

Prof. dr hab. Kinga Sałat
Katedra Farmakodynamiki
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum
Uniwersytet Jagielloński
Ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Kraków, 11.06.2021

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Joanny Bogackiej pt.
„IMPORTANCE OF PHARMACOLOGICAL MODULATION OF C-C
CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 4 (CCR4) IN NEUROPATHIC PAIN OF
DIFFERENT ETIOLOGY”,

wykonanej w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii
Nauk w Krakowie

1. Podstawa formalna opracowania recenzji:

Recenzja została opracowana na zamówienie Dyrektora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, prof. dr hab. Małgorzaty Filip, na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z dnia 17 marca 2021 r.

2. Tematyka rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematu badań

Według definicji *International Association for the Study of Pain*, ból neuropatyczny to przewlekły ból spowodowany uszkodzeniem lub chorobą somatosensorycznego układu nerwowego. Dane epidemiologiczne wskazują, że częstość występowania bólu neuropatycznego w populacji ogólnej wynosi 6.9-10%. W odróżnieniu od bólu ostrego, pełniącego rolę ostrzegawczo-obronną, ból neuropatyczny, jako ból przewlekły, jest chorobą - może być wyniszczający, prowadzić do problemów ze snem oraz obniżać jakość życia osoby cierpiącej. Badania naukowe jasno dowodzą, że ból neuropatyczny może powstawać na drodze różnych mechanizmów - te same procesy inicjujące rozwój bólu neuropatycznego można zaobserwować w różnych zespołach bólowych; z drugiej strony, do powstania jednego zespołu przyczynić się mogą różne mechanizmy. W związku z tym, istotne jest zidentyfikowanie mechanizmów powstawania bólu u poszczególnych pacjentów, a skuteczne leczenie powinno być nastawione na takie postępowanie przeciwbólowe, które zablokuje lub przynajmniej ograniczy te mechanizmy.

Leczenie bólu neuropatycznego jest ogromnym wyzwaniem dla klinicystów, co wynika z faktu, że zmniejszenie dolegliwości bólowych za pomocą dostępnych analgetyków uzyskuje się

jedynie u około 50% chorych. Niska skuteczność leczenia bólu neuropatycznego może wynikać ze złożoności mechanizmów powstawania bólu neuropatycznego oraz współistnienia aspektów psychologicznych i emocjonalnych. Te skomplikowane molekularne mechanizmy rozwoju bólu neuropatycznego nie zostały w pełni poznane, jednak w świetle badań przedklinicznych i klinicznych ostatnich lat, istotną rolę w patogenezie tej choroby przypisuje się czynnikom immunologicznym oraz wzajemnej interakcji pomiędzy komórkami neuronalnymi i immunologicznymi.

Problematykę związku bólu neuropatycznego z funkcją układu chemokinowego i zmianami w obrębie układu immunologicznego podejmuje rozprawa doktorska mgr Joanny Bogackiej. Praca ta wykonana została pod kierownictwem naukowym prof. dr hab. Joanny Mika – promotora pracy w dyscyplinie nauki farmaceutyczne oraz dr hab. n. med. Anny Przeklasa-Muszyńskiej – promotora pracy w dyscyplinie nauki medyczne. Przedstawione w pracy badania były realizowane w ramach projektu OPUS 11 Narodowego Centrum Nauki (nr projektu: UMO-2016/21/B/NZ4/00128, kierownik projektu: prof. dr hab. Joanna Mika) oraz stypendium naukowego mgr Joanny Bogackiej uzyskanym w ramach projektu POWR.03.02.00-00-I013/16.

3. Charakterystyka rozprawy

Rozprawa napisana jest w języku polskim, składa się z 12 rozdziałów, w tym obszernego spisu literatury, obejmującego 296 pozycji z szeroko rozumianego zakresu neurobiologii i farmakologii bólu. Spis literatury został zaprezentowany zgodnie z kolejnością cytowania w tekście. W przeważającej części zawiera on najnowsze prace – 4 pozycje polskie, pozostałe w języku angielskim. Wykaz literatury zredagowany został jednolicie i bez większych błędów.

Całość pracy doktorskiej przedstawiona jest na 69 stronach. Dodatkową część rozprawy stanowią załączniki – kserokopie publikacji będących podstawą pracy doktorskiej, oświadczenia współautorów tych prac oraz uchwały lokalnej komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach, wyrażające zgodę na realizację badań *in vivo*.

Rozprawa pani mgr Joanny Bogackiej została przygotowana jako spójny tematycznie cykl prac, które ukazały się już drukiem. Rozprawa ma typowy dla takich prac doktorskich układ rozdziałów stanowiących logiczną całość – zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, syntetyczny opis wykorzystanej metodologii, główne zagadnienia pracy doktorskiej z omówieniem wyników i dyskusją. Doktorantka zaprezentowała również wnioski płynące z wykonanych badań a na końcu zwięźle podsumowała uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki badań. Rozprawa zawiera dodatkowo 10 rycin.

Załączone są wszystkie trzy prace będące podstawą ubiegania się o stopień doktora oraz oświadczenia współautorów, w których opisowo przedstawiono udział każdej z osób w powstawaniu

tych publikacji. Z informacji zawartej w oświadczeniach współautorów publikacji wynika, że Pani mgr Joanna Bogacka odegrała wiodącą rolę w projektowaniu doświadczeń, koordynowaniu prac eksperymentalnych, zbieraniu wyników i ich interpretacji oraz przygotowaniu wyników do publikacji. We wszystkich trzech publikacjach wchodzących w skład rozprawy, wśród autorów znaleźć można pracowników Instytutu Farmakologii im. J. Maja PAN w Krakowie, jak i badaczy z innych ośrodków (Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum). Ten aspekt rozprawy oceniam bardzo wysoko. Oczywistym wydaje się fakt, że nie wszystkie eksperymenty zostały wykonane przez Doktorantkę samodzielnie – obecnie trudno jest realizować złożone projekty badawcze pojedynczo – bez udziału i zaangażowania innych zespołów badawczych. Taka współpraca ze specjalistami w różnych dziedzinach i dyscyplinach jest niezwykle ważna, ponieważ już na etapie doktoratu pozwala nawiązywać kontakty naukowe, budować cenne relacje naukowe, uczy współpracy i pracy w zespole, co w przyszłości może poszerzać możliwości w zakresie planowania i realizacji kolejnych projektów.

Wartość naukowa projektu badawczego będącego podstawą rozprawy doktorskiej mgr Joanny Bogackiej została doceniona przez kilku międzynarodowych recenzentów, którzy wyrazili aprobatę dla publikacji 3 artykułów w prestiżowych czasopismach z listy JCR (*Impact Factor* tych prac to 15.835, liczba punktów MNiSW₂₀₁₉ wynosi 380). Warto też zauważyć, że wszystkie prace to publikacje, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, co dodatkowo wskazuje na Jej wiodącą rolę w opublikowanych badaniach.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Bogackiej rozpoczyna się przedstawionym w porządku alfabetycznym wykazem najważniejszych skrótów używanych w dalszej części pracy. Spis ten ułatwia analizę rozprawy. Po nim zamieszczono streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. **Rozdział pierwszy** rozprawy to spis publikacji wchodzących w skład cyklu prac będących podstawą rozprawy doktorskiej. Są to:

Publikacja [1]: Bogacka J, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Rojewska E, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, Mika J. 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;880:173166. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173166.

Publikacja [2]: 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. doi: 10.3389/fimmu.2020.01241.

Publikacja [3]: 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. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.06.025.

Rozdział drugi – wstęp - stanowi wprowadzenie do podjętej w pracy tematyki. Doktorantka przedstawiła w nim przegląd literatury dotyczącej ogólnej charakterystyki bólu, jego rodzajów. Skoncentrowała się na neuropatii cukrzycowej, możliwościach leczenia bólu neuropatycznego, neuroimmunologicznych mechanizmach rozwoju neuropatii. W tej części pracy opisała też znaczenie tkanki glejowej w rozwoju tolerancji na opioidy i scharakteryzowała rolę chemokin w procesach nocicepcji. Wstęp napisany jest w sposób interesujący i przejrzysty; stanowi on bardzo dobre wprowadzenie do dalszej części rozprawy. W **rozdziale trzecim** Doktorantka opisała szczegółowo cel podjęcia badań. W mojej opinii cel ten został sformułowany w sposób przejrzysty, zaplanowane zadania badawcze służące realizacji celu doświadczenia zostały dobrane w sposób logiczny, a dalsza część rozprawy doktorskiej jest konsekwentnym nawiązaniem do postawionej hipotezy badawczej. W **rozdziale czwartym** Doktorantka krótko przedstawiła metodykę i wykorzystane do badań materiały i metody analizy statystycznej, które szczegółowo opisane są w publikacjach [1] – [3]. **Rozdział piąty** to opis głównych osiągnięć rozprawy. Doktorantka przedstawiła w nim uzyskane wyniki badań, w tym te wskazujące na znaczenie ligandów receptora chemokinowego CCR4 w rozwoju bólu neuropatycznego w modelu luźnego podwiązania nerwu kulszowego (model CCI – ang. *chronic constriction injury*) i w model bólu neuropatycznego indukowanego podaniem streptozotocyny (STZ). **Rozdział szósty** stanowi dyskusja wyników uzyskanych badań. Oprócz opisu, Doktorantka zamieściła w niej ryciny w sposób schematyczny ilustrujące uzyskane wyniki badań (Ryc. 7-10). Dyskusja prowadzona jest w sposób płynny i logiczny, a wnioski dotyczące uzyskanych rezultatów są poprawne i poparte danymi literaturowymi z ostatnich lat. **Rozdział siódmy** to krótkie podsumowanie poprzednich dwóch rozdziałów. Doktorantka przedstawiła w nim wnioski końcowe i najważniejsze osiągnięcia uzyskane w ramach prowadzonych badań. **Rozdziały ósmy** to podsumowanie rozprawy, po którym przedstawiono spis piśmiennictwa cytowanego w pracy doktorskiej (**rozdział 9**). Kserokopie prac będących podstawą rozprawy to **rozdział dziesiąty**. **Rozdział jedenasty** to oświadczenia współautorów tych prac a **rozdział dwunasty** to kserokopie uchwał II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie.

4. Najważniejsze osiągnięcia rozprawy

W pracy doktorskiej Doktorantka wykazała, że pojedyncze i wielokrotne podpajęczynówkowe i dootrzewnowe podania antagonisty CCR4, związku C021, hamują nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne (tj. niską temperaturę) w modelu CCI u szczurów. Również w mysim modelu STZ podania podpajęczynówkowe i dootrzewnowe C021 hamują nadwrażliwość mechaniczną i

termiczną i korzystnie wpływają na koordynację ruchową zwierząt neuropatycznych mierzoną w teście pręta obrotowego. Doktorantka dowiodła też, że CCR4 odgrywa istotną rolę w pronocyceptywnym efekcie CCL2 w modelu neuropatii cukrzycowej, a oś CCL2/CCR4 odgrywa ważną rolę w rozwoju neuropatii cukrzycowej. Mgr Joanna Bogacka udowodniła też, że wielokrotne podania podpajęczynówkowe związku C021 obniżają poziom markera mikrogleju, IL-1beta oraz IL-18 w modelu CCI, a podanie dootrzewnowe C021 obniża poziom markera aktywacji mikrogleju, ale nie wpływa na poziom ww. interleukin. Wykazała również, że pojedyncze, podpajęczynówkowe podania C021 wzmacniają działanie przeciwbólowe morfiny i buprenorfiny w modelu CCI, natomiast pojedyncze i wielokrotne dootrzewnowe podania C021 wzmacniają działanie przeciwbólowe morfiny i buprenorfiny w tym modelu. W modelu bólu neuropatycznego indukowanego podaniem STZ, związek C021 podany pojedynczo, podpajęczynówkowo i dootrzewnowo wzmacnia działanie morfiny i buprenorfiny. Badania te wykazały więc, że farmakologiczna modulacja CCR4 może być nową, bardzo obiecującą strategią potencjalizacji analgetycznego działania opioidów w bólu neuropatycznym, a sam CCR4 wydaje się być ważnym celem molekularnym dla terapii skojarzonej bólu lekoopornego jakim jest ból neuropatyczny.

Podsumowując, uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań, opublikowane w pracach [1] – [3] i rzetelnie poparte danymi literaturowymi, wskazują zatem na rolę aktywacji CCR4 w rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne. Zmianom neuropatycznym obserwowanym na poziomie behawioralnym (ocenianym w testach von Frey’a i zimnej płytki) towarzyszą zmiany na poziomie molekularnym – wzrost poziomu mRNA dla *CCL2* w rdzeniu kręgowym i dla *CCL2*, *CCL17* i *CCL22* w zwojach korzeni grzbietowych. Moim zdaniem, przedstawione w rozprawie osiągnięcia świadczą o wysokich kompetencjach naukowych Doktorantki.

5. Uwagi do rozprawy

Przygotowując autoreferat Doktorantka nie ustrzegła się od pewnych błędów, głównie edytorskich. Są one następujące:

1. Spis treści nie koresponduje z faktycznym umiejscowieniem rozdziałów w dalszej części pracy, co utrudnia analizę rozprawy – na przykład rozdział 2.3 rozpoczyna się na str. 18 (a nie jak wskazuje spis treści na str. 17). Podobnie rozdział 2.4 – zaczyna się on na str. 22 (a nie na str. 17), itd.
2. Spis skrótów wykorzystanych w rozprawie:
 - W rozwinięciu skrótów i tłumaczeniach z języka angielskiego należałoby ujednolicić nazewnictwo, w tym używanie alfabetu greckiego i łacińskiego do oznaczeń receptorów opioidowych (mi i delta lub μ oraz δ dla MOR i DOR).

- W spisie skrótów nie znalazłam wyjaśnienia skrótów iNOS, NOS2, które są używane w dalszej części pracy (str. 36, 43); w spisie tym natomiast pojawiają się skróty, które w pracy nie są używane (np. SC dla oznaczenia rdzenia kręgowego, który w dalszej części pracy jest pisany pełną nazwą (jak np. na str. 41).

3. Streszczenie w języku polskim i dalsze części pracy (np. str. 32) - Doktorantka używa określenia w języku angielskim „test Rotarod”, podczas gdy dla tego testu istnieje polska nazwa „test pręta obrotowego”.
4. Spis publikacji wchodzących w skład cyklu rozprawy doktorskiej – są to 3 prace przedstawione na str. 11 maszynopisu, jednak prace wskazane jako prace nr 2 i nr 3 to prace, w których Doktorantka błędnie podaje nazwę czasopisma – praca nr 2 to praca opublikowana we *Frontiers in Immunology*, a praca nr 3 opublikowana jest w czasopiśmie *Neuroscience* (a nie odwrotnie). Analogiczny błąd pojawia się w spisie wszystkich publikacji na str. 69. W związku z zaistniałą pomyłką w spisie, moim zdaniem, publikacje będące podstawą pracy doktorskiej powinny być załączone w innej kolejności – jako pierwsza - praca w *European Journal of Pharmacology*, po niej praca opublikowana we *Frontiers in Immunology*, a na końcu praca z *Neuroscience*, co zresztą byłoby zasadne biorąc pod uwagę, że te dwie pierwsze ([1], [2]) to prace dotyczące badań na modelu CCI, a praca ostatnia ([3]) to badania dotyczące modelu STZ.

Poprawne przyporządkowanie tytułów publikacji do czasopism jest natomiast zawarte w oświadczeniach współautorów.

5. Wstęp:

- W podrozdziale 2.2 wymieniając przyczyny bólu neuropatycznego warto byłoby wspomnieć nie tylko o przyczynach takich jak uszkodzenia mechaniczne nerwów i choroby, ale i o polekowym bólu neuropatycznym, na przykład spowodowanym chemioterapią (pochodne platyny, taksany, alkaloidy barwinka, bortezomib, niektóre przeciwciała monoklonalne).

- Na str. 19 odniesienie do Ryc. 2 sugeruje jakoby przedstawiono na niej działania niepożądane leków stosowanych w leczeniu bólu neuropatycznego. Ryc. 2 przedstawia zestawienie leków I, II i III wyboru stosowanych w leczeniu bólu neuropatycznego. Odniesienie do tej ryciny powinno zatem pojawić się wcześniej, np. na str. 18.

- Na tej samej stronie (str. 19), dość niefortunnie, pojawia się sformułowanie sugerujące jakoby gabapentyna i pregabalina działały przez blokowanie kanałów sodowych zależnych od napięcia. Doktorantka pisze o lekach przeciwpadaczkowych stosowanych w leczeniu bólu neuropatycznego, wymienia mechanizmy ich działania (blokada kanałów sodowych i wapniowych), ale wskazuje tylko na pregabalinę i gabapentynę, odnosząc się do pracy

źródłowej (Fornasari D. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. Pain Ther. 2017;6(Suppl 1):25-33. doi: 10.1007/s40122-017-0091-4), w której poprawnie wskazano na kanały wapniowe jako cel terapeutyczny dla gabapentanoidów, a kanały sodowe dla trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (amitryptyliny) i środków znieczulających miejscowo (lidokainy).

6. Materiały i metodyka:

- W opisie metody CCI warto byłoby odnieść się do oryginalnej pracy Bennett i Xie (1988), a nie tylko własnych prac, a w przypadku modelu STZ wskazać dawkę STZ użytą do indukcji cukrzycy.

Inne drobne uwagi redakcyjne:

- Praca napisana jest poprawnym językiem, jedynie w niektórych miejscach pojawiają się błędy interpunkcyjne (brak przecinków - np. str. 8, 12, 13, 15, 16, 28, 29 30, 34; zbędne kropki w tytule na str. 12; powtórzenia wyrazów – str. 21 oraz „literówki” – na str. 24).
- Niezręczne sformułowania (np. na str. 13 – „ból staje się świadomy”; na str. 18 – „poszukiwanie bardziej wydajnych analgetyków”; na str. 31 i 48 „myszy zdrowe” w odniesieniu do myszy bez zaindukowanej neuropatii).
- Skrót wyjaśnione przy pierwszym użyciu powinny być konsekwentnie używane w dalszych częściach pracy – np. na str. 31 Doktorantka używa pełnej nazwy „streptozotocyna” – bez wskazania skrótu, a później stosuje albo tylko pełną nazwę (np. str. 33, 45), albo skrót, albo obydwie formy. Podobnie na rycinach, np. na Ryc. 1 widnieje pełna nazwa „streptozotocyna”, a na Ryc. 10 obie formy - „STZ” i pełna nazwa. Podobnie z terminem „zwoje korzeni grzbietowych” i użycie skrótu DRG (pełna nazwa i skrót – str. 32, sama pełna nazwa – str. 35 oraz sam skrót na str. 48).
- Należałoby użyć polskiej nazwy dla antagonisty CCR5 - marawiroku (str. 35).

Przytoczone uwagi nie mają wpływu na wartość merytoryczną całości opracowania przygotowanego przez p. mgr Joannę Bogacką, które to opracowanie oceniam bardzo pozytywnie.

6. **Ogólna ocena rozprawy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, której autorką jest mgr Joanna Bogacka skupia się na bardzo interesującym zagadaniu naukowym jakim jest związek bólu neuropatycznego ze zmianami w zakresie funkcji układu immunologicznego. W mojej ocenie, z uwagi na wysoką lekooporność bólu neuropatycznego i brak w pełni skutecznych leków do jego łagodzenia, te nowatorskie badania są niezwykle istotne nie tylko z naukowego, ale i potencjalnie użytecznego punktu widzenia, ponieważ wskazują na możliwe wykorzystanie uzyskanych wyników do dalszych

badzeń przyczyn powstawania neuropatii oraz jej objawów. Mogą też być pomocne w wytyczaniu kierunków poszukiwania nowych leków przeciwbólowych do znoszenia dolegliwości bólowych w przebiegu neuropatii różnego pochodzenia.

Cele założone na wstępie pracy były konsekwentnie realizowane i w mojej ocenie zostały osiągnięte. Doświadczenie Doktorantki w zakresie wykorzystania różnych metod badawczych, analiz *in vivo* i *ex vivo*, wskazują jednoznacznie na Jej zaawansowaną wiedzę dotyczącą tematyki opisanej w pracy. Na podkreślenie zasługuje fakt logicznego zaplanowania zestawu doświadczeń, które pozwoliły zweryfikować postawione hipotezy badawcze.

Rozprawa wnosi istotny wkład naukowy w problematykę patogenezy bólu neuropatycznego, a Doktorantka wykazała się nie tylko praktyczną umiejętnością prowadzenia badań naukowych, ale i zdolnością wnikliwej dyskusji dotyczącej różnych aspektów powstawania bólu neuropatycznego. Doktorantka wykazała się obszerną wiedzą teoretyczną i umiejętnością konfrontacji uzyskanych wyników i osiągnięć naukowych w międzynarodowym środowisku naukowym. Należy jeszcze raz podkreślić, że publikacje zostały wcześniej ocenione pozytywnie przez niezależnych międzynarodowych ekspertów.

Podsumowując, uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska, której autorką jest mgr Joanna Bogacka spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Dlatego stawiam wniosek o przyjęcie i dopuszczenie przez Radę Naukową Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie pracy doktorskiej mgr Joanny Bogackiej do publicznej obrony.

Jednocześnie, z uwagi na rangę podjętej tematyki, kompetencje Doktorantki, nowatorski charakter podjętej tematyki badawczej, umiejętność prowadzenia interesującej dyskusji oraz znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju badań nad mechanizmami neuropatii i bólu neuropatycznego, zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Bogackiej, zatytułowanej „Importance of pharmacological modulation of C-C chemokine receptor type 4 (CCR4) in neuropathic pain of different etiology”, wykonanej pod kierownictwem naukowym Promotorów, Pani prof. dr hab. n. med. Joanny Mika i Pani dr hab. n. med. Anny Przeklasa-Muszyńskiej.

Kinga Satał