

Mgr Joanna Bogacka

Zakład Farmakologii Bólu

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Collegium Medicum UJ w Krakowie

Promotorzy:

Dyscyplina: nauki farmaceutyczne: Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika

nauki medyczne: Prof. dr hab. n. med. Anna Przeklasa- Muszyńska

Tytuł pracy doktorskiej:

**Importance of pharmacological modulation
of C-C chemokine receptor type 4 (CCR4)
in neuropathic pain of different etiology**

**Znaczenie farmakologicznej modulacji
receptora chemokinowego z rodziny C-C typu 4 (CCR4)
w bólu neuropatycznym o różnej etiologii**

Streszczenie w języku polskim

Ból neuropatyczny powstaje w wyniku bezpośredniego uszkodzenia lub chorób dotyczących somatosensorycznej części układu nerwowego. Stanowi on istotny problem kliniczny, ze względu na jego skomplikowany mechanizm. Dlatego dobry efekt leczenia farmakologicznego, w oparciu o dostępne rekomendacje, uzyskuje się maksymalnie u 35-50% chorych. Pomimo znacznego postępu, jaki się dokonał w tej dziedzinie w ostatnich dekadach, skuteczność leczenia bólu neuropatycznego jest wciąż niezadowalająca. Złożony patomechanizm bólu neuropatycznego wpływa bezpośrednio na skuteczność farmakoterapii. Dane literaturowe sugerują, że czynniki immunologiczne pełnią istotną rolę w neuropatii, dlatego celem mojej rozprawy doktorskiej było zbadanie mechanizmów leżących u podłoża neuropatii, ze szczególnym uwzględnieniem roli CCR4 i jego ligandów w bólu neuropatycznym o różnej etiologii.

W badaniach wykorzystano szczury rasy Wistar/myszy Albino Swiss (Charles River) zgodnie z wytycznymi II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Zastosowano dwa modele bólu neuropatycznego: model Bennetta polegający na luźnym podwiązaniu nerwu kulszowego oraz model neuropatii cukrzycowej wywołany podaniem streptozotocyny. Narzędzia farmakologiczne podawano jednorazowo lub wielokrotnie, stosując dwie drogi - dootrzewnową lub podpajęczynówkową. Rozwój nadwrażliwości na bodźce dotykowe i termiczne określono za pomocą testu von Frey i zimnej płytki, a sprawność motoryczną przy użyciu testu Rotarod. W celu oceny zmian poziomu mRNA/białka wybranych czynników w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych (L4-L6) zastosowano metody RT-qPCR, Western blot, ELISA i mikromacierze białkowe.

Początkowe badania miały na celu określenie znaczenia selektywnych ligandów CCR4 (CCL17, CCL22) w procesach nocycypcji. Badania farmakologiczne po raz pierwszy dowiodły właściwości probólowych podanych podpajęczynówkowo CCL17 i CCL22 u zdrowych zwierząt. Ponadto, wykazaliśmy zmiany na poziomie mRNA CCL17 oraz CCL22 w zwojach korzeni grzbietowych, ale nie w rdzeniu kręgowym u szczurów/myszy w modelach neuropatii o różnej etiologii [Bogacka i wsp., *Eur. J. Pharm.* 2020; *Front. Immunol.* 2020; *Neuroscience*, 2020]. Wobec uzyskanych danych rola CCR4 na poziomie rdzenia kręgowego wciąż pozostawała niejasna. Nasze kolejne eksperymenty wskazały, że poziom pronocyceptywnej CCL2 znacząco rośnie w rdzeniu kręgowym zarówno po podwiązaniu nerwu kulszowego [Front. Immunol., 2020], jak i w neuropatii cukrzycowej [Neuroscience, 2020], a dane literaturowe sugerowały, że być może jest ona nieselektywnym ligandem CCR4. W naszych badaniach wykazaliśmy, że pronocyceptywny efekt wszystkich trzech chemokin jest osłabiany przez podpajęczynówkowe podania antagonisty CCR4 (C021). W przypadku CCL17 i CCL22 wynik ten nie był zaskakujący, ponieważ są to jego selektywne ligandy, natomiast dostarczyliśmy pierwszych dowodów na zaangażowanie CCR4 neuropatii cukrzycowej, podpajęczynówkowe/dootrzewnowe podania antagonisty CCR2 (RS5043930) nie osłabiają nadwrażliwości, co również sugeruje zaangażowanie CCL2/CCR4, a nie CCL2/CCR2 w transmisję nocycyptywną [Neuroscience, 2020].

W kolejnym etapie badań po raz pierwszy udowodniliśmy, że zarówno pojedyncze jak i wielokrotne podpajęczynówkowe jak też dootrzewnowe podania antagonisty CCR4 (C021) osłabiają nadwrażliwość na bodziec mechaniczny i termiczny w szczurzym [Eur. J. Pharm., 2020] i mysim [Front. Immunol., 2020] modelu neuropatii wywołanej podwiązaniem nerwu kulszowego. Co więcej, również w modelu neuropatii cukrzycowej dowiedliśmy, że podpajęczynówkowe/ dootrzewnowe podania C021, zależnie od dawki osłabiają nadwrażliwość oraz poprawiają sprawność lokomotoryczną [Neuroscience, 2020]. Jest to istotne z klinicznego punktu widzenia, ponieważ u pacjentów z cukrzycą wraz z rozwojem neuropatii, może pogarszać się sprawność motoryczna.

Dalsze badania miały na celu wyjaśnienie molekularnego podłoża obserwowanej analgezji po podaniu C021. W pracy [Eur. J. Pharm. 2020] wykazaliśmy, że wielokrotne podpajęczynówkowe podania C021 osłabiają nadwrażliwość po podwiązaniu nerwu kulszowego, jednocześnie obniżając poziom aktywacji makrofagów/mikrogleju w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych, natomiast nie mają wpływu na komórki astrogleju oraz limfocyty T (CD4, CD8). Co istotne, wielokrotne również dootrzewnowe podania C021 obniżają stopień aktywacji mikrogleju na poziomie rdzenia kręgowego po

podwiązaniu nerwu kulszowego [Front. Immunol., 2020]. Ponadto, na poziomie rdzenia kręgowego zaobserwowaliśmy, że C021 przyczynia się do obniżenia poziomu pronocyceptywnych cytokin (IL-1beta, IL-18, CCL2). Nasze wyniki sugerują, że podanie C021 moduluje oś CCL2/CCR4 na poziomie rdzenia kręgowego, natomiast na poziomie zwojów korzeni grzbietowych oś CCL17/CCL22/CCL2/CCR4.

Badania na szczurzym i mysim modelu neuropatii wykazały po raz pierwszy, że podania C021 zarówno pojedyncze jak i wielokrotne podpajęczynówkowe, jak również dootrzewnowe wzmacniają efekt analgetyczny morfiny i buprenorfiny [Eur J. Pharm., 2020; Front. Immunol., 2020; Neuroscience 2020]. Co ważne z klinicznego punktu widzenia wielokrotne dootrzewnowe podania C021 wraz z morfiną i buprenorfiną przez 12 dni, znacząco wydłużyły efekty analgetyczne tych opioidów, a myszy wykazywały lepszą kondycję lokomotoryczną [Front. Immunol., 2020].

Podsumowując, wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej opublikowane w postaci cyklu 3 oryginalnych prac, jednoznacznie wskazują na zaangażowanie CCR4 i jego ligandów w patogenezę neuropatii o różnej etiologii. Uzyskane dane potwierdzają hipotezę, że blokada sygnalizacji CCL17/CCL22/CCL2/CCR4 korzystnie moduluje procesy nocyceptywne oraz nasila analgetyczne działanie opioidów. W świetle uzyskanych danych poszukiwanie leków oddziałujących poprzez CCR4 wydaje się być nową i ciekawą strategią terapeutyczną w leczeniu bólu neuropatycznego.

Streszczenie w języku angielskim

Neuropathic pain develops as a result of direct damage or diseases affecting the somatosensory part of the nervous system. It is a significant clinical problem due to its complicated mechanism. Hence, good effects of pharmacological treatment based on available recommendations are achieved only in a maximum of 35–50% of patients. In the past few decades, there has been significant progress in this field, nevertheless, the efficacy of the treatment of neuropathic pain is still not satisfactory. The complex pathomechanism of neuropathic pain directly affects the efficacy of pharmacotherapy. Literature data suggest that immunological factors play an important role in neuropathy, therefore, the aim of my doctoral dissertation was to investigate the mechanisms underlying neuropathy, with particular emphasis on the role of CCR4 and its ligands in neuropathic pain of different etiologies.

Wistar rats/Albino Swiss mice (Charles River) were used in the study in accordance with the guidelines of the II Local Ethics Committee for Animal Experimentation. Two models of neuropathic pain were used: the unilateral sciatic nerve injury and the streptozotocin-induced

diabetic neuropathy. Pharmacological tools were administered once or repeatedly using two routes – intraperitoneal or intrathecal. Development of mechanical and thermal hypersensitivity was determined using the von Frey and cold plate tests, and motor functions were assessed using the Rotarod test. The RT-qPCR, Western blot, ELISA, and protein microarrays were used to evaluate the changes in the mRNA/protein levels of selected factors in the spinal cord and dorsal root ganglia (L4-L6).

The aim of the initial studies was to determine the importance of selective CCR4 ligands (CCL17, CCL22) in nociception processes. For the first time, our pharmacological studies proved the pronociceptive properties of CCL17 and CCL22 administered intrathecally to healthy animals. In addition, changes at the level of CCL17 and CCL22 mRNA were observed in the dorsal root ganglia, but not in the spinal cords of rats/mice in the models of neuropathy of different etiology [**Bogacka i wsp., Eur. J. Pharm. 2020; Front. Immunol. 2020; Neuroscience, 2020**]. Given all the obtained data, the role of CCR4 at the spinal cord level remained unclear. Our subsequent experiments indicated that the levels of pronociceptive CCL2 increased significantly in the spinal cord both after sciatic nerve injury [**Front. Immunol., 2020**] and in diabetic neuropathy [**Neuroscience, 2020**], and literature data suggested that it might have been a non-selective CCR4 ligand. In our studies, we showed that the pronociceptive effects of each of these three chemokines are attenuated by intrathecal administrations of the CCR4 (C021) antagonist. This result was not surprising in case of CCL17 and CCL22, though, since they are selective ligands of CCR4. Nevertheless, we provided the first evidence for the involvement of CCR4 in the pronociceptive effects of CCL2 [**Front. Immunol., 2020**]. Moreover, we showed that intrathecal/intraperitoneal administrations of the CCR2 antagonist (RS5043930) do not attenuate hypersensitivity in diabetic neuropathy, what also suggests the involvement of CCL2/CCR4, but not CCL2/CCR2, in nociceptive transmission [**Neuroscience, 2020**].

In the next step of our research, we proved for the first time that both single and repeated intrathecal and intraperitoneal administrations of the CCR4 antagonist (C021) reduce mechanical and thermal hypersensitivity in rats [**Eur. J. Pharm., 2020**] and mice [**Front. Immunol., 2020**] after sciatic nerve injury. Moreover, we showed that intrathecal/intraperitoneal administrations of C021, depending on the dosage, reduce hypersensitivity and improve locomotor activity also in the diabetic neuropathy model [**Neuroscience, 2020**]. This is important from a clinical point of view because in diabetic patients, motor activity may decrease as neuropathy develops.

The aim of our further research was to explain the molecular basis of the observed analgesia after C021 administration. In [**Eur. J. Pharm. 2020**], we showed that repeated intrathecal administrations of C021 reduce hypersensitivity after sciatic nerve injury, lowering the levels of macrophage/microglia activation in the spinal cord and dorsal root ganglia, but have no effect on astroglia or T lymphocytes (CD4, CD8). Importantly, repeated intraperitoneal injections of C021 reduce the levels of microglia activation at the spinal cord level after sciatic nerve injury [**Front. Immunol., 2020**]. Moreover, we observed that C021 contributed to the diminished levels of pronociceptive cytokines (IL-1beta, IL-18, CCL2) in the spinal cord. Our results suggest that C021 administration modulates the CCL2/CCR4 axis at the spinal cord level, whereas the CCL17/CCL22/CCL2/CCR4 axis is modulated at the dorsal root ganglia level.

For the first time, studies on rat and mouse models of neuropathy showed that both single and repeated intrathecal and intraperitoneal administrations of C021 enhance the analgesic effects of morphine and buprenorphine [**Eur. J. Pharm., 2020; Front. Immunol., 2020; Neuroscience 2020**]. What is important from a clinical point of view, repeated intraperitoneal administrations of C021 with morphine and buprenorphine for 12 days significantly prolonged the analgesic effects of these opioids, and the mice showed better locomotor activity [**Front. Immunol., 2020**].

Summarizing, the results of this doctoral dissertation, published as a series of 3 original papers, clearly indicate the involvement of CCR4 and its ligands in the pathogenesis of neuropathy of different etiology. The obtained data support the hypothesis that blocking the CCL17/CCL22/CCL2/CCR4 signalling beneficially modulates nociceptive processes and enhances the analgesic effects of opioids. In the light of the obtained data, the search for drugs that interact through CCR4 seems to be a new and interesting therapeutic strategy in the treatment of neuropathic pain.