µl on mechanical (B, D) and thermal (C, E) hypersensitivity in naive mice after pronociceptive XCL1 100 ng/5 µl (X) administration. Data are presented as the mean ± SEM (n = 4–6). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for comparisons of selected pairs;  $^{\wedge}p < 0.05$ ;  $^{\wedge\wedge}p < 0.01$ ;  $^{\wedge\wedge\wedge}p < 0.001$  indicate significant differences between the veh- (V+V) vs. XCL1(X+V)-treated group;  $^*p < 0.05$ ;  $^{**}p < 0.01$ ;  $^{***}p < 0.001$  indicate significant differences between the XCL1(X+V)- vs. XCL1+YA4-/XCL1+vMIP-II-treated groups. Abbreviations: "V"- vehicle (PBS).



In contrast, in the case of CXCR1, there was clear colocalization with NeuN-positive cells (Figures 9U, Z). However, it is worth emphasizing that a strong CXCR1-positive signal was observed in other cells but not in cells expressing GFAP (astroglia), IBA1 (microglia, macrophages), or NeuN (neurons) (Figure 9).

ITGA9 was also shown to colocalize with a neuronal marker (NeuN) (Figures 10U, Z) but similarly to CXCR1, not with astroglia (Figures 10D, H) and IBA1-positive cells in the spinal cord (Figures 10L, P).

Because the activation of IBA1 and GFAP was expected to be visible in CCI-treated animals, the experiments designed to show colocalization were focused on these groups. Nevertheless, to maintain good laboratory practice, we also collected the stainings performed on naive animals (Supplementary File – Figures 2–4). As

shown, after nerve injury, there was much stronger activation of IBA1-positive (microglia/macrophages) and GFAP-positive cells in the ipsilateral dorsal and ventral parts of the spinal cord (Figures 8a, b, 9a, b, 10a, b) than in the respective supplementary data (Supplementary File – Figures 2a, b, 3a, b, 4a, b).

## 4 Discussion

Our results demonstrated for the first time the upregulation in the level of XCL1 mRNA/protein during neuropathy development (already one day after CCI), which was maintained for up to 35 days, and as revealed by confocal analysis of immunofluorescent staining, these chemokines are produced mainly by spinal astroglial cells. Importantly, our study also

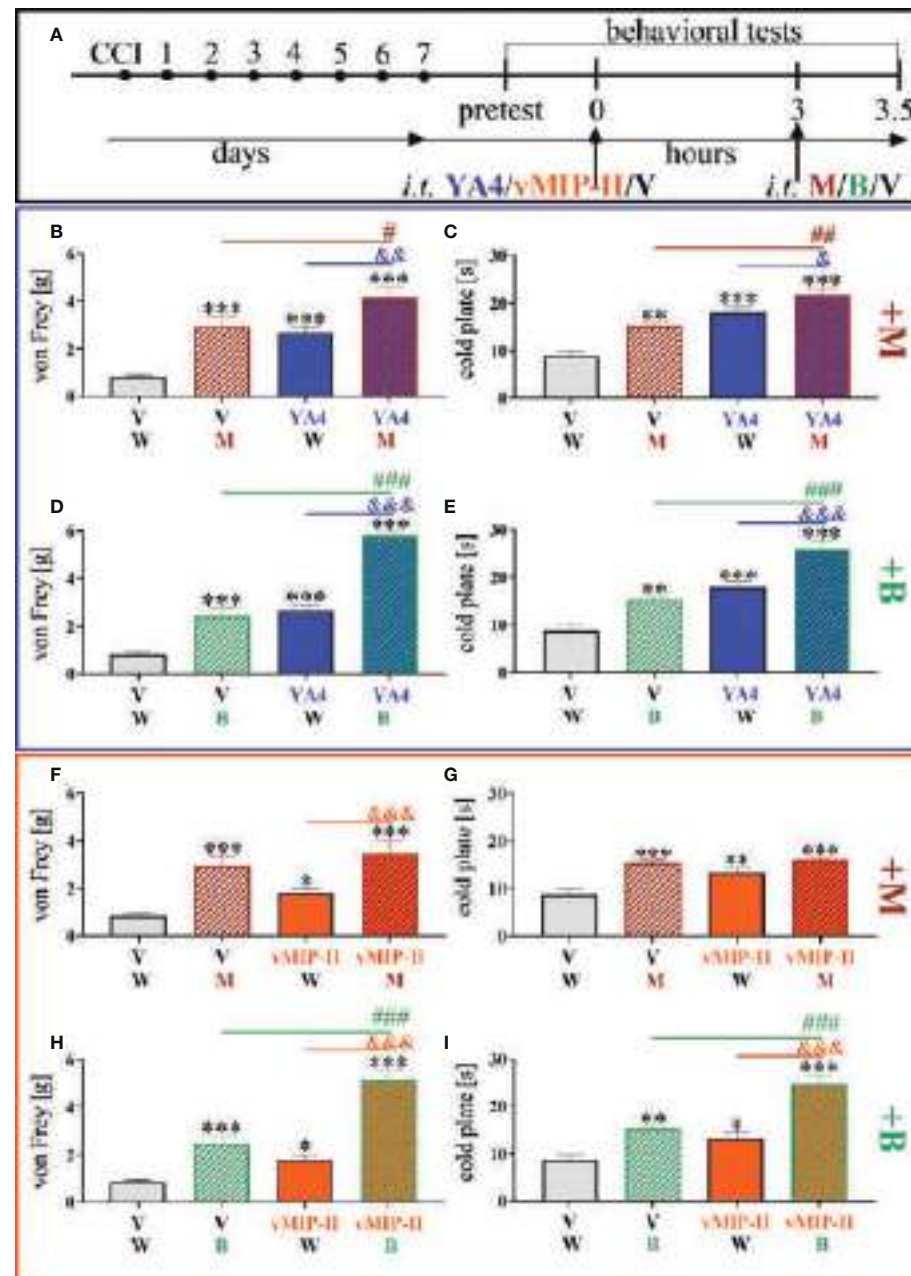
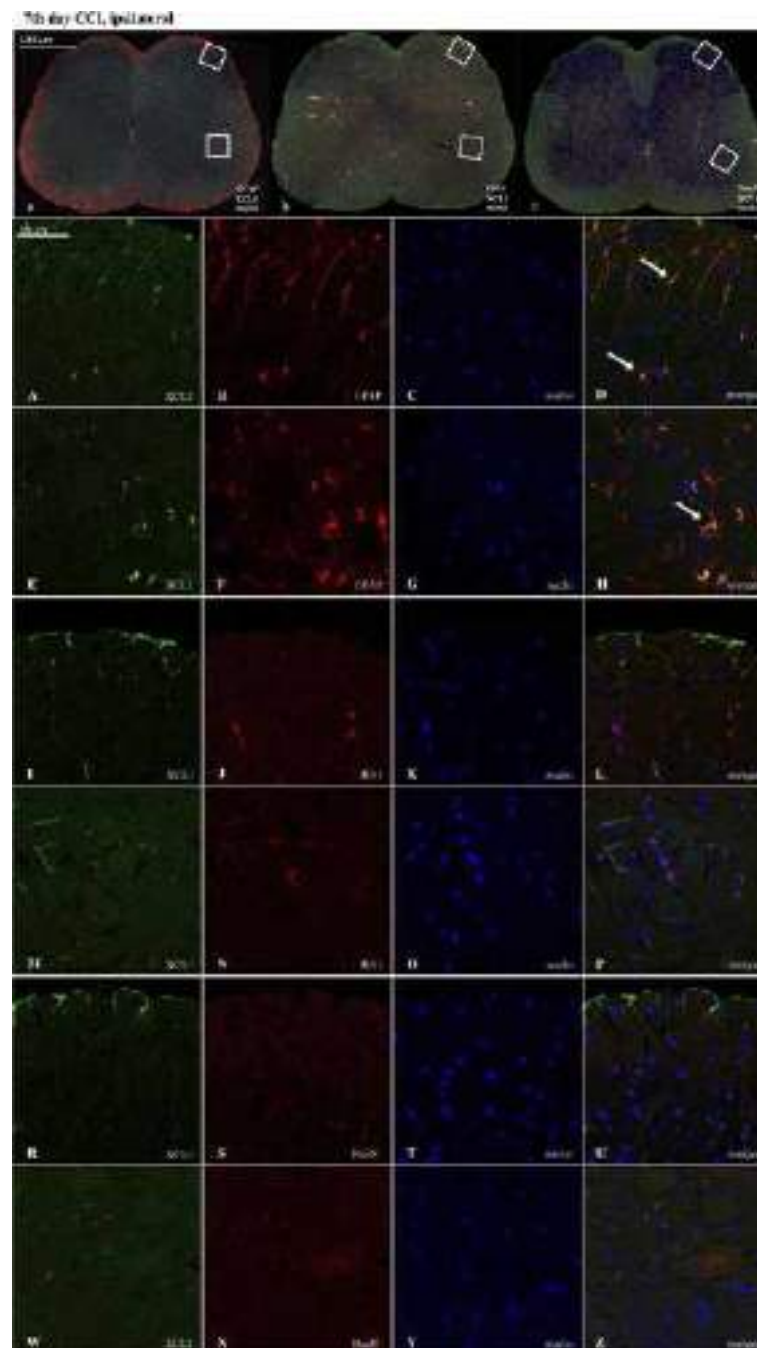


FIGURE 7

The influence of ITGA9 neutralization by YA4 (B–E) or XCR1 blockade by vMIP-II (F–I) at a dose of 1  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  on morphine (M) 2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  (B, C, F, G) and buprenorphine (B) 2.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  (D, E, H, I) effectiveness, administered according to scheme (A), 7 days after chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in mice. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5-12$ ). The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for comparisons of selected pairs; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant differences between the V- vs. YA4-/vMIP-II-/M-/B-treated groups; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$  indicate significant differences between the M-/B-treated vs. M+YA4-/B+YA4-/B+vMIP-II-treated groups;  $\&\#p < 0.05$ ;  $\&\&p < 0.01$ ;  $\&\&\&p < 0.001$  indicate significant differences between the YA4- vs. M+YA4-/B+YA4- or vMIP-II- vs. M+vMIP-II-/B+vMIP-II-treated groups. "V" – vehicle (PBS); "W" – vehicle (water for injections).

unprecedentedly showed that blockade/neutralization of both XCL1 receptors, XCR1 by vMIP-II and ITGA9 by YA4, reverse XCL1 nociceptive properties. In addition, we proved that the XCL1 neutralizing antibody reduces mechanical and thermal hypersensitivity

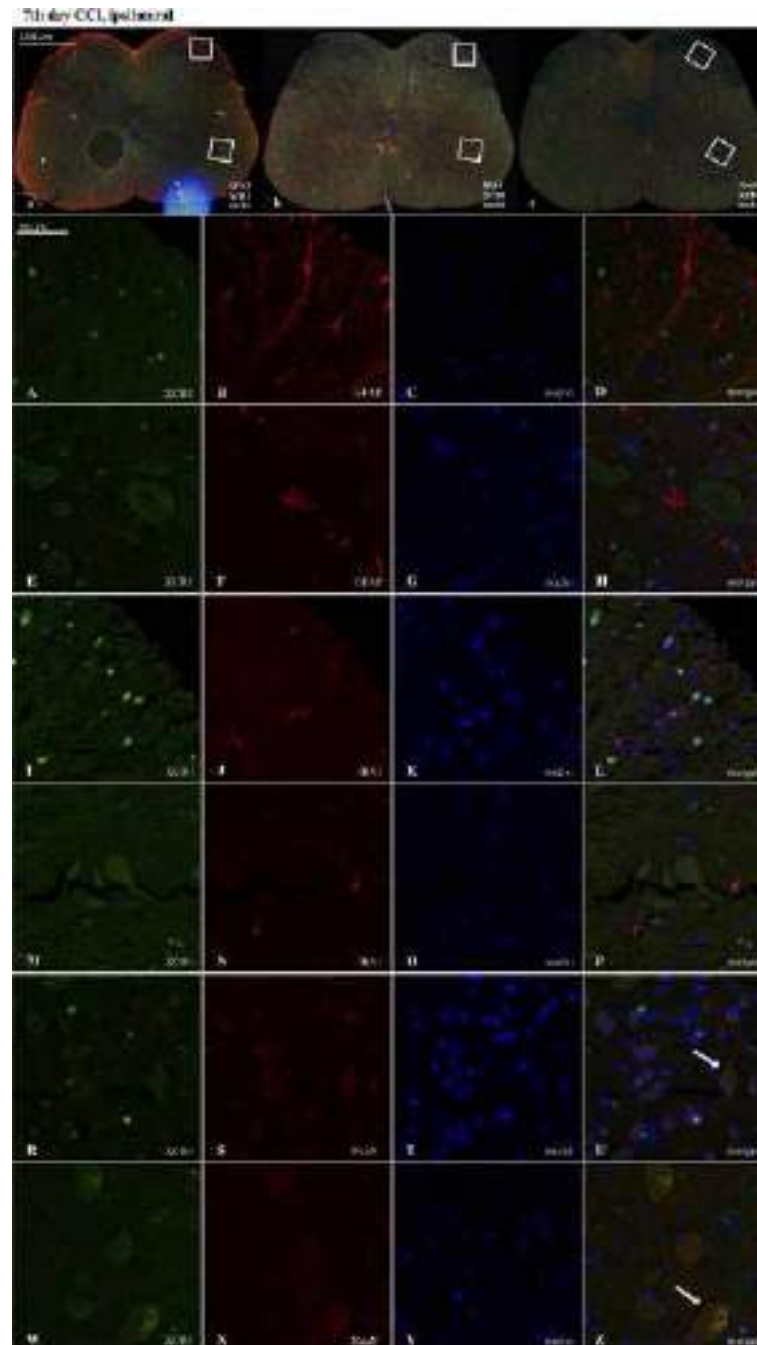
and improves morphine analgesia in CCI-exposed mice. Additionally, our results indicated that the mechanisms of minocycline analgesic action in neuropathy may also involve the decrease in the pronociceptive XCL1. Moreover, behavioral studies provided the first evidence that vMIP-II and



**FIGURE 8**

Immunofluorescence analysis of chemokine-C-motif ligand 1 (XCL1) localization in the lumbar (L4 to L6) spinal cord 7 days after chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in mice. Dorsal (A–D, I–L, R–U) and ventral (E–H, M–P, W–Z) parts of lumbar spinal cord (a,b,c) were shown as an approximate fragments of selected images. Representative immunofluorescence images from colocalization analysis performed on spinal cord, paraffin-embedded 7  $\mu$ M microtome slices: XCL1 (green: A, E, I, M, R, W) with astroglia marker glial fibrillary acidic protein; (GFAP, red: B, F); microglia marker ionized calcium-binding adaptor molecule 1; (IBA1, red: J, N); and with neuronal marker neuronal nucleus; (NeuN, red: S, X). Nuclei are in blue (C, G, K, O, T, Y). High magnification, three-dimensional image rendering shows XCL1 localization inside GFAP-positive cells (yellow: D, H). Scale bars: 50  $\mu$ m (a, b, c), 500  $\mu$ m (A–Z).





**FIGURE 9**

Immunofluorescence analysis of chemokine-C-motif receptor 1 (XCR1) localization in the lumbar (L4 to L6) spinal cord 7 days after chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in mice. Dorsal (A–D, I–L, R–U) and ventral (E–H, M–P, W–Z) parts of lumbar spinal cord (a,b,c) were shown as an approximate fragments of selected images. Representative immunofluorescence images from colocalization analysis performed on spinal cord, paraffin-embedded 7  $\mu$ M microtome slices: XCR1 (green: A, E, I, M, R, W) with astroglia marker glial fibrillary acidic protein; (GFAP, red: B,F); microglia marker ionized calcium-binding adaptor molecule 1; (IBA1, red: J, N); and with neuronal marker neuronal nucleus; (NeuN, red: S, X). Nuclei are in blue (C, G, K, O, T, Y). High magnification, three-dimensional image rendering shows XCR1 localization inside NeuN-positive cells (yellow: U, Z). Scale bars: 50  $\mu$ m (a, b, c), 500  $\mu$ m (A–Z).

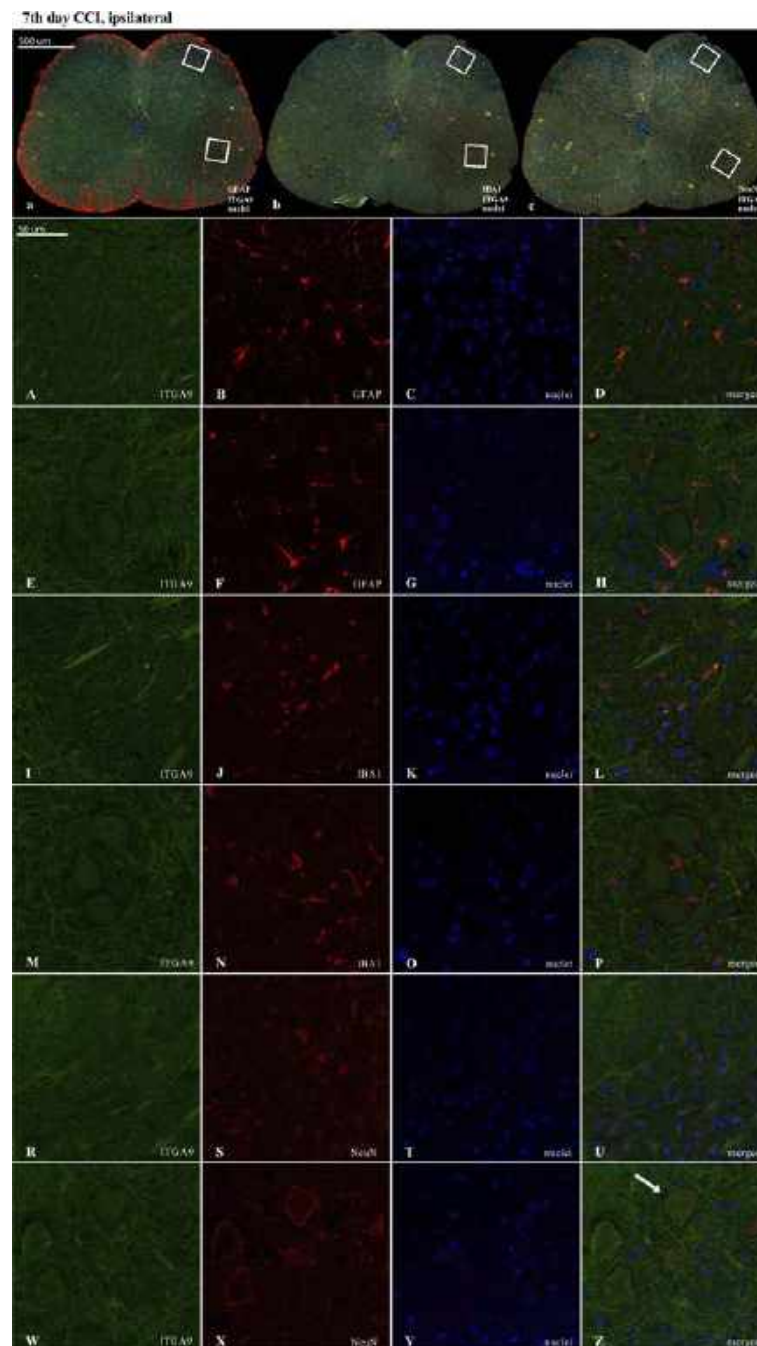
YA4 diminish thermal and mechanical hypersensitivity in CCI-exposed mice and enhance buprenorphine and, in the case of YA4, also morphine analgesia. Importantly, immunofluorescence staining indicated that XCR1 and ITGA9 are expressed on neurons. Remarkably, our results clearly showed that blocking the XCL1-ITGA9 interaction appears to be more potent in relieving neuropathic pain.

XCL1 is known to play an essential role in the classical immune response (28). It is produced by subsets of T and NK cells during the course of inflammation, leading to chemotaxis of these cells by binding to XCR1 (28). However, in the course of neuropathy, the CD<sup>4+</sup> and CD<sup>8+</sup> T helper cells are unchanged in the spinal cord, in contrast to strongly activated glial cells (21). Recently, it was shown that the mRNA and protein level of XCL1 is increased in primary astroglia but not microglia in LPS-stimulated mouse cell cultures (27). Moreover, importantly, XCL1 stimulation of primary microglial and astroglial cells does not directly induce the production of pronociceptive interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6) and chemokines (CCL3, CCL4, CCL9) (27). Therefore, we hypothesized that in neuropathy, XCL1 acts through neuronally localized receptors. Our immunofluorescence analysis proved that XCR1 and ITGA9 are located on spinal neurons, not micro- and astroglial cells. In the present study, we demonstrated for the first time the quick and strong upregulation of spinal XCL1, which lasts up to 5 weeks. Importantly, intrathecal injection of XCL1 in naive mice evoked thermal and mechanical hypersensitivity after 1 h, which lasted up to 24 h (7). Moreover, our studies provided the first evidence that neutralization of XCL1 results in reductions in thermal and mechanical hypersensitivity in CCI-exposed mice. In turn, XCL1-evoked hypersensitivity in naive mice is abolished by pretreatment with vMIP-II and YA4, suggesting that both receptors are responsible for its pronociceptive properties. Many studies have demonstrated that glial cells activated under neuropathic pain conditions produce many pronociceptive cytokines, including interleukins (23, 38, 39) and chemokines (21–24, 40–44). We have followed that concept, and based on our results, we propose that XCL1 is produced by astroglia and activates neuronal XCR1 and ITGA9, which are both strongly engaged in neuropathic pain development. It was already shown by an *in vitro* study that minocycline, a glial inhibitor, treatment before LPS stimulation prevented XCL1 mRNA upregulation in primary astroglial cells (7). Our present results confirmed that consecutive minocycline treatment (twice daily, 7 days) attenuates CCI-evoked neuropathic pain by inhibiting microglia/macrophages and diminishing the levels of p38, ERK, JNK and AKT, which is congruent with literature data (13, 45–48). It was also demonstrated that minocycline diminished hypersensitivity of spinal neurons after traumatic spinal cord injury (49). Importantly, we observed for the first time that minocycline treatment also lowered the protein level of XCL1 in the CCI-induced neuropathy model, which might be considered behind the additional mechanism of its beneficial effects in neuropathy.

XCR1 is the well-known receptor for XCL1. It is expressed in T cells, B cells and neutrophils (50), Schwann cells, oligodendrocytes

(51) and neurons (7, 51). Previous immunofluorescence studies have shown that in the nervous system, XCR1 is expressed in nonpeptidergic and non-IB4 binding terminals of A-delta and C-fiber afferents and/or within excitatory interneurons (51). Our immunofluorescence analysis of lumbar spinal cord sections showed that XCR1 is expressed by neurons and other cells but not microglia and astroglia. Importantly, the membrane, but not cytoplasmic, fraction of spinal protein level XCR1 increased after CCI but not in the group of animals receiving minocycline, which is probably related to its ability to prevent glial activation (52). Since minocycline causes a decrease in the level of XCL1, that is produced by activated astroglial cells, regulation of the membrane level of XCR1 may result from the ligand-receptor interactions favorably altered by it. The pharmacological blockade of XCR1 by vMIP-II was previously shown to inhibit the expression of pERK and p38MAPK in tissue exposed to XCL1 (51), which is a similar effect to that caused by minocycline treatment, as shown by our study and others (13, 14). Moreover, it lowers spontaneously hyperactive neuronal discharges, which are also characteristic of central sensitization (51). The behavioral analysis performed in our studies provided the first evidence that pharmacological blockade of XCR1 by vMIP-II may evoke neuropathic pain relief. These findings indicate that the XCL1/XCR1 axis can participate in many aspects of neuro-glial interactions and play a significant role in nociceptive transmission.

Importantly, XCL1 can also act through ITGA9 (30), an extracellular matrix component, which was shown to participate in the pathophysiology of some intractable disorders by the regulation of the cell physiological state and acts through a diversity of signaling pathways. This adhesion molecule exerts a crucial function to regulate multistep processes, including migration, proliferation, and metastasis (31, 53–55). Integrins consist of two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , so they are heterodimers. On cell membranes, they can interact with extracellular ligands and serve as receptors to mediate intracellular signals. As adhesion proteins, integrins are engaged in a variety of cellular functions (56). If the local responses are disturbed, integrin activation may occur, leading to tissue damage and inflammation (57). ITGA9, which is formed of  $\alpha 9$  and  $\beta 1$  subunits, is one of the less known. Its role in nociceptive transmission needs to be studied, which is why we focused on this topic in our work. The results of our research revealed for the first time that after CCI, the protein level of ITGA9 remains at a similar level in the cytoplasmic fraction and is lowered in the membrane fraction, which may be caused by the internalization of the receptor after its activation by XCL1 in the course of neuropathy. Our immunofluorescence staining indicated the presence of ITGA9 in spinal neurons but not in microglial and astroglial cells. The importance of this receptor in nociceptive transmission was proven for the first time by our pharmacological research. The spinal blockade of ITGA9 by YA4 significantly diminished both thermal and mechanical hypersensitivity evoked by CCI. The results are promising because it was already shown that blocking ITGA9 has



**FIGURE 10**

Immunofluorescence analysis of integrin alpha-9 (ITGA9) localization in the lumbar (L4 to L6) spinal cord 7 days after chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in mice. Dorsal (A–D, I–L, R–U) and ventral (E–H, M–P, W–Z) parts of lumbar spinal cord (a,b,c) were shown as an approximate fragments of selected images. Representative immunofluorescence images from colocalization analysis performed on spinal cord, paraffin-embedded 7 µM microtome slices: ITGA9 (green: A, E, I, M, R, W) with astroglia marker glial fibrillary acidic protein; (GFAP, red: B, F); microglia marker ionized calcium-binding adaptor molecule 1; (IBA1, red: J, N); and with neuronal marker neuronal nucleus; (NeuN, red: S, X), Nuclei are in blue (C, G, K, O, T, Y). High magnification, three-dimensional image rendering shows ITGA9 localization inside NeuN-positive cells (yellow: U, Z). Scale bars: 50 µm (a, b, c), 500 µm (A–Z).

beneficial effects in mouse models of experimental autoimmune encephalomyelitis (31) and arthritis (58). According to some literature data from *in vitro* studies, XCL1 signaling via ITGA9 may be neuroprotective by increasing the number of neurospheres, promoting neuronal differentiation and positively affecting neurogenesis (59); it also potentiates the regeneration of axons (60). On the other hand, some researchers have suggested that its blockade can reverse the outcomes of autoimmune diseases (31). Therefore, in our opinion, ITGA9 is an interesting target for pharmacotherapy, and it is definitely tempting to look for new pharmacological tools for its modulation.

Opioids are used in chronic pain treatment, but in neuropathy, they exhibit lower effectiveness (16, 61). Many studies have proven that pharmacological inhibition of glial activation in neuropathy provides beneficial effects on opioid analgesic efficacy (4, 62). Initially, the reason for this phenomenon was the reduced release of cytokines (including chemokines) by these cells (16, 61). Recent data in the literature confirmed this theory, showing that intrathecal administration of CCL2- and CCL7 neutralizing antibodies enhanced the analgesic effects of morphine and buprenorphine in CCI-exposed mice (19). Moreover, in cancer-induced bone pain, inhibition of CXCL10, CXCL11 and CXCL13 enhanced morphine analgesic properties in rats (63–65). Moreover, in diabetic neuropathic pain, intrathecal administration of CCL1-, CCL3- and CCL9 neutralizing antibodies enhanced morphine effectiveness (18, 20). Our results provide the first evidence that an XCL1 neutralizing antibody improves morphine (a strong agonist of MOR, with lower affinity to DOR, KOR), but not buprenorphine (an agonist of MOR/NOR; antagonist of KOR/DOR), analgesia in CCI-exposed mice. Apart from the fact that these opioids acting through different receptors, which might be the explanation for why neutralization of XCL1 differently affects their analgesic properties, it is important to keep in mind that they also showed different pharmacokinetics and pharmacodynamics. Additionally it is known that chemokine receptors may create heterodimers with the opioid receptors MOR and DOR, which are involved in morphine analgesia (66–68), however, no such data are available for NOR. Some chemokines (e.g., CCL2, CCL5, CXCL12, CX3CL1) have already been known to interfere with the analgesic effects induced by morphine, DAMGO (selective ligand of MOR) and/or DPDPE (selective ligand of DOR) due to heterologous desensitization (67, 68). To date, there are no reports that have documented heterologous desensitization of MOR and chemokine receptors, but this mechanism could be one of the reasons why buprenorphine analgesia is improved by the blockade of XCR1. However, this topic requires further in-depth investigation. We previously proved that the blockade of other typical chemokine receptors, such as CCR1 by J113863 (21), CCR2 by RS504393 (22) and CCR5 by maraviroc (69), enhanced the analgesic properties of morphine and buprenorphine under neuropathy. What may be surprising is that a blockade of ITGA9 acts similarly, which

enhances the analgesic effects of morphine and – to a greater extent – the latter buprenorphine. However, this is not a typical chemokine receptor. It was already shown that some integrins play an important role in the modulation of opioid signaling in trigeminal ganglion neurons. The  $\beta 1$  integrin subunit (present in ITGA9) was shown to have a high degree of colocalization with MOR in these neurons (70). These are particularly significant results since they indicate for the first time that ITGA9 may be an important potential target for the pharmacotherapy of neuropathy. Therefore, our results are particularly important because ITGA9 is not a typical chemokine receptor, which indicates the complexity of neuroimmunological processes occurring in neuropathy. We assume that one of the mechanisms underlying the beneficial properties of chemokine receptor blockers/antagonists is to prevent the anti-opioid effects of chemokines. The inhibition of neuroimmune imbalance may contribute to a potential therapeutic mechanism based on increasing the efficacy of opioids in neuropathic pain treatment.

## 5 Conclusion

Based on the current results, we can confirm that XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 signaling play important roles in CCI-induced neuropathy; however, ITGA9 seems to be a more potent neuronal target and may serve as an innovative strategy for the polypharmacotherapy of neuropathic pain in combination with opioids. Moreover, our data suggest that minocycline, a widely used antibiotic that affects many intracellular pathways, can reveal high analgesic potential in neuropathy by influencing more immune factors than was previously thought, including XCL1. In view of the obtained data and current literature, we suggest that modulation of XCL1 signaling may serve as a promising target for combined therapy with opioids and indicates minocycline repurposing potential in the treatment of neuropathic pain. Moreover, both XCL1 receptors (XCR1 and ITGA9), seem to be important novel targets with beneficial properties for pharmacological intervention after nerve injury. Both used pharmacological tools (MIP-II protein, YA4) are available for experimental studies, but as far as we know, they are not drugs used in the clinics. That is why we need more studies, taking into consideration neuropathic pain of different etiologies, especially in the light of the knowledge that both, chemokines neutralization and neutralization/blockade of their receptors are successfully used as a treatment of varied diseases.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Material](#). Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Ethical Committee of the Maj Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences (LKE: 75/2017, 305/2017, 235/2020, 236/2021, 297/2021, 89/2021, 98/2022). According to the 3R policy, the number of animals was reduced to the necessary minimum.

## Author contributions

AC, ER, AP, JB, KP, KC, GK and JM substantially contributed to the conception and design of the study and to the analysis and interpretation of the data. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This work was supported by the National Science Center, Poland, grant OPUS 22 2021/43/B/NZ7/00230, PRELUDIUM 12 2016/23/N/NZ7/00356 and statutory funds of Department of Pain Pharmacology and Department of Brain Biochemistry from the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences.

## References

1. Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain* (2014) 155:654–62. doi: 10.1016/j.pain.2013.11.013
2. Martin TJ, Eisenach JC. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. *J Pharmacol Exp Ther* (2001) 299:811–7.
3. White FA, Bhargoo SK, Miller RJ. Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat Rev Drug Discovery* (2005) 4:834–44. doi: 10.1038/nrd1852
4. Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* (2013) 716:106–19. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.072
5. Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. Microglial activation in traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci* (2017) 9:208. doi: 10.3389/fnagi.2017.00208
6. Ji RR, Donnelly CR, Nedergaard M. Astrocytes in chronic pain and itch. *Nat Rev Neurosci* (2019) 20:667–85. doi: 10.1038/s41583-019-0218-1
7. Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, Kreiner G, Mika J. Microglial inhibition influences XCL1/XCR1 expression and causes analgesic effects in a mouse model of diabetic neuropathy. *Anesthesiology* (2016) 125:573–89. doi: 10.1097/ALN.0000000000001219
8. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomi T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis* (2013) 4:1–9. doi: 10.1038/cddis.2013.54
9. Abbaszadeh A, Darabi S, Hasanvand A, Amini-Khoei H, Abbasnezhad A, Choghakhor R, et al. Minocycline through attenuation of oxidative stress and inflammatory response reduces the neuropathic pain in a rat model of chronic constriction injury. *Iran J Basic Med Sci* (2018) 21:138–44. doi: 10.22038/ijbms.2017.24248.6053
10. Mika J, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and

## Acknowledgments

The English was corrected by American Journal Experts (3911-94CF-B665-F4B9-F14E).

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1058204/full#supplementary-material>

- neuropathic mice. *Brain Behav Immun* (2009) 23:75–84. doi: 10.1016/j.bbi.2008.07.005
11. Rojewska E, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Minocycline prevents dynorphin-induced neurotoxicity during neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology* (2014) 86:301–10. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.08.001
  12. Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Jurga AM, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Involvement of pro- and antinociceptive factors in minocycline analgesia in rat neuropathic pain model. *J Neuroimmunol* (2014) 277:57–66. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.09.020
  13. Sun JS, Yang YJ, Zhang YZ, Huang W, Li ZS, Zhang Y. Minocycline attenuates pain by inhibiting spinal microglia activation in diabetic rats. *Mol Med Rep* (2015) 12:2677–2682. doi: 10.3892/mmr.2015.3735
  14. Hua XY, Svensson CI, Matsui T, Fitzsimmons B, Yaksh TL, Webb M. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. *Eur J Neurosci* (2005) 22:2431–2440. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04451.x
  15. He L, Xu R, Chen Y, Liu X, Pan Y, Cao S, et al. Intra-CA1 administration of minocycline alters the expression of inflammation-related genes in hippocampus of CCI rats. *Front Mol Neurosci* (2019) 12:248. doi: 10.3389/fnmol.2019.00248
  16. Kwiatkowski K, Mika J. The importance of chemokines in neuropathic pain development and opioid analgesic potency. *Pharmacol Rep* (2018) 70:821–30. doi: 10.1016/j.pharep.2018.01.006
  17. Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain* (2013) 154:10–28. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.022
  18. Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, Kreiner G, Nalepa I, Mika J. Spinal CCL1/CCR8 signaling interplay as a potential therapeutic target – evidence from a mouse diabetic neuropathy model. *Int Immunopharmacol* (2017) 52:261–71. doi: 10.1016/j.intimp.2017.09.021
  19. Kwiatkowski K, Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, Rojewska E, Ciapała K, Makuch W, et al. Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant

- role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. *Cytokine* (2019) 119:202–13. doi: 10.1016/j.cyto.2019.03.007
20. Rojewska E, Zychowska M, Piotrowska A, Kreiner G, Nalepa I, Mika J. Involvement of macrophage inflammatory protein-1 family members in the development of diabetic neuropathy and their contribution to effectiveness of morphine. *Front Immunol* (2018) 9:494. doi: 10.3389/fimmu.2018.00494
21. Pawlik K, Piotrowska A, Kwiatkowski K, Ciapała K, Popiolek-Barczyk K, Makuch W, et al. The blockade of CC chemokine receptor type 1 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in a rat model of neuropathic pain. *Immunology* (2020) 159:413–28. doi: 10.1111/imm.13172
22. Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, Makuch W, Mika J. The RS504393 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in neuropathic rats. *J Neuroimmune Pharmacol* (2017) 12:402–19. doi: 10.1007/s11481-017-9729-6
23. Pawlik K, Ciechanowska A, Ciapała K, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Blockade of CC chemokine receptor type 3 diminishes pain and enhances opioid analgesic potency in a model of neuropathic pain. *Front Immunol* (2021) 12:781310. doi: 10.3389/fimmu.2021.781310
24. Bogacka J, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Rojewska E, et al. CCR4 antagonist (C021) influences the level of nociceptive factors and enhances the analgesic potency of morphine in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* (2020) 880:1–10. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173166
25. Kwiatkowski K, Ciapała K, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Comparison of the beneficial effects of RS504393, maraviroc and cenicriviroc on neuropathic pain-related symptoms in rodents: behavioral and biochemical analyses. *Int Immunopharmacol* (2020) 84:1–12. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106540
26. Piotrowska A, Ciapała K, Pawlik K, Kwiatkowski K, Rojewska E, Mika J. Comparison of the effects of chemokine receptors CXCR2 and CXCR3 pharmacological modulation in neuropathic pain model—*In vivo* and *in vitro* study. *Int J Mol Sci* (2021) 22:1–24. doi: 10.3390/ijms222011074
27. Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, et al. Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes. *Pharmacol Rep* (2020) 72:1579–92. doi: 10.1007/s43440-020-00187-y
28. Lei Y, Takahama Y. XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect* (2012) 14:262–7. doi: 10.1016/j.micinf.2011.10.003
29. Xu F, He D, Ning R, Zeng B, Thompson CW, Li Y, et al. Genetic diversity of chemokine XCL1 and its receptor XCR1 in murine rodents. *Dev Comp Immunol* (2019) 98:80–8. doi: 10.1016/j.dci.2019.04.008
30. Matsumoto N, Kon S, Nakatsuru T, Miyashita T, Inui K, Saitoh K, et al. A novel  $\alpha 9$  integrin ligand, XCL1/Lymphotactin, is involved in the development of murine models of autoimmune diseases. *J Immunol* (2017) 199:82–90. doi: 10.4049/jimmunol.1601329
31. Ito K, Morimoto J, Kihara A, Matsui Y, Kurotaki D, Kanayama M, et al. Integrin  $\alpha 9$  on lymphatic endothelial cells regulates lymphocyte egress. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2014) 111:3080–5. doi: 10.1073/pnas.1311022111
32. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* (1988) 33:87–107. doi: 10.1016/0304-3959(88)90209-6
33. Mika J, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* (2007) 560:142–9. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.01.013
34. Hylden JKL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: A new technique. *Eur J Pharmacol* (1980) 67:313–6. doi: 10.1016/0014-2999(80)90515-4
35. Liu X, Fagotto F. A method to separate nuclear, cytosolic, and membrane-associated signaling molecules in cultured cells. *Sci Signal* (2011) 4:1–13. doi: 10.1126/scisignal.2002373
36. Baghirova S, Hughes BG, Hendzel MJ, Schulz R. Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells. *MethodsX* (2015) 2:440–445. doi: 10.1016/j.mex.2015.11.001
37. Centre TEM, Cardiology M. *Subcellular fractionation protocol. Abcam.6–7*. Available at: <https://www.abcam.com/protocols/subcellular-fractionation-protocol> (Accessed November 9, 2022).
38. Pilat D, Piotrowska A, Rojewska E, Jurga A, Ślusarczyk J, Makuch W, et al. Blockade of IL-18 signaling diminished neuropathic pain and enhanced the efficacy of morphine and buprenorphine. *Mol Cell Neurosci* (2016) 71:114–24. doi: 10.1016/j.mcn.2015.12.013
39. Pilat D, Rojewska E, Jurga AM, Piotrowska A, Makuch W, Przewlocka B, et al. IL-1 receptor antagonist improves morphine and buprenorphine efficacy in a rat neuropathic pain model. *Eur J Pharmacol* (2015) 764:240–8. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.058
40. Bogacka J, Ciapała K, Pawlik K, Kwiatkowski K, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, et al. CCR4 antagonist (C021) administration diminishes hypersensitivity and enhances the analgesic potency of morphine and buprenorphine in a mouse model of neuropathic pain. *Front Immunol* (2020) 11:1241. doi: 10.3389/fimmu.2020.01241
41. Kwiatkowski K, Pawlik K, Ciapała K, Piotrowska A, Makuch W, Mika J. Bidirectional action of cenicriviroc, a CCR2/CCR5 antagonist, results in alleviation of pain-related behaviors and potentiation of opioid analgesia in rats with peripheral neuropathy. *Front Immunol* (2020) 11:615327. doi: 10.3389/fimmu.2020.615327
42. Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W, et al. Pharmacological blockade of spinal CXCL3/CXCR2 signaling by NVP CXCR2 20, a selective CXCR2 antagonist, reduces neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Front Immunol* (2019) 10:2198. doi: 10.3389/fimmu.2019.02198
43. Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W, et al. Pharmacological blockade of CXCR3 by ( $\pm$ )-NBI-74330 reduces neuropathic pain and enhances opioid effectiveness - evidence from *in vivo* and *in vitro* studies. *BBA- Mol Basis Dis* (2018) 1864:3418–37. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.07.032
44. Rojewska E, Ciapała K, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. *Pharmacol Rep* (2019) 71:139–48. doi: 10.1016/j.pharep.2018.10.002
45. Li T, Liu T, Chen X, Li L, Feng M, Zhang Y, et al. Microglia induce the transformation of A1/A2 reactive astrocytes via the CXCR7/PI3K/Akt pathway in chronic post-surgical pain. *J Neuroinflamm* (2020) 17:1–15. doi: 10.1186/s12974-020-01891-5
46. Chu X, Wang C, Wu Z, Fan L, Tao C, Lin J, et al. JNK/c-jun-driven NLRP3 inflammasome activation in microglia contributed to retinal ganglion cells degeneration induced by indirect traumatic optic neuropathy. *Exp Eye Res* (2021) 202:1–8. doi: 10.1016/j.exer.2020.108335
47. Mika J, Osikowicz M, Rojewska E, Korostynski M, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R, et al. Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* (2009) 623:65–72. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.030
48. Makuch W, Mika J, Rojewska E, Zychowska M, Przewlocka B. Effects of selective and non-selective inhibitors of nitric oxide synthase on morphine- and endomorphin-1-induced analgesia in acute and neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology* (2013) 75:445–57. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.031
49. Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* (2006) 26:4308–4317. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0003-06.2006
50. Huang H, Li F, Cairns CM, Gordon JR, Xiang J. Neutrophils and b cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 281:378–82. doi: 10.1006/bbrc.2001.4363
51. Bird EV, Iannitti T, Christmas CR, Obara I, Andreev VI, King AE, et al. A novel role for lymphotactin (XCL1) signaling in the nervous system: XCL1 acts via its receptor XCR1 to increase trigeminal neuronal excitability. *Neuroscience* (2018) 379:334–49. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.03.030
52. Cai Z, Lin S, Fan LW, Pang Y, Rhodes PG. Minocycline alleviates hypoxic-ischemic injury to developing oligodendrocytes in the neonatal rat brain. *Neuroscience* (2006) 137:425–35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.09.023
53. Staniszewska I, Sariyer IK, Lecht S, Brown MC, Walsh EM, Tuszyński GP, et al. Integrin  $\alpha 9\beta 1$  is a receptor for nerve growth factor and other neurotrophins. *J Cell Sci* (2008) 121:504–13. doi: 10.1242/jcs.000232
54. Zhang YL, Xing X, Cai LB, Zhu L, Yang XM, Wang YH, et al. Integrin  $\alpha 9$  suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by rho GTPase signaling. *J Immunol Res* (2018) 2018:1–11. doi: 10.1155/2018/4602570
55. Xu S, Zhang T, Cao Z, Zhong W, Zhang C, Li H, et al. Integrin- $\alpha 9\beta 1$  as a novel therapeutic target for refractory diseases: Recent progress and insights. *Front Immunol* (2021) 12:638400. doi: 10.3389/fimmu.2021.638400
56. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* (2002) 110:673–87. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6
57. Block H, Herter JM, Rossaint J, Stadtmann A, Kliche S, Lowell CA, et al. Crucial role of SLP-76 and ADAP for neutrophil recruitment in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Exp Med* (2012) 209:407–21. doi: 10.1084/jem.20111493
58. Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Asano T, Matsui Y, Nakayama Y, et al. Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J Immunol* (2009) 182:8015–25. doi: 10.4049/jimmunol.0900725
59. Leiter O, Bernas SN, Seidemann S, Overall RW, Horenburg C, Kowal S, et al. The systemic exercise-released chemokine lymphotactin/XCL1 modulates *in vitro*

adult hippocampal precursor cell proliferation and neuronal differentiation. *Sci Rep* (2019) 9:1–12. doi: 10.1038/s41598-019-48360-5

60. Andrews MR, Czvitkovich S, Dasse E, Vogelaar CF, Faissner A, Blits B, et al. Alpha9 integrin promotes neurite outgrowth on tenascin-c and enhances sensory axon regeneration. *J Neurosci* (2009) 29:5546–57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0759-09.2009

61. Jurga AM, Piotrowska A, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Blockade of P2X4 receptors inhibits neuropathic pain-related behavior by preventing MMP-9 activation and, consequently, pronociceptive interleukin release in a rat model. *Front Pharmacol* (2017) 8:48. doi: 10.3389/fphar.2017.00048

62. Mika J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol Rep* (2008) 60:175–6.

63. Ye D, Bu H, Guo G, Shu B, Wang W, Guan X, et al. Activation of CXCL10/CXCR3 signaling attenuates morphine analgesia: Involvement of gi protein. *J Mol Neurosci* (2014) 53:571–9. doi: 10.1007/s12031-013-0223-1

64. Wang S-F, Dong C-G, Yang X, Yin J-J. Upregulation of (C-X-C motif) ligand 13 (CXCL13) attenuates morphine analgesia in rats with cancer-induced bone pain. *Med Sci Monit* (2016) 22:4612–22. doi: 10.12659/msm.897702

65. Guo G, Peng Y, Xiong B, Liu D, Bu H, Tian X, et al. Involvement of chemokine CXCL11 in the development of morphine tolerance in rats with

cancer-induced bone pain. *J Neurochem* (2017) 141:553–64. doi: 10.1111/jnc.13919

66. Adler MW, Geller EB, Chen X, Rogers TJ. Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. *AAPS J* (2006) 7:E865–70. doi: 10.1208/aapsj070484

67. Chen X, Geller EB, Rogers TJ, Adler MW. Rapid heterologous desensitization of antinociceptive activity between mu or delta opioid receptors and chemokine receptors in rats. *Drug Alcohol Depend* (2007) 88:36–41. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2006.09.010

68. Szabo I, Chen XH, Xin L, Adler MW, Howard OMZ, Oppenheim JJ, et al. Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2002) 99:10276–81. doi: 10.1073/pnas.102327699

69. Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, Makuch W, Jurga A, Slusarczyk J, et al. Beneficial properties of maraviroc on neuropathic pain development and opioid effectiveness in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2016) 64:68–78. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.07.005

70. Berg KA, Zardeneta G, Hargreaves KM, Clarke WP, Milam SB. Integrins regulate opioid receptor signaling in trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* (2007) 144:889–97. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.10.033

## 6. DYSKUSJA

Wyniki badań będących podstawą tej pracy doktorskiej wskazują, że poznanie i porównanie zmian obserwowanych zarówno po uszkodzeniu mózgu jak i nerwów obwodowych jest ważne, ponieważ często charakteryzuje je wspólne podłoże immunologiczne. Poznanie tego podłoża może przyczynić się do znalezienia leków skutecznych w terapii skojarzonej urazów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego.

### 6.1. Aktywacja wybranych populacji komórkowych po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego

Wyniki naszych eksperymentów przeprowadzonych na tkance pochodzącej z kory mózgowej wskazują, że to neutrofile jako pierwsze ulegają aktywacji lub napływowi po urazie mózgu<sup>222</sup>. Poziom mRNA ich markera (*Cd177*) wzrasta osiągając najwyższą wartość w dniu 4 w korze mózgowej<sup>222</sup>, czyli w miejscu urazu, co jest spójne z danymi wskazującymi, że rekrutacja neutrofilii następuje w ciągu pierwszych dni<sup>224</sup>. Co ważne w naszych badaniach wykazaliśmy po raz pierwszy, że podniesienie poziomu *Cd177* następuje, choć w mniejszym stopniu, również w prążkowie i hipokampie<sup>222</sup>. Dane literaturowe wskazują, że aktywowane we wczesnych stadiach uszkodzenia neutrofile wiążą się ze śródbłonkiem naczyń krwionośnych i trombocytami, co w konsekwencji utrudnia przepływ krwi<sup>225</sup>. Z jednej strony komórki te są źródłem szeregu mediatorów prozapalnych, takich jak cytokiny, reaktywne formy tlenu i metaloproteinazy macierzy<sup>226,227</sup>, z drugiej strony istnieją badania pokazujące, że wpływają również na regenerację nerwów poprzez uwalnianie TNF  $\beta$ , NGF, a także przeciwzapalnych IL-4 i IL-10<sup>224</sup>. Przynajmniej one są uważane jednak za komórki krótkotrwale zaangażowane w opisane procesy, w przeciwieństwie do komórek Cd8<sup>+</sup> (limfocytów T supresorowych/cytotoksycznych)<sup>228-230</sup>. Nasze dane również sugerują rolę tej populacji komórek w korze mózgowej, zarówno we wczesnej, a tym bardziej w późnej fazie po uszkodzeniu<sup>222</sup>. Co ważne zachodzenie zmian nie ogranicza się do tej struktury i są one obecne również w prążkowie, wzgórzu i hipokampie. Jak pokazują dostępne źródła literaturowe, w mysim modelu urazowego uszkodzenia mózgu można zaobserwować wzrost liczby tych limfocytów w korze mózgowej aż do 8 tygodnia<sup>231</sup>. Ponadto wykazano, że po zablokowaniu tych komórek przy użyciu przeciwciał monoklonalnych dochodzi do poprawy ogólnej kondycji myszy w modelu udaru mózgu<sup>232</sup>. Opierając się na istniejących badaniach<sup>231</sup> można stwierdzić, że po uszkodzeniu mózgu zaktywowane komórki Cd8<sup>+</sup> przyczyniają się do wtórnej degeneracji neuronów nie tylko w korze mózgowej, ale także w innych obszarach mózgu. Ważną rolę w ośrodkowym



układzie nerwowym niewątpliwie pełnią również oligodendrocyty, które formują osłonkę mielinową. Dane literaturowe wskazują, że nadekspresja *Olig2* w komórkach progenitorowych oligodendrocytów jest mechanizmem ochronnym i korzystnie wpływa na naprawę mieliny<sup>233</sup>. Badania innych autorów wykazały, że immunoreaktywność oligodendrocytów przy użyciu mysiego przeciwciała CC1, które znakuje dojrzałe oligodendrocyty, zmniejsza się po urazowym uszkodzeniu mózgu w modelu szczurzym. Co ważne, występuje kolokalizacja z kaspazą 3, co wskazuje że komórki te ulegają apoptozie<sup>227,234</sup>. Nasze dane pokazują, że poziom mRNA *Olig2+*, będącego markerem niedojrzałych oligodendrocytów, jest tylko krótko i nieznacznie podniesiony po urazie, zarówno w korze mózgowej jak i prążkowi, czy hipokampie. Biorąc pod uwagę dane własne<sup>222</sup> i literaturowe<sup>235</sup> sugerujemy, że odbudowa populacji oligodendrocytów po urazowym uszkodzeniu mózgu jest niewystarczająca, co prawdopodobnie prowadzi do stopniowej degeneracji mieliny. Jednak temat ten wymaga dogłębnych badań w przyszłości. W dalszych eksperymentach skoncentrowaliśmy się na astrogleju, czyli na najliczniejszej populacji komórek glejowych których, co jest już dobrze udokumentowane, silna aktywacja następuje w korze mózgowej po urazowym uszkodzeniu mózgu<sup>236,237</sup>. Jest to zgodne z uzyskanymi w naszych eksperymentach wynikami pokazującymi zwiększoną ekspresję GFAP w korze mózgowej, natomiast po raz pierwszy wykazaliśmy u myszy zmiany w prążkowi, wzgórzu i hipokampie rozpoczynające się wkrótce po urazie i trwające aż do 5 tygodni<sup>222</sup>. Już wcześniej pokazano, że podniesiony poziom GFAP w surowicy wydaje się być dobrym markerem prognostycznym u pacjentów po urazowym uszkodzeniu mózgu<sup>238</sup>. Z piśmiennictwa wynika, że astroglej może pełnić pewne funkcje ochronne w uszkodzonym mózgu, np. poprzez uwalnianie czynników neurotroficznych<sup>21,239</sup>. W warunkach fizjologicznych mają one kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania bariery krew-mózg<sup>240</sup>, jednak w wyniku urazów ich nadmierna aktywacja skutkuje powstawaniem blizn glejowych, które stanowią barierę dla regeneracji i wydłużania aksonów<sup>21,241</sup>. W świetle uzyskanych przez nas wyników, wskazujących na zmiany GFAP aż w czterech strukturach mózgu po jego urazowym uszkodzeniu, prowadzenie dalszych badań uważamy za niezmiernie istotne. Równie ważne populacje komórek to mikroglej i makrofagi, a coraz liczniejsze dane literaturowe wskazują, że odgrywają one także rolę w utrzymaniu homeostazy mózgu<sup>242,243</sup>. Przeprowadzone przez nas analizy pokazują wzrost poziomu mRNA i białka IBA-1, który odzwierciedla długoterminową aktywację mikrogleju /makrofagów w korze mózgowej, prążkowi, hipokampie i wzgórzu<sup>222</sup>. W badaniach opublikowanych w roku 2020 wykazano, że monitorowanie poziomu IBA-1 w surowicy

dostarcza istotnych klinicznie informacji na temat patofizjologii leżącej u podstaw urazowego uszkodzenia mózgu <sup>244</sup>. Również inni autorzy wskazują, że mikroglej i makrofagi ulegają aktywacji i/lub naciekają do uszkodzonych obszarów, zarówno we wczesnej, jak i późnej fazie po urazie mózgu <sup>245</sup>. Procesy te prowadzą m.in. do stanu zapalnego, który może mieć co prawda pewne funkcje ochronne, ale przede wszystkim powoduje wtórne uszkodzenie mózgu i przyczynia się do pogłębienia zmian neurodegeneracyjnych <sup>245,246</sup>. Aktywację mikrogleju w urazowym uszkodzeniu mózgu potwierdziliśmy z wykorzystaniem markera TMEM 119 <sup>247-249</sup>, a nasze dane po raz pierwszy pokazały, że jego poziom jest podniesiony w korze mózgowej aż do 2 tygodni <sup>222</sup>. To sugeruje silną aktywację tej populacji komórek, co z pewnością przyczynia się do zaburzenia homeostazy.

Podobne, jednak nie identyczne mechanizmy obserwowane są po uszkodzeniu nerwów obwodowych. Dane literaturowe sugerują, że uszkodzenie nerwu kulszowego powoduje rekrutację/aktywację zarówno mikrogleju/makrofagów i komórek astrogleju, a także neutrofilii na poziomie rdzenia kręgowego <sup>117,121,186,250-253</sup>. W naszych eksperymentach, nie będących podstawą tej rozprawy doktorskiej, dowiedliśmy aktywacji neutrofilii na poziomie rdzenia kręgowego w 7 dniu po podwiązaniu nerwu kulszowego <sup>121</sup>. Ważnym osiągnięciem wspomnianych badań jest także pokazanie, że wyciszenie tych komórek poprzez zastosowanie podań hydrazidu 4-aminobenzoesowego zmniejsza nadwrażliwość u myszy, co potwierdza istotną rolę neutrofilii w bólu neuropatycznym <sup>121</sup>. Natomiast w przytoczonym eksperymencie nie zaobserwowaliśmy zmian poziomu markera limfocytów T Cd8+ <sup>121,169</sup>, chociaż komórki te wydają się być silnie zaangażowane w procesy wtórnego uszkodzenia mózgu <sup>231,232</sup>. W następnej kolejności, ze względu na obserwowane zmiany poziomu mRNA *Olig2* po uszkodzeniu mózgu <sup>222</sup>, przeprowadziliśmy podobne analizy na poziomie rdzenia kręgowego po uszkodzeniu nerwu kulszowego, jednakże nie wykazaliśmy istotnych różnic <sup>223</sup>. Natomiast w świetle istniejącej literatury <sup>254,255</sup> uważamy, że nie należy bagatelizować roli tych komórek, ponieważ m.in. są na nich zlokalizowane receptory XCR1, które są silnie zaangażowane w procesy nocycyptywne <sup>192</sup>, dlatego też warto byłoby kontynuować badania również w modelach neuropatii o odmiennej etiologii.

W ramach tej pracy doktorskiej podjęliśmy się również zbadania zmian markera aktywacji komórek mikrogleju/makrofagów (IBA-1) aż do 35 dnia po podwiązaniu nerwu kulszowego u myszy. Wykazaliśmy jego wzrost na poziomie białka utrzymujący się do 7 dnia w rdzeniu kręgowym <sup>223</sup>. Jest to spójne z wynikami pochodzącymi z tego samego modelu eksperymentalnego u szczurów które dowodzą, że po stronie uszkodzenia następuje gwałtowna, silna aktywacja komórek IBA-1+ w dniu 7 na poziomie rdzenia kręgowego

i zwojów korzeni grzbietowych<sup>169</sup>. Dane literaturowe potwierdzają, że aktywacja, proliferacja i napływ mikrogleju/makrofagów ściśle korelują z rozwojem objawów bólu neuropatycznego, co sugeruje, że komórki te odpowiadają za jego inicjację<sup>256</sup>. Z kolei w przypadku astrogleju, dowiedliśmy wzrost poziomu białka GFAP od 7 aż do 35 dnia<sup>223</sup>, co jest zgodne z badaniami wskazującymi, że ta populacja przyczynia się do utrzymywania nadwrażliwości w neuropatii<sup>123,169,256–258</sup>. Co również istotne, komórki te są źródłem silnie pronocycyptywnej XCL1, której długotrwały wzrost na poziomie białka obserwowaliśmy po podwiązaniu nerwu kulszowego<sup>127</sup>. Jest to dokładniej przedyskutowane w kolejnym rozdziale.

**Podsumowując**, w zależności od czasu i rodzaju uszkodzenia układu nerwowego, wiele typów komórek odgrywa istotną rolę w rozwoju wtórnych zmian, zarówno rezydentne ośrodkowego układu nerwowego, jak np. astroglej, mikroglej, oligodendrocyty<sup>259</sup>, a także te, które napływają do miejsca uszkodzenia jak np. neutrofile, limfocyty T Cd8+ i makrofagi. Jednak niektóre populacje komórkowe, jak limfocyty T Cd8+ i oligodendrocyty, po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego cechuje odmienny wzorzec aktywacji. Z badań podstawowych wynika że, nowym podejściem terapeutycznym niewątpliwie powinno stać się blokowanie nadmiernej aktywacji komórek immunologicznych i glejowych, a także farmakologiczne promowanie ich fenotypu mającego właściwości neuroprotektoryjne.

## **6.2. Układ dopełniacza po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego**

Układ dopełniacza składa się z białek, które modułują homeostazę tkanek wchodząc w interakcje z elementami wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Jednak nadmierna aktywacja składników dopełniacza leży u podłoża wielu chorób neurodegeneracyjnych<sup>260</sup>. Wiedza na temat kaskady zdarzeń następujących po stłuczeniu mózgu jest niekompletna, dlatego badania prowadziliśmy zarówno w korze mózgowej, jak i w głębszych strukturach.

Początkowo uważano, że cząsteczki będące składnikami kaskady układu dopełniacza dostają się do mózgu poprzez uszkodzoną barierę krew-mózg. Pojawiła się jednak hipoteza, że sam mózg może syntetyzować składniki dopełniacza w odpowiedzi na uszkodzenie. W eksperymentach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej udokumentowaliśmy zróżnicowane, w zależności od czasu i badanej struktury mózgu, zmiany mRNA inicjatorów klasycznej (*Clq*, *Cls*, *Clr*) i lektynowej (*MBL*, *kolektyna-11*, *fikolina A*, *fikolina B*) drogi aktywacji układu dopełniacza u myszy w modelu urazowego uszkodzenia mózgu. Nasze wyniki po raz pierwszy dowiodły, że zmiany poziomu inicjatorów układu

dopełniacza zachodzą nie tylko bezpośrednio w miejscu urazu, czyli w korze mózgowej, ale także w innych obszarach mózgu, takich jak prążkowie, hipokamp i wzgórze <sup>222</sup>. Wyniki pochodzące z kory mózgowej są zgodne z dotychczasową literaturą <sup>235,261,262</sup>, natomiast po raz pierwszy wykazaliśmy zmiany również w głębszych strukturach mózgu, co wydaje się niezwykle istotne.

Z dostępnych danych wynika, że C1q może być wytwarzane przez mikroglej <sup>263,264</sup>, co potwierdziły nasze badania *in vitro*. Ponadto dostarczyły one pierwszych dowodów na to, że komórki te mogą być również źródłem C1s i C1r <sup>222</sup>. W związku z tym sugerujemy, że mikroglej posiada zdolność do produkcji całego kompleksu C1, który uruchamia po aktywacji spowodowanej zakłóceniem homeostazy. Wzrost C1q odnotowano u ludzi podczas schorzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, otępienie czołowo-skroniowe, infekcja wirusem Zachodniego Nilu i schizofrenia <sup>98,265–267</sup>. W naszych badaniach dowiedliśmy, że po uszkodzeniu mózgu następuje znaczny wzrost poziomu mRNA *C1q*, od dnia 4 do 2 tygodni w korze mózgowej, wzgórzu, prążkowie, a także w hipokampie do 7 dni <sup>222</sup>. Co ważne, badania innych autorów w warunkach *in vitro* wykazały, że C1q hamuje wywołaną przez LPS produkcję TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6, co sugeruje jego przeciwzapalną rolę <sup>268</sup>. Co więcej C1q, pod nieobecność C1r i C1s, w warunkach *in vitro* korzystnie wpływa na przeżycie neuronów i wzrost neurytów <sup>269,270</sup> oraz chroni neurony przed apoptozą wywołaną przez fibrylarny amyloid  $\beta$  <sup>271</sup>. Jak udało nam się dowieść w modelu urazowego uszkodzenia mózgu, wraz z *C1q*, wzrastają poziomy mRNA *C1r* i *C1s*, nie tylko w korze mózgowej, ale także w innych obszarach mózgu (prążkowie, hipokamp i wzgórze) <sup>222</sup>. Może być to jedną z głównych przyczyn rozwoju rozległego wtórnego urazu. Opisane wyniki i dostępna literatura mogą świadczyć o tym, że C1q wykazuje efekty neuroprotekcjne jedynie działając niezależnie, natomiast zaangażowanie całego kompleksu C1 przyczynia się do rozwoju neurodegeneracji.

Podczas gdy inicjatory klasycznej drogi aktywacji układu dopełniacza (C1q, C1s i C1r) mogą być syntetyzowane w mózgu, MBL czyli białko aktywujące układ dopełniacza na drodze lektynowej, jest wytwarzane głównie w wątrobie. Co ważne dowiedziono, że myszy pozbawione genów MBL-A i -C lub otrzymujące przeciwciała neutralizujące skierowane przeciwko tym czynnikom, wykazują poprawę funkcji motorycznych i zmniejszoną utratę komórek neuronalnych po urazie mózgu <sup>272</sup>. Nasze wyniki dostarczają dowodów sugerujących, że na poziomie badanych przez nas obszarów mózgu nie dochodzi do biosyntezy MBL, nawet po jego uszkodzeniu. Ponadto nasze eksperymenty *in vitro* potwierdzają brak biosyntezy MBL w pierwotnych komórkach mikrogleju <sup>222</sup>. Jest to zgodne

z danymi literaturowymi wskazującymi, że MBL dostaje się do mózgu z krwi, poprzez uszkodzoną barierę krew-mózg<sup>273-275</sup>. Co ważne wykazaliśmy, że w przeciwieństwie do MBL, kolektyna-11 jest syntetyzowana w wybranych strukturach mózgu, jednakże po uszkodzeniu poziom jej mRNA ulega niewielkim zmianom<sup>222</sup>. Wyniki innych autorów, dowodzące że myszy pozbawione kolektyny-11 nie wykazują poprawy funkcji lokomotorycznych<sup>103</sup>, zdają się potwierdzać, że ten inicjator szlaku lektynowego nie jest kluczowy dla rozwoju wtórnych zmian. Również fikoliny aktywują drogę lektynową dopełniacza, dlatego stały się przedmiotem naszych badań. U myszy obecne są tylko dwie fikoliny. Fikolina A jest odpowiednikiem ludzkiej fikoliny 2, a B fikoliny 1<sup>276,277</sup>. Nasze wyniki dowodzą, że po uszkodzeniu mózgu poziom mRNA *fikoliny A* wzrasta we wczesnej fazie, natomiast zmiany *fikoliny B* są bardzo niewielkie, prawdopodobnie nieistotne biologicznie<sup>222</sup>, co pasuje do wcześniejszych wyników opisanych dla fikoliny 1 u ludzi<sup>278</sup>. Co ważne, w eksperymentach *in vitro* wykazaliśmy, że w komórkach mikrogleju może zachodzić biosynteza *fikoliny A* (ale nie *B*)<sup>222</sup>, co jest zgodne z danymi literaturowymi<sup>279</sup>. Ponadto, dotychczasowe badania dowodzą, że po uszkodzeniu mózgu myszy pozbawione fikoliny A wykazują poprawę deficytów czuciowo-ruchowych w testach behawioralnych w porównaniu z myszami typu dzikiego<sup>103</sup>, co wskazuje na niekorzystne zaangażowanie tego czynnika w zachodzące procesy wtórne.

Rola dopełniacza w bólu neuropatycznym nie była badana w ramach tej pracy doktorskiej, natomiast dane literaturowe sugerują, że stan zapalny zainicjowany przez kaskadę dopełniacza może zaburzać transmisję nocyceptywną<sup>76,84,280</sup>. Przy pomocy analizy mikromacierzy DNA wykazano już, że poziom wszystkich trzech inicjatorów klasycznej drogi aktywacji układu dopełniacza wzrasta po podwiązania nerwów rdzeniowych w szczurzym modelu<sup>281</sup>. Ponadto, w badaniach prowadzonych w modelu podwiązania nerwu kulszowego wykazano u myszy i szczurów, że podanie minocykliny hamuje aktywację mikrogleju, co pociąga za sobą obniżenie poziomu C1q oraz ulgę w bólu<sup>282,283</sup>. Wciąż pozostaje do zbadania, czy na poziomie rdzenia kręgowego inicjatory drogi lektynowej biorą udział w procesach nocyceptywnych, co mamy nadzieję zweryfikować w przyszłości.

**Podsumowując**, nadmierna aktywacja inicjatorów układu dopełniacza może być jedną z przyczyn rozwoju wtórnych zmian po urazowym uszkodzeniu mózgu. Obecnie wzrasta zainteresowanie blokowaniem czynników układu dopełniacza jako podejściem terapeutycznym mającym na celu zapobieganie uszkodzeniom tkanek w trudnych do leczenia schorzeniach. W naszych badaniach skupiliśmy się przede wszystkim na określeniu zmian poziomu mRNA inicjatorów ścieżek klasycznej i lektynowej od 1 do 35 dnia. Biorąc pod

uwagę doniesienia literaturowe, a także uzyskane przez nas wyniki uważamy, że w kaskadę prowadzącą do wtórnych uszkodzeń po bezpośrednim mechanicznym uszkodzeniu mózgu najbardziej zaangażowana wydaje się klasyczna droga aktywacji dopełniacza. Jednak droga lektynowa również bierze udział w powstawaniu deficytów po urazie, a szczególnie istotnym jej inicjatorem wydaje się być ficolina A. Nie wiadomo natomiast, czy w przypadku neuropatii, również to inicjatory klasycznej drogi dopełniacza są kluczowe. W związku z czym należy zbadać tę kwestię, ponieważ wyniki mogą w przyszłości usprawnić postępowania farmakologiczne.

### **6.3. Rodzina MIP-1 po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego**

W naszych badaniach w modelu urazowego uszkodzenia mózgu zaobserwowaliśmy wzrost poziomu białka CCL3 - najsilniejszy po 24 godzinach, ale wciąż wysoki po upływie 7 dni <sup>220</sup>. Analiza immunohistochemiczna przeprowadzona przez nasz zespół pokazała, że CCL3 może być wytwarzana przez neurony <sup>118</sup>. Potwierdzają to badania innych autorów, którzy dodatkowo wskazali, że za wydzielanie CCL3 odpowiadają również zaktywowane komórki mikrogleju <sup>284</sup>. W związku z tym sądzimy, że we wczesnych fazach urazowego uszkodzenia mózgu komórki neuronalne są głównym źródłem CCL3, ponieważ najwyższa aktywacja mikrogleju następuje po około 7 dniach <sup>223</sup>. Niedawno udowodniono, że CCL3 reguluje mechanizmy plastyczności synaptycznej zaangażowane w procesy uczenia się i pamięci <sup>285</sup>, a jej zmiany wykazano także w padaczce skroniowej <sup>286</sup> i chorobie Alzheimera <sup>287,288</sup>. Co ważne, podobny wzorzec aktywacji obserwowaliśmy również w przypadku CCL4 <sup>220</sup>, która może być uwalniana przez neurony <sup>289</sup>, neutrofile <sup>290,291</sup>, mikroglej <sup>118</sup> i astroglej <sup>292</sup>. Jest ona jedną z głównych chemokin wydzielanych przez śródbłonek mikronaczyniowy i działa jako silny chemoatraktant dla neutrofilii <sup>293</sup>. Mimo, że w warunkach fizjologicznych w mózgu ulega jedynie słabej ekspresji, jej poziom wzrasta w chorobie Alzheimera <sup>288,294</sup>, chorobie zwyrodnieniowej stawów <sup>295</sup>, w cukrzycy typu 1 <sup>296</sup> oraz trakcie przewlekłego zapalenia oskrzeli <sup>297</sup>. W przypadku CCL9, również zaobserwowaliśmy wzrost po urazowym uszkodzeniu mózgu, zmiany te były jednak niższe niż w przypadku CCL3 i CCL4 <sup>220</sup>. Natomiast badania immunohistochemiczne wskazują, że CCL9 kolokalizuje z NeuN <sup>118,298</sup>, ale nie z IBA-1 i GFAP, co świadczy o tym, że to neurony są głównym źródłem tej chemokiny, będącej silnym chemoatraktantem dla neutrofilii <sup>299</sup>. Warto jednak zaznaczyć, że CCL9 nie ulega ekspresji u ludzi, ma jednak ortolog - CCL23, którego poziom jest podniesiony u pacjentów po uszkodzeniu mózgu <sup>300</sup>. Jest ponadto uważany za biomarker złego rokowania zarówno po udarze niedokrwiennym <sup>301</sup>, jak

i krwotocznym<sup>302</sup>. Przytoczone wyniki oraz dane literaturowe sugerują, że u pacjentów po urazach mózgu ważną rolę mogą odgrywać CCL3, CCL4 oraz CCL23, co wymaga dalszych wnikliwych badań.

Charakterystyczną cechą chemokin jest ich plejotropowość, czyli zdolność do interakcji z więcej niż jednym receptorem chemokinowym. Członkowie rodziny MIP-1 wchodzi w interakcje z CCR1 i/lub CCR5<sup>176</sup>. Według danych literaturowych, w ośrodkowym układzie nerwowym te receptory są obecne na neuronach<sup>118,303,304</sup>, neutrofilach<sup>305</sup>, mikrogleju<sup>288,303,306</sup> i astrogleju<sup>303,307</sup>. Nasze wyniki, będące podstawą tej pracy doktorskiej, potwierdzają obecność CCR1 i CCR5 w pierwotnych komórkach mikrogleju i astrogleju uzyskanych z kory mózgowej myszy. Jednak nie zaobserwowaliśmy zmian poziomu białka dla CCR1 i CCR5 w korze mózgowej<sup>220</sup>, podobnie jak inni autorzy w przypadku myszy zakażonych trzęsawką<sup>308</sup>. Można zatem przypuszczać, że pomimo nasilenia ich biosyntezy, ekspozycja CCR1 i CCR5 na ich agonistów prowadzi do szybkiego spadku liczby miejsc wiązania na powierzchni komórki. Wyniki naszych badań sugerują, że we wczesnej fazie uszkodzenia mózgu chemokiny z rodziny MIP-1 mogą nasilać naciekanie komórek immunologicznych do miejsca urazu. Co więcej, Joy i wsp.<sup>181</sup> ujawnili, że antagonistą CCR5 (marawirok) poprawia zdolność uczenia się i funkcje poznawcze u zwierząt po stłuczeniu mózgu. Autorzy zwracają uwagę, że CCR5 może okazać się ważnym punktem uchwytu w leczeniu udaru i urazowego uszkodzenia mózgu.

W odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego, tylko dwie chemokiny z rodziny MIP-1 wykazywały silny wzrost na poziomie białka - CCL3 i CCL9, ale nie CCL4<sup>223</sup>, co jest spójne z wcześniejszymi wynikami w modelu neuropatii cukrzycowej uzyskanymi przez zespół prof. Miki<sup>118</sup>. Co więcej, CCL3 było już wcześniej postulowane jako dobry biomarker rozwoju cukrzycy typu 1 u ludzi<sup>309</sup>. Dlatego wydaje się, że spośród członków rodziny MIP-1, inaczej niż było to w przypadku urazowego uszkodzenia mózgu, przede wszystkim CCL3 i CCL9 są zaangażowane w zaburzenia homeostazy. Nasze wyniki wykazały, że przeciwciała neutralizujące skierowane przeciwko CCL3 odwróciły nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne po podwiązaniu nerwu kulszowego<sup>223</sup>. W naszych badaniach obserwowaliśmy również silny wzrost CCL9, co sugeruje istotną rolę tej chemokiny, zwłaszcza w początkowej fazie neuropatii u myszy. Ponadto, podobnie jak w przypadku CCL3, również podpajęczynówkowe podanie przeciwciała neutralizującego CCL9 zahamowało rozwiniętą nadwrażliwość<sup>223</sup>. Co ważne, podobne działanie przeciwciał skierowanych przeciwko CCL3 i CCL9 obserwowano także w neuropatii cukrzycowej<sup>118</sup>. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, uważamy, że wśród członków rodziny MIP-1, CCL9

podobnie jak CCL3, jest ważnym czynnikiem pronocyceptywnym u myszy. Choć CCL9 ulega ekspresji tylko u gryzoni, dowiedziono że jej ludzki ortolog - CCL23 silnie wzrasta w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z bólem neuropatycznym<sup>310</sup>. Wyniki nasze oraz innych autorów sugerują, że u pacjentów CCL3 oraz CCL23 mogą być ważnymi potencjalnymi punktami uchwytu dla terapii, co wymaga jednak dalszych wnikliwych badań.

W dalszej części eksperymentów opisywanych w tej pracy skupiliśmy naszą uwagę na receptorach rodziny MIP-1: CCR1 i CCR5. Ich neuronalna lokalizacja w rdzeniu kręgowym sugeruje ważną rolę w transmisji nocyceptywnej i wyjaśnia, dlaczego CCL3 i CCL9 mają tak silne i szybkie działanie pronocyceptywne po podaniu podpajęczynówkowym<sup>117,118</sup>. Wykazaliśmy po raz pierwszy, że pojedyncze podanie podpajęczynówkowe antagonisty CCR1 (J113863) i antagonistów CCR5 (TAK-220, AZD-5672), w sposób zależny od dawki, zmniejsza nadwrażliwość bólową rozwiniętą w modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego<sup>223</sup>. Jest to zgodne z danymi literaturowymi dowodzącymi, że J113863 obniża nadwrażliwość u myszy po podaniu kompletnego adiuwantu Freund<sup>311</sup> i w modelu neuropatii cukrzycowej wywołanej podaniem streptozotocyny<sup>118</sup>. Natomiast antagoniści CCR5 (TAK-220 i AZD-5672), nowo zastosowani po podwiązaniu nerwu kulszowego, uśmierniają ból podobnie jak marawirok badany u myszy i szczurów<sup>123,170,186</sup>. Co więcej, ci silni i selektywni antagoniści wykazują korzystne działanie, mimo że poziom CCR1 i CCR5 nie zmienia się w rdzeniu kręgowym. Podobną sytuację opisano już w przypadku innych receptorów z grupy CC-, np. CCR1, CCR5 i CCR4 w modelu wywołanym podaniem streptozotocyny<sup>118,312</sup>, a także CCR1 i CCR3 w bólu neuropatycznym wywołanym przez podwiązanie nerwu kulszowego<sup>117</sup>. Uzyskane przez nas wyniki dowiodły, że łączne blokowanie CCR1 i CCR5 ma właściwości przeciwbólowe, ale co zaskakujące nie jest bardziej efektywne od pojedynczej blokady każdego z tych receptorów. Niemniej warto pamiętać, że przy jednoczesnym podaniu różnych substancji nie można całkowicie wykluczyć interakcji pomiędzy nimi oraz przewidzieć w jaki sposób wpłyną one na heterologiczną desensytyzację receptorów<sup>313</sup>.

**Podsumowując,** w naszych badaniach dowiedliśmy zmian wszystkich chemokin z rodziny MIP-1 po uszkodzeniu mózgu, natomiast na poziomie rdzenia kręgowego po uszkodzeniu nerwu kulszowego tylko dwie z nich (CCL3 i CCL9) wydają się odgrywać ważną rolę u myszy. Obie te chemokiny mają silne właściwości pronocyceptywne, a ich blokada przynosi ulgę w bólu. Uzyskane wyniki są kolejnym dowodem, że dalsze badanie roli receptorów dla rodziny MIP-1 jest istotne, ponieważ mogą one być w przyszłości kluczowymi punktami uchwytu w leczeniu zaburzeń neuroimmunologicznych o różnej etiologii. Badania



nasze i innych naukowców, oraz fakt, że antagonistą CCR5 (marawirok) jest już stosowany w praktyce klinicznej, wskazują na ten receptor jako ciekawy cel molekularny w przyszłej terapii chorób związanych z uszkodzeniami układu nerwowego.

#### **6.4. XCL1 po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego**

Dane kliniczne dowodzą, że XCL1 jest chemokiną zaangażowaną w odpowiedź immunologiczną kilku schorzeń. Wzrost jej poziomu został wykryty między innymi u pacjentów dotkniętych chorobą Leśniowskiego-Crohna<sup>190</sup>, reumatoidalnym zapaleniem stawów<sup>187,314</sup>, a także w zakażeniu HIV-1<sup>191</sup>. W naszych badaniach dostarczyliśmy pierwszych dowodów na zmiany poziomu XCL1 w korze mózgowej po jej urazowym uszkodzeniu, a także, co szczególnie nowatorskie, w głębszych strukturach mózgu (we wzgórzu i hipokampie) u myszy<sup>221</sup>. Chemokina ta wywołuje swoje efekty działając poprzez klasyczny receptor chemokinowy XCR1<sup>116,156</sup>, którego ekspresję wykazano na mysich komórkach dendrytycznych<sup>315</sup>, limfocytach T i B oraz neutrofilach<sup>316</sup>, a ostatnio również na komórkach neuronalnych<sup>128</sup>. W naszych analizach dowiedliśmy, że po urazowym uszkodzeniu mózgu poziom mRNA *XCR1* jest silnie podniesiony we wszystkich badanych strukturach, chociaż nie wychwyciliśmy zmian na poziomie białka<sup>221</sup>. Ostatnio pojawiła się praca, w której dowiedziono, że XCL1 może działać również poprzez receptor integrynowy ITGA9<sup>158</sup>, białko adhezyjne zaangażowane w procesy neurodegeneracyjne<sup>317,318</sup>. W naszych eksperymentach obserwowaliśmy wzrost ekspresji mRNA *ITGA9* w korze i hipokampie. Jednakże analiza poziomu białka tego czynnika, podobnie jak to było w przypadku XCR1, również nie wykazała istotnych zmian<sup>221</sup>. Można przypuszczać, że jest to związane z silną ekspozycją XCR1 i ITGA9 na XCL1, co wymaga jednak dalszych wnikliwych badań. Nasze wyniki sugerują po raz pierwszy, że osie XCL1/XCR1 i XCL1/ITGA9 mogą uczestniczyć w rozwoju wtórnych zmian zachodzących w korze mózgowej, hipokampie i wzgórzu po urazie mózgu. Uważamy XCL1 za jeden z kluczowych czynników wtórnego uszkodzenia, a spośród receptorów dla tej chemokiny nie tylko klasyczny XCR1 ale także niedawno zidentyfikowany w tej roli ITGA9, może być ważnym punktem uchwytu dla farmakoterapii. Jest to tym bardziej obiecujący wynik, że przeciwciała neutralizujące XCL1 znoszą postęp choroby w modelu stwardnienia rozsianego<sup>158</sup>.

Badania kontynuowaliśmy na poziomie rdzenia kręgowego w modelu bólu neuropatycznego. Po raz pierwszy dowiedliśmy szybkiego i silnego wzrostu poziomu XCL1 w rdzeniu kręgowym, który trwał aż do 5 tygodni. Co ważne, wcześniejsze badania zespołu prof. Miki pokazały, że podpajęczynówkowe podanie XCL1 myszom zdrowym wywołuje

w krótkim czasie nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne utrzymującą się do 24 godzin<sup>128</sup>. Natomiast eksperymenty stanowiące podstawę tej pracy doktorskiej dostarczyły pierwszego dowodu na to, że neutralizacja XCL1 skutkuje zmniejszeniem nadwrażliwości termicznej i mechanicznej u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego<sup>127</sup>. Z kolei nadwrażliwość wywołana podpajęczynówkowym podaniem XCL1 zdrowym zwierzętom jest odwracana przez vMIP-II (antagonistę XCR1), jak i YA4 (przeciwciało neutralizujące ITGA9)<sup>127</sup>, co sugeruje, że obydwa te receptory są odpowiedzialne za pronocyceptywne działanie XCL1. Na podstawie naszych wyników immunohistochemicznych możemy wysnuć hipotezę, że XCL1 na poziomie rdzenia kręgowego jest wytwarzana przez astroglej i może aktywować oba neuronalnie zlokalizowane receptory - XCR1 i ITGA9<sup>127</sup>. Co ważne blokada ITGA9 przez YA4 po podaniu podpajęczynówkowym wydaje się być bardziej efektywna w zmniejszaniu nadwrażliwości wywołanej przez uszkodzenie nerwu kulszowego, niż blokada XCR1 przez vMIP-II<sup>127</sup>. Ponadto, wcześniejsze badania *in vitro* wykonane przez zespół prof. Miki dostarczyły dowodów, że zastosowanie minocykliny, będącej inhibitorem mikrogleju/makrofagów<sup>319</sup>, przed stymulacją LPS pierwotnych komórek astrogleju zapobiega biosyntezie XCL1<sup>128</sup>. Przeprowadzone przez nas badania behawioralne wykazały, że wielokrotne dootrzewnowe podawanie minocykliny osłabia wywołaną przez podwiązanie nerwu kulszowego nadwrażliwość oraz obniża poziom XCL1<sup>127</sup>, co można uznać za dotychczas nieznaną mechanizm analgezji tego leku w neuropatii. Ponadto, w badaniach *in vitro* dowiedliśmy, że użycie XCL1 w pierwotnych komórkach mikrogleju i astrogleju wydaje się nie indukować bezpośrednio produkcji pronocyceptywnych interleukin (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6) i chemokin (CCL3, CCL4, CCL9)<sup>221</sup>. Pośrednio dowodzi to, że XCL1 działa poprzez neuronalnie zlokalizowane receptory<sup>127</sup>. Odkrycia te świadczą o tym, że osie XCL1/XCR1 jak i XCL1/ITGA9 mogą uczestniczyć w wielu aspektach interakcji neuronalno-glejujowych i odgrywać znaczącą rolę w transmisji nocyceptywnej. Co ważne, zgodnie z dostępną literaturą blokowanie ITGA9 ma korzystny wpływ w mysim modelu zapalenia stawów<sup>320</sup>, dlatego też poszukiwanie nowych narzędzi farmakologicznych mogących skutecznie blokować zarówno XCR1 jak i ITGA9 wydaje się ważne z klinicznego punktu widzenia.

**Podsumowując**, wyniki naszych badań po raz pierwszy pokazują, że XCL1 wzrasta na poziomie mRNA i/lub białka w korze mózgowej, wzgórzu i hipokampie po uszkodzeniu kory mózgowej oraz w rdzeniu kręgowym po uszkodzeniu nerwu kulszowego. XCL1/XCR1 i XCL1/ITGA9 wydają się być kluczowymi parami sygnalizacyjnymi, uczestniczącymi w procesach immunologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym, a ponadto są

zaangażowane w transmisję nocycyptywną. W świetle uzyskanych danych i aktualnego piśmiennictwa sugerujemy, że modulacja sygnalizacji XCL1 może służyć jako obiecujący punkt uchwytu dla przyszłych terapii. Zwłaszcza, że zarówno neutralizacja pewnych chemokin, jak i blokada kilku receptorów chemokinowych są z już powodzeniem stosowane w klinice.

### **6.5. Chemokiny (CCL3, CCL9 i XCL1) oraz ich receptory a leki opioidowe**

Opioidy są z powodzeniem stosowane w leczeniu bólu przewlekłego, jednak w neuropatii wykazują mniejszą skuteczność<sup>105,321</sup>. Powoduje to konieczność stopniowego zwiększania dawek, co nierozzerwalnie wiąże się ze wzrostem ryzyka wystąpienia działań niepożądanych<sup>207,322,323</sup>. Mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska jest nadal słabo zbadany. Dowiedziono już, że farmakologiczne hamowanie aktywacji gleju w neuropatii poprawia skuteczność analgetyków opioidowych<sup>324,325</sup>. Wyniki badań prowadzonych w Zakładzie Farmakologii Bólu w ostatnich latach wskazywały, że niektóre chemokiny są nie tylko ważnymi mediatorami pronocycyptywnymi, ale również ich zwiększone uwalnianie zmniejsza skuteczność przeciwbólową opioidów<sup>105</sup>. Dowiedziono, że podpajęczynówkowe podanie przeciwciał neutralizujących CCL2 i CCL7 nasila działanie przeciwbólowe morfiny i buprenorfiny u myszy w modelu bólu neuropatycznego<sup>116</sup>. Natomiast wyniki uzyskane w naszych badaniach po raz pierwszy wskazują, że zablokowanie CCL3, CCL9 oraz XCL1 przez zastosowanie przeciwciał neutralizujących znacząco poprawia analgezję morfinową po podwiązaniu nerwu kulszowego<sup>127,223</sup>. Jednak spośród zastosowanych narzędzi farmakologicznych, to neutralizacja XCL1 zasługuje na szczególną uwagę ze względu na długi czas utrzymywania się efektów, aż do 48 godzin<sup>127,223</sup>. Warto jednak podkreślić, że przeciwciało neutralizujące XCL1 poprawia efektywność morfiny (silnego agonisty MOR oraz agonisty DOR i KOR), ale nie buprenorfiny (agonisty MOR/NOR oraz antagonisty KOR/DOR)<sup>127</sup>. Początkowo wynik ten wydawał się zaskakujący, jednakże należy wziąć pod uwagę fakt, że receptory chemokinowe mogą tworzyć heterodimery z receptorami opioidowymi MOR i DOR, które są zaangażowane w działanie analgetyczne morfiny<sup>218,219,326</sup>. Z kolei brak jest takich danych dla NOR, który jest niewątpliwie istotny dla efektów analgetycznych buprenorfiny. Nasze wyniki wskazują, że dalsze badania z wykorzystaniem różnych leków opioidowych stosowanych w klinice są konieczne. Ta strategia terapeutyczna jest szczególnie obiecująca ze względu na silne powinowactwo i selektywność przeciwciał monoklonalnych, a także długi okres półtrwania. Jako terapia skojarzona z morfiną umożliwiłaby zmniejszenie jej dawek i częstości przyjmowania, a tym samym

zminimalizowałyby niepożądane efekty, których obserwuje się wiele począwszy od nudności, świądu, zaburzeń ze strony układu nerwowego oraz układu pokarmowego, do najbardziej niebezpiecznych, czyli depresji ośrodka oddechowego.

Ze względu na uzyskanie obiecujących wyników, przeprowadziliśmy również badania polegające na łącznych podaniach opioidów i substancji, które blokują receptory dla CCL3, CCL9 oraz XCL1<sup>127,223</sup>. Koncepcja zastosowania antagonistów receptorów chemokinowych w połączeniu z morfiną w modelach bólu neuropatycznego wywodzi się z eksperymentów prowadzonych przez nasz zespół od wielu lat. Wykazaliśmy już skuteczność antagonistów dla CCR2 (RS504393)<sup>106</sup>, CCR3 (SB328437)<sup>121</sup>, CCR4 (C021)<sup>119,312</sup>, CCR5 (marawiroku)<sup>170</sup> oraz CXCR3 (NBI-74330)<sup>120</sup>, zarówno w uśmierzaniu bólu neuropatycznego, jak również we wzmacnianiu analgezji morfinowej. Biorąc pod uwagę fakt, że monoterapia ma niską skuteczność w leczeniu neuropatii<sup>327</sup>, postanowiliśmy sprawdzić, czy niebadane wcześniej pod tym kątem, selektywne narzędzia farmakologiczne mogą zwiększyć skuteczność morfiny po łącznym podaniu. Jest to ważne ponieważ, oprócz zwiększania skuteczności terapeutycznej jednoczesne podawanie leków zmniejsza również ryzyko wystąpienia działań niepożądanych ze względu na możliwość zastosowania niższych dawek<sup>328</sup>. Naszym zdaniem farmakoterapia skojarzona jest uzasadniona, jeśli stosowane substancje mają różne mechanizmy działania, tak jest właśnie w przypadku jednoczesnego podawania narzędzi farmakologicznych blokujących receptory chemokinowe i opioidowe. Mechanizmy leżące u podstaw rozwoju tolerancji na morfinę obejmują uniewrażliwienie i internalizację receptorów opioidowych oraz ich heterodimeryzację z innymi receptorami sprzężonymi z białkami G<sup>219,326,329,330</sup>. W badaniach *in vitro* wykazano, że może dochodzić do zjawiska heterologicznej desensytyzacji<sup>326</sup> pomiędzy receptorami chemokinowymi i opioidowymi, co opisano dla CCR5-MOR<sup>329,331</sup>, CXCR2-DOR<sup>332</sup>. W naszych badaniach dowiedliśmy, że antagonistą CCR1 poprawia przeciwbólowe właściwości morfiny, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi wcześniej u myszy z neuropatią cukrzycową<sup>118</sup> oraz u szczurów w modelu uszkodzenia nerwu kulszowego<sup>169</sup>. Na podstawie dostępnych danych możemy jedynie przypuszczać, że wzmocnienie analgezji morfinowej wywołane przez J113863 jest związane z faktem, że CCR1 obecny na komórkach neuronalnych współwystępuje z MOR<sup>333</sup>. Zjawisko to jest jednak jeszcze bardziej skomplikowane, ponieważ wiadomo, że CCR1 jest w stanie tworzyć heterodimery również z CCR5<sup>334,335</sup>. Fakt ten może tłumaczyć, dlaczego zarówno antagoniści CCR1 (J113863), jak i CCR5 (TAK-220, AZD-5672) w podobny sposób poprawiają działanie przeciwbólowe morfiny<sup>223</sup>. Natomiast pozostaje do wyjaśnienia dlaczego blokada CXCR1 (vMIP-II) korzystnie wpływa na analgezję wywołaną podaniem

buprenorfiny, ale nie morfiny. Natomiast blokada atypowego receptora ITGA9 poprzez YA4 nasila działanie przeciwbólne zarówno morfiny jak i buprenorfiny<sup>127</sup>. Zjawisko to wymaga dalszych badań, jednakże wiadomo już, że podjednostka integryny  $\beta 1$  (obecna w ITGA9) wykazuje wysoki stopień kolokalizacji z MOR na komórkach neuronalnych<sup>336</sup>. Są to szczególnie istotne wyniki, ponieważ po raz pierwszy zwracają uwagę, że ITGA9 może być ważnym potencjalnym punktem uchwytu w politerapii neuropatii.

Po urazowym uszkodzeniu mózgu często pojawia się ból ośrodkowy, który jest uśmierzany poprzez zastosowanie opioidowych leków przeciwbólowych, takich jak morfina, fentanyl, sufentanyl, remifentanyl, alfentanyl i fenoperydyna<sup>200</sup>. Nie wykazano znaczących różnic przy porównywaniu efektywności tych opioidów, natomiast wykazano że fentanyl obniża ciśnienie wewnątrzczaszkowe lepiej niż morfina i sufentanyl<sup>200</sup>. Badacze sugerują, że pierwotny uraz indukuje proces obejmujący pobudzenie komórek immunologicznych i glejowych, a głównie mikrogleju. Aktywacja ta, która jest dodatkowo pobudzana ekspozycją na opioidy, podczas wtórnego uszkodzenia zaostrza stan zapalny nerwów, modyfikuje plastyczność synaptyczną i wpływa na rozprzestrzenianie agregatów białka tau pogłębiając neurodegenerację<sup>337</sup>. W związku z tymi doniesieniami oraz uzyskanymi wynikami uważamy, że poszukiwanie substancji wyciszających zmiany immunologiczne może w przyszłości zaowocować poprawą terapii urazowego uszkodzenia mózgu - konieczne są jednak dalsze wnikliwe badania farmakologiczne w zwierzęcych modelach.

**Podsumowując**, nasze badania i dostępna literatura pokazują, że zastosowanie antagonistów receptorów chemokinowych może nie tylko korzystnie wpłynąć na zmiany immunologiczne po uszkodzeniu układu nerwowego, ale także przynieść ulgę w bólu. Co ważne w naszych doświadczeniach udało się wytypować 2 chemokiny (CCL3 i XCL1) oraz 4 receptory (CCR1, CCR5, XCR1, ITGA9), które w przyszłości mogą posłużyć jako nowe potencjalne punkty uchwytu w uśmierzaniu bólu neuropatycznego, także w połączeniu z lekami opioidowymi. Przywrócenie zaburzonej równowagi neuroimmunologicznej może przynieść korzyści terapeutycznie, w tym przyczynić się do zwiększenia skuteczności opioidów w klinice.

## 7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Po kontrolowanym stłuczeniu kory mózgowej (bezpośrednie uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego) dowiedziono:

*Ciechanowska i wsp. Immunobiology 2020, Pharmacol Rep 2020, Int J Mol Sci 2021*

### I. Zaangażowania wybranych komórek immunologicznych i glejowych oraz czynników układu dopełniacza poprzez wykazanie:

<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>wzrostu poziomu mRNA i/lub białka markerów komórkowych neutrofile, limfocytów T Cd8+, mikrogleju/makrofagów, astrogleju, oligodendrocytów w 4 strukturach mózgu</li> <li>silnego wzrostu poziomu mRNA czynników zarówno klasycznej (<i>C1q</i>, <i>C1s</i>, <i>C1r</i>) jak i lektynowej (<i>fikolina A</i>) drogi aktywacji układu dopełniacza</li> <li>kolokalizacji C1q w korze mózgowej z komórkami mikrogleju/makrofagów i neuronów, ale nie astrogleju</li> </ul>
<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>wzrostu poziomu mRNA <i>C1q</i>, <i>C1s</i>, <i>C1r</i>, ale nie <i>kolektyny 11</i> i <i>fikoliny A</i>, w pierwotnych hodowlach mikrogleju po stymulacji LPS</li> </ul>

Nasze badania sugerują, że za inicjację procesów wtórnego uszkodzenia mózgu odpowiadają w pierwszej kolejności zaktywowane, napływające neutrofile, a następnie również mikroglej/makrofagi i astroglej. Dlatego modulacja tych komórek wydaje się mieć znaczny potencjał terapeutyczny. Wyniki uzyskane w warunkach *in vitro* wskazują, że mikroglej prawdopodobnie jest w dużej mierze odpowiedzialny za biosyntezę inicjatorów drogi klasycznej, ale w niewielkim stopniu lektynowej. Ponadto dowiedliśmy, że wśród inicjatorów klasycznej drogi aktywacji dopełniacza, cały kompleks C1 (*C1q*, *C1s*, *C1r*), a w przypadku drogi lektynowej *fikolina A*, odgrywają ważną rolę po uszkodzeniu mózgu we wszystkich badanych strukturach (kora, prążkowie, wzgórze i hipokamp). W związku z tym celowanie w te czynniki może okazać się skuteczną strategią w leczeniu uszkodzeń mózgu.

### II. Udziału rodziny MIP-1 poprzez wykazanie:

<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>obecności CCR1 i CCR5 oraz zależnego od czasu wzrostu poziomu mRNA i białka CCL3, CCL4 oraz CCL9 w wybranych strukturach mózgu (kora, wzgórze)</li> </ul>
<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>obecności receptorów CCR1 i CCR5 na powierzchni komórek mikrogleju i astrogleju w pierwotnych hodowlach komórkowych z kory mózgowej</li> </ul>

Przeprowadzone analizy pozwoliły wytypować trzy chemokiny CCL3, CCL4 oraz CCL9 jako kluczowe dla rozwoju wtórnych zmian na poziomie mózgu u myszy. Wyniki wskazują, że dwie z nich, które występują u ludzi - chemokina CCL4 i CCL3 oraz ich receptory, stanowią obiecujące punkty uchwytu i być może w przyszłości zaowocują poprawą terapii po urazowym uszkodzeniu mózgu.

### III. Znaczenie osi XCL1/XCR1 oraz XCL1/ITGA9 poprzez wykazanie:

<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>obecności receptorów XCR1 oraz ITGA9 na poziomie mózgu oraz wzrostu poziomu XCL1 na poziomie białka 24h po urazie w korze i wzgórzu, a w hipokampie do 7 dni</li> </ul>
<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>możliwości biosyntezy XCL1 przez komórki astrogleju po stymulacji LPS</li> <li>braku wpływu XCL1 na aktywację pierwotnych hodowli mikrogleju i astrogleju</li> </ul>

Bazując na uzyskanych wynikach wysunęliśmy hipotezę, że XCL1 może działać poprzez neuronalnie zlokalizowane receptory, a jej źródłem komórkowym może być astroglej. Nasze dane pokazały po raz pierwszy, że XCL1 jest jednym z kluczowych czynników inicjujących zmiany wtórne. Natomiast, spośród receptorów dla tej chemokiny nie tylko klasyczny XCR1, ale także niedawno zidentyfikowany w tej roli atypowy receptor ITGA9, mogą być ważnymi punktami uchwytu dla interwencji farmakologicznej po urazowym uszkodzeniu mózgu.

Po podwiązaniu nerwu kulszowego (bezpośrednie uszkodzenie obwodowego układu nerwowego) dowiedziono:

*Ciechanowska i wsp. Front Immunol 2022 i Brain Sci 2023*

### I. Zaangażowania wybranych komórek immunologicznych i glejowych poprzez wykazanie:

<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>wzrostu poziomu mRNA/białka markerów komórkowych mikrogleju/makrofagów, astrogleju w rdzeniu kręgowym</li> </ul>
----------------	---

Wyniki pokazują, że w pierwszym tygodniu po uszkodzeniu nerwów obwodowych następuje aktywacja mikrogleju/makrofagów oraz astrogleju, którego poziom pozostaje znacznie podniesiony aż do 35 dnia. Nasze dane sugerują, że za rozwój bólu neuropatycznego odpowiadają w znacznej mierze wymienione komórki immunologiczne i glejowe, w związku z czym ich modulacja ma znaczny potencjał terapeutyczny.

### II. Udziału rodziny MIP-1 poprzez wykazanie:

<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>zależnego od czasu wzrostu poziomu białka CCL3, CCL9, ale nie CCL4 oraz obecności CCR1 i CCR5 na poziomie rdzenia kręgowego</li> </ul>
<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>że podpajęczynówkowe, jednorazowe podanie <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ przeciwciał neutralizujących CCL3 i CCL9 powoduje: <ul style="list-style-type: none"> <li>o obniżenie rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne</li> <li>o lepsze efekty przeciwbólowe, po łącznym podaniu z morfiną</li> </ul> </li> <li>➤ antagonistów CCR1 (J113863) i CCR5 (TAK-220, AZD-5672) powoduje: <ul style="list-style-type: none"> <li>o obniżenie rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne</li> <li>o lepsze efekty przeciwbólowe, po łącznym podaniu z morfiną</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

Przeprowadzone analizy pozwoliły wytypować dwie chemokiny CCL3 i CCL9 jako kluczowe dla rozwoju procesów nocyceptywnych na poziomie rdzenia kręgowego u myszy. Wyniki sugerują, że występująca u ludzi chemokina CCL3, jak i jej receptory CCR1 i CCR5, są ważnymi potencjalnymi punktami uchwytu dla terapii bólu neuropatycznego.

### III. Znaczenia osi XCL1/XCR1 oraz XCL1/ITGA9 poprzez wykazanie:

<i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>obecności receptorów XCR1 oraz ITGA9 oraz długotrwałego wzrostu poziomu XCL1 na poziomie rdzenia kręgowego</li> <li>że XCL1 jest wytwarzana przez astroglej, a XCR1 i ITGA9 są obecne na neuronach</li> </ul>
<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>że podpajęczynówkowe, jednorazowe podanie <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ XCL1 ma właściwości probólowe działając poprzez: <ul style="list-style-type: none"> <li>o typowy receptor chemokinowy XCR1</li> <li>o atypowy receptor chemokinowy ITGA9</li> </ul> </li> <li>➤ przeciwciała neutralizującego XCL1 powoduje: <ul style="list-style-type: none"> <li>o obniżenie rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne</li> <li>o lepsze efekty przeciwbólowe, po łącznym podaniu z morfiną</li> </ul> </li> <li>➤ antagonisty XCR1 powoduje: <ul style="list-style-type: none"> <li>o obniżenie rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne</li> <li>o lepsze efekty przeciwbólowe, po łącznym podaniu z buprenorfiną</li> </ul> </li> <li>➤ przeciwciała neutralizującego ITGA9 powoduje: <ul style="list-style-type: none"> <li>o obniżenie rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne</li> <li>o lepsze efekty przeciwbólowe, po łącznym podaniu z morfiną i/lub buprenorfiną</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

Nasze badania pokazują, że XCL1 działając poprzez oba receptory - XCR1 i ITGA9, przyczynia się do rozwoju procesów nocyceptywnych na poziomie rdzenia kręgowego. Spośród przebadanych receptorów, to atypowy ITGA9 wydaje się być bardziej obiecującym punktem uchwytu, jednak obydwie są godne uwagi w poszukiwaniu nowej strategii leczenia bólu neuropatycznego, również w skojarzeniu z lekami opioidowymi.

## 8. WNIOSKI KOŃCOWE

W modelu urazowego uszkodzenia mózgu u myszy wykazaliśmy wzrost poziomu markerów komórkowych neutrofilii w korze mózgowej, a ponadto mikrogleju/makrofażów i astrogleju w aż czterech badanych strukturach mózgu. Są to obszary niezwykle istotne w prawidłowym funkcjonowaniu: hipokamp (odpowiedzialny głównie za pamięć), wzgórze (za integrację informacji czuciowych i ruchowych oraz procesy uwagi), prążkowie (za napięcie i ukierunkowanie ruchów) oraz wreszcie będąca miejscem uszkodzenia kora mózgowa (za procesy związane z emocjami, motywacją, pamięcią i nocycepcją). Postulujemy więc, że modulacja wytypowanych komórek immunologicznych i glejowych może mieć znaczący potencjał terapeutyczny, szczególnie biorąc pod uwagę wydzielane przez nie czynniki immunologiczne jakimi są inicjatory układu dopełniacza, a także chemokiny o silnie probólowym działaniu. Dowiedliśmy, że ekspresja składników kompleksu C1 (*C1q, C1r, C1s*), który inicjuje klasyczną drogę aktywacji układu dopełniacza jest nasiloną we wszystkich badanych strukturach mózgu, natomiast spośród inicjatorów lektynowej drogi - tylko *ficoliny A*. Wyniki badań wykonanych w warunkach *in vitro* sugerują, że komórki mikrogleju są w dużej mierze odpowiedzialne za biosyntezę inicjatorów szlaku klasycznego, ale w niewielkim stopniu lektynowego. W naszej opinii silna aktywacja inicjatorów układu dopełniacza do pewnego stopnia odpowiada za rozwój wtórnych zmian, a ich blokowanie może stać się ważnym, nowym podejściem terapeutycznym. Ponadto, wykazane po raz pierwszy zmiany w poziomie chemokin (CCL3, CCL4, CCL9 i XCL1) oraz ich receptorów (CCR1, CCR5, XCR1, ITGA9) po uszkodzeniu mózgu sugerują, że również one, bądź ich analogi, mogą stanowić obiecujące punkty uchwytu do przyszłych farmakoterapii urazów ośrodkowego układu nerwowego.

Wyniki uzyskane na poziomie rdzenia kręgowego w modelu uszkodzenia nerwu kulszowego, także wskazują na silne zaangażowanie komórek mikrogleju/makrofażów i astrogleju w obserwowane procesy immunologiczne. Natomiast inaczej niż po bezpośrednim uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego, zaobserwowaliśmy znaczny wzrost poziomu CCL3, CCL9, ale nie CCL4. Ponadto, nasze eksperymenty ujawniły potencjał przeciwbólowy zarówno przeciwciał neutralizujących chemokiny CCL3 i CCL9, jak również antagonistów CCR1 (J113863) i CCR5 (TAK-220, AZD-5672). Co więcej, zastosowane narzędzia farmakologiczne wykazały lepsze działanie przeciwbólowe po łącznych podaniach z morfiną, co w przyszłości może skutkować możliwością zastosowania leków o podobnym mechanizmie działania w terapii skojarzonej z opioidami. Uzyskane wyniki są spójne z danymi literaturowymi wskazującymi, że receptory chemokinowe mogą tworzyć heterodimery z receptorami opioidowymi, z tego powodu uważamy że ich zablokowanie korzystnie wpływa na przeciwbólowe efekty agonistów opioidowych. Biorąc pod uwagę fakt, że CCL9 nie występuje u ludzi uważamy, że ważną częścią terapii po uszkodzeniach układu nerwowego powinno stać się przede wszystkim poszukiwanie leków obniżających poziom CCL3, a także blokujących CCR1 i CCR5. Ponadto, rezultaty naszych badań wskazują, że silne pronocyceptywne efekty XCL1 są związane z neuronalną lokalizacją jej receptorów - XCR1 i ITGA9, a dodatkowo wskazują na receptor ITGA9 jako szczególnie obiecujący punkt uchwytu dla przyszłych strategii terapeutycznych. Co ważne farmakologiczna blokada zarówno ITGA9, XCR1 jak i XCL1 jest korzystna w przypadku terapii skojarzonej z opioidami o różnym mechanizmie działania.

**Wyniki badań będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują, że mechanizmy zachodzące zarówno na poziomie mózgu po jego bezpośrednim urazie, jak i na poziomie rdzenia kręgowego po uszkodzeniu nerwu kulszowego mają w znacznym stopniu wspólne podłoże immunologiczne. Uzyskane dane pozwalają wnioskować, że częścią przyszłej terapii zaburzeń funkcjonowania układu nerwowego po jego uszkodzeniu powinno stać się zastosowanie substancji modulujących funkcje komórek immunologicznych oraz glejowych. Ponadto, dokładniejsze zrozumienie zaangażowania inicjatorów układu dopełniacza, a także poszczególnych chemokin może doprowadzić do powstania innowacyjnych i skutecznych farmakoterapii skojarzonych o mniejszym ryzyku skutków niepożądanych. Jednak konieczne są dalsze prace eksperymentalne, ponieważ postęp w medycynie jest ograniczony zarówno przez etyczne jak i metodologiczne problemy związane z prowadzeniem badań na poziomie układu nerwowego.**



## 9. PIŚMIENNICTWO

- 1 James SL, Bannick MS, Montjoy-Venning WC, Lucchesi LR, Dandona L, Dandona R *et al.* Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 2019; **18**. doi:10.1016/S1474-4422(18)30415-0.
- 2 Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Punchak M *et al.* Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2019; **130**. doi:10.3171/2017.10.JNS17352.
- 3 NIH (National Institutes of Health) Traumatic brain injury information. <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/traumatic-brain-injury-tbi>.
- 4 Bouras M, Asehnoune K, Roquilly A. Immune modulation after traumatic brain injury. *Front. Med.* 2022; **9**. doi:10.3389/fmed.2022.995044.
- 5 Mira RG, Lira M, Cerpa W. Traumatic Brain Injury: Mechanisms of Glial Response. *Front. Physiol.* 2021; **12**. doi:10.3389/fphys.2021.740939.
- 6 Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Widespread tau and amyloid-beta pathology many years after a single traumatic brain injury in humans. *Brain Pathol* 2012; **22**. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00513.x.
- 7 Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, Roberts GW.  $\beta$ -Amyloid precursor protein ( $\beta$ APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 1993; **160**. doi:10.1016/0304-3940(93)90398-5.
- 8 Graham NSN, Sharp DJ. Understanding neurodegeneration after traumatic brain injury: From mechanisms to clinical trials in dementia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2019; **90**. doi:10.1136/jnnp-2017-317557.
- 9 Scheid R, Walther K, Guthke T, Preul C, Von Cramon DY. Cognitive sequelae of diffuse axonal injury. *Arch Neurol* 2006; **63**. doi:10.1001/archneur.63.3.418.
- 10 Sariaslan A, Sharp DJ, D'Onofrio BM, Larsson H, Fazel S. Long-Term Outcomes Associated with Traumatic Brain Injury in Childhood and Adolescence: A Nationwide Swedish Cohort Study of a Wide Range of Medical and Social Outcomes. *PLOS Med* 2016; **13**. doi:10.1371/journal.pmed.1002103.
- 11 Li Y, Li Y, Li X, Zhang S, Zhao J, Zhu X *et al.* Head injury as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of 32 observational studies. *PLoS One* 2017; **12**. doi:10.1371/journal.pone.0169650.
- 12 Nordström A, Nordström P. Traumatic brain injury and the risk of dementia diagnosis: A nationwide cohort study. *PLoS Med* 2018; **15**. doi:10.1371/journal.pmed.1002496.
- 13 Fann JR, Ribe AR, Pedersen HS, Fenger-Grøn M, Christensen J, Benros ME *et al.* Long-term risk of dementia among people with traumatic brain injury in Denmark: a population-based observational cohort study. *The Lancet Psychiatry* 2018; **5**. doi:10.1016/S2215-0366(18)30065-8.
- 14 Bao W, Lin Y, Chen Z. The peripheral immune system and traumatic brain injury: Insight into the role of t-helper cells. *Int. J. Med. Sci.* 2021; **18**. doi:10.7150/ijms.46834.
- 15 Osthoff M, Walder B, Delhumeau C, Trendelenburg M, Turck N. Association of Lectin Pathway Protein Levels and Genetic Variants Early after Injury with Outcomes after Severe Traumatic Brain Injury: A Prospective Cohort Study. *J. Neurotrauma.* 2017; **34**. doi:10.1089/neu.2016.4941.
- 16 Das M, Mohapatra S, Mohapatra SS. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 2012; **9**. doi:10.1186/1742-2094-9-236.
- 17 Utagawa A, Truettner JS, Dietrich WD, Bramlett HM. Systemic inflammation exacerbates behavioral and histopathological consequences of isolated traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol* 2008; **211**. doi:10.1016/j.expneurol.2008.02.001.
- 18 Gentleman SM, Leclercq PD, Moyes L, Graham DI, Smith C, Griffin WST *et al.* Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. In: *Forensic Science International.* 2004 doi:10.1016/j.forsciint.2004.06.027.
- 19 Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol* 2015; **72**. doi:10.1001/jamaneurol.2014.3558.

- 20 Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 2018; **285**. doi:10.1111/febs.14466.
- 21 Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: Opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun* 2012; **26**. doi:10.1016/j.bbi.2012.06.008.
- 22 Irvine KA, David Clark J. Chronic pain after traumatic brain injury: Pathophysiology and pain mechanisms. *Pain Med (United States)* 2018; **19**. doi:10.1093/pm/pnx153.
- 23 Smith-Seemiller L, Fow NR, Kant R, Franzen MD. Presence of post-concussion syndrome symptoms in patients with chronic pain vs mild traumatic brain injury. *Brain Inj* 2003; **17**. doi:10.1080/0269905021000030823.
- 24 Dobscha SK, Clark ME, Morasco BJ, Freeman M, Campbell R, Helfand M. Systematic review of the literature on pain in patients with polytrauma including traumatic brain injury. *Pain Med* 2009; **10**. doi:10.1111/j.1526-4637.2009.00721.x.
- 25 Lucas S. Posttraumatic Headache: Clinical Characterization and Management. *Curr. Pain Headache Rep.* 2015; **19**. doi:10.1007/s11916-015-0520-1.
- 26 Bose P, Hou J, Nelson R, Nissim N, Parmer R, Keener J *et al.* Effects of acute intrathecal baclofen in an animal model of tbi-induced spasticity, cognitive, and balance disabilities. *J Neurotrauma* 2013; **30**. doi:10.1089/neu.2012.2740.
- 27 Ofek H, Defrin R. The characteristics of chronic central pain after traumatic brain injury. *Pain* 2007; **131**. doi:10.1016/j.pain.2007.06.015.
- 28 Wordliczek J, Dobrogowski J. *Leczenie bólu*. PZWL, 2007.
- 29 Dobrogowski J, Zajączkowska R, Dutka J, Wordliczek J. Patofizjologia i klasyfikacja bólu. *Pol Przegląd Neurol* 2011; **7**: 20–30.
- 30 Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K, Woroń J, Wordliczek J. Mechanizmy przewodzenia bólu. Rola układu odpornościowego w regulacji odczuwania bólu. *Anestezjol i Ratow* 2010; **4**: 500–509.
- 31 Defrin R, Riabinin M, Feingold Y, Schreiber S, Pick CG. Deficient pain modulatory systems in patients with mild traumatic brain and chronic post-traumatic headache: Implications for its mechanism. *J Neurotrauma* 2015; **32**. doi:10.1089/neu.2014.3359.
- 32 Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res. Rev.* 2009; **60**. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.009.
- 33 Arakawa S, Nakamura S, Kawashima N, Nishiike S, Okuyama S. Antagonizing effects of VA-045 on reduced activity of rat locus coeruleus neurons following head injury or intravenous injection of clonidine. *Life Sci* 1995; **57**. doi:10.1016/0024-3205(95)02158-F.
- 34 Elliott MB, Oshinsky ML, Amenta PS, Awe OO, Jallo JI. Nociceptive neuropeptide increases and periorbital allodynia in a model of traumatic brain injury. *Headache.* 2012; **52**. doi:10.1111/j.1526-4610.2012.02160.x.
- 35 Wang Z, Wang Q, Wang C, Xu X, Yu H. Tetramethylpyrazine attenuates periorbital allodynia and neuroinflammation in a model of traumatic brain injury. *J Inflamm (United Kingdom)* 2017; **14**. doi:10.1186/s12950-017-0161-8.
- 36 Liang DY, Shi X, Liu P, Sun Y, Sahbaie P, Li WW *et al.* The chemokine receptor CXCR2 supports nociceptive sensitization after traumatic brain injury. *Mol Pain* 2017; **13**. doi:10.1177/1744806917730212.
- 37 Simon-O'Brien E, Gauthier D, Riban V, Verleye M. Etifoxine improves sensorimotor deficits and reduces glial activation, neuronal degeneration, and neuroinflammation in a rat model of traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 2016; **13**. doi:10.1186/s12974-016-0687-3.
- 38 Xing Z, Xia Z, Peng W, Li J, Zhang C, Fu C *et al.* Xuefu Zhuyu decoction, a traditional Chinese medicine, provides neuroprotection in a rat model of traumatic brain injury via an anti-inflammatory pathway. *Sci Rep* 2016; **6**. doi:10.1038/srep20040.
- 39 Holden SS, Grandi FC, Aboubakr O, Higashikubo B, Cho FS, Chang AH *et al.* Complement factor C1q mediates sleep spindle loss and epileptic spikes after mild brain injury. *Science (80-)* 2021; **373**. doi:10.1126/science.abj2685.
- 40 Lloyd E, Somera-Molina K, Van Eldik LJ, Watterson DM, Wainwright MS. Suppression of acute proinflammatory cytokine and chemokine upregulation by post-injury administration of a novel small molecule improves long-term neurologic outcome in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 2008; **5**. doi:10.1186/1742-2094-5-28.
- 41 Shi H, Wang HL, Pu HJ, Shi YJ, Zhang J, Zhang WT *et al.* Ethyl Pyruvate Protects against

- Blood-Brain Barrier Damage and Improves Long-term Neurological Outcomes in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *CNS Neurosci Ther* 2015; **21**. doi:10.1111/cns.12366.
- 42 Lee J, Costantini TW, D'Mello R, Eliceiri BP, Coimbra R, Bansal V. Altering leukocyte recruitment following traumatic brain injury with ghrelin therapy. *J Trauma Acute Care Surg* 2014; **77**. doi:10.1097/TA.0000000000000445.
- 43 Todd AJ. Nociceptive Circuitry in the Spinal Cord. In: *Encyclopedia of Pain*. 2006 doi:10.1007/978-3-540-29805-2\_2748.
- 44 Todd AJ. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol* 2002; **87**. doi:10.1113/eph8702351.
- 45 D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth.* 2008; **101**. doi:10.1093/bja/aen088.
- 46 Noble J, Munro CA, Prasad VSSV, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma - Inj Infect Crit Care* 1998; **45**. doi:10.1097/00005373-199807000-00025.
- 47 Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin. Neurophysiol.* 2008; **119**. doi:10.1016/j.clinph.2008.03.018.
- 48 Kretschmer T, Antoniadis G, Braun V, Rath SA, Richter HP. Evaluation of iatrogenic lesions in 722 surgically treated cases of peripheral nerve trauma. *J Neurosurg* 2001; **94**. doi:10.3171/jns.2001.94.6.0905.
- 49 Althagafi A, Mustafa N. Acute Nerve Injury. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549848/>.
- 50 Selecki B, Ring I, Simpson D, Vanderfield G, Sewell M. Trauma to the central and peripheral nervous systems. Part II: A statistical profile of surgical treatment New South Wales 1977. *Aust N Z J Surg* 1982; **52**. doi:10.1111/j.1445-2197.1982.tb06081.x.
- 51 L Stone; M A Keenan. Peripheral nerve injuries in the adult with traumatic brain injury. *Clin Orthop Relat Res* 1988; **233**: 136–144.
- 52 Alles SRA, Smith PA. Etiology and pharmacology of neuropathic pain. *Pharmacol Rev* 2018; **70**. doi:10.1124/pr.117.014399.
- 53 Kuner R, Flor H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2016; **18**. doi:10.1038/nrn.2016.162.
- 54 Rowbotham MC, Yosipovitch G, Connolly MK, Finlay D, Forde G, Fields HL. Cutaneous innervation density in the allodynic form of postherpetic neuralgia. *Neurobiol Dis* 1996; **3**. doi:10.1006/nbdi.1996.0021.
- 55 Ochoa JL, Campero M, Serra J, Bostock H. Hyperexcitable polymodal and insensitive nociceptors in painful human neuropathy. *Muscle and Nerve* 2005; **32**. doi:10.1002/mus.20367.
- 56 Reichling DB, Levine JD. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends Neurosci.* 2009; **32**. doi:10.1016/j.tins.2009.07.007.
- 57 Ratté S, Prescott SA. Afferent hyperexcitability in neuropathic pain and the inconvenient truth about its degeneracy. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2016; **36**. doi:10.1016/j.conb.2015.08.007.
- 58 Latremoliere A, Woolf CJ. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain* 2009; **10**. doi:10.1016/j.jpain.2009.06.012.
- 59 Novakovic SD, Tzoumaka E, McGivern JG, Haraguchi M, Sangameswaran L, Gogas KR *et al*. Distribution of the tetrodotoxin-resistant sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions. *J Neurosci* 1998; **18**. doi:10.1523/jneurosci.18-06-02174.1998.
- 60 Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron.* 2006; **52**. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.021.
- 61 Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J. Neuroinflammation.* 2011; **8**. doi:10.1186/1742-2094-8-110.
- 62 Huang LYM, Gu Y, Chen Y. Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia.* 2013; **61**. doi:10.1002/glia.22541.
- 63 McLachlan EM, Jänig W, Devor M, Michaelis M. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nat* 1993 3636429 1993; **363**. doi:10.1038/363543a0.
- 64 Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: Aetiology, symptoms, mechanisms, and

- management. *Lancet*. 1999; **353**. doi:10.1016/S0140-6736(99)01307-0.
- 65 Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 2009; **89**. doi:10.1152/physrev.00025.2008.
- 66 Study RE, Kral MG. Spontaneous action potential activity in isolated dorsal root ganglion neurons from rats with a painful neuropathy. *Pain* 1996; **65**. doi:10.1016/0304-3959(95)00216-2.
- 67 Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS. Neuropathic pain: From mechanisms to treatment. *Physiol Rev* 2021; **101**. doi:10.1152/physrev.00045.2019.
- 68 Muley MM, Krustev E, Reid AR, McDougall JJ. Prophylactic inhibition of neutrophil elastase prevents the development of chronic neuropathic pain in osteoarthritic mice. *J Neuroinflammation* 2017; **14**. doi:10.1186/s12974-017-0944-0.
- 69 Silva JR, Lopes AH, Talbot J, Cecilio NT, Rossato MF, Silva RL *et al*. Neuroimmune–glia interactions in the sensory ganglia account for the development of acute herpetic neuralgia. *J Neurosci* 2017; **37**. doi:10.1523/JNEUROSCI.2233-16.2017.
- 70 Lim H, Lee H, Noh K, Lee SJ. IKK/NF-B-dependent satellite glia activation induces spinal cord microglia activation and neuropathic pain after nerve injury. *Pain* 2017; **158**. doi:10.1097/j.pain.0000000000000959.
- 71 Purwata TE. High TNF-alpha plasma levels and macrophages iNOS and TNF-alpha expression as risk factors for painful diabetic neuropathy. *J Pain Res* 2011; **4**. doi:10.2147/JPR.S21751.
- 72 Kambrun C, Roca-Lapirot O, Salio C, Landry M, Moqrich A, Le Feuvre Y. TAFA4 Reverses Mechanical Allodynia through Activation of GABAergic Transmission and Microglial Process Retraction. *Cell Rep* 2018; **22**. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.068.
- 73 White FA, Jung H, Miller RJ. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**. doi:10.1073/pnas.0709250104.
- 74 Khatri N, Sumadhura B, Kumar S, Kaundal RK, Sharma S, Datusalia AK. The Complexity of Secondary Cascade Consequent to Traumatic Brain Injury: Pathobiology and Potential Treatments. *Curr Neuropharmacol* 2021; **19**. doi:10.2174/1570159x19666210215123914.
- 75 Tenner AJ, Stevens B, Woodruff TM. New tricks for an ancient system: Physiological and pathological roles of complement in the CNS. *Mol Immunol* 2018; **102**. doi:10.1016/j.molimm.2018.06.264.
- 76 Dalakas MC, Alexopoulos H, Spaeth PJ. Complement in neurological disorders and emerging complement-targeted therapeutics. *Nat. Rev. Neurol.* 2020; **16**. doi:10.1038/s41582-020-0400-0.
- 77 Sharp TH, Boyle AL, Diebolder CA, Kros A, Koster AJ, Gros P. Insights into IgM-mediated complement activation based on in situ structures of IgM-C1-C4b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; **116**. doi:10.1073/pnas.1901841116.
- 78 Almitairi JOM, Giriya UV, Furze CM, Simpson-Gray X, Badakshi F, Marshall JE *et al*. Structure of the C1r–C1s interaction of the C1 complex of complement activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; **115**. doi:10.1073/pnas.1718709115.
- 79 Klaska I, Nowak JZ. Rola dopełniacza w fizjologii i patologii. *Postepy Hig Med Dosw* 2007; **61**.
- 80 Nan R, Furze CM, Wright DW, Gor J, Wallis R, Perkins SJ. Flexibility in Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Proteases-1 and -2 Provides Insight on Lectin Pathway Activation. *Structure* 2017; **25**. doi:10.1016/j.str.2016.12.014.
- 81 Schwaeble WJ, Lynch NJ, Clark JE, Marber M, Samani NJ, Ali YM *et al*. Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**. doi:10.1073/pnas.1101748108.
- 82 Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K *et al*. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997; **386**. doi:10.1038/386506a0.
- 83 Nauser CL, Howard MC, Fanelli G, Farrar CA, Sacks S. Collectin-11 (CL-11) is a major sentinel at epithelial surfaces and key pattern recognition molecule in complement-mediated ischaemic injury. *Front Immunol* 2018; **9**. doi:10.3389/fimmu.2018.02023.
- 84 Fritzing DC, Benjamin DE. The Complement System in Neuropathic and Postoperative Pain. *Open Pain J* 2016; **9**. doi:10.2174/1876386301609010026.
- 85 Griffin RS, Costigan M, Brenner GJ, Ma CHE, Scholz J, Moss A *et al*. Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity. *J Neurosci* 2007; **27**. doi:10.1523/JNEUROSCI.2018-07.2007.

- 86 Xu M, Bennett DLH, Querol LA, Wu LJ, Irani SR, Watson JC *et al.* Pain and the immune system: emerging concepts of IgG-mediated autoimmune pain and immunotherapies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2020; **91**. doi:10.1136/jnnp-2018-318556.
- 87 Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, Ho TW, Cornblath DR, McKhann GM *et al.* Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 1996; **39**. doi:10.1002/ana.410390512.
- 88 Dalakas MC, Engel WK. Immunoglobulin and Complement Deposits in Nerves of Patients with Chronic Relapsing Polyneuropathy. *Arch Neurol* 1980; **37**. doi:10.1001/archneur.1980.00500590061010.
- 89 Quast I, Keller CW, Hiepe F, Tackenberg B, Lünemann JD. Terminal complement activation is increased and associated with disease severity in CIDP. *Ann Clin Transl Neurol* 2016; **3**. doi:10.1002/acn3.331.
- 90 Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; **47**. doi:10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q.
- 91 Ingram G, Hakobyan S, Robertson NP, Morgan BP. Elevated plasma C4a levels in multiple sclerosis correlate with disease activity. *J Neuroimmunol* 2010; **223**. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.03.014.
- 92 Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL *et al.* Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; **50**. doi:10.1002/ana.1255.
- 93 Ingram G, Loveless S, Howell OW, Hakobyan S, Dancey B, Harris CL *et al.* Complement activation in multiple sclerosis plaques: An immunohistochemical analysis. *Acta Neuropathol Commun* 2014; **2**. doi:10.1186/2051-5960-2-53.
- 94 Sta M, Sylva-Steenland RMR, Casula M, de Jong JMBV, Troost D, Aronica E *et al.* Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: Evidence of complement activation. *Neurobiol Dis* 2011; **42**. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.002.
- 95 Dalmau J, Graus F. Antibody-Mediated Encephalitis. *N Engl J Med* 2018; **378**. doi:10.1056/nejmra1708712.
- 96 Stoltzner SE, Grenfell TJ, Mori C, Wisniewski KE, Wisniewski TM, Selkoe DJ *et al.* Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2000; **156**. doi:10.1016/S0002-9440(10)64753-0.
- 97 Singhrao SK, Neal JW, Morgan BP, Gasque P. Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Exp Neurol* 1999; **159**. doi:10.1006/exnr.1999.7170.
- 98 Sekar A, Bialas AR, De Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N *et al.* Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 2016; **530**. doi:10.1038/nature16549.
- 99 Gao H, Han Z, Bai R, Huang S, Ge X, Chen F *et al.* The accumulation of brain injury leads to severe neuropathological and neurobehavioral changes after repetitive mild traumatic brain injury. *Brain Res* 2017; **1657**. doi:10.1016/j.brainres.2016.11.028.
- 100 Hammad A, Westacott L, Zaben M. The role of the complement system in traumatic brain injury: a review. *J Neuroinflammation* 2018; **15**. doi:10.1186/S12974-018-1066-Z.
- 101 Färber K, Cheung G, Mitchell D, Wallis R, Weibe E, Schwaeble W *et al.* C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation. *J Neurosci Res* 2009; **87**. doi:10.1002/jnr.21875.
- 102 Krukowski K, Chou A, Feng X, Tired B, Paladini MS, Riparip LK *et al.* Traumatic brain injury in aged mice induces chronic microglia activation, synapse loss, and complement-dependent memory deficits. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. doi:10.3390/ijms19123753.
- 103 Mercurio D, Oggioni M, Fumagalli S, Lynch NJ, Roscher S, Minuta D *et al.* Targeted deletions of complement lectin pathway genes improve outcome in traumatic brain injury, with MASP-2 playing a major role. *Acta Neuropathol Commun* 2020; **8**. doi:10.1186/s40478-020-01041-1.
- 104 Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000; **12**. doi:10.1016/S1074-7613(00)80165-X.
- 105 Kwiatkowski K, Mika J. The importance of chemokines in neuropathic pain development and opioid analgesic potency. *Pharmacol Reports* 2018; **70**. doi:10.1016/j.pharep.2018.01.006.
- 106 Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, Makuch W, Mika J. The RS504393 Influences the

- Level of Nociceptive Factors and Enhances Opioid Analgesic Potency in Neuropathic Rats. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2017; **12**. doi:10.1007/s11481-017-9729-6.
- 107 Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; **270**. doi:10.1126/science.270.5243.1811.
- 108 Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13**. doi:10.1016/S1359-6101(02)00045-X.
- 109 Gyoneva S, Ransohoff RM. Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines. *Trends Pharmacol Sci* 2015; **36**. doi:10.1016/j.tips.2015.04.003.
- 110 Losy J, Zaremba J. Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke* 2001; **32**. doi:10.1161/hs1101.097380.
- 111 Stowe AM, Wacker BK, Cravens PD, Perfater JL, Li MK, Hu R *et al.* CCL2 upregulation triggers hypoxic preconditioning-induced protection from stroke. *J Neuroinflammation* 2012; **9**. doi:10.1186/1742-2094-9-33.
- 112 Arakelyan A, Petrkova J, Hermanova Z, Boyajyan A, Lukl J, Petrek M. Serum levels of the MCP-1 chemokine in patients with ischemic stroke and myocardial infarction. *Mediators Inflamm* 2005; **2005**. doi:10.1155/MI.2005.175.
- 113 Lumpkins K, Bochicchio G V., Zagol B, Ulloa K, Simard JM, Schaub S *et al.* Plasma levels of the beta chemokine regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted (RANTES) correlate with severe brain injury. *J Trauma - Inj Infect Crit Care* 2008; **64**. doi:10.1097/TA.0b013e318160df9b.
- 114 Popiolek-Barczyk K, Ciechanowska A, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D *et al.* The CCL2/CCL7/CCL12/CCR2 pathway is substantially and persistently upregulated in mice after traumatic brain injury, and CCL2 modulates the complement system in microglia. *Mol Cell Probes* 2020; **54**. doi:10.1016/j.mcp.2020.101671.
- 115 Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, Kreiner G, Nalepa I, Mika J. Spinal CCL1/CCR8 signaling interplay as a potential therapeutic target – Evidence from a mouse diabetic neuropathy model. *Int Immunopharmacol* 2017; **52**. doi:10.1016/j.intimp.2017.09.021.
- 116 Kwiatkowski K, Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, Rojewska E, Ciapała K, Makuch W *et al.* Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. *Cytokine* 2019; **119**. doi:10.1016/j.cyto.2019.03.007.
- 117 Pawlik K, Ciapała K, Ciechanowska A, Kwiatkowski K, Mika J. Pharmacological Evidence of the Important Roles of CCR1 and CCR3 and Their Endogenous Ligands CCL2/7/8 in Hypersensitivity Based on a Murine Model of Neuropathic Pain. *Cells* 2023; **12**. doi:10.3390/cells12010098.
- 118 Rojewska E, Zychowska M, Piotrowska A, Kreiner G, Nalepa I, Mika J. Involvement of Macrophage Inflammatory Protein-1 Family Members in the Development of Diabetic Neuropathy and Their Contribution to Effectiveness of Morphine. *Front Immunol* 2018; **9**. doi:10.3389/fimmu.2018.00494.
- 119 Bogacka J, Ciapała K, Pawlik K, Kwiatkowski K, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A *et al.* CCR4 Antagonist (C021) Administration Diminishes Hypersensitivity and Enhances the Analgesic Potency of Morphine and Buprenorphine in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Front Immunol* 2020; **11**. doi:10.3389/fimmu.2020.01241.
- 120 Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W *et al.* Pharmacological blockade of CXCR3 by (±)-NBI-74330 reduces neuropathic pain and enhances opioid effectiveness - Evidence from in vivo and in vitro studies. *BBA- Mol Basis Dis* 2018; **1864**. doi:10.1016/j.bbadis.2018.07.032.
- 121 Pawlik K, Ciechanowska A, Ciapała K, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Blockade of CC Chemokine Receptor Type 3 Diminishes Pain and Enhances Opioid Analgesic Potency in a Model of Neuropathic Pain. *Front Immunol* 2021; **12**. doi:10.3389/fimmu.2021.781310.
- 122 Bogacka J, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Rojewska E *et al.* CCR4 antagonist (C021) influences the level of nociceptive factors and enhances the analgesic potency of morphine in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2020; **880**. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173166.

- 123 Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, Makuch W, Jurga A, Slusarczyk J *et al.* Beneficial properties of maraviroc on neuropathic pain development and opioid effectiveness in rats. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2016; **64**. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.07.005.
- 124 Zychowska M, Rojewska E, Pilat D, Mika J. The role of some chemokines from the CXC subfamily in a mouse model of diabetic neuropathy. *J Diabetes Res* 2015; **2015**. doi:10.1155/2015/750182.
- 125 Jiang BC, Cao DL, Zhang X, Zhang ZJ, He LN, Li CH *et al.* CXCL13 drives spinal astrocyte activation and neuropathic pain via CXCR5. *J Clin Invest* 2016; **126**. doi:10.1172/JCI81950.
- 126 Rojewska E, Ciapała K, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. *Pharmacol Reports* 2019; **71**. doi:10.1016/j.pharep.2018.10.002.
- 127 Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, Ciapała K *et al.* New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies. *Front Immunol* 2022; **13**. doi:10.3389/FIMMU.2022.1058204.
- 128 Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, Kreiner G, Mika J. Microglial Inhibition Influences XCL1/XCR1 Expression and Causes Analgesic Effects in a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *Anesthesiology* 2016; **125**. doi:10.1097/ALN.0000000000001219.
- 129 Staniland AA, Clark AK, Wodarski R, Sasso O, Maione F, D'Acquisto F *et al.* Reduced inflammatory and neuropathic pain and decreased spinal microglial response in fractalkine receptor (CX3CR1) knockout mice. *J Neurochem* 2010; **114**. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06837.x.
- 130 Hou H, Li J, Wang J, Zhou L, Li J, Liang J *et al.* ITGA9 Inhibits Proliferation and Migration of Dermal Microvascular Endothelial Cells in Psoriasis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2022; **15**. doi:10.2147/CCID.S394398.
- 131 Reyes N, Benedetti I, Rebollo J, Correa O, Geliebter J. Atypical chemokine receptor CCRL2 is overexpressed in prostate cancer cells. *J Biomed Res* 2019; **33**. doi:10.7555/JBR.32.20170057.
- 132 Salvi V, Sozio F, Sozzani S, Prete A Del. Role of atypical chemokine receptors in microglial activation and polarization. *Front. Aging Neurosci.* 2017; **9**. doi:10.3389/fnagi.2017.00148.
- 133 Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, Dimitrova S, Zsak M, Middleton J *et al.* The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol* 2009; **10**. doi:10.1038/ni.1675.
- 134 Hansell CA, Maclellan LM, Oldham RS, Doonan J, Chapple KJ, Anderson EJR *et al.* The atypical chemokine receptor ACKR2 suppresses Th17 responses to protein autoantigens. *Immunol Cell Biol* 2015; **93**. doi:10.1038/icb.2014.90.
- 135 Banisadr G, Podojil JR, Miller SD, Miller RJ. Pattern of CXCR7 Gene Expression in Mouse Brain Under Normal and Inflammatory Conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 2016; **11**. doi:10.1007/s11481-015-9616-y.
- 136 Friess MC, Kritikos I, Schineis P, Medina-Sanchez JD, Gkountidi AO, Vallone A *et al.* Mechanosensitive ACKR4 scavenges CCR7 chemokines to facilitate T cell de-adhesion and passive transport by flow in inflamed afferent lymphatics. *Cell Rep* 2022; **38**. doi:10.1016/j.celrep.2022.110334.
- 137 Akimoto N, Honda K, Uta D, Beppu K, Ushijima Y, Matsuzaki Y *et al.* CCL-1 in the spinal cord contributes to neuropathic pain induced by nerve injury. *Cell Death Dis* 2013; **4**. doi:10.1038/cddis.2013.198.
- 138 Gao YJ, Zhang L, Samad OA, Suter MR, Yasuhiko K, Xu ZZ *et al.* JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci* 2009; **29**. doi:10.1523/JNEUROSCI.3623-08.2009.
- 139 Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T, Saika F, Kishioka S. CC-chemokine MIP-1 $\alpha$  in the spinal cord contributes to nerve injury-induced neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2010; **484**. doi:10.1016/j.neulet.2010.07.085.
- 140 Silva JR, Iftinca M, Gomes FIF, Segal JP, Smith OMA, Bannerman CA *et al.* Skin-resident dendritic cells mediate postoperative pain via CCR4 on sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; **119**. doi:10.1073/pnas.2118238119.
- 141 Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W *et al.*

- Pharmacological blockade of spinal CXCL3/CXCR2 signaling by NVP CXCR2 20, a selective CXCR2 antagonist, reduces neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Front Immunol* 2019; **10**. doi:10.3389/fimmu.2019.02198.
- 142 Rowe RK, Ellis GI, Harrison JL, Bachstetter AD, Corder GF, Van Eldik LJ *et al*. Diffuse traumatic brain injury induces prolonged immune dysregulation and potentiates hyperalgesia following a peripheral immune challenge. *Mol Pain* 2016; **12**. doi:10.1177/1744806916647055.
- 143 Helmy A, Antoniadou CA, Guilfoyle MR, Carpenter KLH, Hutchinson PJ. Principal component analysis of the Cytokine and Chemokine response to human traumatic brain injury. *PLoS One* 2012; **7**. doi:10.1371/journal.pone.0039677.
- 144 Sahbaie P, Irvine KA, Liang DY, Shi X, Clark JD. Mild Traumatic Brain Injury Causes Nociceptive Sensitization through Spinal Chemokine Upregulation. *Sci Rep* 2019; **9**. doi:10.1038/s41598-019-55739-x.
- 145 Chen Y, Wang Y, Xu J, Hou T, Zhu J, Jiang Y *et al*. Multiplex Assessment of Serum Chemokines CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL10, and CXCL13 Following Traumatic Brain Injury. *Inflammation* 2023; **46**. doi:10.1007/s10753-022-01729-7.
- 146 Lee TS, Mane S, Eid T, Zhao H, Lin A, Guan Z *et al*. Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes. *Mol Med* 2007; **13**. doi:10.2119/2006-00079.Lee.
- 147 Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim JH, Kang KM, Song EC *et al*. Region-specific plasticity in the epileptic rat brain: A hippocampal and extrahippocampal analysis. *Epilepsia* 2009; **50**. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01718.x.
- 148 Liu ZY, Song ZW, Guo SW, He JS, Wang SY, Zhu JG *et al*. CXCL12/CXCR4 signaling contributes to neuropathic pain via central sensitization mechanisms in a rat spinal nerve ligation model. *CNS Neurosci Ther* 2019; **25**. doi:10.1111/cns.13128.
- 149 Liu M, Zhang SB, Luo YX, Yang YL, Zhang XZ, Li B *et al*. NFATc2-dependent epigenetic upregulation of CXCL14 is involved in the development of neuropathic pain induced by paclitaxel. *J Neuroinflammation* 2020; **17**. doi:10.1186/s12974-020-01992-1.
- 150 Dubovy P, Klusakova I, Svizenska I, Brazda V. Spatio-temporal changes of SDF1 and its CXCR4 receptor in the dorsal root ganglia following unilateral sciatic nerve injury as a model of neuropathic pain. *Histochem Cell Biol* 2010; **133**. doi:10.1007/s00418-010-0675-0.
- 151 Lindia JA, McGowan E, Jochnowitz N, Abbadie C. Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. *J Pain* 2005; **6**. doi:10.1016/j.jpain.2005.02.001.
- 152 Zhang ZJ, Cao DL, Zhang X, Ji RR, Gao YJ. Chemokine contribution to neuropathic pain: Respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons. *Pain* 2013; **154**. doi:10.1016/j.pain.2013.07.002.
- 153 Strong JA, Xie W, Coyle DE, Zhang JM. Microarray analysis of rat sensory ganglia after local inflammation implicates novel cytokines in pain. *PLoS One* 2012; **7**. doi:10.1371/journal.pone.0040779.
- 154 Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W *et al*. Dataset of (±)-NBI-74330 (CXCR3 antagonist) influence on chemokines under neuropathic pain. *Data Br* 2018; **21**. doi:10.1016/j.dib.2018.10.091.
- 155 Lei Y, Takahama Y. XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect* 2012; **14**. doi:10.1016/j.micinf.2011.10.003.
- 156 Fox JC, Nakayama T, Tyler RC, Sander TL, Yoshie O, Volkman BF. Structural and agonist properties of XCL2, the other member of the C-chemokine subfamily. *Cytokine* 2015; **71**. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.010.
- 157 Xu F, He D, Ning R, Zeng B, Thompson CW, Li Y *et al*. Genetic diversity of chemokine XCL1 and its receptor XCR1 in murine rodents. *Dev Comp Immunol* 2019; **98**. doi:10.1016/j.dci.2019.04.008.
- 158 Matsumoto N, Kon S, Nakatsuru T, Miyashita T, Inui K, Saitoh K *et al*. A Novel  $\alpha 9$  Integrin Ligand, XCL1/Lymphotactin, Is Involved in the Development of Murine Models of Autoimmune Diseases. *J Immunol* 2017; **199**. doi:10.4049/jimmunol.1601329.
- 159 Milligan ED, Sloane EM, Watkins LR. Glia in pathological pain: A role for fractalkine. *J Neuroimmunol* 2008; **198**. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.04.011.



- 160 Subbarayan MS, Joly-Amado A, Bickford PC, Nash KR. CX3CL1/CX3CR1 signaling targets for the treatment of neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Ther.* 2022; **231**. doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107989.
- 161 Clausen F, Marklund N, Hillered L. Acute Inflammatory Biomarker Responses to Diffuse Traumatic Brain Injury in the Rat Monitored by a Novel Microdialysis Technique. *J Neurotrauma* 2019; **36**. doi:10.1089/neu.2018.5636.
- 162 Wang J, Zhang XS, Tao R, Zhang J, Liu L, Jiang YH *et al.* Upregulation of CX3CL1 mediated by NF- $\kappa$ B activation in dorsal root ganglion contributes to peripheral sensitization and chronic pain induced by oxaliplatin administration. *Mol Pain* 2017; **13**. doi:10.1177/1744806917726256.
- 163 Verge GM, Milligan ED, Maier SF, Watkins LR, Naeve GS, Foster AC. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur J Neurosci* 2004; **20**. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03593.x.
- 164 Pawelec P, Ziemka-Nalecz M, Sypecka J, Zalewska T. The Impact of the CX3CL1/CX3CR1 Axis in Neurological Disorders. *Cells* 2020; **9**. doi:10.3390/cells9102277.
- 165 Chen G, Zhou Z, Sha W, Wang L, Yan F, Yang X *et al.* A novel CX3CR1 inhibitor AZD8797 facilitates early recovery of rat acute spinal cord injury by inhibiting inflammation and apoptosis. *Int J Mol Med* 2020; **45**. doi:10.3892/ijmm.2020.4509.
- 166 Zhu X, Liu J, Chen O, Xue J, Huang S, Zhu W *et al.* Neuroprotective and anti-inflammatory effects of isoliquiritigenin in kainic acid-induced epileptic rats via the TLR4/MYD88 signaling pathway. *Inflammopharmacology* 2019. doi:10.1007/s10787-019-00592-7.
- 167 Zhu X, Wei D, Chen O, Zhang Z, Xue J, Huang S *et al.* Upregulation of CCL3/MIP-1 $\alpha$  regulated by MAPKs and NF-kappaB mediates microglial inflammatory response in LPS-induced brain injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2016; **76**. doi:10.21307/ane-2017-029.
- 168 Sun S, Chen D, Lin F, Chen M, Yu H, Hou L *et al.* Role of interleukin-4, the chemokine CCL3 and its receptor CCR5 in neuropathic pain. *Mol Immunol* 2016; **77**. doi:10.1016/j.molimm.2016.08.006.
- 169 Pawlik K, Piotrowska A, Kwiatkowski K, Ciapała K, Popiolek-Barczyk K, Makuch W *et al.* The blockade of CC chemokine receptor type 1 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in a rat model of neuropathic pain. *Immunology* 2020; **159**. doi:10.1111/imm.13172.
- 170 Kwiatkowski K, Ciapała K, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Comparison of the beneficial effects of RS504393, maraviroc and cenicriviroc on neuropathic pain-related symptoms in rodents: behavioral and biochemical analyses. *Int Immunopharmacol* 2020; **84**. doi:10.1016/j.intimp.2020.106540.
- 171 Förstner P, Rehman R, Anastasiadou S, Haffner-Luntzer M, Sinske D, Ignatius A *et al.* Neuroinflammation after Traumatic Brain Injury Is Enhanced in Activating Transcription Factor 3 Mutant Mice. *J Neurotrauma* 2018; **35**. doi:10.1089/neu.2017.5593.
- 172 Stefani R, Catenacci E, Piva S, Sozzani S, Valerio A, Bergomi R *et al.* Chemokine detection in the cerebral tissue of patients with posttraumatic brain contusions. *J Neurosurg* 2008; **108**. doi:10.3171/JNS/2008/108/5/0958.
- 173 Karpus WJ, Kennedy KJ. MIP-1 $\alpha$  and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol* 1997; **62**: 681–687.
- 174 Karpus WJ, Lukacs NW, McRae BL, Strieter RM, Kunkel SL, Miller SD. An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1995; **155**. doi:10.4049/jimmunol.155.10.5003.
- 175 Kennedy KJ, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW, Karpus WJA and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the C chemokines macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1. *J Neuroimmunol* 1998; **92**. doi:10.1016/S0165-5728(98)00187-8.
- 176 Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;

36. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.019.
- 177 Rottman, Slavin, Silva, Weiner G. Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent. *Eur J Immunol* 2000; **30**. doi:10.1002/1521-4141(2000)30:8<2372::AID-IMMU2372>3.0.CO;2-D.
- 178 Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 $\alpha$  and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**. doi:10.1073/pnas.96.12.6873.
- 179 Barcellos LF, Schito AM, Rimmler JB, Vittinghoff E, Shih A, Lincoln R *et al*. CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. *Immunogenetics* 2000; **51**. doi:10.1007/s002510050621.
- 180 Sellebjerg F, Madsen HO, Jensen C V., Jensen J, Garred P. CCR5  $\Delta$ 32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; **102**. doi:10.1016/S0165-5728(99)00166-6.
- 181 Joy MT, Ben Assayag E, Shabashov-Stone D, Liraz-Zaltsman S, Mazzitelli J, Arenas M *et al*. CCR5 Is a Therapeutic Target for Recovery after Stroke and Traumatic Brain Injury. *Cell* 2019; **176**. doi:10.1016/j.cell.2019.01.044.
- 182 Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber M *et al*. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; **382**. doi:10.1038/382722a0.
- 183 Maayan S, Zhang L, Shinar E, Ho J, He T, Manni N *et al*. Evidence for recent selection of the CCR5- $\Delta$ 32 deletion from differences in its frequency between Ashkenazi and Sephardi Jews. *Genes Immun* 2000; **1**. doi:10.1038/sj.gene.6363690.
- 184 Yan J, Xu W, Lenahan C, Huang L, Wen J, Li G *et al*. CCR5 activation promotes NLRP1-dependent neuronal pyroptosis via CCR5/PKA/CREB pathway after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2021; **52**. doi:10.1161/STROKEAHA.120.033285.
- 185 Liu XL, Sun DD, Zheng MT, Li XT, Niu HH, Zhang L *et al*. Maraviroc promotes recovery from traumatic brain injury in mice by suppression of neuroinflammation and activation of neurotoxic reactive astrocytes. *Neural Regen Res* 2023; **18**. doi:10.4103/1673-5374.344829.
- 186 Piotrowska A, Kwiatkowski K, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Maraviroc reduces neuropathic pain through polarization of microglia and astroglia - Evidence from in vivo and in vitro studies. *Neuropharmacology* 2016; **108**. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.04.024.
- 187 Wang CR, Liu MF, Huang YH, Chen HC. Up-regulation of XCR1 expression in rheumatoid joints. *Rheumatology* 2004; **43**. doi:10.1093/rheumatology/keh147.
- 188 Khurram SA, Whawell SA, Bingle L, Murdoch C, McCabe BM, Farthing PM. Functional expression of the chemokine receptor XCR1 on oral epithelial cells. *J Pathol* 2010; **221**. doi:10.1002/path.2695.
- 189 Kiaii S, Kokhaei P, Mozaffari F, Rossmann E, Pak F, Moshfegh A *et al*. T cells from indolent CLL patients prevent apoptosis of leukemic B cells in vitro and have altered gene expression profile. *Cancer Immunol Immunother* 2013; **62**. doi:10.1007/s00262-012-1300-y.
- 190 Middel P, Thelen P, Blaschke S, Polzien F, Reich K, Blaschke V *et al*. Expression of the T-cell chemoattractant chemokine lymphotactin in Crohn's disease. *Am J Pathol* 2001; **159**. doi:10.1016/S0002-9440(10)63022-2.
- 191 Guzzo C, Fox J, Lin Y, Miao H, Cimbri R, Volkman BF *et al*. The CD8-Derived Chemokine XCL1/Lymphotactin Is a Conformation-Dependent, Broad-Spectrum Inhibitor of HIV-1. *PLoS Pathog* 2013; **9**. doi:10.1371/journal.ppat.1003852.
- 192 Bird E V., Iannitti T, Christmas CR, Obara I, Andreev VI, King AE *et al*. A Novel Role for Lymphotactin (XCL1) Signaling in the Nervous System: XCL1 Acts via its Receptor XCR1 to Increase Trigeminal Neuronal Excitability. *Neuroscience* 2018; **379**. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.03.030.
- 193 Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S *et al*. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 2020; **161**. doi:10.1097/J.PAIN.0000000000001939.
- 194 Anekar AA, Hendrix JM, Cascella M. WHO Analgesic Ladder. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554435/>.
- 195 Orhan ME, Bilgin F, Ergin A, Dere K, Güzeldemir ME. Pain treatment practice according to the WHO analgesic ladder in cancer patients: Eight years experience of a single center.

- Agri* 2008; **20**: 37–43.
- 196 Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DLH, Bouhassira D *et al.* Neuropathic pain: An updated grading system for research and clinical practice. *Pain* 2016; **157**. doi:10.1097/j.pain.0000000000000492.
- 197 NICE. Neuropathic pain : the pharmacological management of neuropathic pain in adults in non-specialist settings. *NICE Clin Guidel* 1997; **96**: 1–104.
- 198 Wordliczek J, Kotlińska-Lemieszek A, Leppert W, Woron J, Dobrogowski J, Krajnik M *et al.* Pharmacotherapy of pain in cancer patients – recommendations of the Polish Association for the Study of Pain, Polish Society of Palliative Medicine, Polish Society of Oncology, Polish Society of Family Medicine, Polish Society of Anaesthesiology and Inten. *Polish J Surg* 2018; **90**. doi:10.5604/01.3001.0012.2904.
- 199 Araujo AM, Gómez M, Pascual J, Castañeda M, Pezonaga L, Borque JL. Treatment of pain in the oncology patient. *An Sist Sanit Navar* 2004; **27**: 63–75.
- 200 Wiener J, McIntyre A, Janzen S, Mirkowski M, MacKenzie HM, Teasell R. Opioids and cerebral physiology in the acute management of traumatic brain injury: a systematic review. *Brain Inj.* 2019; **33**. doi:10.1080/02699052.2019.1574328.
- 201 Szczudlik A, Dobrogowski J, Wordliczek J, Stępień A, Krajnik M, Leppert W *et al.* Diagnosis and management of neuropathic pain: Review of literature and recommendations of the Polish Association for the Study of Pain and the Polish Neurological Society - Part one. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2014; **48**. doi:10.1016/j.pjnns.2014.07.011.
- 202 Przewłocka B. Podstawowe mechanizmy działania przeciwbólowego opioidów. *Med Paliatywna w Prakt* 2017; **11**: 48–54.
- 203 Linares V, Jakoel E, Be'eri R, Lipschits O, Neumann R, Gadot Y. Opium trade and use during the Late Bronze Age: Organic residue analysis of ceramic vessels from the burials of Tel Yehud, Israel. *Archaeometry* 2022. doi:10.1111/arc.m.12806.
- 204 Pathan H, Williams J. Basic opioid pharmacology: an update. *Br J Pain* 2012; **6**. doi:10.1177/2049463712438493.
- 205 Wolff RF, Aune D, Truyers C, Hernandez A V., Misso K, Riemsma R *et al.* Systematic review of efficacy and safety of buprenorphine versus fentanyl or morphine in patients with chronic moderate to severe pain. *Curr Med Res Opin* 2012; **28**. doi:10.1185/03007995.2012.678938.
- 206 Dobrogowski J, Wordliczek J, Woron J. *Farmakoterapia bólu*. Wydawnictwo Termedia, 2014.
- 207 Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ *et al.* Advances in Neuropathic Pain: Diagnosis, Mechanisms, and Treatment Recommendations. *Arch Neurol* 2003; **60**. doi:10.1001/archneur.60.11.1524.
- 208 Mika J, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, Makuch W, Przewłocka B. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice. *Brain Behav Immun* 2009; **23**. doi:10.1016/J.BBI.2008.07.005.
- 209 Lutfy K, Cowan A. Buprenorphine: a unique drug with complex pharmacology. *Curr Neuropharmacol* 2004; **2**. doi:10.2174/1570159043359477.
- 210 Walsh SL, Middleton LS. Buprenorphine pharmacodynamics and pharmacokinetics. In: *Handbook of Methadone Prescribing and Buprenorphine Therapy*. 2013 doi:10.1007/978-1-4614-6974-2\_12.
- 211 Khroyan T V., Polgar WE, Orduna J, Jiang F, Olsen C, Toll L *et al.* Activity of new NOP receptor ligands in a rat peripheral mononeuropathy model: Potentiation of morphine anti-allodynic activity by NOP receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2009; **610**. doi:10.1016/j.ejphar.2009.03.019.
- 212 Kocot-Kępska M, Przeklasa-Muszyńska A, Dobrogowski J. Buprenorphine - opioid with unique properties | Buprenorfina - opioid o unikalnych właściwościach. *Med Paliatywna w Prakt* 2016; **10**: 77–88.
- 213 Woron J, Adamczyk A, Malec-Milewska M, Jakowicka-Wordliczek J. Stosowanie koanalgetyków u pacjentów z bólem neuropatycznym w przebiegu choroby nowotworowej. *Med Paliatywna w Prakt* 2014; **8**: 85–90.
- 214 Khanna IK, Pillarisetti S. Buprenorphine – An attractive opioid with underutilized potential in treatment of chronic pain. *J. Pain Res.* 2015; **8**. doi:10.2147/JPR.S85951.
- 215 Wordliczek J, Zajackowska R, Leppert W. Farmakoterapia bólu neuropatycznego. *Med Paliatywna w Prakt* 2017; **11**: 61–73.

- 216 Zhao CM, Guo RX, Hu F, Meng JL, Mo LQ, Chen PX *et al.* Spinal MCP-1 contributes to the development of morphine antinociceptive tolerance in rats. *Am J Med Sci* 2012; **344**. doi:10.1097/MAJ.0b013e31826a82ce.
- 217 Rivat C, Sebaihi S, Van Steenwinckel J, Fouquet S, Kitabgi P, Pohl M *et al.* Src family kinases involved in CXCL12-induced loss of acute morphine analgesia. *Brain Behav Immun* 2014; **38**. doi:10.1016/j.bbi.2013.11.010.
- 218 Adler MW, Geller EB, Chen X, Rogers TJ. Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. *AAPS J.* 2006; **7**. doi:10.1208/aapsj070484.
- 219 Chen X, Geller EB, Rogers TJ, Adler MW. Rapid heterologous desensitization of antinociceptive activity between mu or delta opioid receptors and chemokine receptors in rats. *Drug Alcohol Depend* 2007; **88**. doi:10.1016/j.drugalcdep.2006.09.010.
- 220 Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciapała K, Oggioni M, Mercurio D *et al.* Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice. *Immunobiology* 2020; **225**. doi:10.1016/j.imbio.2020.151911.
- 221 Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D *et al.* Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes. *Pharmacol Reports* 2020; **72**. doi:10.1007/s43440-020-00187-y.
- 222 Ciechanowska A, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG *et al.* Initiators of classical and lectin complement pathways are differently engaged after traumatic brain injury—time-dependent changes in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus in a mouse model. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. doi:10.3390/ijms22010045.
- 223 Ciechanowska A, Pawlik K, Ciapała K, Mika J. Pharmacological Modulation of the MIP-1 Family and Their Receptors Reduces Neuropathic Pain Symptoms and Influences Morphine Analgesia: Evidence from a Mouse Model. *Brain Sci* 2023; **13**. doi:10.3390/brainsci13040579.
- 224 Liu YW, Li S, Dai SS. Neutrophils in traumatic brain injury (TBI): Friend or foe? *J. Neuroinflammation.* 2018; **15**. doi:10.1186/s12974-018-1173-x.
- 225 Zhang X, Cheng R, Rowe D, Sethu P, Daugherty A, Yu G *et al.* Shear-sensitive regulation of neutrophil flow behavior and its potential impact on microvascular blood flow dysregulation in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; **34**. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302868.
- 226 Pliyev BK, Menshikov M. Differential effects of the autophagy inhibitors 3-methyladenine and chloroquine on spontaneous and TNF- $\alpha$ -induced neutrophil apoptosis. *Apoptosis* 2012; **17**. doi:10.1007/s10495-012-0738-x.
- 227 Flygt J, Djupsjö A, Lenne F, Marklund N. Myelin loss and oligodendrocyte pathology in white matter tracts following traumatic brain injury in the rat. *Eur J Neurosci* 2013; **38**. doi:10.1111/ejn.12179.
- 228 West EE, Kolev M, Kemper C. Complement and the Regulation of T Cell Responses. *Annu Rev Immunol* 2018; **36**. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053245.
- 229 Kolev M, Dimeloe S, Le Friec G, Navarini A, Arbore G, Povoleri GA *et al.* Complement Regulates Nutrient Influx and Metabolic Reprogramming during Th1 Cell Responses. *Immunity* 2015; **42**. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.024.
- 230 West EE, Kunz N, Kemper C. Complement and human T cell metabolism: Location, location, location. *Immunol Rev* 2020; **295**. doi:10.1111/imr.12852.
- 231 Daglas M, Draxler DF, Ho H, McCutcheon F, Galle A, Au AE *et al.* Activated CD8+ T Cells Cause Long-Term Neurological Impairment after Traumatic Brain Injury in Mice. *Cell Rep* 2019; **29**. doi:10.1016/j.celrep.2019.09.046.
- 232 Mracsko E, Liesz A, Stojanovic A, Lou WPK, Osswald M, Zhou W *et al.* Antigen dependently activated cluster of differentiation 8-positive T cells cause perforin-mediated neurotoxicity in experimental stroke. *J Neurosci* 2014; **34**. doi:10.1523/JNEUROSCI.1867-14.2014.
- 233 Wegener A, Deboux C, Bachelin C, Frah M, Kerninon C, Seilhean D *et al.* Gain of Olig2 function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination. *Brain* 2015; **138**. doi:10.1093/brain/awu375.
- 234 Lotocki G, Vaccari J de R, Alonso O, Molano JS, Nixon R, Dietrich WD *et al.* Oligodendrocyte Vulnerability Following Traumatic Brain Injury in Rats: Effect of Moderate Hypothermia. *Ther Hypothermia Temp Manag* 2011; **1**. doi:10.1089/ther.2010.0011.

- 235 Dent KA, Christie KJ, Bye N, Basrai HS, Turbic A, Habgood M *et al.* Oligodendrocyte birth and death following traumatic brain injury in adult mice. *PLoS One* 2015; **10**. doi:10.1371/journal.pone.0121541.
- 236 Mayer CA, Brunkhorst R, Niessner M, Pfeilschifter W, Steinmetz H, Foerch C. Blood Levels of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Patients with Neurological Diseases. *PLoS One* 2013; **8**. doi:10.1371/journal.pone.0062101.
- 237 Yang Z, Wang KKW. Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci* 2015; **38**. doi:10.1016/j.tins.2015.04.003.
- 238 Honda M, Tsuruta R, Kaneko T, Kasaoka S, Yagi T, Todani M *et al.* Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. *J Trauma - Inj Infect Crit Care* 2010; **69**. doi:10.1097/TA.0b013e3181bbd485.
- 239 Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurol.* 2010; **6**. doi:10.1038/nrneurol.2010.74.
- 240 Herndon JM, Tome ME, Davis TP. Development and Maintenance of the Blood-Brain Barrier. In: *Primer on Cerebrovascular Diseases: Second Edition*. Elsevier Inc., 2017 doi:10.1016/B978-0-12-803058-5.00009-6.
- 241 Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB *et al.* Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2017; **37**. doi:10.1007/s10571-016-0400-1.
- 242 Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2018; **18**. doi:10.1038/nri.2017.125.
- 243 Yin J, Valin KL, Dixon ML, Leavenworth JW. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *J Immunol Res* 2017; **2017**. doi:10.1155/2017/5150678.
- 244 Lafrenaye AD, Mondello S, Wang KK, Yang Z, Povlishock JT, Gorse K *et al.* Circulating GFAP and Iba-1 levels are associated with pathophysiological sequelae in the thalamus in a pig model of mild TBI. *Sci Rep* 2020; **10**. doi:10.1038/s41598-020-70266-w.
- 245 Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. Microglial activation in traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci* 2017; **9**. doi:10.3389/fnagi.2017.00208.
- 246 Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol* 2016; **275**. doi:10.1016/j.expneurol.2015.08.018.
- 247 Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB *et al.* New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**. doi:10.1073/pnas.1525528113.
- 248 Van Wageningen TA, Vlaar E, Kooij G, Jongenelen CAM, Geurts JJG, Van Dam AM. Regulation of microglial TMEM119 and P2RY12 immunoreactivity in multiple sclerosis white and grey matter lesions is dependent on their inflammatory environment. *Acta Neuropathol Commun* 2019; **7**. doi:10.1186/s40478-019-0850-z.
- 249 Satoh J ichi, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T *et al.* TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology* 2016; **36**. doi:10.1111/neup.12235.
- 250 Hsieh CL, Kim CC, Ryba BE, Niemi EC, Bando JK, Locksley RM *et al.* Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. *Eur J Immunol* 2013; **43**. doi:10.1002/eji.201243084.
- 251 Faden AI. Microglial activation and traumatic brain injury. *Ann. Neurol.* 2011; **70**. doi:10.1002/ana.22555.
- 252 Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM *et al.* Inflammation after trauma: Microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol* 2011; **70**. doi:10.1002/ana.22455.
- 253 Xue QS, Yang C, Hoffman PM, Streit WJ. Microglial response to murine leukemia virus-induced encephalopathy is a good indicator of neuronal perturbations. *Brain Res* 2010; **1319**. doi:10.1016/j.brainres.2009.12.089.
- 254 Dewar D, Underhill SM, Goldberg MP. Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**. doi:10.1097/01.WCB.0000053472.41007.F9.
- 255 Zarpelon AC, Rodrigues FC, Lopes AH, Souza GR, Carvalho TT, Pinto LG *et al.* Spinal cord

- oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. *FASEB J* 2016; **30**. doi:10.1096/fj.14-267146.
- 256 Echeverry S, Shi XQ, Zhang J. Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain* 2008; **135**. doi:10.1016/j.pain.2007.05.002.
- 257 Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 1991; **565**. doi:10.1016/0006-8993(91)91729-K.
- 258 Murad H, Ayuob N. Co-administration of pioglitazone improves fluoxetine's antinociceptive, neuroprotective, and antidepressant effects in chronic constriction injury in rats. *Pain Physician* 2015; **18**. doi:10.36076/ppj.2015/18/609.
- 259 Korin B, Ben-Shaanan TL, Schiller M, Dubovik T, Azulay-Debby H, Boshnak NT *et al*. High-dimensional, single-cell characterization of the brain's immune compartment. *Nat Neurosci* 2017; **20**. doi:10.1038/nn.4610.
- 260 Ziabska K, Ziemka-Nalecz M, Pawelec P, Sypecka J, Zalewska T. Aberrant complement system activation in neurological disorders. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. doi:10.3390/ijms22094675.
- 261 Pruitt DT, Danaphongse TT, Schmid AN, Morrison RA, Kilgard MP, Rennaker RL *et al*. Traumatic Brain Injury Occludes Training-Dependent Cortical Reorganization in the Contralateral Hemisphere. *J Neurotrauma* 2017; **34**. doi:10.1089/neu.2016.4796.
- 262 Combs HL, Jones TA, Kozlowski DA, Adkins DL. Combinatorial Motor Training Results in Functional Reorganization of Remaining Motor Cortex after Controlled Cortical Impact in Rats. *J Neurotrauma* 2016; **33**. doi:10.1089/neu.2015.4136.
- 263 Mulder SD, Nielsen HM, Blankenstein MA, Eikelenboom P, Veerhuis R. Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia* 2014; **62**. doi:10.1002/glia.22619.
- 264 Morgan TE, Rozovsky I, Sarkar DK, Young-Chan CS, Nichols NR, Laping NJ *et al*. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces transforming growth factor- $\beta$ 1 and transforming growth factor- $\beta$  receptor messenger RNAs and reduces complement C1qB messenger RNA in rat brain microglia. *Neuroscience* 2000; **101**. doi:10.1016/S0306-4522(00)00387-0.
- 265 Lui H, Zhang J, Makinson SR, Cahill MK, Kelley KW, Huang HY *et al*. Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. *Cell* 2016; **165**. doi:10.1016/j.cell.2016.04.001.
- 266 Vasek MJ, Garber C, Dorsey D, Durrant DM, Bollman B, Soung A *et al*. A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* 2016; **534**. doi:10.1038/nature18283.
- 267 Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S *et al*. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science (80- )* 2016; **352**. doi:10.1126/science.aad8373.
- 268 Fraser DA, Pisalyaput K, Tenner AJ. C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J Neurochem* 2010; **112**. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06494.x.
- 269 Pisalyaput K, Tenner AJ. Complement component C1q inhibits  $\beta$ -amyloid- and serum amyloid P-induced neurotoxicity via caspase- and calpain-independent mechanisms. *J Neurochem* 2008; **104**. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05012.x.
- 270 Benoit ME, Tenner AJ. Complement protein C1q-mediated neuroprotection is correlated with regulation of neuronal gene and microRNA expression. *J Neurosci* 2011; **31**. doi:10.1523/JNEUROSCI.3932-10.2011.
- 271 Benoit ME, Hernandez MX, Dinh ML, Benavente F, Vasquez O, Tenner AJ. C1q-induced LRP1B and GPR6 proteins expressed early in Alzheimer disease mouse models, are essential for the C1q-mediated protection against amyloid- $\beta$  neurotoxicity. *J Biol Chem* 2013; **288**. doi:10.1074/jbc.M112.400168.
- 272 Longhi L, Orsini F, De Blasio D, Fumagalli S, Ortolano F, Locatelli M *et al*. Mannose-binding lectin is expressed after clinical and experimental traumatic brain injury and its deletion is protective. *Crit Care Med* 2014; **42**. doi:10.1097/CCM.0000000000000399.
- 273 Vegh Z, Kew RR, Gruber BL, Ghebrehiwet B. Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR.

- Mol Immunol* 2006; **43**. doi:10.1016/j.molimm.2005.07.030.
- 274 Wagner S, Lynch NJ, Walter W, Schwaeble WJ, Loos M. Differential Expression of the Murine Mannose-Binding Lectins A and C in Lymphoid and Nonlymphoid Organs and Tissues. *J Immunol* 2003; **170**. doi:10.4049/jimmunol.170.3.1462.
- 275 Lu J, Wu X, Teh BK. The regulatory roles of C1q. *Immunobiology* 2007; **212**. doi:10.1016/j.imbio.2006.11.008.
- 276 Endo Y, Liu Y, Kanno K, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T. Identification of the mouse H-ficolin gene as a pseudogene and orthology between mouse ficolins A/B and human L-/M-ficolins. *Genomics* 2004; **84**. doi:10.1016/j.ygeno.2004.07.006.
- 277 Kwon S, Kim MS, Kim D, Lee KW, Choi SY, Park J *et al*. Identification of a functionally relevant signal peptide of mouse ficolin A. *J Biochem Mol Biol* 2007; **40**. doi:10.5483/bmbrep.2007.40.4.532.
- 278 De Blasio D, Fumagalli S, Orsini F, Neglia L, Perego C, Ortolano F *et al*. Human brain trauma severity is associated with lectin complement pathway activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2019; **39**. doi:10.1177/0271678X18758881.
- 279 Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O’Keeffe S *et al*. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 2014; **34**. doi:10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.
- 280 Li M, Peake PW, Charlesworth JA, Tracey DJ, Moalem-Taylor G. Complement activation contributes to leukocyte recruitment and neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Eur J Neurosci* 2007; **26**. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05971.x.
- 281 Levin ME, Jin JG, Ji RR, Tong J, Pomonis JD, Lavery DJ *et al*. Complement activation in the peripheral nervous system following the spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Pain* 2008; **137**. doi:10.1016/j.pain.2007.11.005.
- 282 Rojewska E, Ciapała K, Piotrowska A, Makuch W, Mika J. Pharmacological inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase-2 and kynurenine 3-monooxygenase, enzymes of the kynurenine pathway, significantly diminishes neuropathic pain in a rat model. *Front Pharmacol* 2018; **9**. doi:10.3389/fphar.2018.00724.
- 283 Osikowicz M, Skup M, Mika J, Makuch W, Czarkowska-Bauch J, Przewlocka B. Glial inhibitors influence the mRNA and protein levels of mGlu2/3, 5 and 7 receptors and potentiate the analgesic effects of their ligands in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* 2009; **147**. doi:10.1016/j.pain.2009.09.002.
- 284 Kuijpers M, van Gassen KLI, de Graan PNE, Gruol D. Chronic exposure to the chemokine CCL3 enhances neuronal network activity in rat hippocampal cultures. *J Neuroimmunol* 2010; **229**. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.07.004.
- 285 Marciniak E, Faivre E, Dutar P, Alves Pires C, Demeyer D, Caillierez R *et al*. The Chemokine MIP-1 $\alpha$ /CCL3 impairs mouse hippocampal synaptic transmission, plasticity and memory. *Sci Rep* 2015; **5**. doi:10.1038/srep15862.
- 286 Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Bushell TJ, Gray PW, Miller RJ. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**. doi:10.1073/pnas.95.24.14500.
- 287 Liu C, Cui G, Zhu M, Kang X, Guo H. Neuroinflammation in Alzheimer’s disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; **7**: 8342–8355.
- 288 Xia M, Qin S, Wu L, Mackay CR, Hyman BT. Immunohistochemical study of the  $\beta$ -chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimer’s disease brains. *Am J Pathol* 1998; **153**. doi:10.1016/S0002-9440(10)65542-3.
- 289 MacNair L, Xiao S, Miletic D, Ghani M, Julien J-P, Keith J *et al*. MTHFSD and DDX58 are novel RNA-binding proteins abnormally regulated in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2016; **139**. doi:10.1093/brain/awv308.
- 290 Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection. *J Immunol* 2003; **171**. doi:10.4049/jimmunol.171.11.6052.
- 291 Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G *et al*. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog* 2010; **6**. doi:10.1371/journal.ppat.1000755.

- 292 Ghirnikar RS, Lee YL, He TR, Eng LF. Chemokine expression in rat stab wound brain injury. *J Neurosci Res* 1996; **46**. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19961215)46:6<727::AID-JNR9>3.0.CO;2-H.
- 293 Yang T, Liu YW, Zhao L, Wang H, Yang N, Dai SS *et al*. Metabotropic glutamate receptor 5 deficiency inhibits neutrophil infiltration after traumatic brain injury in mice. *Sci Rep* 2017; **7**. doi:10.1038/s41598-017-10201-8.
- 294 Zhu M, Allard JS, Zhang Y, Perez E, Spangler EL, Becker KG *et al*. Age-related brain expression and regulation of the chemokine CCL4/MIP-1 $\beta$  in APP/PS1 double-transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014; **73**. doi:10.1097/NEN.000000000000060.
- 295 Koch AE, Kunkel SL, Shah MR, Fu R, Mazarakis DD, Haines GK *et al*. Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$ : A C-C Chemokine in Osteoarthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; **77**. doi:10.1006/clin.1995.1157.
- 296 Hanifi-Moghaddam P, Kappler S, Seissler J, Müller-Scholze S, Martin S, Roep BO *et al*. Altered chemokine levels in individuals at risk of Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2006; **23**. doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01743.x.
- 297 Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B *et al*. Increased MCP-1 and MIP-1 $\beta$  in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur Respir J* 1999; **14**. doi:10.1034/j.1399-3003.1999.14a27.x.
- 298 Baba N, Wang F, Iizuka M, Shen Y, Yamashita T, Takaishi K *et al*. Induction of regional chemokine expression in response to human umbilical cord blood cell infusion in the neonatal mouse ischemia-reperfusion brain injury model. *PLoS One* 2019; **14**. doi:10.1371/journal.pone.0221111.
- 299 Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* 2011; **32**. doi:10.1016/j.it.2011.06.008.
- 300 Simats A, García-Berrocso T, Penalba A, Giralt D, Llovera G, Jiang Y *et al*. CCL23: a new CC chemokine involved in human brain damage. *J Intern Med* 2018; **283**. doi:10.1111/joim.12738.
- 301 Bonaventura A, Montecucco F. CCL23 is a promising biomarker of injury in patients with ischaemic stroke. *J. Intern. Med.* 2018; **283**. doi:10.1111/joim.12742.
- 302 Lin H, Shen J, Zhu Y, Zhou L, Zhang S, Liu Z *et al*. Serum CCL23 emerges as a biomarker for poor prognosis in patients with intracerebral hemorrhage. *Clin Chim Acta* 2022; **537**. doi:10.1016/j.cca.2022.10.012.
- 303 Rottman JB, Ganley KP, Williams K, Wu L, Mackay CR, Ringler DJ. Cellular localization of the chemokine receptor CCR5: Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am J Pathol* 1997; **151**: 1341–1351.
- 304 Zhang N, Inan S, Cowan A, Sun R, Wang JM, Rogers TJ *et al*. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**. doi:10.1073/pnas.0406030102.
- 305 Rudd JM, Pulavendran S, Ashar HK, Ritchey JW, Snider TA, Malayer JR *et al*. Neutrophils induce a novel chemokine receptors repertoire during influenza pneumonia. *Front Cell Infect Microbiol* 2019; **9**. doi:10.3389/fcimb.2019.00108.
- 306 Eltayeb S, Berg AL, Lassmann H, Wallström E, Nilsson M, Olsson T *et al*. Temporal expression and cellular origin of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR5 in the central nervous system: Insight into mechanisms of MOG-induced EAE. *J Neuroinflammation* 2007; **4**. doi:10.1186/1742-2094-4-14.
- 307 Knerlich-Lukoschus F. Chemokines and their receptors: Important mediators to be aware of in neuroregenerative approaches for spinal cord injury. *Neural Regen. Res.* 2015; **10**. doi:10.4103/1673-5374.155423.
- 308 Lee HP, Jun YC, Choi JK, Kim J Il, I. Carp R, Kim YS. The expression of RANTES and chemokine receptors in the brains of scrapie-infected mice. *J Neuroimmunol* 2005; **158**. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.08.010.
- 309 Shehadeh N, Pollack S, Wildbaum G, Zohar Y, Shafat I, Makhoul R *et al*. Selective Autoantibody Production against CCL3 Is Associated with Human Type 1 Diabetes Mellitus and Serves As a Novel Biomarker for Its Diagnosis. *J Immunol* 2009; **182**. doi:10.4049/jimmunol.0803348.
- 310 Bäckryd E, Lind A-L, Thulin M, Larsson A, Gerdle B, Gordh T. High levels of cerebrospinal



- fluid chemokines point to the presence of neuroinflammation in peripheral neuropathic pain: a cross-sectional study of 2 cohorts of patients compared with healthy controls. *Pain* 2017; **158**. doi:10.1097/j.pain.0000000000001061.
- 311 Llorián-Salvador M, González-Rodríguez S, Lastra A, Fernández-García MT, Hidalgo A, Menéndez L *et al*. Involvement of CC Chemokine Receptor 1 and CCL3 in Acute and Chronic Inflammatory Pain in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016; **119**. doi:10.1111/bcpt.12543.
- 312 Bogacka J, Ciapała K, Pawlik K, Dobrogowski J, Przekłasa-Muszynska A, Mika J. Blockade of CCR4 Diminishes Hypersensitivity and Enhances Opioid Analgesia – Evidence from a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *Neuroscience* 2020; **441**. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.06.025.
- 313 Brunton L., Hilal-Dandan R, Knollmann BC. Pharmacodynamics: Molecular Mechanisms of Drug Action : The Pharmacological Basis of Therapeutics. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2189&sectionid=170349571> (accessed 7 Feb2023).
- 314 Blaschke S, Middel P, Dorner BG, Blaschke V, Hummel KM, Kroczeck RA *et al*. Expression of activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related cytokine/lymphotactin and its functional role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**. doi:10.1002/art.11171.
- 315 Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S *et al*. Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells. *Immunity* 2009; **31**. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.027.
- 316 Huang H, Li F, Cairns CM, Gordon JR, Xiang J. Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **281**. doi:10.1006/bbrc.2001.4363.
- 317 Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; **110**. doi:10.1016/S0092-8674(02)00971-6.
- 318 Block H, Herter JM, Rossaint J, Stadtmann A, Kliche S, Lowell CA *et al*. Crucial role of SLP-76 and ADAP for neutrophil recruitment in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Exp Med* 2012; **209**. doi:10.1084/jem.20111493.
- 319 Piotrowska A, Popiolek-Barczyk K, Pavone F, Mika J. Comparison of the expression changes after botulinum toxin type a and minocycline administration in lipopolysaccharide-stimulated rat microglial and astroglial cultures. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; **7**. doi:10.3389/fcimb.2017.00141.
- 320 Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Asano T, Matsui Y, Nakayama Y *et al*. Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J Immunol* 2009; **182**. doi:10.4049/jimmunol.0900725.
- 321 Smith HS. Opioids and neuropathic pain. *Pain Physician*. 2012; **15**. doi:10.36076/ppj.2012/15/es93.
- 322 Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D *et al*. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Prim* 2017; **3**. doi:10.1038/nrdp.2017.2.
- 323 Fornasari D. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. *Pain Ther* 2017; **6**. doi:10.1007/s40122-017-0091-4.
- 324 Mika J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol Rep* 2008; **60**: 297–307.
- 325 Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2013; **716**. doi:10.1016/j.ejphar.2013.01.072.
- 326 Szabo I, Chen XH, Xin L, Adler MW, Howard OMZ, Oppenheim JJ *et al*. Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**. doi:10.1073/pnas.102327699.
- 327 Afonso AS, Carnaval T, Cés SV. Combination therapy for neuropathic pain: A review of recent evidence. *J Clin Med* 2021; **10**. doi:10.3390/jcm10163533.
- 328 Inan S, Chen X, Eisenstein EM, Meissler JJ, Geller EB, Tallarida C *et al*. Chemokine receptor antagonists enhance morphine’s antinociceptive effect but not respiratory depression. *Life Sci* 2021; **285**. doi:10.1016/j.lfs.2021.120014.
- 329 Chen C, Li J, Bot G, Szabo I, Rogers TJ, Liu-Chen LY. Heterodimerization and cross-desensitization between the  $\mu$ -opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor. *Eur J Pharmacol* 2004; **483**. doi:10.1016/j.ejphar.2003.10.033.

- 330 Ferré S, Casadó V, Devi LA, Filizola M, Jockers R, Lohse MJ *et al.* G protein-coupled receptor oligomerization revisited: Functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol Rev* 2014; **66**. doi:10.1124/pr.113.008052.
- 331 Arnatt CK, Falls BA, Yuan Y, Raborg TJ, Masvekar RR, El-Hage N *et al.* Exploration of bivalent ligands targeting putative mu opioid receptor and chemokine receptor CCR5 dimerization. *Bioorganic Med Chem* 2016; **24**. doi:10.1016/j.bmc.2016.09.059.
- 332 Parenty G, Appelbe S, Milligan G. CXCR2 chemokine receptor antagonism enhances DOP opioid receptor function via allosteric regulation of the CXCR2-DOP receptor heterodimer. *Biochem J* 2008; **412**. doi:10.1042/BJ20071689.
- 333 Zhang N, Rogers TJ, Caterina M, Oppenheim JJ. Proinflammatory chemokines, such as C-C chemokine ligand 3, desensitize mu-opioid receptors on dorsal root ganglia neurons. *J Immunol* 2004; **173**. doi:10.4049/jimmunol.173.1.594.
- 334 Di Prisco S, Summa M, Chellakudam V, Rossi PIA, Pittaluga A. RANTES-mediated control of excitatory amino acid release in mouse spinal cord. *J Neurochem* 2012; **121**. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07720.x.
- 335 Kramp BK, Megens RTA, Sarabi A, Winkler S, Projahn D, Weber C *et al.* Exchange of extracellular domains of CCR1 and CCR5 reveals confined functions in CCL5-mediated cell recruitment. *Thromb Haemost* 2013; **110**. doi:10.1160/TH13-05-0420.
- 336 Berg KA, Zardeneta G, Hargreaves KM, Clarke WP, Milam SB. Integrins regulate opioid receptor signaling in trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 2007; **144**. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.10.033.
- 337 Jammoul M, Jammoul D, Wang KK, Kobeissy F, Depalma RG. Traumatic Brain Injury and Opioids: Twin Plagues of the Twenty-First Century. *Biol Psychiatry* 2023. doi:10.1016/J.BIOPSYCH.2023.05.013.

## 10. SPIS WSZYSTKICH DOTYCZĄCYCH CZASOWYCH PUBLIKACJI DOKTORANTKI

### 1. Pharmacological blockade of CXCR3 by (±)-NBI-74330 reduces neuropathic pain and enhances opioid effectiveness - Evidence from in vivo and in vitro studies

Piotrowska A., Rojewska E., Pawlik K., Kreiner G., Ciechanowska A., Makuch W., Żychowska M., Mika J. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(10):3418-3437. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.07.032.

IF<sub>2018</sub>= 4.328, MEN<sub>2018</sub>=40

### 2. Dataset of (±)-NBI-74330 (CXCR3 antagonist) influence on chemokines under neuropathic pain

Piotrowska A., Rojewska E., Pawlik K., Kreiner G., Ciechanowska A., Makuch W., Mika J. *Data Brief.* 2018;21:1145-1150. doi: 10.1016/j.dib.2018.10.091.

### 3. Monitoring of fungal root colonisation, arbuscular mycorrhizal fungi diversity and soil microbial processes to assess the success of ecosystem translocation

Zubek S., Chmolewska D., Jamrozek D., Ciechanowska A., Nobis M., Błaszczowski J., Rożek K., Rutkowska J. *J Environ Manage.* 2019;246:538-546. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.04.044.

IF<sub>2019</sub>= 5.647, MEN<sub>2019</sub>=100

### 4. Pharmacological blockade of spinal CXCL3/CXCR2 signaling by NVP CXCR2 20, a selective CXCR2 antagonist, reduces neuropathic pain following peripheral nerve injury

Piotrowska A., Rojewska E., Pawlik K., Kreiner G., Ciechanowska A., Makuch W., Nalepa I., Mika J. *Front Immunol.* 2019;10:2198. doi: 10.3389/fimmu.2019.02198.

IF<sub>2019</sub>= 5.085, MEN<sub>2019</sub>=140

### 5. Fluorinated indole-imidazole conjugates: selective orally bioavailable 5-HT7 receptor low-basicity agonists, potential neuropathic painkillers

Hogendorf A.S., Hogendorf A., Popiołek-Barczyk K., Ciechanowska A., Mika J., Satała G., Walczak M., Latacz G., Handzlik J., Kieć-Kononowicz K., Ponimaskin E., Schade S., Zeug A., Bijata M., Kubicki M., Kurczab R., Lenda T., Staroń J., Bugno R., Duszyńska B., Pilarski B., Bojarski A.J. *Eur J Med Chem.* 2019;170:261-275. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.03.017.

IF<sub>2019</sub>= 5.573, MEN<sub>2019</sub>=140

### 6. Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice

Ciechanowska A., Popiołek-Barczyk K., Pawlik K., Ciapała K., Oggioni M., Mercurio D., DeSimoni M.G., Mika J.

*Immunobiology.* 2020;225(3):151911. doi: 10.1016/j.imbio.2020.151911.

IF<sub>2020</sub>= 3.144, MEN<sub>2020</sub>=100

### 7. CCR4 Antagonist (C021) influences the level of nociceptive factors and enhances the analgesic potency of morphine in a rat model of neuropathic pain

Bogacka J., Popiołek-Barczyk K., Pawlik K., Ciechanowska A., Makuch W., Rojewska E., Dobrogowski J., Przekłasa-Muszynska A., Mika J.

*Eur J Pharmacol.* 2020;880:173166. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173166.

IF<sub>2020</sub>= 4.432, MEN<sub>2020</sub>=100

### 8. Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes

Ciechanowska A., Popiołek-Barczyk K., Ciapała K., Pawlik K., Oggioni M., Mercurio D., DeSimoni M.G., Mika J.

*Pharmacol Rep.* 2020;72(6):1579-1592. doi: 10.1007/s43440-020-00187-y.

IF<sub>2020</sub>= 3.027, MEN<sub>2020</sub>=100

### 9. The CCL2/CCL7/CCL12/CCR2 pathway is substantially and persistently upregulated in mice after traumatic brain injury, and CCL2 modulates the complement system in microglia

Popiołek-Barczyk K., Ciechanowska A., Ciapała K., Pawlik K., Oggioni M., Mercurio D., DeSimoni M.G., Mika J.

*Mol Cell Probes.* 2020;54:101671. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101671.

IF<sub>2020</sub>= 2.365, MEN<sub>2020</sub>=70

### 10. Initiators of classical and lectin complement pathways are differently engaged after Traumatic brain injury—time-dependent changes in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus in a mouse model

Ciechanowska A., Ciapała K., Pawlik K., Oggioni M., Mercurio D., DeSimoni M.G., Mika J.

*Int J Mol Sci.* 2020;22(1):45. doi: 10.3390/ijms22010045.

IF<sub>2020</sub>= 5.924, MEN<sub>2020</sub>=140

**11. Long pentraxin PTX3 is upregulated systemically and centrally after experimental neurotrauma, but its depletion leaves unaltered sensorimotor deficits or histopathology**

Oggioni M., Mercurio D., Minuta D., Fumagalli S., Popiolek-Barczyk K., Sironi M., Ciechanowska A., Ippati S., De Blasio D., Perego C., Mika J., Garlanda C., DeSimoni M.G.  
*Sci Rep.* 2021;11(1):9616. doi: 10.1038/s41598-021-89032-7.

IF<sub>2021</sub> = 4.997, MEN<sub>2021</sub> = 140

**12. Blockade of CC Chemokine Receptor Type 3 Diminishes Pain and Enhances Opioid Analgesic Potency in a Model of Neuropathic Pain**

Pawlik K., Ciechanowska A., Ciapała K., Rojewska E., Makuch W., Mika J.  
*Front Immunol.* 2021;12:781310. doi: 10.3389/fimmu.2021.781310.

IF<sub>2021</sub> = 8.787, MEN<sub>2021</sub> = 140

**13. Mirogabalin Decreases Pain-like Behaviours and Improves Opioid and Ketamine Antinociception in a Mouse Model of Neuropathic Pain**

Zajączkowska R., Rojewska E., Ciechanowska A., Pawlik K., Ciapała K., Kocot-Kępska M., Makuch W., Wordliczek J., Mika J.  
*Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(1):88. doi: 10.3390/ph15010088.

IF<sub>2022</sub> = 4.600, MEN<sub>2022</sub> = 100

**14. CC Chemokine Receptor 4 (CCR4) as a Possible New Target for Therapy**

Bogacka J., Pawlik K., Ciapała K., Ciechanowska A., Mika J.  
*Int J Mol Sci.* 2022;23(24):15638. doi: 10.3390/ijms232415638.

IF<sub>2022</sub> = 5.600, MEN<sub>2022</sub> = 140

**15. New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies**

Ciechanowska A., Rojewska E., Piotrowska A., Barut J., Pawlik K., Ciapała K., Kreiner G., Mika J.  
*Front Immunol.* 2022;13:1058204. doi: 10.3389/fimmu.2022.1058204.

IF<sub>2022</sub> = 7.300, MEN<sub>2022</sub> = 140

**16. Pharmacological Evidence of the Important Roles of CCR1 and CCR3 and Their Endogenous Ligands CCL2/7/8 in Hypersensitivity Based on a Murine Model of Neuropathic Pain**

Pawlik K., Ciapała K., Ciechanowska A., Kwiatkowski K., Mika J.  
*Cells.* 2022;12(1):98. doi: 10.3390/cells12010098.

IF<sub>2022</sub> = 6.000, MEN<sub>2022</sub> = 140

**17. Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain**

Ciapała K., Pawlik K., Ciechanowska A., Mika J., Rojewska E.  
*Toxicol Appl Pharmacol.* 2023;461:116382. doi: 10.1016/j.taap.2023.116382.

IF<sub>2023</sub> = 3.800, MEN<sub>2023</sub> = 140

**18. Pharmacological Modulation of the MIP-1 Family and Their Receptors Reduces Neuropathic Pain Symptoms and Influences Morphine Analgesia: Evidence from a Mouse Model**

Ciechanowska A., Pawlik K., Ciapała K., Mika J.  
*Brain Sci.* 2023;13(4):579. doi: 10.3390/brainsci13040579.

IF<sub>2023</sub> = 3.300, MEN<sub>2023</sub> = 100

**19. Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain**

Ciapała K., Rojewska E., Pawlik K., Ciechanowska A., Mika J.  
*Int J Mol Sci.* 2023;24(10):9000. doi: 10.3390/ijms24109000.

IF<sub>2023</sub> = 5.600, MEN<sub>2023</sub> = 140

**20. Mirogabalin Decreases Pain-like Behaviors by Inhibiting the Microglial/Macrophage Activation, p38MAPK Signaling, and Pronociceptive CCL2 and CCL5 Release in a Mouse Model of Neuropathic Pain**

Zajączkowska R., Pawlik K., Ciapała K., Piotrowska A., Ciechanowska A., Rojewska E., Kocot-Kępska M., Makuch W., Wordliczek J., Mika J.  
*Pharmaceuticals (Basel).* 2023;16(7):1023. doi: 10.3390/ph16071023.

IF<sub>2023</sub> = 4.600, MEN<sub>2023</sub> = 140

**Sumaryczny Impact Factor = 94.109**

**Sumaryczna liczba punktów Ministerstwo Edukacji i Nauki (MEN) = 2250**

**Łączna całkowita ilość cytowań powyższych publikacji = 176, bez autocytowań = 146  
wg bazy Scopus – 20.09.2023**

## **11. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW**



Kraków 03.04.2023

## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Agaty Ciechanowskiej w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. *"New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies"*  
Ciechanowska A, **Rojewska E**, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, Ciapała K, Kreiner G, Mika J.

*Ewelina Rojewska*  
dr hab. Ewelina Rojewska



## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Agaty Ciechanowskiej w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. *"New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies"*  
Ciechanowska A, Rojewska E, **Piotrowska A**, Barut J, Pawlik K, Ciapała K, Kreiner G, Mika J.

dr Anna Piotrowska-Murzyn



Kraków 03.04.2023

## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Agaty Ciechanowskiej w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. *"New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies"*  
Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, Ciapała K, **Kreiner G**, Mika J.

dr hab. Grzegorz Kreiner





## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Agaty Ciechanowskiej w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. *"New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies"*  
Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, Ciapała K, Krejncir G, Mika J.

mgr Justyna Barut



Kraków 04.04.2023

## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Agaty Ciechanowskiej w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu wraz ze mną generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał również na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. *"Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice"* Ciechanowska A, **Popiolek-Barczyk K**, Pawlik K, Ciapała K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J.

2. *"Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes"* Ciechanowska A, **Popiolek-Barczyk K**, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J.

  
dr inż. Katarzyna Popiolek-Barczyk



## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Agaty Ciechanowskiej w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. *"Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice"* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, **Ciapala K**, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J.
2. *"Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes"* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, **Ciapala K**, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J.
3. *"Initiators of classical and lectin complement pathways are differently engaged after traumatic brain injury - time-dependent changes in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus in a mouse model"* Ciechanowska A, **Ciapala K**, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J.
4. *"New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies"* Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, **Ciapala K**, Kreiner G, Mika J.
5. *"Pharmacological Modulation of the MIP-1 Family and Their Receptors Reduces Neuropathic Pain Symptoms and Influences Morphine Analgesia: Evidence from a Mouse Model"* Ciechanowska A, Pawlik K, **Ciapala K**, Mika J.

*Katarzyna Ciapala*

mgr Katarzyna Ciapala



## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Agaty Ciechanowskiej w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. *“Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciapała K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J.

2. *“Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J.

3. *“Initiators of classical and lectin complement pathways are differently engaged after traumatic brain injury - time-dependent changes in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus in a mouse model”* Ciechanowska A, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J.

4. *“New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies”* Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, Ciapała K, Kreiner G, Mika J.

5. *“Pharmacological Modulation of the MIP-1 Family and Their Receptors Reduces Neuropathic Pain Symptoms and Influences Morphine Analgesia: Evidence from a Mouse Model”* Ciechanowska A, Pawlik K, Ciapała K, Mika J.

Katarzyna Pawlik - Szczerba

mgr inż. Katarzyna Pawlik-Szczerba



## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Agaty Ciechanowskiej w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu wraz ze mną generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał również na finansowaniu badań z uzyskanych przeze mnie projektów z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju ERA-NET NEURON-Cofund/L/LEAP/15/17, Narodowego Centrum Nauki OPUS 22 2021/43/B/NZ7/00230 oraz działalności statutowej Zakładu Farmakologii Bólu IF PAN.

1. *“Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciapała K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, **Mika J.**

2. *“Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, **Mika J.**

3. *“Initiators of classical and lectin complement pathways are differently engaged after traumatic brain injury - time-dependent changes in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus in a mouse model”* Ciechanowska A, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, **Mika J.**

4. *“New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies”* Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, Ciapała K, Kreiner G, **Mika J.**

5. *“Pharmacological Modulation of the MIP-1 Family and Their Receptors Reduces Neuropathic Pain Symptoms and Influences Morphine Analgesia: Evidence from a Mouse Model”* Ciechanowska A, Pawlik K, Ciapała K, **Mika J.**

prof. dr hab. Joanna Mika

Milan, February 10th, 2021

## DECLARATION

I hereby declare that Agata Ciechanowska (principal investigator) participation in the publication listed below consisted in developing the general concept of the research in question, putting the experimental part into effect and preparing manuscript for print.

On my part, my role was to contribute to model injured mice and review the obtained results:

1. *“Changes in macrophage inflammatory protein (MIP) family members expression induced by traumatic brain injury in mice”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciapała K, Oggioni M, **Mercurio D**, De Simoni MG, Mika J.
2. *“Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, **Mercurio D**, De Simoni MG, Mika J.
3. *“Initiators of classical and lectin complement pathways are differently engaged after traumatic brain injury-time-dependent changes in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus in a mouse model”* Ciechanowska A, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, **Mercurio D**, De Simoni MG, Mika J.

PhD Marco Oggioni



Department of Neuroscience,  
Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS,  
via Mario Negri, 2, 20156, Milan, Italy

---

Sede Legale  
Mario Negri Milano

Via Mario Negri, 2 - 20156 Milano  
Tel. +39 02 390141  
mnegri@marionegri.it

Centro di Ricerche Cliniche  
per le Malattie Rare “Aldo e Cele Daccò”  
Villa Camozzi

Via G.B. Camozzi, 3 - 24020 Ranica (BG)  
Tel. +39 035 45351  
villacamozzi@marionegri.it

Centro Anna Maria Astori  
Parco Scientifico Tecnologico  
Kilometro Rosso

Via Stezzano, 87 - 24126 Bergamo  
Tel. +39 035 42131  
bergamo@marionegri.it

marionegri.it

Milan, February 10th, 2021

## DECLARATION

I hereby declare that Agata Ciechanowska (principal investigator) participation in the publication listed below consisted in developing the general concept of the research in question, putting the experimental part into effect and preparing manuscript for print.

On my part, my role was to contribute to model injured mice and review the obtained results:

1. *“Changes in macrophage inflammatory protein (MIP) family members expression induced by traumatic brain injury in mice”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciapała K, Oggioni M, **Mercurio D**, De Simoni MG, Mika J.
2. *“Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, **Mercurio D**, De Simoni MG, Mika J.
3. *“Initiators of classical and lectin complement pathways are differently engaged after traumatic brain injury-time-dependent changes in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus in a mouse model”* Ciechanowska A, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, **Mercurio D**, De Simoni MG, Mika J.

PhD Domenico Mercurio



Department of Neuroscience,  
Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS,  
via Mario Negri, 2, 20156, Milan, Italy

Sede Legale  
Mario Negri Milano

Via Mario Negri, 2 - 20156 Milano  
Tel. +39 02 390141  
mnegri@marionegri.it

Centro di Ricerche Cliniche  
per le Malattie Rare “Aldo e Cele Daccò”  
Villa Camozzi

Via G.B. Camozzi, 3 - 24020 Ranica (BG)  
Tel. +39 035 45351  
villacamozzi@marionegri.it

Centro Anna Maria Astori  
Parco Scientifico Tecnologico  
Kilometro Rosso

Via Stezzano, 87 - 24126 Bergamo  
Tel. +39 035 42131  
bergamo@marionegri.it

marionegri.it

## DECLARATION

I hereby declare that Agata Ciechanowska (principal investigator) participation in the publication listed below consisted in developing the general concept of the research in question, putting the experimental part into effect and preparing manuscript for print.

On my part, my role was to review the obtained results and manuscripts:

1. *“Changes in macrophage inflammatory protein (MIP) family members expression induced by traumatic brain injury in mice”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciapała K, Oggioni M, Mercurio D, **De Simoni MG**, Mika J.
2. *“Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes”* Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, **De Simoni MG**, Mika J.
3. *“Initiators of classical and lectin complement pathways are differently engaged after traumatic brain injury-time-dependent changes in the cortex, striatum, thalamus and hippocampus in a mouse model”* Ciechanowska A, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, **De Simoni MG**, Mika J.

Prof. Maria Grazia De Simoni



Department of Neuroscience,  
Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS,  
via Mario Negri, 2, 20156, Milan, Italy

Sede Legale  
Mario Negri Milano

Via Mario Negri, 2 - 20156 Milano  
Tel. +39 02 390141  
mnegri@marionegri.it

Centro di Ricerche Cliniche  
per le Malattie Rare “Aldo e Cele Daccò”  
Villa Camozzi

Via G.B. Camozzi, 3 - 24020 Ranica (BG)  
Tel. +39 035 45351  
villacamozzi@marionegri.it

Centro Anna Maria Astori  
Parco Scientifico Tecnologico  
Kilometro Rosso

Via Stezzano, 87 - 24126 Bergamo  
Tel. +39 035 42131  
bergamo@marionegri.it

marionegri.it



## **12. ZGODY KOMISJI ETYCZNEJ**



*Ministero della Salute*

Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari  
Ufficio 6



IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche  
MARIO NEGRI - Milano  
Ufficio Animal Care Unit  
pec: acu@pec.marionegri.it

e, per conoscenza

ASL Milano  
Dipartimento Veterinario  
dipartimentoveterinario@pec.asl.milano.it

**OGGETTO:** D.lgs. 26/2014 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.  
Trasmissione autorizzazione ai sensi dell'art. 31.  
Autorizzazione n° 753/2017-PR (Risposta a prot. 9F5F5.81 del 01/06/2017)

Si trasmette l'autorizzazione n° 753/2017-PR rilasciata in data 10/10/2017, ai sensi dell'art. 31  
del D.lgs. 26/2014.

IL DIRETTORE DELL'UFFICIO 6  
Dr. Vincenzo Ugo SANTUCCI



## AUTORIZZA

1. L'IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" con sede legale in Milano (MI), Via La Masa, 19, all'esecuzione del progetto di ricerca ex articolo 31 del decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, in conformità a quanto indicato nella richiesta di autorizzazione citata in premessa ed, in particolare, con riferimento a:

**"Valutazione dell'attivazione della via lectinica del sistema del complemento nel trauma cranico. Identificazione di nuovi target terapeutici"**

2. La **Dr.ssa Maria Grazia DE SIMONI** quale responsabile del progetto di ricerca, ai sensi dell'articolo 3, comma 1, lettera g) del d.lgs. n. 26/2014;

3. L'IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" con sede legale in Milano (MI), Via La Masa, 19, all'esecuzione del progetto di ricerca di cui al punto 1 nello stabilimento utilizzatore dell'IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", sito in Milano (MI), Via La Masa, 19, regolarmente autorizzato con decreto n. 19/2008-A, del 06/03/2008, ai sensi del D.lgs. 116/92.

Alla conclusione del progetto di ricerca, il responsabile di cui all'articolo 3, comma 1, lettera g) del d.lgs. n. 26/2014 dovrà inviare alla scrivente Amministrazione la documentazione necessaria ai fini della valutazione retrospettiva come previsto dall'articolo 32 del citato decreto.

La presente autorizzazione ha una durata di ventiquattro mesi e può essere revocata secondo quanto previsto dall'articolo 31, comma 15 del d.lgs. n. 26/2014.

10 OTT. 2017

IL DIRETTORE GENERALE  
(Dot. Silvio BORDELLO)

## UCHWAŁA NR 1277/2015

z dnia 17 grudnia 2015

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

### § 1

Na podstawie art. 48 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) po rozpatrzeniu wniosku pt.:

„Poszukiwanie nowych punktów uchwytu dla skutecznej terapii bólu neuropatycznego i nasilania działania leków opioidowych w oparciu o zbadanie i modulację zmian w układach chemokinowych” z dnia 11 grudnia 2015, złożonego przez, adres: Instytut Farmakologii PAN,<sup>1</sup> zaplanowanego przez<sup>2</sup> dr hab. Joannę Mikę lokalna komisja etyczna:

### WYRAŻA ZGODĘ<sup>3</sup>

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: badania podstawowe
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: umiarkowany
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>4</sup>: szczur Wistar ok. 62-67 dni – 1720 (ogółem).; mysz Albino-Swiss ok. 32-38 dni – 920 (ogółem) ; samice ciężarne Wistar ok. 2 mies. – 20 (ogółem)
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: J. Mikę, B. Przewłocka, M. Żychowska, W. Makuch, E. Rojewska, K. Kwiatkowski, A. Piotrowska, A. Jurga, D. Piłat
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>5</sup> od 06.2016 do 06.2021
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>6</sup>: Instytut Farmakologii PAN Kraków
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nd
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez nd, w sposób: nd
9. Doświadczenie nie zostanie<sup>7</sup> poddane ocenie retrospektywnej :

<sup>1</sup> imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby;

<sup>2</sup> imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

<sup>3</sup> Niewłaściwy zapis usunąć

<sup>4</sup> Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju

<sup>5</sup> Nie dłużej niż 5 lat

<sup>6</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

<sup>7</sup> Niewłaściwy zapis usunąć

**Uzasadnienie:**

Celem projektu jest stworzenie eksperymentalnych podstaw do rozwoju bardziej selektywnej i skutecznej terapii bólu neuropatycznego poprzez zastosowanie terapii skojarzonej, łączącej leki przeciwbólowe i substancje modulujące interakcje neuroimmunologiczne, w szczególności układy chemokinowe. Zahamowanie ekspresji czynników pochodzenia immunologicznego może zwiększyć efektywność leków przeciwbólowych oraz umożliwić stosowanie niższych dawek, co pozwoli uniknąć występowania objawów niepożądanych. Badania te pozwolą lepiej zrozumieć patomechanizm bólu neuropatycznego. Wynikiem zaplanowanych badań będzie stwierdzenie, który z mechanizmów działania substancji/leków modulujących interakcje neuroimmunologiczne mógłby być korzystny w terapii bólu neuropatycznego.

Wyznaczone w projekcie cele można osiągnąć stosując zaproponowany model i metody badawcze.

**§ 4**

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

II Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach  
przy Instytucie Farmakologii PAN  
w Krakowie

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca  
II Lokalnej Komisji Etycznej  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach  
*B. Budziszewska*  
Prof. dr hab. Bogusława Budziszewska

Podpisy przewodniczącego komisji

Otrzymuje Użytkownik

**Pouczenie:**

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

## UCHWAŁA NR 301/2017

z dnia 7-11-2017

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

### § 1

Lokalna komisja etyczna po rozpatrzeniu wniosku pt. „Poszukiwanie nowych punktów uchwytu dla skutecznej terapii bólu neuropatycznego i nasilenia działania leków opioidowych w oparciu o zbadanie i modulację zmian w układach chemokinowych” z dnia 25-10-2017 złożonego przez: Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków<sup>1</sup>, zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joanna Mika<sup>2</sup>, a dotyczącego:

#### **dotychczasowych osób przeprowadzających doświadczenia**

w ramach wydanej przez komisję zgody uchwałą nr 1277/2015 z dnia 17.12.2015 r.

### WYRAŻA ZGODĘ<sup>3</sup>

**na dokonanie zmian w zakresie określonym poniżej.**

### § 2

1. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur po zatwierdzonych zmianach to: bez zmian.
2. Zespół prowadzący doświadczenia rozszerza się o następujące osoby (nazwisko i imię, nazwa użytkownika): mgr Joanna Kujacz, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie; mgr Katarzyna Ciapała, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie; mgr Agata Ciechanowska, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie; mgr inż. Katarzyna Pawlik, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.
3. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>4</sup>: bez zmian.

<sup>1</sup> Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby;

<sup>2</sup> Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

<sup>3</sup> Niewłaściwy zapis usunąć

<sup>4</sup> Nie dłużej niż 5 lat

**Uzasadnienie:**

Celem projektu przedstawionego we wniosku macierzystym jest opracowanie nowego podejścia terapeutycznego do leczenia bólu neuropatycznego poprzez wzmocnienie działania leków opioidowych w oparciu o zbadanie i modulację zmian w układach chemokinowych.

W niniejszym wniosku Autorka projektu zwraca się z prośbą o włączenie do zespołu wykonawców tego doświadczenia 4 osób posiadających wymagane wyznaczenia.

Mając to na uwadze, komisja wyraża zgodę na włączenie tych dodatkowych osób jako osób uczestniczących w zaplanowanych doświadczeniach.

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

II Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie przy  
Instytucie Farmakologii PAN  
ul. Smełna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Otrzymuje Użytkownik

**Pouczenie:**

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

Przewodniczący II Lokalnej Komisji  
Etycznej do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie

  
Adam Roman

Podpis przewodniczącego komisji

## UCHWAŁA NR 75/2017

z dnia 16-02-2017

### II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

#### § 1

Na podstawie art. 48 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) po rozpatrzeniu wniosku pt. „Poszukiwanie nowych punktów uchwytu dla skutecznej terapii bólu neuropatycznego i nasilania działania leków opioidowych w oparciu o zbadanie i modulację zmian w układach chemokinowych – badania in vivo w mysich modelach bólu neuropatycznego” z dnia 08-02-2017, złożonego przez: Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków<sup>1</sup>, zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę<sup>2</sup>, 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: badania podstawowe.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>3</sup>: 1320 myszy rasy Albino Swiss, ok. 32-38-dniowych.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, dr Katarzyna Popiołek-Barczyk, mgr Magdalena Żychowska, mgr Wioletta Makuch, dr Ewelina Rojewska, mgr Klaudia Kwiatkowski, mgr Anna Piotrowska, mgr Agnieszka Jurga, Agnieszka Młynarczyk.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>4</sup>: 1 marca 2017 r. do 1 marca 2022 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>5</sup>: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzięki zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie<sup>6</sup> poddane ocenie retrospektywnej w terminie: po zakończeniu realizacji badań.

<sup>1</sup> Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby;

<sup>2</sup> Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

<sup>3</sup> Podać liczbę, szczerp/stado, wiek/stadium rozwoju

<sup>4</sup> Nie dłużej niż 5 lat

<sup>5</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

<sup>6</sup> Niewłaściwy zapis usunąć



**Uzasadnienie:**

Badania przeprowadzone przez Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu wskazują, że co piąty Europejczyk cierpi na ból przewlekły, a jednemu na trzech pacjentów stan ten uniemożliwia prowadzenie dotychczasowego i niezależnego stylu życia. Pomimo licznych badań zarówno klinicznych, jak i doświadczalnych, mechanizm powstawania i utrzymywania się bólu neuropatycznego u ludzi i zwierząt wciąż nie jest dokładnie poznany, a ten rodzaj bólu jest bólem lekoopornym. Celem przedstawionych we wniosku badań jest stworzenie eksperymentalnych podstaw dla rozwoju bardziej selektywnej i skutecznej terapii skojarzonej bólu neuropatycznego. Podania u zwierząt chemokin - modulatorów interakcji neuroimmunologicznych, przeciwciał neutralizujących, antagonistów receptorów, do których badane chemokiny wykazują największe powinowactwo, także w połączeniu ze stosowanymi opioidowymi lekami przeciwbólowymi pozwolą lepiej zrozumieć patomechanizm bólu neuropatycznego, a więc i zoptymalizować jego terapię. Oczekiwanym wynikiem badań będzie stwierdzenie, który z mechanizmów działania substancji/leków modulujących interakcje neuroimmunologiczne mógłby być korzystny w terapii bólu neuropatycznego. Zahamowanie ekspresji czynników pochodzenia immunologicznego, może zwiększyć efektywność leków przeciwbólowych oraz umożliwić stosowanie ich niższych dawek, co pozwoli uniknąć występowania polekowych objawów niepożądanych. Dlatego też obecny projekt jest istotny z punktu widzenia nie tylko naukowego, ale i klinicznego, a badania przedstawione we wniosku są niezwykle istotne pod względem poznawczym (potencjalnych zastosowań praktycznych – poszukiwanie nowych możliwości terapii bólu neuropatycznego) i uzasadniają przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń. Organizacja badań uwzględnia zasady 3R (przeszukiwanie piśmiennictwa, wybór dawek potencjalnie najbardziej skutecznych). Liczebność grup oszacowano prawidłowo (metodami statystycznymi i na podstawie piśmiennictwa – liczebność osobników w grupie: maksymalnie 10 myszy/grupę podano na podstawie wyboru piśmiennictwa oraz wcześniejszych doświadczeń Autorów. Jak zapewnił obecny na posiedzeniu komisji Kierownik niniejszego projektu, prof. nadzw. dr hab. Joanna Mika, wykorzystywane przez Jej zespół modele badawcze bólu neuropatycznego wymagają użycia takiej liczby zwierząt eksperymentalnych, co jest związane z występującymi niekiedy, a niemożliwymi do przewidzenia, problemami podczas indukcji znieczulenia ogólnego wykonywanego przed zabiegiem podwiązania nerwu kulszowego, a nie z samą metodą wywoływania bólu neuropatycznego. Zdanie to podzielają inni członkowie komisji zajmujący się zbliżoną tematyką badawczą (dr hab. Kinga Sałat). Autorka projektu udzieliła wyczerpujących wyjaśnień wszystkich kwestii dotyczących dobrostanu zwierząt w trakcie operacji i w okresie pooperacyjnym.

Oczekiwanym wyników nie można uzyskać innymi metodami bez użycia zwierząt, gdyż nie ma metod modelowania bólu neuropatycznego w warunkach *in vitro*. Dotkliwość procedur oszacowano poprawnie (najwyższa kategoria dotkliwości: dotkliwa). Zespół odpowiedzialny za realizację projektu ma duże doświadczenie w wykonywaniu tego typu badań. Zwierzęta będą miały zapewnione odpowiednie warunki bytowania.

Podsumowując, w świetle przedstawionych we wniosku danych oraz biorąc pod uwagę znaczenie oczekiwanym wyników, zgoda komisji na wnioskowane badania jest uzasadniona. Na podstawie Art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej po jego zakończeniu.

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

II Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie przy  
Instytucie Farmakologii PAN  
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

Przewodniczący II Lokalnej Komisji  
Etycznej do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie  
*Adam Roman*  
dr Adam Roman

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Podpis przewodniczącego komisji

Otrzymuje Użytkownik

Pouczenie:

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

## UCHWAŁA NR 305/2017

z dnia 7-11-2017

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

### § 1

Lokalna komisja etyczna po rozpatrzeniu wniosku pt. „Poszukiwanie nowych punktów uchwytu dla skutecznej terapii bólu neuropatycznego i nasilenia działania leków opioidowych w oparciu o zbadanie i modulację zmian w układach chemokinowych – badania in vivo w mysich modelach bólu neuropatycznego” z dnia 25-10-2017 złożonego przez: Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków<sup>1</sup>, zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joanna Mika<sup>2</sup>, a dotyczącego:

#### **dotychczasowych osób przeprowadzających doświadczenia**

w ramach wydanej przez komisję zgody uchwałą nr 75/2017 z dnia 16.02.2017 r.

### WYRAŻA ZGODĘ<sup>3</sup>

na dokonanie zmian w zakresie określonym poniżej.

### § 2

1. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur po zatwierdzonych zmianach to: bez zmian.
2. Zespół prowadzący doświadczenia rozszerza się o następujące osoby (nazwisko i imię, nazwa użytkownika): mgr Joanna Kujacz, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie; mgr Katarzyna Ciapała, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie; mgr Agata Ciechanowska, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie; mgr inż. Katarzyna Pawlik, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.
3. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>4</sup>: bez zmian.

---

<sup>1</sup> Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby;

<sup>2</sup> Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

<sup>3</sup> Niewłaściwy zapis usunąć

**Uzasadnienie:**

Wniosek dotyczy doświadczenia, na które II LKE w Krakowie wyraziła zgodę uchwałą nr 75/2017 w dn. 12.02.2017 r. Kierownik projektu, prof. dr hab. Joanna Mika, wnioskuje o włączenie dodatkowych osób do realizacji badań. Nowi członkowie zespołu posiadają wymagane kwalifikacje i wyznaczenia jako osoby uczestniczące w doświadczeniach, które wnioskodawca dołączył do dokumentacji. W związku z tym komisja wyraża zgodę na proponowaną zmianę.

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

II Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie przy  
Instytucie Farmakologii PAN  
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Otrzymuje Użytkownik

Porozumienie:

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

Przewodniczący II Lokalnej Komisji  
Etycznej do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie

*Adrian Roman*  
dr. Adrian Roman

Podpis przewodniczącego komisji

---

<sup>4</sup> Nie dłużej niż 5 lat

## UCHWAŁA NR 235/2020

z dnia 24-09-2020

### II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

#### § 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie profilu długotrwałych zmian w biosyntezie wybranych chemokin i ich receptorów w rdzeniu kręgowym u myszy w modelu bólu neuropatycznego” z dnia 16-09-2020 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków<sup>1</sup>, zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Miłę<sup>2</sup>, przy udziale<sup>3</sup>; nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

#### WYRAŻA ZGODĘ<sup>4</sup>

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: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>5</sup>: mysz domowa, stado CD1 IGS, 36 szt., 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, dr Ewelina Rojewska, mgr Wioletta Makuch, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, Agnieszka Młynarczyk, mgr inż. Katarzyna Pawlik, mgr Joanna Bogacka.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>6</sup>: 28.09.2020 r. do 30.09.2022 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>7</sup>: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzięki zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie 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:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji.

<sup>1</sup> Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

<sup>2</sup> Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

<sup>3</sup> Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

<sup>4</sup> Niewłaściwy zapis usunąć.

<sup>5</sup> Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

<sup>6</sup> Nie dłużej niż 5 lat.

<sup>7</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

#### § 4

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

II Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie przy  
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Mijskiej  
ul. Smętna 12, 31-143 Kraków  
(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji  
Etycznej do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie  
*K. Salińska*  
prof. dr hab. Kinga Salińska  
Podpis przewodniczącego 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 – t.j.; 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 40/2023

z dnia 09-02-2023

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

### § 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie efektywności przeciwbólowej łącznych podań antagonistów receptorów chemokinowych – CCR1 i CCR5 w modelu bólu neuropatycznego u myszy” z dnia 09-02-2023 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków<sup>1</sup>, zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę<sup>2</sup>, przy udziale<sup>3</sup>: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

### WYRAŻA ZGODĘ<sup>4</sup>

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: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>5</sup>: mysz domowa, CD1 IGS (Albino Swiss), samce, 40 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>6</sup>: 13.02.2023 r. do 10.02.2028 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>7</sup>; nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie 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.

<sup>1</sup> Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

<sup>2</sup> Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

<sup>3</sup> Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

<sup>4</sup> Niewłaściwy zapis usunąć.

<sup>5</sup> Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

<sup>6</sup> Nie dłużej niż 5 lat.

<sup>7</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

**Uzasadnienie:**

Niniejszy wniosek jest rozpatrywany po raz pierwszy. Pochodzi z Instytutu Farmakologii im. J. Maja PAN w Krakowie a osobą planującą doświadczenie jest prof. dr hab. Joanna Mika.

Celem projektu jest zbadanie przeciwbólowego działania antagonistów receptorów chemokinowych CCR1 i CCR5 u samców myszy domowej. Badania podstawowe (PB[3]) mają być wykonane na modelu luźnego podwiązania nerwu kulszowego (model CCI). Testy behawioralne jakie mają być wykonane siódmego dnia po wywołaniu neuropatii to test von Frey'a i test zimnej płytki. Po zakończeniu badania myszy zostaną uśmiercone poprzez dekapitację, a tkanki będą przekazane do dalszych badań. Kategoria dotkliwości procedur to kategoria tagodna (10 myszy) i dotkliwa (30 myszy).

Komisja zwraca uwagę na następujące uchybienia:

- W punkcie 7A wskazano, że do badań użyte będą samce i samice myszy stada CD1 IGS, podczas gdy w punkcie 7B wskazano wyłącznie samce.

- Nieprawidłowa kolejność czynności w procedurze nr 2 – jak wskazano w opisie czynności nr 2, ważenie będzie się odbywać w 7-ym dniu po podwiązaniu nerwu kulszowego, dlatego czynność ważenia powinna być czynnością nr 3, a czynność podwiązania nerwu – czynnością nr 2.

Powyższe nie stanowi przeszkody w udzieleniu zgody na realizację doświadczenia.

Podsumowując, w świetle przedstawionych we wniosku danych, jak również biorąc pod uwagę szkodliwość doświadczenia dla zwierząt oraz znaczenie oczekiwanych wyników, zgoda Komisji na wnioskowane badania jest uzasadniona.

Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.



II Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie przy  
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN  
ul. Smolna 12, 31-343 Kraków

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji  
Etycznej do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie  
**K-SALAT**  
prof. dr hab. Kinga Salut

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Podpis przewodniczącego 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 – t.j.; 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 236/2021

z dnia 22-07-2021

### II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

#### § 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie efektywności przeciwbólowej przeciwciała neutralizującego integralinę  $\alpha 9$  i antagonisty XCR1 po podaniu probólowej chemokiny XCL1 u myszy” z dnia 14-07-2021 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków<sup>1</sup>, zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę<sup>2</sup>, przy udziale<sup>3</sup>: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

#### WYRAŻA ZGODĘ<sup>4</sup>

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: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>5</sup>: mysz domowa, stado CD1 IGS, 130 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, dr Ewelina Rojewska, mgr Wioletta Makuch, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, Agnieszka Młynarczyk, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>6</sup>: 29.07.2021 r. do 26.07.2026 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>7</sup>: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzięki zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie 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:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji. Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

<sup>1</sup> Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

<sup>2</sup> Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

<sup>3</sup> Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

<sup>4</sup> Niewłaściwy zapis usunąć.

<sup>5</sup> Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

<sup>6</sup> Nie dłużej niż 5 lat.

<sup>7</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

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

II Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie przy  
Instytucie Farmakologii im. Karola Jajka PAN  
ul. Smętna 12, 31-143 Kraków  
(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej  
Etycznej do Spraw Doświadczeń  
Zwierzętach w Krakowie  
*K. Salaś*  
prof. dr hab. Kinga Salaś  
Podpis przewodniczącego 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 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; 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 297/2021

z dnia 07-10-2021

### II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

#### § 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie efektywności przeciwbólowej przeciwciała neutralizującego integrynę  $\alpha 9$  i antagonisty XCR1 w modelu bólu neuropatycznego u myszy” z dnia 29-09-2021 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków<sup>1</sup>, zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę<sup>2</sup>, przy udziale<sup>3</sup>: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

#### WYRAŻA ZGODĘ<sup>4</sup>

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: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>5</sup>: mysz domowa, stado CD1 IGS, 230 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, dr Ewelina Rojewska, mgr Wioletta Makuch, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, Agnieszka Młynarczyk, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>6</sup>: 07.10.2021 r. do 06.10.2025 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>7</sup>: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzięki zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie 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:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji. Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

<sup>1</sup> Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

<sup>2</sup> Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

<sup>3</sup> Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

<sup>4</sup> Niewłaściwy zapis usunąć.

<sup>5</sup> Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

<sup>6</sup> Nie dłużej niż 5 lat.

<sup>7</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

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

• Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie przy  
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN  
ul. Śmigłowa 17, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca K. Lokalnej Komisji  
Etycznej do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie  
*K. Szałot*  
prof. dr hab. Kinga Szałot

Podpis przewodniczącego 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 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; 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 89/2021

z dnia 18-03-2021

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

### § 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie wpływu przeciwciała neutralizującego XCL1 na efektywność stosowanych w klinice przeciwbólowych leków opioidowych w modelu bólu neuropatycznego u myszy” z dnia 10-03-2021 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków<sup>1</sup>, zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę<sup>2</sup>, przy udziale<sup>3</sup>: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

### WYRAŻA ZGODĘ<sup>4</sup>

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: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>5</sup>: mysz domowa, stado CD1 IGS, 140 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, dr Ewelina Rojewska, mgr Wioletta Makuch, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, Agnieszka Młynarczyk, mgr inż. Katarzyna Pawlik, mgr Joanna Bogacka.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>6</sup>: 22.03.2021 r. do 22.03.2025 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>7</sup>: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzięki zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie 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.

<sup>1</sup> Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

<sup>2</sup> Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

<sup>3</sup> Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

<sup>4</sup> Niewłaściwy zapis usunąć.

<sup>5</sup> Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

<sup>6</sup> Nie dłużej niż 5 lat.

<sup>7</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

**Uzasadnienie:**

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji. Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 4

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

II Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie przy  
Instytucie Farmakologii im. Jęzego Maja PAN  
ul. Śmiełna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji  
Etycznej do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie  
*R. Szała*  
prof. dr hab. Kinga Szała

Podpis przewodniczącego 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 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; 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 98/2022

z dnia 07-04-2022

### II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

#### § 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku uzupełniającego pt.: „Określenie wpływu przeciwciała neutralizującego XCL1 na efektywność stosowanych w klinice przeciwbólowych leków opiodowych w modelu bólu neuropatycznego u myszy” z dnia 29-03-2022, złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków<sup>1</sup>, zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę<sup>2</sup> przy udziale<sup>3</sup>: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

#### WYRAŻA ZGODĘ<sup>4</sup>

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie niniejszego wniosku uzupełniającego.

#### § 2

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

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: bez zmian.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: bez zmian.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków<sup>5</sup>: mysz domowa, CD1 IGS (Albino Swiss), samce, 70 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: bez zmian.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>6</sup>: bez zmian.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku<sup>7</sup>: bez zmian.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzięki zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie<sup>8</sup> poddane ocenie retrospektywnej w terminie: bez zmian.

#### § 3

##### Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji.

<sup>1</sup> Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

<sup>2</sup> Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

<sup>3</sup> Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

<sup>4</sup> Niewłaściwy zapis usunąć.

<sup>5</sup> Podać liczbę, szczepi-stado, wiek/stadium rozwoju.

<sup>6</sup> Nie dłużej niż 5 lat.

<sup>7</sup> Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

<sup>8</sup> Niewłaściwy zapis usunąć.

#### § 4

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

II Lokalna Komisja Etyczna  
do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie przy  
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN  
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji  
Etycznej do Spraw Doświadczeń na  
Zwierzętach w Krakowie:

**C. Sałat**

prof. dr hab. Kinga Sałat

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Podpis przewodniczącego 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 – t.j.; 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