



## **AUTOREFERAT**

**Wykazanie nowych punktów uchwytu dla farmakoterapii  
skojarzonej bólu neuropatycznego opartej na modulacji układu  
immunologicznego i szlaku kinureninowego**

**Dr Ewelina Rojewska-Mendel**

Zakład Farmakologii Bólu

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie

**Kraków 2020**

## Spis treści:

### 1. DANE OSOBOWE

- 1.1. Imię i nazwisko
- 1.2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe
- 1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

### 2. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 POZ. 1311)

- 2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego
- 2.2. Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

### 3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

#### 3.1. Wprowadzenie w tematykę badawczą

##### 3.1.1. Ból neuropatyczny

#### 3.2. EFEKTY TOKSYNY BOTULINOWEJ TYPU A W BÓLU NEUROPATYCZNYM

##### 3.2.1 Stan dotychczasowej wiedzy

##### 3.2.2. Geneza prac

##### 3.2.3. Cele badawcze

##### 3.2.4. Uzyskane wyniki

##### 3.2.5. Znaczenie uzyskanych wyników

#### 3.3. ROLA ENDOGENNYCH SYSTEMÓW OPIODOWYCH W BÓLU NEUROPATYCZNYM

##### 3.3.1. Stan dotychczasowej wiedzy

##### 3.3.2. Geneza cyklu prac

##### 3.3.3. Cele badawcze

##### 3.3.4. Uzyskane wyniki

##### 3.3.5. Znaczenie uzyskanych wyników

#### 3.4. ROLA SZLAKU KINURENINOWEGO W BÓLU NEUROPATYCZNYM

##### 3.4.1. Stan dotychczasowej wiedzy

##### 3.4.2. Geneza cyklu prac i cele badawcze

##### 3.4.3. Cele badawcze

##### 3.4.4. Uzyskane wyniki

**3.4.5. Znaczenie uzyskanych wyników**

**4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH**

**5. KIEROWANIE I UCZESTNICTWO W GRANTACH BADAWCZYCH**

**6. WSPÓŁPRACA NAUKOWA Z JEDNOSTKAMI KRAJOWYMI I ZAGRANICZNYMI**

**7. WYKŁADY NA KRAJOWYCH I MIĘDZYNARODOWYCH KONFERENCJACH NAUKOWYCH**

**8. NAGRODY**

**9. CZŁONKOSTWO W TOWARZYSTWACH NAUKOWYCH.**

**10. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA I DYDAKTYCZNA**

**11. STAŻE NAUKOWE ZAGRANICZNE**

**12. PODSUMOWANIE CAŁOŚCI DOROBKU NAUKOWEGO**

**13. ZAŁĄCZNIKI**

**Załącznik 1 – Dane kontaktowe**

**Załącznik 2 – Uwierzytelniony odpis z dyplomu doktorskiego**

**Załącznik 3 – Analiza bibliometryczna dorobku naukowego przygotowana przez Centrum Informacji Naukowej, Biblioteki i Archiwum Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN**

**Załącznik 4 – Pełny wykaz wszystkich prac opublikowanych przez habilitanta**

**Załącznik 5 – Oświadczenia współautorów publikacji będących przedmiotem dzieła habilitacyjnego**

**Załącznik 6 – Pełne wersje prac stanowiących podstawę habilitacji**

## 1. DANE OSOBOWE

### 1.1. Imię i nazwisko

Ewelina Rojewska-Mendel

### 1.2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

**2009** stopień magistra biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca magisterska pt. „Porównanie dwóch modeli bólu neuropatycznego – mechanicznego uszkodzenia nerwu kulszowego (model CCI) oraz neuropatii cukrzycowej (model STZ)” została wykonana w Zakładzie Farmakologii Bólu pod opieką Prof. dr hab. Barbary Przewłockiej. Recenzentem była Prof. dr hab. Barbara Płytycz.

**2013** stopień doktora nauk biologicznych, Zakład Farmakologii Bólu Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Obrona pracy doktorskiej z wyróżnieniem. Rozprawa doktorska pt. „Zmiany czynników neuroimmunologicznych w bólu neuropatycznym - analgetyczny mechanizm działania minocykliny” wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Joanny Mika. Recenzentami byli Prof. dr hab. Barbara Płytycz oraz Prof. dr hab. Andrzej Lipkowski.

### 1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2008	2009	Pracowałam jako laborant w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie
2009	2013	Odbyłam studia doktorskie w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
2013	2016	Adiunkt w granicie Maestro 2012/06/A/NZ4/00028 w Zakładzie Farmakologii Bólu, Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie
2016	nadal	Kierownik grantu Sonata 2015/17/D/NZ4/02284 Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

## 2. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 POZ. 1311)

### 2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Wykazanie nowych punktów uchwytu dla farmakoterapii skojarzonej bólu neuropatycznego opartej na modulacji układu immunologicznego i szlaku kinureninowego

Uzyskane osiągnięcia naukowe stanowiące podstawę habilitacji zostały przedstawione w cyklu 9 prac (8 publikacji oryginalnych i 1 przeglądowa) o łącznym współczynniku Impact Factor: **32.589**, liczbie punktów MNiSW: **345** i liczbie cytowań: 127, opublikowanych w latach 2015-2019. Cykl prac poświęcony jest badaniu roli Toksyny botulinowej typu A, endogennych systemów opioidowych oraz szlaku kinurenionowego w bólu neuropatycznym.

## 2.2. Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

**Tabela 1.** Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego będącego przedmiotem habilitacji wraz ze wskaźnikami bibliometrycznymi oraz informacjami na temat mojego wkładu w powstanie publikacji. Punkty IF/MNiSW liczone wg wskaźników podanych dla roku opublikowania pracy.

L.p.	Publikacja	IF	MNiSW	Wkład habilitanta
1	Zychowska M, <b>Rojewska E</b> , Makuch W, Luvisetto S, Pavone F, Marinelli S, Przewlocka B, Mika J. Participation of pro- and anti-nociceptive interleukins in botulinum toxin A-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 2016; 15;791:377-388. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.09.019	2.896	30	Autorzy w równym stopniu byli zaangażowani w przygotowanie tej publikacji. Uczestniczyłam w wykonaniu większości eksperymentów behawioralnych, których wyniki zilustrowano na Figurze 1A-C; 2A,C,E; 3A,C; 6A,C. Przeprowadziłam operację podwiązania nerwu kulszowego u zwierząt. Podawałam związki farmakologiczne do analizy. Wykonywałam test zimnej płytki, test Rota-rod test oraz test otwartego pola. Ponadto brałam udział w pobieraniu i przygotowaniu tkanki do badań metodą Western Blot. Brałam udział w analizie i dyskusji wyników, przygotowaniu rycin oraz redagowaniu manuskryptu. Szacowany udział procentowy 60%.
2	<b>Rojewska E</b> , Piotrowska A, Popiolek-Barczyk K, Mika J. Botulinum Toxin Type A-A Modulator of Spinal Neuron-Glia Interactions under Neuropathic Pain Conditions. Toxins (Basel). 2018; 2;10(4). doi:	3.895	35	Mój wkład w powstanie pracy przeglądowej polegał na zebraniu, opracowaniu i napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Brałam również udział w przygotowaniu Figury 1. Wkład w powstanie pracy – 50%.

	10.3390/toxins10040145.			
3	<p><b>Rojewska E</b>, Wawrzczak-Bargiela A, Szucs E, Benyhe S, Starnowska J, Mika J, Przewlocki R, Przewlocka B. Alterations in the Activity of Spinal and Thalamic Opioid Systems in a Mice Neuropathic Pain Model. <i>Neuroscience</i>. 2018; 15;390:293-302. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018</p>	3.244	25	<p>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń. Przeprowadziłam operację podwiązania nerwu kulszowego u zwierząt. Wykonywałam test von Frey (Fig. 1B), brałam udział w pobieraniu tkanki do badań biochemicznych. Następnie wykonałam badania z wykorzystaniem metody RT-qPCR zilutrowane na figurach 2A-F oraz 3A-D. Brałam również udział w przygotowaniu tkanki do analizy metodą GTPγbinding w ramach współpracy z grupą Prof. Benyhe. Przeanalizowałam wyniki, przygotowałam ryciny i napisałam manuskrypt pracy. Wkład w powstanie pracy – 65%.</p>
4	<p><b>Rojewska E</b>, Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Zychowska M, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. PD98059 Influences Immune Factors and Enhances Opioid Analgesia in Model of Neuropathy. <i>PLoS One</i>. 2015; 1;10(10):e0138583. doi: 10.1371/journal.pone.0138583</p>	3.057	40	<p>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu operacji podwiązania nerwu kulszowego u zwierząt, podawaniu badanych związków farmakologicznych, wykonywaniu testów behawioralnych, takich jak test zimnej płytki i test odsuwania ogona (Fig. 1B oraz 4B,D,F). Brałam udział w pobieraniu i przygotowaniu tkanki do analizy biochemicznej. Wykonałam analizę czynników z wykorzystaniem techniki RT-qPCR (Fig. 3A-E). Ponadto mój wkład polegał na analizie statystycznej i dyskusji wyników, przygotowywaniu figur oraz pisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Szacowany udział procentowy 60%.</p>

5	<p><b>Rojewska E</b>, 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. <i>Front Immunol.</i> 2018; 12:9:494. doi: 10.3389/fimmu.2018.00494.</p>	4.716	35	<p>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń behawioralnych i biochemicznych. Przeprowadziłam procedurę związaną z wywołaniem neuropatii cukrzycowej u myszy. Podawałam zwierzętom badane substancje farmakologiczne. W doświadczeniach behawioralnych wykonywałam test von Frey, wyniki zilustrowano na rycinach 1A,C,E; 7A,C; 8B,D; 9A,C,F oraz 10A,C,F. Brałam udział w pobieraniu tkanki do badań biochemicznych. Następnie pomagałam w wykonaniu eksperymentów z wykorzystaniem techniki mikromacierzy białkowych. Interpretowałam otrzymane wyniki, wykonywałam analizę statystyczną, przygotowywałam ryciny oraz napisałam wstępną wersję manuskryptu. Szacowany udział procentowy 60%.</p>
6	<p><b>Rojewska E</b>, Piotrowska A, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. <i>Neuropharmacology.</i> 2016; 102:80-91. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.040.</p>	5.012	40	<p>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zdobyciu funduszy na badania (Grant SONATA), zaplanowaniu doświadczeń behawioralnych oraz biochemicznych. Przeprowadziłam operację nardzeniowej implantacji kaniul oraz podwiązania nerwu kulszowego u zwierząt. Wykonywałam test zimnej płytki. Przeprowadziłam analizę szeregu czynników neuroimmunologicznych z wykorzystaniem metody RT-qPCR. Interpretowałam otrzymane wyniki badań, napisałam ostateczną wersję manuskryptu oraz wykonałam</p>

				analizę statystyczną. Przygotowałam ryciny 1A,B,C,G,H,J (analiza mRNA), ryciny 2B,D; 3; 4; 5 (analiza mRNA), 6 oraz tabelę 1. Szacowany udział procentowy 70%.
7	<b>Rojewska E</b> , Piotrowska A, Jurga A, Makuch W, Mika J. Zaprinast diminished pain and enhanced opioid analgesia in a rat neuropathic pain model. Eur J Pharmacol. 2018; 15;839:21-32. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.09.001 .	3.170	30	Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zdobyciu funduszy na badania (Grant SONATA), zaplanowaniu doświadczeń behawioralnych oraz biochemicznych. W badaniach behawioralnych wykonywałam operacje, takie jak: nardzeniowa implantacja kaniul oraz podwiązanie nerwu kulszowego, podawałam zwierzętom testowane związki, wykonywałam test zimnej płytki (Fig. 1B,D; 2C; 4C,E). Następnie brałam udział w przygotowaniu i pobieraniu tkanki do analizy metodą Western blot. Opracowywałam otrzymane rezultaty, zrobiłam analizę statystyczną, przygotowałam ryciny oraz napisałam wstępną wersję manuskryptu. Szacowany udział procentowy 65%.
8	<b>Rojewska E</b> , 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; 11;9:724. doi: 10.3389/fphar.2018.00724.	3.845	40	Wkład w powstanie tej pracy polegał na zdobyciu funduszy na badania (Grant SONATA), zaplanowaniu doświadczeń behawioralnych oraz biochemicznych. W badaniach behawioralnych wykonywałam operacje nardzeniowej implantacji kaniul oraz podwiązania nerwu kulszowego, podawałam zwierzętom testowane związki, wykonywałam test zimnej płytki (Fig. 1B; 3B; 4B,D). Współuczestniczyłam w pobieraniu tkanki do badań biochemicznych a



				następnie wykonałam analizę z wykorzystaniem metody RT-qPCR, co zilustrowane zostało na figurach 1C-P; 2B-H; 3C-P. Przygotowałam ryciny zamieszczone w manuskrypcie, analizowałam otrzymane rezultaty oraz napisałam wstępną wersję manuskryptu. Szacowany udział procentowy 70%.
9	<b>Rojewska E</b> , Ciapała K, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. <i>Pharmacol Rep.</i> 2019; 71(1):139-148. doi: 10.1016/j.pharep.2018.10.002	2.754	70	Wkład w powstanie tej pracy polegał na zdobyciu funduszy na badania (Grant SONATA), zaplanowaniu doświadczeń behawioralnych oraz biochemicznych. W badaniach behawioralnych przeprowadziłam operację podwiązania nerwu kulszowego u myszy, wykonywałam test von Frey, którego wyniki zilustrowano na figurach: 1A; 2B; 3B; 4A; 5A,C; 6B,D. Opracowałam wyniki w ostatecznej formie, przygotowałam w finalnej wersji wszystkie ryciny i ostateczną wersję pracy. Szacowany udział procentowy 70%.
		<b>32.589</b>	<b>345</b>	

Podsumowując, na osiągnięcie naukowe będące przedmiotem habilitacji składają się:

- **8 prac oryginalnych**
- **1 praca przeglądowa**

Badania wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej zostały zrealizowane w ramach grantów Narodowego Centrum Nauki - SONATA 2015/17/D/NZ4/02284; OPUS 2016/21/B/NZ4/00128; Harmonia 2013/10/M/NZ4/00261; PRELUDIUM 2012/05/N/NZ4; MAESTRO 2012/06/A/NZ4/00028; OPUS 2011/03/B/NZ4/00042 oraz działalności statutowej.

### 3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

#### 3.1. Wprowadzenie w tematykę badawczą

##### 3.1.1. Ból neuropatyczny

Ważność aspektu bólowego w funkcjonowaniu ludzkiej jednostki oddają słowa polskiego dramaturga i rysownika Sławomira Mrożka: „Nic lepszego człowiek nie może zrobić człowiekowi, niż uwolnić go od bólu, i nic gorszego niż mu ból zadać”. Ból jest najpowszechniej występującym objawem wielu chorób, który pełni w organizmie funkcję ostrzegawczą, gdyż informuje nas o zagrożeniu chorobą. Międzynarodowe Stowarzyszenie Bólu (International Association for the Study of Pain, IASP) zaproponowało następującą definicję: „ból jest nieprzyjemnym doznaniem czuciowym i emocjonalnym, towarzyszącym rzeczywistemu lub potencjalnemu uszkodzeniu tkanek, albo opisywanym w kategoriach takiego uszkodzenia” (**International Association for the Study of Pain. IASP Taxonomy. Pain terms. Neuropathic pain. Updated 2017 Dec 14. [www.iasp-pain.org/Taxonomy#Neuropathicpain](http://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Neuropathicpain)**). Zgodnie z tą definicją ból neuropatyczny jest spowodowany uszkodzeniem lub chorobą somatosensorycznego układu nerwowego i dotyczy on około 7–10% ludności na świecie (van Hecke i wsp., 2014). Charakterystyczne jego objawy to: nieprawidłowe odczucia zwane dysestezją; ból spowodowany przez fizjologicznie niebolesne bodźce o charakterze ciągłym lub napadowym, czyli alodynia; a także nasiloną reakcją bólową na skutek działania szkodliwego bodźca, czyli hiperalgezia. Objawy te znacznie wpływają na obniżenie jakości życia oraz wpływają w sposób negatywny na fizyczne, emocjonalne i socjalne aspekty funkcjonowania człowieka. Z ośrodkowym bólem neuropatycznym mamy do czynienia w następstwie urazu rdzenia kręgowego, w stwardnieniu rozsianym oraz jako konsekwencja przebytego udaru. Poza cukrzycą (neuropatia cukrzycowa) i innymi zaburzeniami metabolicznymi, najczęstszą przyczyną obwodowych neuropatii są: półpasiec, neuropatie związane z zakażeniem HIV, toksyny, choroby genetyczne i immunologiczne oraz niedobory żywieniowe (Colloca i wsp., 2017). Ten rodzaj bólu często występuje także przy nowotworach jako bezpośredni skutek działania guza na nerwy obwodowe, ale również jako efekt niepożądany działania niektórych chemioterapeutyków bądź wynikający z uszkodzeń spowodowanych przez promieniowanie (Fallon, 2013). Badania przeprowadzone przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Bólu wykazały, że trwający ból neuropatyczny nie jest łagodzony przez typowe środki przeciwbólowe, dlatego też staje się często dolegliwością, bez perspektyw na znaczną poprawę. W terapii bólu neuropatycznego obserwuje się słabsze działanie dwóch głównych grup analgetyków: opioidów i niesteroidowych leków przeciwzapalnych, przez co jego terapia wymaga bardziej kompleksowego podejścia. Tylko u połowy pacjentów udaje się uzyskać znaczące, rzędu 30–50%, zmniejszenie dolegliwości bólowych (Butera, 2007). Obecnie rekomenduje się jako lek pierwszego wyboru: pregabalinę, gabapentynę oraz trójcykliczne leki przeciwdepresyjne, drugi rzut stanowią plastry z lidokainą i kapsaicyną lub tramadol, a trzeci to opioidy i toksyna botulinowa typu A (Colloca i wsp., 2017). Molekularne mechanizmy powstawania i utrzymywania się bólu neuropatycznego nie są w pełni poznane, pomimo licznych badań

zarówno klinicznych, jak i eksperymentalnych. O ile pierwotną przyczynę pojawienia się bólu można łatwo określić, to zmiany w funkcjonowaniu komórek przyczyniających się do powstania bólu przewlekłego nie są tak łatwe do ustalenia. Patologia zaburzeń obwodowych powodujących ból neuropatyczny obejmuje neurony w obwodowych zakończeniach przetwarzających ból niemielinowanych włókien C oraz mielinowanych włókien A $\delta$  (Finnerup i wsp., 2016), które w wyniku działania różnych czynników szkodliwych stają się nadpobudliwe. Urazy, niedotlenienie, ucisk, stany zapalne oraz uszkodzenia chemiczne przebiegające wzdłuż aksonów powodują zwyrodnienia włókien, zmiany w ekspresji połączeń międzykomórkowych, co w konsekwencji skutkuje zaburzeniami w transmisji sygnału. Gdy rozwija się ból neuropatyczny w zwojach korzeni grzbietowych i zwoju trójdzielnym, komórki włókien neuronów aferentnych wykazują modyfikację komponentów błony komórkowej, właściwości i lokalizacji synaps. Wówczas dochodzi do powstawania ognisk nieprawidłowych wyładowań. W następstwie rdzeń kręgowy jest w sposób nieprzerwany bombardowany informacją, że na obwodzie stale działa jakiś bodziec bólowy. Prowadzi to do rozwinięcia się nadwrażliwości neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) na normalny lub podprogowy sygnał pochodzący z obwodu – już po ustaniu szkodliwego bodźca. Zmiany w przepuszczalności dla jonów wapnia, receptorach i położeniu synaps powodują nadwrażliwość neuronów. Dodatkowo przyczyną bólu chronicznego jest silna aktywacja mikrogleju, będącego źródłem wielu czynników probólowych takich jak: chemokiny, interleukiny, czynniki wzrostu oraz inne cząsteczki uwalniane przez komórki immunokompetentne. Mediatorzy te są odpowiedzialne za uwrażliwienie szlaków sygnalizacyjnych w bólu (Meacham i wsp., 2017). Oddziaływanie każdego rodzaju bodźców na struktury układu nerwowego indukuje procesy neuroplastyczne, czyli zmiany czynnościowe i morfologiczne w tych obszarach. Moje badania w dziedzinie bólu koncentrowały się na zrozumieniu zmian plastycznych w układzie nerwowym po uszkodzeniu nerwu, identyfikacji nowych celów terapeutycznych oraz ułatwieniu zastosowania wiedzy z badań podstawowych z modeli zwierzęcych do praktyki klinicznej. Wiele różnych patomechanizmów może być zaangażowanych w powstawanie bólu neuropatycznego. Do pierwszej grupy zalicza się zmiany właściwości elektrofizjologicznych błony komórkowej pierwszego neuronu czuciowego. Dotyczą one zarówno zmian pobudliwości nocyceptorów oraz zmiany w uwalnianiu neuroprzebiegających. Do tej grupy zalicza się także zmiany ekspresji genów w ciele komórkowym neuronu. Zmiany w przetwarzaniu impulsów w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego mogą być kolejnym czynnikiem powodującym pojawienie się bólu. Szereg badań podkreśla istotną rolę nasilenia transmisji glutaminergicznej, zaburzeń funkcjonowania zstępujących układów hamujących w rdzeniu kręgowym, aktywacji komórek mikrogleju. Komórki neuronalne podlegają licznym zmianom morfologicznym polegającym między innymi na reorganizacji połączeń synaptycznych. Do trzeciej grupy możliwych patomechanizmów bólu neuropatycznego zaliczamy zaburzenia na wyższych piętrach OUN, a wśród nich zaburzenia równowagi pomiędzy aktywnością wstępujących układów wstępujących i zstępujących układów hamujących (antynocyceptywnych). Dlatego jak wskazują badania Basbaum i wsp. 2009 autonomiczny układ nerwowy również może być zaangażowany w powstawanie bólu neuropatycznego.

Opracowanie metody skutecznego zwalczania bólu neuropatycznego stanowi ważny problem kliniczny. Brak dobrego efektu analgetycznego stosowanych w terapii leków przeciwbólowych trzeciego stopnia drabiny analgetycznej przyczynia się do zwiększania ich dawek, co powoduje występowanie wielu objawów niepożądanych jak nudności, wymioty, zaparcia, hipotonia, bradykardia czy depresja ośrodka oddechowego. Obecnie postuluje się, że zastosowanie politerapii bólu neuropatycznego jest korzystniejsze i pozwala na ograniczenie dawek przyjmowanych leków, a tym samym zmniejszenie efektów ubocznych. Dużym problemem w terapii bólu jest osłabienie przeciwbólowego działania leków opioidowych. Mechanizm tego spadku efektywności też nie jest jeszcze na tyle poznany, aby można było w pełni zapobiegać temu zjawisku i stosować efektywne leczenie tego bólu. W celu znalezienia skutecznej formy terapii prowadzi się analizę zmian, które zachodzą pod wpływem uszkodzenia, stosując liczne modele zwierzęce. Istnieją wprawdzie liczne badania kliniczne i doświadczalne dotyczące molekularnego mechanizmu powstawania i utrzymywania się bólu neuropatycznego, wciąż jednak brak podstaw do opracowania bardziej skutecznej terapii w oparciu o jego patomechanizm. Dlatego wydaje się słuszny wybór tematyki mojej pracy naukowej, w której zajmuję się badaniem endogennych czynników regulujących stany bólu neuropatycznego ze szczególnym uwzględnieniem interakcji neuroimmunologicznych. W celu zbadania molekularnych mechanizmów bólu neuropatycznego, a także testowania związków o potencjalnych właściwościach terapeutycznych konieczne są dobre modele zwierzęce. Stanowią one niezastąpiony punkt pomiędzy badaniami *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych a próbami klinicznymi. Jednym z przykładów zwierzęcego modelu bólu neuropatycznego, stosowanego w mojej pracy jest model jednostronnego, luźnego podwiązania nerwu kulszowego zaproponowany przez Bennett i Xie (1988). Na skutek uszkodzenia nerwu w tym modelu dochodzi do ośrodkowych i obwodowych zmian prowadzących do rozwoju symptomów charakterystycznych dla bólu neuropatycznego tj. nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne, ściśle korelujące z objawami obserwowanymi w klinice i jest najmniej inwazyjną techniką stosowaną do wywołania neuropatii. Nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne jest odpowiedzią organizmu na działanie szkodliwego bodźca. Sprawdzenie tej reakcji jest możliwe dzięki licznym testom behawioralnym stosowanym w naszym Zakładzie. Dodatkowo stosujemy w badaniach model neuropatii cukrzycowej (wywoływany przez jednorazowe podanie streptozotocyny u myszy), której występowanie u pacjentów jest bardzo rozpowszechnione. Istnieje konieczność zrozumienia tego zjawiska ponieważ cukrzyca jest jedną z przyczyn rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne, która powstaje w konsekwencji uszkodzenia nerwów obwodowych. Mimo tak dużego rozpowszechnienia patogeneza neuropatii cukrzycowej nie jest do końca poznana i może ona dotyczyć każdej części obwodowego układu nerwowego. Długi czas trwania cukrzycy oraz nasilona hiperglikemia zwiększa ryzyko jej wystąpienia, chociaż zdążają się też przypadki, że neuropatia, wywołana hipoglikemią pojawia się w sposób nagły (Apfel, 1999). Istnieją dwie główne teorie mówiące o patogenezie neuropatii cukrzycowej: metaboliczna i niedokrwienne. Enzym reduktaza aldozowa jest kluczowy w teorii metabolicznej. Wysoki poziom glukozy jest powodem nasilonego jej napływu do komórek nerwowych, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej reaktywności alternatywnej drogi przemiany w cyklu polioli. Tutaj następuje przemiana glukozy w sorbitol, a następnie przy udziale enzymu dehydrogenazy sorbitolu

przekształca się w fruktozę. Wysokie stężenie glukozy, sorbitolu i fruktozy w nerwach jest powodem zaburzeń metabolicznych (Dyck i wsp., 1988). W teorii naczyniowej jako główna przyczynę uważa się obecność zmian patologicznych w obrębie naczyń odżywczych nerwów. Występujące w przebiegu cukrzycy zmiany reologiczne wśród których należy wymienić zwiększoną lepkość krwi, zmniejszenie poziomu albumin, wzrost poziomu  $\alpha$ -2-globulin i fibrynogenu, prowadzą do zaburzeń w przepływie krwi, co skutkuje zmniejszeniem wymiany tlenowej oraz prowadzi do pojawienia się ognisk niedokrwiennych (Cameron i wsp., 2001). Do innych czynników odpowiedzialnych za pojawienie się zmian neuropatycznych zaliczmy: niedobory czynników neurotroficznych, zaburzenia immunologiczne i transportu aksonalnego, zaburzenia syntezy i nieenzymatyczna glikozylacja białek strukturalnych nerwów oraz zwiększona nadwrażliwość nerwów na ucisk (Boulton i wsp., 1984; Sidenius i wsp., 1981). Jak wykazały już nasze wcześniejsze badania po podaniu streptozotocyny rozwijają się objawy charakterystyczne dla bólu neuropatycznego. Dodatkowo dochodzi do aktywacji komórek glejowych, jak również zwiększenie szeregu czynników neuroimmunologicznych ważnych w procesach nocyciepcji (Zychowska i wsp., 2013). Badanie interakcji neuroimmunologicznych w bólu neuropatycznym wyłania wciąż nowe pytania, a odpowiedzi na nie wymagają wielu wnikliwych badań.

### 3.2. EFEKTY TOKSYNY BOTULINOWEJ TYPU A W BÓLU NEUROPATYCZNYM

#### 3.2.1 Stan dotychczasowej wiedzy

Toksyna botulinowa A (BoNT, *botulinum neurotoxin*) zaczęła być szeroko stosowana w praktyce klinicznej wraz z wpisaniem jej na listę leków przez Komisję FDA w Stanach Zjednoczonych w 1989 roku. W raporcie Amerykańskiej Akademii Neurologii uznano zastosowanie BoNT A za skuteczną metodę leczenia kurczu powiek, spastyczności twarzy, zespołach bólowych, drżenia, nadpotliwości, ślinienia, a także w korekcji zmarszczek, a ostatnio również znalazła zastosowanie w leczeniu różnych rodzajów bólu neuropatycznego. BoNT/A działa przez SNAP-25 powodując utrudnienia wiązania i fuzji pęcherzyków synaptycznych (Montecucco i Molgo, 2005; Snyder i wsp., 2006). Jednym z proponowanych mechanizmów działania BoNT/A jest silne hamowanie uwalniania neuroprzekaźników i neuropeptydów biorących udział w transmisji bólu, takich jak glutaminian (Cui i wsp., 2004), substancja P (Welch i wsp., 2000) oraz CGRP (Durham i wsp., 2004). BoNT/A wpływa również na blokowanie kanałów sodowych (Shin i wsp., 2012). Udział BoNT/A w procesach nocyciepcji został po raz pierwszy opisany przez grupę Cui i wsp. 2004, którzy badali efekt jej działania w szczurzym modelu bólu zapalnego wywołanym podaniem formaliny. Jak wynika z badań jednorazowe podskórne podanie do łapy BoNT/A zmniejszyło obrzęk łapy i nadwrażliwość bólową, a efekt ten związany był z zahamowaniem uwalniania glutaminianu, substancji P i CGRP. W modelach bólu neuropatycznego BoNT/A wykazuje właściwości przeciwbólowe (Bach-Rojecky i wsp., 2005; Luvisetto i wsp., 2007; Kitamura i wsp., 2009; Marinelli i wsp., 2010). Od momentu gdy była stosowana w klinice badano czy podobnie jak toksyna tężcowa, poprzez transport wsteczny do rdzenia, wykazuje również działanie ośrodkowe. Wyjaśnienie mechanizmu działania BoNT/A pozostaje wciąż przedmiotem badań. Badania Antonucci i wsp. (2008) wskazują, że BoNT/A wywiera swoje efekty poprzez

transport wsteczny oraz transcytozę, dzięki czemu efekty jej działania można obserwować nie tylko w miejscu wstrzyknięcia, ale także w odległych rejonach. Pomimo licznych badań przeciwbólowe działanie BoNT/A w ośrodkowym układzie nerwowym jest wciąż niewyjaśnione. Molekularny mechanizm jej obwodowego działania oraz wpływ na stopień aktywacji gleju oraz innych komórek nieneuronalnych jest wciąż badany. Z badań Rossetto i wsp., 2004 wynika, że BoNT/A oddziałując na białko SNAP-25 wpływa na komórki neuronalne powodując hamowanie uwalniania neuroprzekaźników. W modelu bólu neuropatycznego u myszy (Vacca i wsp., 2013) wykazano wpływ BoNT/A na modulację aktywacji komórek glejowych i ekspresji receptora MOP. Wiadomo, że BoNT/A zwiększa przeciwbólowe działanie morfiny, jak również przeciwdziała rozwojowi tolerancji morfinowej przy długotrwałym leczeniu. Przeciwbólowy efekt BoNT/A wykazano również w innych modelach bólu jak ból zapalny wywołany podaniem karageniny i kapsaicyny do łapy (Bach-Rojecky i wsp., 2005; Luvisetto i wsp., 2006) czy bólu trzewnego (Chuang i wsp., 2004). BoNT/A zmniejsza stan zapalny równolegle ze zmniejszeniem ekspresji białka TRPV1 w modelu bólu stawów (Fan i wsp., 2017). Także liczne badania w tym prowadzone przez naszą grupę potwierdzają, że podanie jej do łapy hamuje nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne w szczurzym i mysim modelu bólu neuropatycznego polegającym na podwiązaniu nerwu kulszowego (Marinelli i wsp., 2012; Mika i wsp., 2011; Luvisetto i wsp., 2007), jak również w modelu neuropatii nerwu trójdzielnego (Kitamura i wsp., 2009). W naszych badaniach (Mika i wsp., 2011) wykazaliśmy, że podanie BoNT/A w podeszwę łapy szczura zmniejsza nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne, jak również zmniejsza aktywację mikrogleju i czynników neuroimmunologicznych ważnych w procesach nocycepcji, co może wskazywać na możliwe mechanizmy działania BoNT/A w bólu neuropatycznym. Zastosowanie BoNT/A w klinice po raz pierwszy wykazał Klein w 2004 roku, potwierdzając jej właściwości przeciwbólowe w łagodzeniu objawów bólu w neuropatii obwodowej, neuralgii i w stwardnieniu rozsianym. W praktyce klinicznej stosowana jest w leczeniu bólu głowy (Wheeler, 1998), migrenie (Binder i wsp., 2002), a także w neuropatii (Ranoux i wsp., 2008; Apalla i wsp. 2013; Han i wsp., 2016). Istnieją doniesienia o badaniach jej właściwości przeciwbólowych w leczeniu neuralgii popółpaścowej (Xiao i wsp., 2010); neuropatii cukrzycowej (Yuan i wsp., 2009; Ghasemi i wsp., 2014); bólu pooperacyjnym (Ranoux i wsp., 2008); nerwobólu potylicznym (Kapural i wsp., 2007); zespół cieśni nadgarstka (Breuer i wsp., 2006) oraz w bólu fantomowym (Wu i wsp., 2012). Również dane kliniczne sugerują na możliwość zastosowania BoNT/A w leczeniu zapalenia stawów oraz w bólu neuropatycznym (Ranoux i wsp., 2008; Yuan i wsp., 2009). Zakres badań klinicznych nad jej zastosowaniem stale rośnie i rozwija się.

### 3.2.2. *Geneza prac*

Od kilkunastu lat nasz Zakład współpracuje z Instytutem Neurobiologii w Rzymie, zajmującym się badaniem układu nerwowego oraz biologicznych i molekularnych podstaw chorób cywilizacyjnych. W ramach współpracy prowadzone są badania nad procesami nocycepcji oraz interakcjami pomiędzy neuronami a komórkami glejowymi. Wspólnie z grupą prowadzona przez Prof. Flaminie Pavone zajmujemy się szukaniem nowej, skutecznej terapii bólu, udoskonalaniem badań w obszarze nauk biologicznych, tworzeniem i

rozpowszechnianiem wiedzy. Realizujemy cele poprzez inwestowanie w kapitał ludzki dążąc do poprawy jakości życia. Biorąc pod uwagę fakt, że w ostatnich latach pracownicy Instytutu otrzymali szereg prestiżowych nagród i wyróżnień za swoją działalność naukową jednostkę uważa się za jedną z wiodących placówek biologicznych w Europie. W trakcie wykonywania badań do swojej pracy doktorskiej włączyłam się w nurt badań nad mechanizmem działania BoNT/A w bólu neuropatycznym, który był tematem grantu Harmonia kierowanego przez Prof. dr hab. Joannę Mika pt. „Neuronalne i nieneuronalne mechanizmy toksyny botulinowej A w rozwoju bólu neuropatycznego - badania behawioralne i biochemiczne”. Również badania te były kontynuowane w ramach STYPENDIUM START, które otrzymałam w 2015 roku. Jak wynika z badań eksperymentalnych wykonywanych wspólnie z grupą prof. Pavone BoNT/A może być bardzo skuteczna także w różnych rodzajach bólu neuropatycznego, także w klinice. Obiecujące i nowatorskie wyniki zainspirowały nas do dalszych wnikliwych badań.

### 3.2.3. Cele badawcze

#### I. Określenie czy BoNT/A wpływa na:

1. **Funkcję motoryczną, aktywność eksploracyjną oraz nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne u szczurów zdrowych i po uszkodzeniu nerwu kulszowego**
2. **Zmiany poziomu białka markerów mikrogleju/makrofagów oraz astrogleju w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego oraz w DRG**
3. **Zmiany poziomu białka cytokin pro- i przeciwbólowych**

#### II. Zbadanie czy łączne podanie BoNT/A z minocykliną nasila jej działanie przeciwbólowe oraz wpływa na poziom białka cytokin pro- i przeciwbólowych u szczurów po CCI

### 3.2.4. Uzyskane wyniki

Niezwykle ważnym elementem uzyskanych wyników jest zwrócenie uwagi na istotną rolę BoNT/A w bólu neuropatycznym, co zawarte jest w jednej pracy oryginalnej (1) i jednej przeglądowej (2) wchodzących w skład dorobku habilitacyjnego. W pierwszej pracy (1, *European Journal of Pharmacology*, 2016) z cyklu publikacji będących przedmiotem omawianego osiągnięcia naukowego wykazano, że pojedyncze podanie BoNT/A (300 pg/do łapy) do podeszwy łapy nie wpływa na funkcję motoryczną zarówno u zwierząt zdrowych, jak i po uszkodzeniu nerwu kulszowego. W badaniach tych wykorzystano dwa testy behawioralne: test Rota-Rod i test otwartego pola. Jednocześnie wykazano przeciwbólowe właściwości BoNT/A w modelu uszkodzenia nerwu kulszowego oraz u zwierząt zdrowych. Metodą Western blot wykazano, że w 7 dniu po CCI BoNT/A hamuje aktywację mikrogleju/makrofagów na poziomie rdzenia kręgowego oraz DRG, odpowiednio. W badaniach nie odnotowano wpływu BoNT/A na stopień aktywacji astrocytów. Co ciekawe BoNT/A zmniejsza aktywowany po uszkodzeniu poziom białka IL-1beta oraz IL-18 w rdzeniu kręgowym i/lub DRG, równoległe prowadząc do zwiększenia poziomu czynników

antynocyceptywnych, takich jak: IL-10 i IL-1RA w DRG. Jak wykazano po raz pierwszy łączne podanie BoNT/A z minocykliną nasila jej przeciwbólowe efekty, co wykazano w testach von Frey i zimnej płytki. Wielokrotnie podana minocyklina obniża podniesiony po uszkodzeniu poziom mikrogleju/makrofagów oraz czynników probólowych, ale także podwyższa poziom czynników przeciwbólowych na poziomie rdzenia kręgowego i DRG. Jednak co ciekawe efekt ten nie jest nasilony po podaniu BoNT/A z minocykliną, która jest inhibitorem mikrogleju. W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy dowiedliśmy, że BoNT/A podobnie jak minocyklina działa przeciwbólowo, poprzez hamowanie aktywacji mikrogleju/makrofagów oraz przywracanie zachwianej w bólu neuropatycznym równowagi pomiędzy czynnikami pro- i przeciwbólowymi. W skład dorobku habilitacyjnego wchodzi również publikacja przeglądowa (2), która stanowi przegląd literatury na temat roli BoNT/A w bólu. W pracy skupiono się na roli BoNT/A w interakcjach neuronalno-glejowych oraz jej efektach terapeutycznych. Opisano poznane mechanizmy działania w bólu neuropatycznym oraz rolę komórek glejowych w przeciwbólowym mechanizmie działania BoNT/A.

### 3.2.5. Znaczenie uzyskanych wyników

Przeprowadzone badania są bardzo istotne z uwagi na fakt, że są to pierwsze doniesienia dotyczące wpływu toksyny botulinowej A na funkcje motoryczne, aktywność eksploracyjną oraz procesy nocycepcji zarówno u zwierząt zdrowych, jak i po uszkodzeniu nerwu kulszowego. W badaniach wykazano również istotny wpływ BoNT/A na komórki mikrogleju oraz poziom cytokin pro- i przeciwbólowych. Dodatkowo wyniki jakie uzyskano po łącznym podaniu BoNT/A i minocykliny są nowością w literaturze i z pewnością posłużą do lepszego zrozumienia mechanizmów działania tej substancji w bólu neuropatycznym. Otrzymane rezultaty sugerują, że BoNT/A oprócz zmiany funkcji neuronów może wpływać na komórki nieneuronalne, zwłaszcza mikroglej. Dokładniejsze poznanie mechanizmu działania tej substancji, która jest unikatowa ze względu na swoje długotrwałe efekty może przyczynić się do znalezienia nowego punktu uchwytu dla substancji przeciwbólowych. Przedstawione badania wchodzące w skład osiągnięcia naukowego niewątpliwie uzupełniły podstawową wiedzę z zakresu funkcjonowania organizmu w patologii. Ważność przedstawionych wyników podkreśla fakt, iż do cywilizacyjnego postępu w życiu społeczeństw należy skuteczna terapia przewlekłego bólu a tego nie można uzyskać bez dokładnego poznania procesów, które do niego doprowadzają.

## 3.3. ROLA ENDOGENNYCH SYSTEMÓW OPIOIDOWYCH W BÓLU NEUROPATYCZNYM

### 3.3.1. Stan dotychczasowej wiedzy

Od momentu odkrycia endogennych peptydów opioidowych są one nieprzerwanym obiektem badań, dążących do wykorzystania ich jako analgetyków w bólu przewlekłym. Intensywne badania i odkrycia dotyczące budowy, struktury i funkcji układów opioidowych, będących głównym endogennym systemem antynocyceptywnym rozpoczęły się w latach 70. ubiegłego wieku. To okres największych osiągnięć pozwalających nam lepiej zrozumieć mechanizm



działania leków opioidowych. Do prekursorów peptydów opioidowych zaliczamy: proopiomelanokortynę (POMC), proenkefalinę (PENK) i prodynorfiny (PDYN). Z POMC powstają peptydy opioidowe: alfa, beta i gamma endorfiny oraz nieopiodowe peptydy: hormon adenokortykotropowy (ACTH), alfa i beta-MSH (hormon melanotropowy, MSH) i beta-LPH (hormon lipotropowy, LPH) (Mika, 2008; Przewlocki i Przewlocka, 2005). Wykorzystując metody immunocytochemiczne i hybrydyzacji *in situ* wykazano występowanie prohormonów peptydów opioidowych na wszystkich poziomach szlaków neuronalnych. Neurony w których zachodzi ekspresja POMC, znajdują się w następujących strukturach: w jądrach wzgórza i szwu, w układzie limbicznym, jądrze łukowatym podwzgórza, w substancji szarej okołowodociągowej, w jądrze pasma samotnego, skąd projektują do rdzenia kręgowego. Pierwszą grupę poznanych opioidów stanowiły enkefaliny (Met- i Leu-enkefaliny) (Hughes i wsp., 1975) oraz  $\beta$ -endorfiny (Bradbury i wsp., 1976). Peptydy te wykazują działanie antynocyceptywne podobne do morfiny, a także powodują charakterystyczne dla opioidów efekty uzależnienia oraz rozwoju tolerancji na ich efekty przeciwbólowe (Wei i Loh, 1976; Belluzzi i Stein, 1977; Van Ree i wsp., 1999). Endogenne enkefaliny i ich pochodne są punktem zainteresowania jako potencjalne środki przeciwbólowe, gdyż wykazują silne działanie analgetyczne w modelach bólu przewlekłego, takich jak: ból zapalny (Yang i wsp. 2008), nowotworowy (Moulin i wsp. 1985), neuropatyczny (Hao i wsp. 2003; Xu i wsp., 2008) oraz w przebiegu cukrzycy (Chan i wsp., 1992). Badania skupiające się na poszukiwaniu bardziej selektywnych ligandów receptora opioidowego MOP doprowadziły do odkrycia grupy peptydów opioidowych, nazwanej endomorfina-1 i endomorfina-2. Charakteryzują się one odmienną strukturą, dystrybucją i wysoką selektywnością do jednego typu receptora opioidowego (Zadina i wsp., 1999). W modelach bólu zapalnego, ostrego oraz neuropatycznego endomorfiny wykazują silne przeciwbólowe działanie poprzez hamowanie wydzielania cytokin prozapalnych (Jessop i wsp. 2010). Kolejna grupa endogennych peptydów opioidowych czyli dynorfin została wyizolowana i scharakteryzowana trzy lata później (Goldstein i wsp., 1979). PDYN jest prekursorem dla: dynorfiny A, dynorfiny B (rimorfina) oraz alfa- i beta-neoendorfiny. Dynorfiny zaliczane są do niezwykle interesującej grupy peptydów, ponieważ zależnie od stosowanej dawki mogą wykazywać działanie probólowe lub antynocyceptywne. Oprócz wiązania się do odpowiednich receptorów opioidowych, wykazują się zdolnością działania poprzez mechanizm nieopiodowy aktywując receptor NMDA (Przewlocki i wsp., 1983; Stevens i Yaksh, 1986; Obara i wsp., 2003). Neurony zawierające PENK i PDYN występują w układzie nerwowym, szczególnie w substancji szarej okołowodociągowej, wzgórzu, jądrach szwu i w brzeźnych warstwach rdzenia kręgowego. Słabszą ekspresję tych prohormonów obserwuje się w korze mózgowej (Przewlocki, 2015). Jeden z proponowanych mechanizmów wydzielania endogennych opioidów polega na stymulacji ich uwalniania przez czynnik uwalniający kortykotropinę (CRF), co jest nasilane przez IL-1beta i inne cytokiny, które mogą same inicjować wydzielanie endogennych opioidów. Peptydy opioidowe działają przez specyficzne receptory, do których zaliczamy: receptory  $\mu$  (OPRM, mi, MOP),  $\delta$  (OPRD, delta, DOP),  $\kappa$  (OPRK, kappa, KOP) (Chen i wsp., 1993; Lipkowski, 1987; Mogil i wsp., 1996; Pasternak, 1988; Przewlocka i wsp., 1999; Przewlocki i wsp., 1983). Endogenne peptydy opioidowe nie wykazują jednoznacznego powinowactwa tylko do jednego typu receptora opioidowego. Peptydy pochodzące z POMC,

a wśród nich najlepiej poznanym przedstawicielem jest  $\beta$ -endorfina, wykazują największe powinowactwo do receptora MOP i DOP, natomiast peptydy pochodzące z PENK są endogennymi ligandami receptora DOR, a w mniejszym stopniu receptora MOP i KOP. Peptydy wywodzące się z PDYN wiążą się głównie do receptora KOP, a niektóre z nich wykazują także duże powinowactwo do receptora MOP i DOP. W modelu mechanicznego uszkodzenia nerwu kulszowego oraz w przewlekłym stanie zapalnym dochodzi do wzrostu poziomu mRNA *PDYN* w lędźwiowej części rdzenia kręgowego (Faden i wsp., 1985; Przewlocki i wsp., 1988), natomiast jak wykazały badania opublikowane przez Przewlocki i Przewlocka w 2001 poziom mRNA *PENK* nie uległ zmianie do trzeciego dnia po uszkodzeniu. Wykonane metodą hybrydyzacji *in situ* badania wskazują, że po uszkodzeniu dochodzi do wzrostu poziomu mRNA *PDYN*, jak również pojawienia się wyższej ekspresji *PDYN* w głębszych warstwach (w warstwie I-II jak i w warstwie IV-V) rdzenia kręgowego (Obara i wsp., 2003). Również badania Kajender i wsp. (1990) ukazują podniesiony poziom dynorfiny A(1-8) w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego w modelu podwiązania nerwu kulszowego. Po podaniu wysokiej dawki dynorfiny A(1-17) zaobserwowano wzrost nadwrażliwości na bodźce dotykowe i termiczne (Laughlin i wsp., 1997; Vanderah i wsp., 1996), porażenie oraz całkowitą utratę napięcia mięśniowego, co wskazuje na jej neurotoksyczne właściwości (Rojewska i wsp., 2014; Faden i wsp., 1990; Stevens i Yaksh, 1986; Long i wsp., 1988). Wywodzące się z PNOC peptydy działają na receptor opioidopodobny tj. receptor nocyceptynowy NOP. Jak donoszą badania Xu i wsp., 1996 nocyceptyna obok przeciwbólowego działania wykazuje również właściwości znoszące analgetyczne działania opioidów bez wiązania się z ich receptorami. Jej działanie antynocycetywne, niezależne od opioidów wykazano po podaniu jej do rdzenia kręgowego (Grisel i wsp. 1996). Natomiast podanie do komory bocznej mózgu spowodowało wystąpienie hiperalgezji na skutek hamowania wydzielania endogennych peptydów opioidowych (Mogil i wsp. 1996; Wagner i wsp., 1998). Powstające w komórkach neuronalnych w zwojach korzeni grzbietowych receptory opioidowe są transportowane do rogu grzbietowego rdzenia kręgowego, a także do obwodowych zakończeń pierwotnych. Rozmieszczenie receptorów opioidowych w zwojach korzeni grzbietowych i rdzeniu kręgowym jest dowodem na ich udział w procesie nocycepcji. Odkrycie receptorów opioidowych w tkankach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, a także jak wskazują najnowsze badania na komórkach układu immunologicznego, otworzyło możliwości obwodowego stosowania opioidów w uśmierzaniu przewlekłego oraz bólu ostrego np. pooperacyjnego (Przewlocki i Przewlocka, 2005). Jednak czasem dochodzi do takiej sytuacji, gdzie leki opioidowe jak np. morfina tracą swą efektywność. Określenie przyczyn osłabienia działania morfiny w bólu neuropatycznym może mieć istotne znaczenie dla znalezienia lepszej terapii bólu neuropatycznego. Wyniki badań wskazują, że w wyniku uszkodzenia dochodzi do spadku ekspresji i stężenia białka receptora MOP w zwojach korzeni grzbietowych oraz w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego. Jednocześnie jako przyczynę spadku efektywności podaje się silną aktywację mikrogleju, a w późniejszych dniach również astrogleju w układzie nerwowym w wyniku uszkodzenia. Wiele badań wskazuje na udział obwodowych receptorów opioidowych w procesach bólowych związanych z uszkodzeniem nerwu (Obara i wsp., 2004, 2006; Labuz i wsp., 2006). Obwodowe receptory opioidowe zlokalizowane są na obwodowych zakończeniach włókien

czuciowych jednocześnie pośrednicząc w efektach antynocyceptywnych po uszkodzeniu nerwu obwodowego (Truong i wsp., 2003). Zhang i wsp., 1998 dowiedli, że przecięcie lub podwiązanie nerwu obwodowego prowadzi do spadku liczby receptorów oraz do obniżenia poziomu mRNA receptorów opioidowych (głównie receptora MOP) w zwojach korzeni grzbietowych. Natomiast badania przeprowadzone przez Truong i wsp. 2003 pokazały wzrost ekspresji receptora MOP na włóknach neuronów czuciowych po stronie uszkodzenia. Wokół uszkodzonego nerwu dochodzi do gromadzenia się makrofagów, które nie tylko promują procesy regeneracyjne, ale także mogą aktywować zlokalizowane na nerwach czuciowych obwodowe receptory opioidowe, a przez to pośredniczyć w analgezji (Stein i wsp., 2001). Odkrycie endogennych systemów opioidowych oraz ich receptorów umożliwiło badania nad ich funkcją oraz otworzyło nowe możliwości poszukiwania ich zastosowania w terapii bólu. Poznanie molekularnej budowy receptorów opioidowych dzięki zastosowaniu metody klonowania daje możliwości stworzenia nowych, selektywnych ligandów tych receptorów, które mogą przynieść w przyszłości korzyści w terapii bólu neuropatycznego. U podstaw powstawania i utrzymywania się symptomów bólu neuropatycznego leżą interakcje neuroimmunologiczne. Komórki mikrogleju komunikują się z neuronami, astrocytami oraz komórkami układu odpornościowego za pomocą licznych mediatorów i ich receptorów. Aktywacja mikrogleju prowadzi do przekazywania sygnału wieloma szlakami wewnątrzkomórkowymi, między innymi MAPK. Niedawne badania wykazały, że celowanie w te kaskady jest skutecznym sposobem na zmniejszenie bólu neuropatycznego. MAPK są ewolucyjnie konserwowanymi cząsteczkami, które składają się z trzech głównych członków: kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK), p38 i c-Jun N-końcowa kinaza (JNK). Jak wskazują badania zastosowanie inhibitorów p38 – SB203580 oraz minocykliny wpływa na zmniejszenie nadwrażliwości na bodźce bólowe (Popiolek-Barczyk i wsp., 2014; Rojewska i wsp., 2014; Tsuda i wsp., 2004). Dodatkowo w badaniach Ledebor i wsp. (2005) oraz Ragavendra i wsp. (2003) wykazali, że inhibitory p38 wykazują większą skuteczność jeśli podawane są przed uszkodzeniem. W naszych eksperymentach wykazaliśmy, że w 7 dniu po uszkodzeniu nerwu kulszowego rośnie poziom białka ERK1/2 w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego, co związane jest ze wzrostem aktywacji komórek mikrogleju (Popiolek-Barczyk i wsp., 2015). Zainspirowani tymi wynikami postanowiliśmy zbadać jak zahamowanie wybranych kinaz MAP wpłynie na procesy nocycepcji oraz ocenić jak wpłynie na skuteczność środków opioidowych w bólu neuropatycznym. Niezwykle ważnym w kontekście zwiększenia skuteczności związków opioidowych w klinice wydaje się lepsze poznanie zależności dotyczących struktury i funkcji receptorów chemokin oraz regulacji ich ścieżek sygnałowych. Dzięki zahamowaniu receptorów dla chemokin związki te mogą stać się nowym orężem w walce z bólem. W poszukiwaniu skutecznej i efektywnej terapii należy przede wszystkim skupić się na pośrednim działaniu leku, który oprócz blokowania działania chemokin wpływałby na zmianę ich syntezy, zmniejszał uwalnianie oraz ich aktywację poprzez zahamowanie szlaku MAPK. Doniesienia zespołu Brack i wsp. (2004) mówiące o heterologicznej desensytyzacji receptorów opioidowych i chemokinowych sugerują, że egzogenne ligandy receptorów dla chemokin mogą stać się koanalgetykami w opioidowej terapii bólu. Mechanizm działania jednego z receptorów dla chemokiny CCL5 - CCR1 nie został jeszcze do końca wyjaśniony, jednak dane literaturowe sugerują, że zastosowanie antagonisty CCR1 może hamować napływ komórek immunologicznych i cytokin. Może to

wpływać w sposób bezpośredni na obniżenie progu bólowego. Dlatego ważne jest zrozumienie zagadnienia chemokin i zakresu ich działania w ludzkim organizmie. Potrzebne są dalsze badania, które pozwolą — być może — na odkrycie nowych możliwości leczenia bólu neuropatycznego.

### 3.3.2. Geneza cyklu prac

Leki opioidowe, takie jak morfina wykazują działanie silnie przeciwbólowe poprzez swoiste receptory znajdujące się na powierzchni komórek nerwowych. Efekt przeciwbólowy wywołują działając na receptor MOP, jednocześnie powodując działania niepożądane – euforię (tzw. „*high*”) i depresję ośrodka oddechowego. Długotrwale stosowane opioidy tracą swoją skuteczność przeciwbólową i mogą prowadzić do wielu niepożądanych skutków m.in. ryzyka uzależnienia fizycznego i rozwoju tolerancji na efekt przeciwbólowy. Aktywacja systemów probólowych podczas stosowania opioidów jest uważana za główną przyczynę rozwoju tolerancji opioidowej, a stosowanie coraz wyższych dawek opioidów jest potrzebne aby zniwelować efekt pronocyceptywny. Taki mechanizm jest poważnym ograniczeniem używania tych leków w terapii bólu neuropatycznego. Długotrwale przyjmowanie opioidów prowadzi także do powstawania zmian neuroplastycznych, prowadzących do zwiększonego uwalniania probólowych peptydów. Dlatego ważne jest znalezienie takich substancji, które będą nasilać analgetyczne działanie morfiny jednocześnie dając możliwość zastosowania jak najniższych jej dawek. Cykl prac (3-5) poświęcony jest badaniu roli endogennych systemów opioidowych, inhibitora jednego ze szlaków wewnątrzkomórkowych oraz inhibitorów wybranych chemokin w bólu neuropatycznym ze szczególnym uwzględnieniem nasilenia analgetycznych właściwości środków opioidowych. Badania prowadzone były w ramach grantów Opus, Maestro oraz Preludium, a ich celem było modulowanie interakcji neuroimmunologicznych, które ulegają zaburzeniom w neuropatii, a jednocześnie są odpowiedzialne za obniżenie efektów opioidowych leków przeciwbólowych. Jednak wciąż niezbędne są badania, które pozwolą nam na zrozumienie zależności pomiędzy chemokinami a innymi czynnikami zapalnymi, aktywacją szlaków wewnątrzkomórkowych oraz osłabionym działaniem środków opioidowych w patomechanizmie bólu neuropatycznego. Zachęcona wcześniejszymi badaniami naszego Zespołu, które wykazały że pentoksyfilina, minocyklina i partenolid zwiększają efektywność morfiny, postanowiłam zbadać jaki wpływ na efekty analgetyczne morfiny mają takie substancje jak: selektywny inhibitor kinaz MAP - PD98059 oraz antagonistą CCR1 - J113863. Praca (4) powstała w ramach współpracy z Akademią Węgierską, a celem jej była analiza biochemiczna funkcjonalnego stanu receptorów opioidowych w rdzeniu kręgowym i wzgórzu myszy kontrolnych i w modelu bólu neuropatycznego. Moja współpraca z Akademią Węgierską rozpoczęła się w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej. Wtedy to w naszych badaniach wykazaliśmy, że na poziomie lędźwiowego odcinka rdzenia kręgowego po stronie uszkodzenia nerwu kulszowego nie ma zmian w stymulacji przez dynorfinę  $A_{(1-17)}$  wiązania  $[^{35}S]$  GTP $\gamma$ S, natomiast w zwojach korzeni grzbietowych zaobserwowano wzrost stymulacji, obniżany przez wielokrotne podania inhibitora mikrogleju - minocykliny. Inspiracją do badań było brak danych literaturowych na temat zmian funkcjonalnych receptorów KOP i DOP w

szlakach nocyceptywnych w bólu neuropatycznym. Jest to szczególnie ważne gdyż opioidy, szczególnie te o zróżnicowanej selektywności względem receptorów opioidowych mogą być potencjalnymi lekami w terapii bólu neuropatycznego.

### 3.3.3. Cele badawcze

1. **Zbadanie roli endogennych układów opioidowych w bólu neuropatycznym wywołanym uszkodzeniem nerwu – analiza behawioralna i biochemiczna.**

2. **Określenie wpływu:**

- **inhibitora kinazy MEK1/2 - PD98059**
- **antagonistów wybranych receptorów chemokinowych**

**na procesy nocycepcji oraz efekty środków opioidowych w rozwoju bólu neuropatycznego.**

### 3.3.4. Uzyskane wyniki

Ważność endogennych układów opioidowych w kontroli procesów nocyceptywnych podkreśla publikacja (3), która ukazała się w czasopiśmie *Neuroscience* w 2018 roku. Doświadczenia przeprowadzono w 1, 14 oraz 28 dniu po wywołaniu uszkodzenia u myszy i wykazano zależny od czasu rozwój symptomów charakterystycznych dla bólu neuropatycznego: nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne. W przeprowadzonych badaniach udowodniono, że równoległe z pojawieniem się symptomów bólu neuropatycznego dochodzi do spadku mRNA receptorów opioidowych (MOP, DOP, KOP) w rdzeniu kręgowym po stronie uszkodzenia w dniu 14 po CCI. Natomiast we wzgórzu spadek mRNA wymienionych receptorów zaobserwowaliśmy po stronie przeciwnej. Wzrost mRNA prodynorfiny i proenkefaliny odnotowaliśmy jedynie w rdzeniu kręgowym. Do analizy biochemicznej funkcjonalnego stanu receptorów opioidowych w rdzeniu kręgowym i wzgórzu myszy kontrolnych i w modelu bólu neuropatycznego zastosowano metodę wiązania GTP $\gamma$ S. Określa ona zdolność receptora do wywołania reakcji po zadziałaniu agonisty. W badaniach wykazano, że zmiany w wiązaniu GTP $\gamma$ S dla receptorów MOP i KOP są podobne w obu badanych strukturach. Co ciekawe spadek wiązania receptora DOP do liganda po stronie przeciwnej od uszkodzenia odnotowany we wzgórzu może być przyczyną zmniejszonej skuteczności leków opioidowych w bólu neuropatycznym. W badaniach wykazano lateralizację zmian w obydwu strukturach. Zmiany po stronie uszkodzenia w rdzeniu kręgowym i po stronie przeciwnej do uszkodzenia we wzgórzu wskazują na spadek wiązania GTP $\gamma$ S, czyli słabszą reakcję tych receptorów w modelu bólu neuropatycznego, co może mieć związek z osłabionym działaniem środków opioidowych w neuropatii.

W publikacji (4) z cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wykazano ważną rolę inhibitora kinazy MEK1/2 - PD98059 w hamowaniu objawów bólu neuropatycznego oraz nasilaniu analgetycznego efektu morfiny oraz buprenorfiny (*Plos One*, 2015). Jak wykazano w badaniach hamowanie kinazy MEK1/2 poprzez wielokrotne nardzeniowe podania PD98059 wywołuje przeciwbólowe efekty, jak również nasila działanie morfiny i buprenorfiny w szczurzym modelu bólu neuropatycznego. W przeprowadzonej analizie biochemicznej wykazano, że inhibitor obniża podniesiony po uszkodzeniu poziom

ekspresji białka p38MAPK, ERK1/2, JNK i NF- $\kappa$ B w rdzeniu kręgowym. Dodatkowo PD98059 obniża podniesiony po uszkodzeniu poziom czynników probólowych (IL-1 $\beta$ , IL-6, i iNOS) oraz podnosi poziom przeciwbólowej IL-10, co może być jednym z mechanizmów jego przeciwbólowego działania. Zatem na tej podstawie możemy wnioskować, iż PD98059 wpływa na przywrócenie równowagi pomiędzy czynnikami pro- i przeciwbólowymi w neuropatii, a zablokowanie ścieżki MAPKK wskazuje na nowy punkt uchwytu w leczeniu bólu neuropatycznego, który jest wciąż dużym problemem klinicznym.

Aktualnie opublikowane badania podkreślają ważną rolę chemokin w efektywności opioidów należących do podrodziny C-C w rozwoju bólu neuropatycznego, jednak rola ich w neuropatii cukrzycowej nie jest wyjaśniona dlatego stało się to celem naszych badań. Kolejna praca (5, *Frontiers Immunology*, 2018) z cyklu publikacji będących przedmiotem omawianego osiągnięcia naukowego, koncentruje się na określeniu roli chemokin C-C z rodziny MIP-1 w rozwoju neuropatii cukrzycowej, a mianowicie chemokin: CCL3, CCL4 oraz CCL9. Doświadczenia wykonano na mysim modelu neuropatii cukrzycowej, który uzyskuje się poprzez jednorazowe dootrzewnowe podanie streptozotocyny (STZ; 200 mg/kg). Wyniki badań behawioralnych wykazały, że pojedyncze podpajęczynówkowe podanie wyżej wymienionych chemokin u myszy zdrowych wywoływało nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne. Jednocześnie wykorzystując metodę mikromacierzy białkowych oraz Western blot dowiedliśmy, że w 7 dniu po podaniu streptozotocyny dochodzi do wzrostu poziomu białka CCL3 i CCL9 (ale nie CCL4) w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego. Dodatkowo analiza immunohistochemiczna wykazała obecność chemokin CCL3 i CCL9 oraz ich receptorów CCR1 i CCR5 głównie w neuronach. Jak wskazują badania *in vitro* ekspresja CCL3 i CCL9 może być także pochodzenia glejowego; jednak ta obserwacja była tylko częściowo możliwa do potwierdzenia przez badanie immunohistochemiczne. Co ciekawe podpajęczynówkowe podanie neutralizujących przeciwciał CCL3 lub CCL9 zmniejsza nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne u myszy w dniu 7 po podaniu streptozotocyny, jak również nasila właściwości przeciwbólowe morfiny w neuropatii cukrzycowej. Kolejnym krokiem w doświadczeniach było określenie wpływu podania antagonistów receptorów CCR1 oraz CCR5 (J113863 i DAPTA) na procesy nocycepcji oraz nasilenie środków opioidowych w 7 dniu po podaniu streptozotocyny. Otrzymane przez nas rezultaty są pierwszymi doniesieniami w literaturze na ten temat. W szeregu eksperymentów wykazaliśmy, że podanie antagonisty CCR1 - J113863 zmniejsza nadwrażliwość na bodźce bólowe i dodatkowo nasila analgetyczne właściwości morfiny. Natomiast podanie antagonisty CCR5 - DAPTA nie wpływało na procesy nocycepcji w modelu neuropatii cukrzycowej oraz nie nasilało przeciwbólowego efektu morfiny.

### 3.3.5. Znaczenie uzyskanych wyników

Przedstawiony przeze mnie cykl prac (3-5) stanowiących osiągnięcie naukowe wskazuje na istotną rolę endogennych układów opioidowych, kinaz MAP, jak również chemokin w bólu neuropatycznym. W badaniach wykazano, że wzrostowi syntezy prohormonów opioidowych i późniejszemu uwalnianiu endogennych ligandów towarzyszy spadek poziomu ekspresji mRNA receptorów opioidowych MOP, DOP, KOP oraz spadek ich wiązania do receptorów w rdzeniu kręgowym po stronie uszkodzenia i we wzgórzu po stronie przeciwnej do

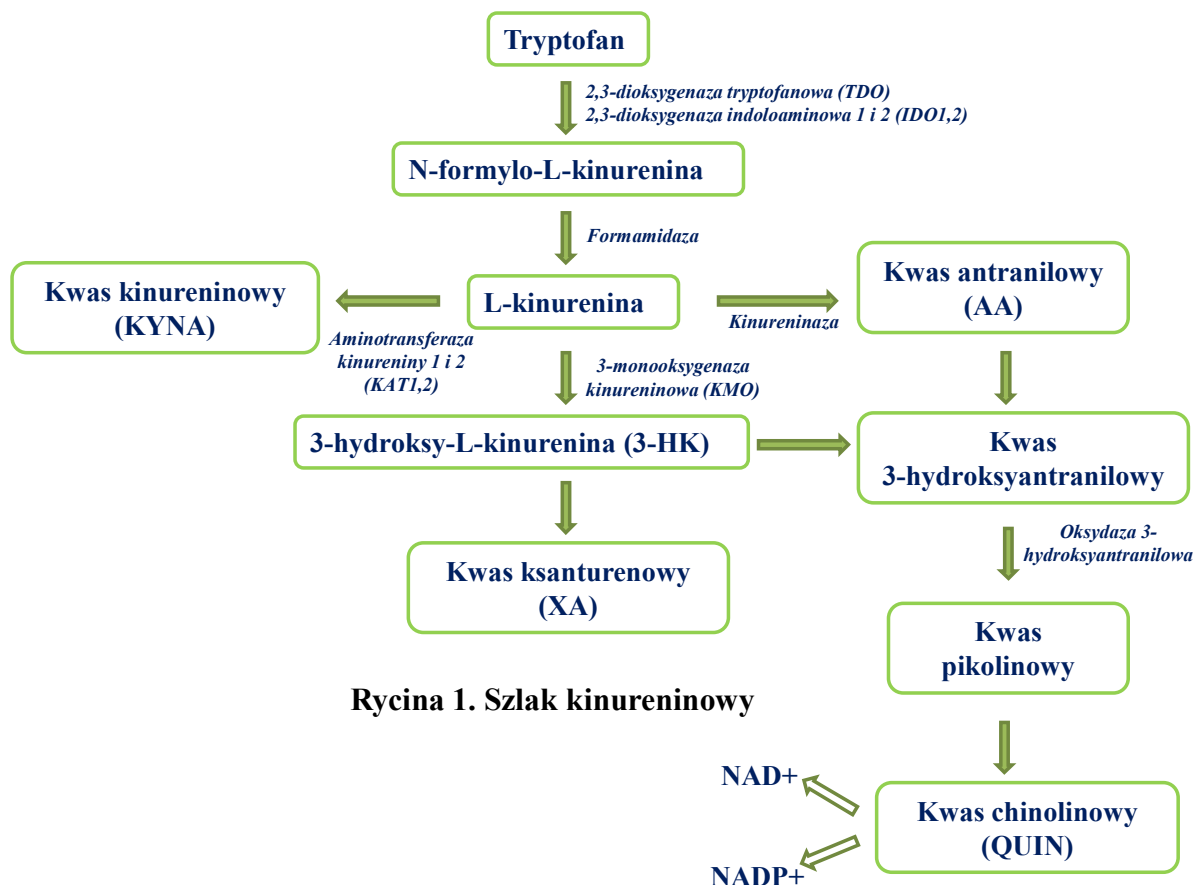
uszkodzenia w mysim modelu bólu neuropatycznego. Niezwykle ważnym wynikiem jest wykazanie spadku wiązania receptora DOP do liganda po stronie przeciwnej od uszkodzenia we wzgórzu, co może być przyczyną zmniejszonej skuteczności leków opioidowych w bólu neuropatycznym. Mechanizmy odpowiadające za osłabione efekty analgetyczne morfiny w bólu neuropatycznym są wciąż słabo poznane. Dlatego zrozumienie molekularnych mechanizmów zachodzących w systemach opioidowych w bólu neuropatycznym ze szczególnym uwzględnieniem interakcji komórek mikrogleju z neuronami powinno wyznaczyć nowe skuteczniejsze metody farmakoterapii bólu. Wyniki badań pozwoliły na uzyskanie odpowiedzi postawionych celów badawczych. W badaniach dowiedziono, że hamowanie ścieżek MAPK po podaniu selektywnego inhibitora kinazy MAP - PD98059 ma znaczące działanie przeciwbólowe, a dodatkowo przyczynia się do wzrostu skuteczności opioidów. Przedstawione dane sugerują, że blokada szlaków MAPKK może być potencjalnym punktem uchwytu do znalezienia nowej skutecznej terapii w leczeniu bólu. Dodatkowym istotnym elementem uzyskanych wyników jest wykazanie ważnej roli dwóch chemokin z rodziny MIP-1 w bólu neuropatycznym towarzyszącym cukrzycy. Wykazany w naszych badaniach podwyższony po podaniu streptozotocyny poziom endogennych chemokin jest punktem uchwytu dla szukania substancji farmakologicznych mogących mieć zastosowanie w neuropatii cukrzycowej. Tym samym udało nam się wyselekcjonować trzy narzędzia farmakologiczne: J113863 oraz neutralizujące przeciwciała CCL3 i CCL9 będące modulatorami nocycepcji przyczyniającymi się do wzmocnienia analgetycznych właściwości morfiny. Jak wykazano w badaniach bezpośrednia neutralizacja chemokin nie tylko łagodzi objawy bólu neuropatycznego, ale także nasila efektywność morfiny, co może mieć kluczowe znaczenie w terapii neuropatii cukrzycowej. Opublikowane rezultaty wzbogacą naszą wiedzę oraz będą stanowić ważny argument do budowania nowych schematów terapeutycznych.

### 3.4. ROLA SZLAKU KINURENINOWEGO W BÓLU NEUROPATYCZNYM

#### 3.4.1. Stan dotychczasowej wiedzy

Zaburzeniom w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego towarzyszą zmiany w metabolizmie tryptofanu, którego główną drogą katabolizmu jest szlak kinureninowy. W wyniku jego przemian dochodzi do powstania produktów pośrednich wpływających na endogenną regulację pobudliwości neuronów, a także pośredniczących w regulacji odpowiedzi komórek odpornościowych. Uzyskane przez zastosowanie metody mikromacierzy DNA wyniki skierowały naszą uwagę na ważną rolę, jaką w rozwoju neuropatii odgrywa szlak kinureninowy. Badania opublikowane w *Molecular Pain* w 2014 roku umożliwiły nam poznanie transkryptów zmieniających się po uszkodzeniu nerwu kulszowego, jak również po wielokrotnych dootrzewnowych podaniach minocykliny w tym modelu. Jeden z tych genów - KMO (3-monooksygenaza kynureiny) ulegał nasileniu w bólu neuropatycznym, dlatego stał się przedmiotem dalszych badań. Opublikowane dotychczas dane literaturowe sugerują, że ten enzym odgrywa istotną rolę w patologii wielu chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych, natomiast jego rola w bólu neuropatycznym jest dotąd niepoznana. Tryptofan, niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu, egzogeny aminokwas jest związkiem wchodzącym w skład białek, jak również prekursorem

do syntezy aktywnych biologicznie cząsteczek, wśród których wyróżniamy: dinukleotydy nikotynamidoadeninowy (NAD), kwas nikotynowy, serotonina i melatonina (Oxenkrug, 2007). Duża część tryptofanu metabolizowana jest na drodze enzymatycznych przemian, zwanych szlakiem kinureninowym, w wyniku którego dochodzi do powstania całej puli kinurenin zaangażowanych w wiele różnych, często przeciwstawnych procesów fizjologicznych. Metabolizm tryptofanu (**Rycina 1**) zwany szlakiem kinureninowym, rozpoczyna się od jego przekształcenia w N-formylo-L-kinureninę przy udziale trzech enzymów: 2,3-dioksygenazy tryptofanowej (TDO) oraz 2,3-dioksygenazy indoloaminowej 1 i 2 (IDO 1 i 2). N-formylo-L-kinurenina szybko ulega przekształceniu do jednego z istotniejszych metabolitów szlaku - L-kinureniny. W kolejnym etapie L-kinurenina może ulec trzem różnym przekształceniom do kwasu kinureninowego (KYNA) za pomocą enzymów: aminotransferazy kinureniny 1 i 2 (KAT 1 i 2); 3-hydroksy-L-kinureniny przy udziale 3-monooksygenazy kinureninowej (KMO), jak również kwasu antranilowego (AA) przy działaniu kinureninazy. Następnie 3-hydroksy-L-kinurenina przekształcana jest do kwasu ksanturenowego (XA). Zarówno 3-hydroksy-L-kinurenina, jak i kwas antranilowy mogą być



Rycina 1. Szlak kinureninowy

enzymatycznie przekształcane do kwasu 3-hydroksyantranilowego. Oksydaza 3-hydroksyantranilowa przekształca kwas 3-hydroksyantranilowy do nietrwałego związku, z którego powstaje kwas pikolinowy, a następnie na drodze nieenzymatycznej dochodzi do powstania kwasu chinolinowego (QUIN) – prekursora syntezy NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> (Schwarcz i Stone, 2017). Wielu chorobom neurodegeneracyjnym, a także chorobom o podłożu immunologicznym w ośrodkowym układzie nerwowym przypisuje się udział kinurenin wykazujących właściwości neuroaktywne. Do nich zaliczamy m.in. kwas chinolinowy, L-



kinureninę, 3-hydroksy-L-kinureninę i kwas kinureninowy. W procesach nocycypcji rola metabolitów szlaku kinureninowego została stosunkowo mało poznana. Fejes i wsp. 2011 wskazali na ważną rolę kinurenin w migrenie, natomiast badania przeprowadzone przez grupę Mecs i wsp., z 2009 sugerują na ich udział w bólu zapalnym. Historia badań szlaku kinureninowego rozpoczęła się od enzymu monooksygenazy kinurenininy (KMO) w 1983 roku, gdy Whetsell i Schwarcz na podstawie przeprowadzonych badań eksperymentalnych zauważyli, że wstrzyknięcie kwasu chinolinowego (QUIN) do mózgowi myszy prowadzi do powstawania uszkodzeń podobnych do obserwowanych w mózgowi pacjentów z chorobą Huntingtona. QUIN jest substancją endogenną odpowiedzialną za powstanie zjawiska zwanego śmiercią ekscytotoksyczną. Źródłem metabolitów szlaku kinureninowego, który odgrywa niezwykle ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego w obrębie OUN są głównie komórki glejowe. Dlatego wydaje się oczywiste, że są one punktem, w który należałoby celować chcąc dogłębniej poznać rolę kinurenin w bólu neuropatycznym. Badania przeprowadzone w ramach mojej pracy doktorskiej dowiodły, że po uszkodzeniu nerwu kulszowego dochodzi do wzrostu ekspresji mRNA enzymu *Kmo* w szczurzym modelu bólu neuropatycznego (Rojewska i wsp., 2014). Dodatkowo w badaniach biochemicznych dowiedliśmy, że zastosowane inhibitory wywołują spadek poziomu endogennych czynników pronocycyptywnych, a także nasilają analgetyczny efekt morfiny (Rojewska i wsp., 2015). Praca Zhou i wsp., 2015 sugeruje, że IDO 1 odpowiada jedynie na zachowania depresyjne współwystępujące w neuropatii, natomiast nie wpływa na nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne. Brak badań nad rolą tego enzymu oraz innych produktów i enzymów szlaku kinureninowego w bólu neuropatycznym był inspiracją do dalszych badań. Ich realizację umożliwił mi otrzymany w 2016 roku grant SONATA pt. „Rola szlaku kinureninowego w bólu neuropatycznym w kontekście innowacyjnego podejścia terapeutycznego”. Ważnym metabolitem w kontekście patomechanizmu neuropatii jest kwas kinureninowy. Istnieją doniesienia o jego znaczeniu w bólu zapalnym (Pineda-Farias i wsp., 2013; Resta i wsp., 2016), migrenie (Curto i wsp., 2015, Fejes i wsp., 2011), a także w bólu neuropatycznym (Rojewska i wsp., 2019). W procesach nocycypcji znaczącą rolę odgrywa L-kinurenina, która wykazuje działanie przeciwbólowe w zwierzęcym modelu bólu ostrego (Heyliger i wsp., 1998), a także w bólu zapalnym (Cosi i wsp., 2011). Również wyniki badań prezentowane przez Pineda-Farias i wsp., 2011 potwierdzają jej analgetyczne właściwości, gdyż koadministracja L-kinurenininy z probenecidem zmniejsza nadwrażliwość mechaniczną u szczurów z rozwiniętą neuropatią. Laumet i wsp., w 2017 roku wykazali, że enzym *Kmo* odgrywa ważną rolę w procesach depresji rozwijającej się po uszkodzeniu nerwów obwodowych, ale jego zahamowanie nie wpływa na procesy bólowe. U myszy po częściowym uszkodzeniu nerwu zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji mRNA *Kmo* w mózgu po stronie przeciwnej do miejsca uszkodzenia. W modelu częściowego uszkodzenia nerwu Autorzy wykazali zwiększoną ekspresję: *Kmo*, *Kynu*, *Haa* oraz *Quin* po stronie przeciwnej do uszkodzenia w hipokampie. Również zwiększony stosunek QA-do-KYN w hipokampie wskazuje na aktywację całej gałęzi *Kmo* w szlaku kinureninowym. Badania opublikowane przez Nahomi i wsp., 2020 sugerują, że w neuropatii wzrokowej, w której ma miejsce postępująca degeneracja komórek zwojowych siatkówki (RGC) dożylnie lub do ciała szklistego podawanie KYNA chroniło RGC przed uszkodzeniem. Uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne spowodowało większą utratę RGC u muszy zdrowych w

porównaniu z myszami z pozbawionymi Kmo. U myszy pozbawionych enzymu Kmo zaobserwowano nieco wyższy poziom glukozy na czczo niż u myszy typu dzikiego. Myszy z cukrzycą wykazywały znacznie niższą utratę RGC w porównaniu z myszami zdrowymi po uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnym. Dlatego ciekawym i nowym punktem uchwytu dla terapii może być modulacja szlaku kinureninowego. Brak danych literaturowych mówiących o jego roli w rozwoju bólu neuropatycznego. Temat ten jest szczególnie interesujący, gdyż farmakologiczna modulacja szlaku kinureninowego może przynieść dobre efekty terapeutyczne w przyszłości. W literaturze istnieją już doniesienia mówiące o jego znaczeniu w chorobach neuroimmunologicznych i neurodegeneracyjnych, dlatego uzupełnienie tej wiedzy w tematyce bólu neuropatycznego jest niezwykle ważne.

### 3.4.2. Geneza cyklu prac i cele badawcze

Moja przygoda z badaniami dotyczącymi roli szlaku kinureninowego w bólu neuropatycznym rozpoczęła się jeszcze gdy przygotowywałam swoją pracę doktorską. Wtedy to przy wykorzystaniu metody mikromacierzy DNA stworzyliśmy wzorce transkrypcyjne oraz narodziły się nowe hipotezy dotyczące modulującego wpływu minocykliny na poziom abundancji transkryptów ulegających zmianie po uszkodzeniu nerwu obwodowego. Jednym z nich był enzym szlaku kinureninowego – Kmo. Enzym ten odgrywa ważną rolę w chorobach neurodegeneracyjnych i neuroimmunologicznych, natomiast jego rola w bólu neuropatycznym wymagała wyjaśnienia i wnikliwych badań. I tak rozpoczęły się moje badania dotyczące roli szlaku kinureninowego w bólu neuropatycznym, co zaowocowało opublikowaniem czterech publikacji (6-9), które są cyklem prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej na temat roli szlaku kinureninowego w bólu neuropatycznym. Wcześniejsze badania dotyczące roli szlaku kinureninowego w bólu neuropatycznym przyczyniły się do sformułowania kilku pytań badawczych, które stały się celem moich badań.

### 3.4.3. Cele badawcze

1. **Określenie czy w bólu neuropatycznym dochodzi do zmian w aktywności enzymów i produktów szlaku kinureninowego w rdzeniu kręgowym i w zwojach korzeni grzbietowych**
2. **Oznaczenie komórkowego źródła oraz farmakologiczna modulacja enzymów szlaku kinureninowego poprzez zahamowanie aktywności związków toksycznych w hodowli pierwotnej mikrogleju i astrogleju (stymulacja komórek LPS)**
3. **Farmakologiczna modulacja ścieżki neurotoksycznej szlaku kinureninowego oraz badania biochemiczne zmian ekspresji wybranych enzymów po modulacji szlaku kinureninowego**
4. **Farmakologiczna modulacja ścieżki neuroprotektoryjnej szlaku kinureninowego poprzez nasilenie aktywności kwasu kinureninowego oraz badania biochemiczne zmian ekspresji wybranych enzymów i ich produktów po modulacji szlaku kinureninowego**
5. **Zbadanie roli agonistów receptora GPR35 w bólu neuropatycznym**

#### 3.4.4. Uzyskane wyniki

Odpowiedzi na przedstawione cele zawarte są w cyklu prac będących przedstawionym do recenzji osiągnięciem naukowym (6-9). Wyniki prac jednoznacznie wskazują na ważną rolę jaką odgrywa szlak kinureninowy w rozwoju neuropatii. W pracy opublikowanej w *Neuropharmacology* w 2016 roku (6) wykazaliśmy, że w różnych po uszkodzeniu nerwu kulszowego punktach czasowych, tj. w dniu 3, 7 oraz 14 wzrasta poziom mRNA i białka Kmo w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych. Zmiany te korelowały ze zwiększonym poziomem markerów: mikrogleju (CD40 i IBA-1) oraz astrocytów (Gfap). Ponadto, jak wskazują wyniki, wielokrotne dootrzewnowe i podpajęczynówkowe podania inhibitora mikrogleju – minocykliny zmniejszają podniesiony po uszkodzeniu poziom mRNA Kmo w obu badanych strukturach, czemu towarzyszy zmniejszenie nadwrażliwości na bodźce bólowe. Badania z użyciem pierwotnych komórek glejowych wykazały, że minocyklina hamuje stymulowany lipopolisacharydem wzrost poziomu mRNA Kmo w komórkach mikrogleju, ale nie astrogleju. W następnym etapie badań wykazaliśmy, że zastosowanie inhibitorów Kmo (Ro61-6048 and JM6) zmniejsza objawy bólu neuropatycznego oraz nasila analgetyczne działanie morfiny. Badania biochemiczne z wykorzystaniem metody qRT-PCR oraz Western Blot wskazują, że Ro61-6048 obniża podniesiony po uszkodzeniu nerwu kulszowego poziom mRNA i/lub białka CD40/Iba1, IL-1beta, IL-6, NOS2 zarówno w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych. Badania umożliwiły poznanie roli szlaku kinureninowego w bólu neuropatycznym oraz uzupełniły podstawową wiedzę z zakresu funkcjonowania organizmu w normie i patologii. Praca (8, *Frontiers Pharmacology*, 2018) jest obszerną analizą dotyczącą wpływu uszkodzenia nerwu kulszowego na poziom mRNA enzymów szlaku kinureninowego. Wiodącym założeniem hipotezy badawczej było poznanie czy zahamowanie aktywności enzymów ścieżki neurotoksycznej szlaku może mieć właściwości neuroprotekcjne i być jednym ze sposobów ochrony neuronów przed uszkodzeniami. Wyniki analiz RT-qPCR wykazały, że w różnych czasach po uszkodzeniu nerwu kulszowego rośnie poziom mRNA enzymów szlaku kinureninowego, takich jak: 2,3 dioksygenaza indolowa 1 (Ido1), 2,3 dioksygenaza indolowa 2 (Ido2), Kmo i dioksygenaza kwasu 3-hydroksyantranilowego (Hao) w rdzeniu kręgowym lub/i w zwojach korzeni grzbietowych. Badania z wykorzystaniem hodowli pierwotnych mikrogleju dowiodły, że po stymulacji LPS wzrasta poziom mRNA Ido2, Kmo oraz Hao. Zastosowanie inhibitora mikrogleju – minocykliny odwraca wywołane uszkodzeniem zmiany mRNA Ido2 i Kmo w rdzeniu kręgowym lub/i w zwojach korzeni grzbietowych. Dodatkowo w badaniach wykazano, że zastosowanie inhibitorów enzymów: Ido2 (1-MT) i Kmo (UPF648) zmniejsza symptomy bólu neuropatycznego. Wyniki badań wskazują, że zahamowanie aktywności enzymów ścieżki neurotoksycznej szlaku może mieć właściwości neuroprotekcjne i być jednym ze sposobów ochrony neuronów przed uszkodzeniami. W aktywacji szlaku kinureninowego kluczową rolę odgrywa GPR35. Wyniki badań kolejnej pracy (7, *European Journal of Pharmacology*) wchodzącej w skład mojej rozprawy habilitacyjnej opublikowane w 2018 roku sugerują, że zaprinast – działający zarówno jako agonista GPR35, jak i inhibitor fosfodiesterazy wpływa na ból neuropatyczny u szczurów. Wyniki pracy wskazują że

zarówno pojedyncze, jak i wielokrotne podpajęczynówkowe podania zaprinastu zmniejszają nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne. Badania biochemiczne z wykorzystaniem metody Western blot dowiodły, że wielokrotnie podawany zaprinast zmniejsza aktywowany w wyniku uszkodzenia poziom białka IBA-1 oraz podnosi poziom Gfap w rdzeniu kręgowym w 7 dniu po CCI. Po przeprowadzeniu analizy czynników pronocyceptywnych wynika, że zaprinast zmniejsza podniesiony po uszkodzeniu poziom białka IL-1beta w zwojach korzeni grzbietowych oraz IL-18, IL-6 i NOS2 w rdzeniu kręgowym w 7 dniu po CCI. Ponadto wykazano, że zaprinast nie wpływa na poziom białka IL-1RA, IL-18BP oraz IL-10. Zainspirowana zaobserwowanymi wynikami związanymi zarówno z udziałem szlaku kinureninowego, jak i rolą receptora Gpr35 w bólu neuropatycznym podjęłam badania, które zostały opublikowane w pracy (9). Wcześniejsze badania wyodrębniły szereg metabolitów szlaku kinureninowego, które odgrywają ważną rolę w modulacji bólu neuropatycznego. W pracy opublikowanej w *Pharmacological Reports* w 2019 wykazano wpływ podania kwasu kinureninowego oraz zaprinastu u myszy po uszkodzeniu nerwu kulszowego. Co ciekawe, a zarazem będące pierwszym doniesieniem podpajęczynówkowe podanie chemokiny CXCL17 u myszy zdrowych inicjuje rozwój bólu neuropatycznego, co związane jest z GPR35. Jak wykazano w doświadczeniach probólowy efekt CXCL17 jest odwracany po podaniach agonistów GPR35: kwasu kinureninowego oraz zaprinastu. Ponadto udowodniono, że podanie tych dwóch substancji zmniejsza nadwrażliwość na bodźce bólowe oraz zwiększa efektywność morfiny u myszy po uszkodzeniu nerwu kulszowego. Podsumowując przedstawiono wyniki sugerujące, że zarówno zaprinast, jak i kwas kinureninowy mogą skutecznie zmniejszać neuropatyczne zachowania związane z bólem.

#### 3.4.5. Znaczenie uzyskanych wyników

W świetle przedstawionych prac wydaje się, że modulacja aktywności szlaku kinureninowego może zostać wykorzystana w planowaniu nowych strategii terapeutycznych bólu neuropatycznego. Wyniki naszych badań pokazują, że szlak kinureninowy jest ważnym mediatorem patologii bólu neuropatycznego i wskazują, że enzym Kmo może stanowić nowy cel farmakologiczny w leczeniu neuropatii. Niezwykle istotnym doniesieniem jest wykazanie, że zastosowanie inhibitorów enzymów Kmo i Ido2 wpływa na procesy nocyciepcji. Sugerujemy również, że wzmocnienie ścieżki neuroprotekcijnej poprzez zwiększenie ilości wydzielanego kwasu kinureninowego może wywoływać efekty przeciwbólowe. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę chemokiny CXCL17 w rozwoju bólu neuropatycznego po uszkodzeniu nerwu kulszowego i jest to pierwsze doniesienie w literaturze. Jak wynika z przeprowadzonych badań kolejnym punktem uchwytu dla znalezienia skutecznej terapii może stać się GPR35. Wzajemna zależność pomiędzy mechanizmem bólu neuropatycznego a aktywnością szlaku kinureninowego być może pozwoli na znalezienie nowego mechanizmu powstawania zmian towarzyszących uszkodzeniu oraz stworzy możliwość wykorzystania tej wiedzy w postępowaniu profilaktycznym lub leczniczym. Otrzymane wyniki badań mogą posłużyć jako eksperymentalne podstawy do rozwoju bardziej selektywnej i skutecznej terapii bólu neuropatycznego w klinice z zastosowaniem inhibitorów substancji endogennych. Otrzymane rezultaty pozwalają na lepsze zrozumienie procesu inicjacji i rozwoju bólu neuropatycznego. Wyniki badań przedstawione w pracach (6-9) wchodzących w skład

rozprawy habilitacyjnej, a wykonane w ramach kierowanego przeze mnie grantu SONATA umożliwią poznanie mechanizmów bólu neuropatycznego i wskazanie nowych strategii leczenia, co stanowi istotny problem zarówno naukowy, jak i kliniczny.

## Literatura:

- American Society of Anesthesiologists Task Force on Chronic Pain Management; American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine. Practice guidelines for chronic pain management: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Chronic Pain Management and the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine. *Anesthesiology* 2010; 112(4): 810-833.
- Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 2008; 28(14): 3689-96.
- Apalla Z, Sotiriou E, Lallas A, Lazaridou E, Ioannides D. Botulinum toxin A in postherpetic neuralgia: A parallel, randomized, double-blind, single-dose, placebo-controlled trial. *Clin. J. Pain* 2013; 29: 857-864.
- Apfel SC. Introduction to diabetic neuropathy. *Am. J. Med.* 1999; 107 (supl.): 1-8.
- Bach-Rojecky L, Relja M, Lacković Z. Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. *J Neural Transm* 2005; 112(2): 215-9.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; 139(2): 267-284.
- Belluzzi JD, Stein L. Enkephaline may mediate euphoria and drive-reduction reward. *Nature.* 1977, 266:556-8.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33(1): 87-107.
- Binder WJ, Brin MF, Blitzer A, Pogoda JM. Botulinum toxin type A (BOTOX) for treatment of migraine. *Dis Mon.* 2002; 48(5): 323-35.
- Boulton AJ, Worth RC, Drury J, Hardisty CA, Wolf E, Cudworth AG, Ward JD. Genetic and metabolic studies in diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1984; 26(1): 15-9.
- Brack A, Rittner HL, Machelska H, et al. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. *Pain.* 2004; 112(3): 229-238.
- Breuer B, Sperber K, Wallenstein S, Kiproviski K, Calapa A, Snow B, Pappagallo M. Clinically significant placebo analgesic response in a pilot trial of botulinum B in patients with hand pain and carpal tunnel syndrome. *Pain Med.* 2006; 7(1): 16-24.
- Butera J.A. Miniperspectives: recent approaches in the treatment of neuropathic pain. *J. Med. Chem.* 2007; 11: 2543-2546.
- Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2001; 44(11): 1973-88.
- Chan AW, Macfarlane IA, Masson EA, Bowsher D, Morley JS, Venn RF. CSF enkephalins in diabetic neuropathy. *Neuropeptides.* 1992; 22(2): 125-128. Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol.* 1993; 44(1):8-12.
- Chuang YC, Yoshimura N, Huang CC, Chiang PH, Chancellor MB. Intravesical botulinum toxin A administration produces analgesia against acetic acid induced bladder pain responses in rats. *J Urol* 2004; 172: 1529-32.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Prim* 2017; 3: 17002.
- Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, Carlà V, Sili M, Cavone L, Maratea D, Moroni F. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology* 2011; 60: 1227-1231.
- Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 2004; 107(1-2): 125-33.
- Curto M, Lionetto L, Negro A, Capi M, Fazio F, Giamberardino MA, Simmaco M, Nicoletti F, Martelletti P. Altered kynurenine pathway metabolites in serum of chronic migraine patients. *J Headache Pain* 2015; 17: 47.
- Durham PL, Cady R, Cady R. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy. *Headache* 2004; 44(1): 35-42.

- Dyck PJ, Zimmerman BR, Vilen TH, Minnerath SR, Karnes JL, Yao JK, Poduslo JF. Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med.* 1988; 1; 319(9): 542-8.
- Faden AI, Molineaux CJ, Rosenberger JG, Jacobs TP, Cox BM. Endogenous opioid immunoreactivity in rat spinal cord following traumatic injury. *Ann Neurol* 1985; 17(4): 386-90.
- Faden AI. Opioid and nonopioid mechanisms may contribute to dynorphin's pathophysiological actions in spinal cord injury. *Ann. Neurol* 1990; 27: 67-74.
- Fallon MT. Neuropathic pain in cancer. *Br J Anaesth* 2013; 111: 105–111.
- Fan C, Chu X, Wang L, Shi H, Li T. Botulinum toxin type A reduces TRPV1 expression in the dorsal root ganglion in rats with adjuvant-arthritis pain. *Toxicon.* 2017 Jul;133:116-122. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.05.001. Epub 2017 May 3. PubMed PMID: 28478059.
- Fejes A, Pardutz A, Toldi J, Vecsei L. Kynurenine Metabolites and Migraine: Experimental Studies and Therapeutic Perspectives. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9: 376–387.
- Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DL, Bouhassira D, Cruccu G, Freeman R, Hansson P, Nurmikko T, Raja SN, Rice AS, Serra J, Smith BH, Treede RD, Jensen TS. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *Pain.* 2016; 157(8): 1599-606.
- Ghasemi M, Ansari M, Basiri K, Shaigannejad V. The effects of intradermal botulinum toxin type a injections on pain symptoms of patients with diabetic neuropathy. *J Res Med Sci.* 2014; 19(2): 106-11.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76(12): 6666-70.
- Grisel JE, Mogil JS, Belknap JK, Grandy DK. Orphanin FQ acts as a supraspinal, but not a spinal, anti-opioid peptide. *Neuroreport,* 1996; 7: 2125-2129.
- Han ZA, Song DH, Oh HM, Chung ME. Botulinum toxin type A for neuropathic pain in patients with spinal cord injury. *Ann Neurol.* 2016; 79(4): 569-78.
- Hao S, Mata M, Goins W, Glorioso JC, Fink DJ. Transgene-mediated enkephalin release enhances the effect of morphine and evades tolerance to produce a sustained antiallodynic effect in neuropathic pain. *Pain.* 2003; 102(1-2): 135-42.
- Heyliger SO, Goodman CB, Ngong JM, Soliman KFA. The Analgesic Effects Of Tryptophan And Its Metabolites In The Rat. *Pharmacol Res* 1998; 38: 243–250.
- Hughes J, Smith T, Morgan B, Fothergill L. Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sci.* 1975; 16: 1753-8.
- Jessop DS, Fassold A, Wolff C, Hofbauer R, Chover-Gonzalez A, Richards LJ, Straub RH. Endomorphins in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and experimental arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1193: 117-122.
- Kajander KC, Sahara Y, Iadarola MJ, Bennett GJ. Dynorphin increases in the dorsal spinal cord in rats with a painful peripheral neuropathy. *Peptides* 1990; 11(4): 719-28.
- Kapural L, Stillman M, Kapural M, McIntyre P, Guirgius M, Mekhail N. Botulinum toxin occipital nerve block for the treatment of severe occipital neuralgia: a case series. *Pain Pract.* 2007; 7(4): 337-40.
- Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Sonoyama W, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K. Botulinum toxin type a (150 kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal ganglion neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infraorbital nerve constriction. *Neuroscience* 2009; 159(4): 1422-9.
- Klein AW. The therapeutic potential of botulinum toxin. *Dermatol Surg.* 2004; 30(3): 452-5.
- Labuz D, Berger S, Mousa SA, Zöllner C, Rittner HL, Shaqura MA, Segovia-Silvestre T, Przewlocka B, Stein C, Machelska H. Peripheral antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain. *J Neurosci.* 2006; 19;26(16): 4350-8.
- Laughlin TM, Vanderah TW, Lashbrook J, Nichols ML, Ossipov M, Porreca F, Wilcox GL. Spinally administered dynorphin A produces long-lasting allodynia: involvement of NMDA but not opioid receptors. *Pain* 1997; 72(1-2): 253-60.
- Laumet G, Zhou W, Dantzer R, Edralin JD, Huo X, Budac DP, O'Connor JC, Lee AW, Heijnen CJ, Kavelaars A. Upregulation of neuronal kynurenine 3-monooxygenase mediates depression-like behavior in a mouse model of neuropathic pain. *Brain Behav Immun.* 2017; 66: 94-102.

- Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 2005; 115(1-2): 71-83.
- Lipkowski AW, Konecka AM, Sroczynska I, Przewlocki R, Stala L, Tam SW. Bivalent opioid peptide analogues with reduced distances between pharmacophores. *Life Sci.* 1987; 8;40(23): 2283-8.
- Long JB, Petras JM, Mobley WC, Holaday JW. Neurological dysfunction after intrathecal injection of dynorphin A (1-13) in the rat. II. Nonopioid mechanisms mediate loss of motor, sensory and autonomic function. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246(3): 1167-74.
- Luisetto S, Marinelli S, Cobianchi S, Pavone F. Anti-allodynic efficacy of botulinum neurotoxin A in a model of neuropathic pain. *Neuroscience* 2007; 145(1): 1-4.
- Luisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobianchi S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F. Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res* 2006; 1082(1): 124-31.
- Marinelli S, Luisetto S, Cobianchi S, Makuch W, Obara I, Mezzaroma E, Caruso M, Straface E, Przewlocka B, Pavone F. Botulinum neurotoxin type A counteracts neuropathic pain and facilitates functional recovery after peripheral nerve injury in animal models. *Neuroscience* 2010; 171(1): 316-28.
- Marinelli S, Vacca V, Ricordy R, Uggenti C, Tata AM, Luisetto S, Pavone F. The analgesic effect on neuropathic pain of retrogradely transported botulinum neurotoxin A involves Schwann cells and astrocytes. *PLoS One* 2012; 7(10): e47977.
- Meacham K, Shepherd A, Mohapatra DP, Haroutounian S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr Pain Headache Rep.* 2017; 21(6): 28.
- Mecs L, Tuboly G, Nagy E, Benedek G, Horvath G. The peripheral antinociceptive effects of endomorphin-1 and kynurenic acid in the rat inflamed joint model. *Anesth Analg* 2009; 109: 1297–304.
- Mika J, Rojewska E, Makuch W, Korostynski M, Luisetto S, Marinelli S, Pavone F, Przewlocka B. The effect of botulinum neurotoxin A on sciatic nerve injury-induced neuroimmunological changes in rat dorsal root ganglia and spinal cord. *Neuroscience* 2011; 175: 358-66.
- Mika J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol Rep.* 2008; 60(3): 297-307.
- Mogil JS, Grisel JE, Reinscheid RK, Civelli O, Belknap JK, Grandy DK. Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience.* 1996; 75(2): 333-7.
- Mogil JS, Grisel JE, Reinscheid RK, Civelli O, Belknap JK, Grandy DK. Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience.* 1996 Nov;75(2):333-7.
- Montecucco C, Molgó J. Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5(3): 274-9.
- Moulin DE, Max MB, Kaiko RF, Inturrisi CE, Maggard J, Yaksh TL, Foley KM. The analgesic efficacy of intrathecal D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>5</sup>-enkephalin in cancer patients with chronic pain. *Pain.* 1985; 23(3): 213-21.
- Nahomi RB, Nam MH, Rankenberg J, et al. Kynurenic Acid Protects Against Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Ganglion Cell Death in Mice. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(5): 1795.
- Obara I, Makuch W, Spetea M, Schütz J, Schmidhammer H, Przewlocki R, Przewlocka B. Local peripheral antinociceptive effects of 14-O-methyloxymorphone derivatives in inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2007; 8; 558(1-3): 60-7.
- Obara I, Mika J, Schafer MK, Przewlocka B. Antagonists of the kappa-opioid receptor enhance allodynia in rats and mice after sciatic nerve ligation. *Br J Pharmacol.* 2003, 140: 538-46.
- Obara I, Mika J, Schafer MK, Przewlocka B. Antagonists of the kappa-opioid receptor enhance allodynia in rats and mice after sciatic nerve ligation. *Br J Pharmacol* 2003; 140(3): 538-46.
- Obara I, Przewlocki R, Przewlocka B. Local peripheral effects of mu-opioid receptor agonists in neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett.* 2004; 22;360(1-2): 85-9.
- Oxenkrug GF. Genetic and Hormonal Regulation of Tryptophan-Kynurenine Metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1122: 35–49.
- Pasternak GW. Multiple mu opiate receptors. *Atlas of science. Pharmacology* 1988; 148-154.
- Pineda-Farias JB, Pérez-Severiano F, González-Esquivel DF, Barragán-Iglesias P, Bravo-Hernández M, Cervantes- Durán C, Aguilera P, Ríos C, Granados-Soto V. The l-kynurenine-probenecid combination reduces neuropathic pain in rats. *Eur J Pain* 2013; 17: 1365–1373.
- Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, et al. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy. *Neural Plast.* 2015; 2015:676473.

- Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Jurga AM, et al. Minocycline enhances the effectiveness of nociceptin/orphanin FQ during neuropathic pain. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:762930.
- Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in neuropathic pain. *Curr Pharm Des.* 2005; 11(23): 3013-25.
- Przewlocki R, Shearman GT, Herz A. Mixed opioid/nonopioid effects of dynorphin and dynorphin related peptides after their intrathecal injection in rats. *Neuropeptides.* 1983, 3:233-40.
- Przewlocki R. Opioid peptides. Springer Science+Business Media New York 2015. DW Pfaff, ND Volkow (eds) *Neuroscience in the 21st Century New York, 2015.*
- Przewłocka B, Mika J, Labuz D, Toth G, Przewłocki R. Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 367(2-3): 189-96.
- Przewłocki R, Haarmann I, Nikolarakis K, Herz A, Höllt V. Prodynorphin gene expression in spinal cord is enhanced after traumatic injury in the rat. *Brain Res* 1988; 464(1): 37-41.
- Przewłocki R, Shearman GT, Herz A. Mixed opioid/nonopioid effects of dynorphin and dynorphin related peptides after their intrathecal injection in rats. *Neuropeptides* 1983; 3(3): 233-40.
- Raghavendra V, Tanga F, Rutkowski MD, DeLeo JA. Anti-hyperalgesic and morphine-sparing actions of propentofylline following peripheral nerve injury in rats: mechanistic implications of spinal glia and proinflammatory cytokines. *Pain* 2003; 104(3): 655-64.
- Ranoux D, Attal N, Morain F, Bouhassira D. Botulinum toxin type A induces direct analgesic effects in chronic neuropathic pain. *Ann Neurol.* 2008; 64(3): 274-83.
- Resta F, Masi A, Sili M, Laurino A, Moroni F, Mannaioni G. Kynurenic acid and zaprinast induce analgesia by modulating HCN channels through GPR35 activation. *Neuropharmacology.* 2016;108: 136-43.
- 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(1): 139-148.
- 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(1-2): 57-66.
- Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Zychowska M, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. PD98059 Influences Immune Factors and Enhances Opioid Analgesia in Model of Neuropathy. *PLoS One.* 2015; 1; 10(10): e0138583.
- Rossetto O, Rigoni M, Montecucco C. Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. *Toxicol Lett* 2004; 149(1-3): 91-101.
- Schwarcz R, Stone TW. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology* 2017; 112: 237-247.
- Shin MC, Wakita M, Xie DJ. Inhibition of membrane Na<sup>+</sup> channels by A type botulinum toxin at femtomolar concentrations in central and peripheral neurons. *J. Pharmacol. Sci.* 2012; 118: 33-42.
- Sidenius P, Jakobsen J. Retrograde axonal transport. A possible role in the development of neuropathy. *Diabetologia* 1981; 20: 110-112.
- Snyder DA, Kelly ML, Woodbury DJ. SNARE complex regulation by phosphorylation. *Cell Biochem Biophys* 2006; 45(1): 111-23.
- Stein C, Machelska H, Binder W, Schäfer M. Peripheral opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol.* 2001; 1(1): 62-5.
- Stevens CW, Yaksh TL. Dynorphin A and related peptides administered intrathecally in the rat: a search for putative kappa opiate receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986; 238: 833-8.
- Truong W, Cheng C, Xu QG, Li XQ, Zochodne DW. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann Neurol.* 2003; 53(3): 366-75.
- Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia.* 2004; 45(1): 89-95.
- Vacca V, Marinelli S, Luvisetto S, Pavone F. Botulinum toxin A increases analgesic effects of morphine, counters development of morphine tolerance and modulates glia activation and  $\mu$  opioid receptor expression in neuropathic mice. *Brain Behav Immun* 2013; (13) 1-11.
- 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(4): 654-62.



- Van Ree JM, Gerrits MA, Vanderschuren LJ. Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacol Rev.* 1999; 51: 341-96.
- Vanderah TW, Laughlin T, Lashbrook JM, Nichols ML, Wilcox GL, Ossipov MH, Malan TP Jr, Porreca F. Single intrathecal injections of dynorphin A or des-Tyr-dynorphins produce long-lasting allodynia in rats: blockade by MK-801 but not naloxone. *Pain* 1996; 68(2-3): 275-81.
- Wagner EJ, Rønnekleiv OK, Grandy DK, Kelly MJ. The peptide orphanin FQ inhibits beta-endorphin neurons and neurosecretory cells in the hypothalamic arcuate nucleus by activating an inwardly-rectifying K<sup>+</sup> conductance. *Neuroendocrinology.* 1998; 67(2): 73-82.
- Wei E, Loh H. Physical dependence of opiate-like peptides. *Science* 1976, 193:1262-3.
- Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. *Toxicon* 2000 ;38(2): 245-58.
- Wheeler AH. Botulinum toxin A, adjunctive therapy for refractory headaches associated with pericranial muscle tension. *Headache.* 1998; 38(6): 468-71.
- Whetsell WO Jr, Schwarcz R. The organotypic tissue culture model of corticostriatal system used for examining amino acid neurotoxicity and its antagonism: studies on kainic acid, quinolinic acid and (-)2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. *J Neural Transm Suppl* 1983; 19: 53-63.
- Wu, H.; Sultana, R.; Taylor, K.B.; Szabo, A. A prospective randomized double-blinded pilot study to examine the effect of botulinum toxin type A injection vs. Lidocaine/Depomedrol injection on residual and phantom limb pain. *Clin. J. Pain* 2012; 28: 108–112.
- Xiao L, Mackey S, Hui H, Xong D, Zhang Q, Zhang D. Subcutaneous injection of botulinum toxin a is beneficial in postherpetic neuralgia. *Pain Med.* 2010; 11(12): 1827-33.
- Xu XJ, Hao JX, Wiesenfeld-Hallin Z. Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *Neuroreport.* 1996; 2;7(13): 2092-4.
- Xu Y, Tian XB, An K, Yang H, Tian YK. Lumbar transplantation of immortalized enkephalin-expressing astrocytes attenuates chronic neuropathic pain. *Eur J Pain.* 2008; 12(4): 525-33.
- Yang H, McNearney TA, Chu R, Lu Y, Ren Y, Yeomans DC, Wilson SP, Westlund KN. Enkephalin-encoding herpes simplex virus-1 decreases inflammation and hotplate sensitivity in a chronic pancreatitis model. *Mol Pain.* 2008; 28;4:8.
- Yuan RY, Sheu JJ, Yu JM, Chen WT, Tseng IJ, Chang HH, Hu CJ. Botulinum toxin for diabetic neuropathic pain: a randomized double-blind crossover trial. *Neurology.* 2009; 28;72(17): 1473-8.
- Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X. Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 897: 136-44.
- Zhang S, Tong Y, Tian M, Dehaven RN, Cortesburgos L, Mansson E, Simonin F, Kieffer B, Yu L. Dynorphin A as a potential endogenous ligand for four members of the opioid receptor gene family. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 286(1): 136-41.
- Zhou W, Dantzer R, Budac DP, Walker AK, Mao-Ying Q-L, Lee AW, Heijnen CJ, Kavelaars A. Peripheral indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is required for comorbid depressionlike behavior but does not contribute to neuropathic pain in mice. *Brain Behav Immun* 2015; 46: 147–53.
- Zychowska M, Rojewska E, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J Neuroimmunol.* 2013; 15; 262(1-2): 35-45.

#### 4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Swoją przygodę z nauką w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie rozpoczęłam na czwartym roku studiów kierunku biologia na Uniwersytecie Jagiellońskim. Studiowanie tego kierunku rozwinęło moje zainteresowania w kierunku zagadnień związanych z układem nerwowym, chorobami oraz procesami nocycepcji. Szeroka, innowacyjna i bardzo interesująca tematyka badawcza skierowały mnie do Pracowni Farmakologii Bólu PAN, której kierownikiem wtedy była Prof. dr hab. Barbara Przewłocka. Pracę w laboratorium rozpoczęłam od krótkiego wolontariatu, w ramach którego włączyłam się w nurt badań prowadzonych w Zakładzie. Dodatkowo prowadziłam badania do swojej pracy magisterskiej pt. „Porównanie dwóch modeli bólu neuropatycznego – mechanicznego uszkodzenia nerwu kulszowego (model CCI) oraz neuropatii cukrzycowej (model STZ)”, którą wykonałam pod opieką Prof. dr hab. Barbary Przewłockiej. Już wtedy interesowała mnie tematyka bólu, a w szczególności bólu neuropatycznego powstającego w wyniku uszkodzenia nerwów obwodowych. To tutaj pogłębiłam swoją wiedzę na temat fizjologii układu nerwowego oraz zaburzeń w jego funkcjonowaniu oraz zainspirowałam inne osoby do podobnych działań. Nauczyłam się planowania doświadczeń, ich analizy oraz pracy w zespole. Poznałam także szereg metod behawioralnych i biochemicznych stosowanych w Zakładzie. Zaznajomiłam się z takimi metodami jak: RT-qPCR, mikromacierzy białkowych i immunohistochemii. Wyjazd na Akademię Węgierską umożliwił mi poznanie i posługiwanie się metodą GTP $\gamma$  binding. Część przeprowadzonych tam eksperymentów zamieszczona została w mojej rozprawie doktorskiej. Praca w Zakładzie Farmakologii Bólu pozwoliła mi także na poznanie i samodzielne posługiwanie się testami behawioralnymi, takimi jak: test odsuwania ogona (tail-flick); test wrażliwości na bodźce dotykowe (von Frey’a); test odsuwania łapy (test Hargreavesa); test wrażliwości na zimne i ciepłe bodźce termiczne (zimna i gorąca płytką); test obciążenia łapy (Dynamic Test Bearing); test mierzący aktywność motoryczną (test Rotarod). Pozwoliło mi to na dalszy rozwój oraz dało możliwość aplikowania na studia doktoranckie, co zawsze było moim marzeniem. W międzyczasie współpracowałam w grupie Prof. Ryszarda Przewłockiego i prowadziłam badania dotyczące samopodawania związków uzależniających u myszy. Na początku mojej pracy w Zakładzie Farmakologii Bólu włączyłam się w badania dotyczące roli komórek glejowych w neuropatii realizowane w ramach grantów kierowanych przez Prof. dr hab. Joannę Mikę. Jestem współautorem publikacji, w których wykazaliśmy, że w rozwoju bólu neuropatycznego większy udział odgrywają komórki mikrogleju niż astrogleju (*Mika i wsp., 2009 Eur J Pharmacol*). Jak wykazała analiza western blot oraz immunohistochemii w rdzeniu kręgowym po stronie uszkodzenia występuje nasilona ekspresję komórek OX42-pozytywnych oraz brak lub słabe zmiany komórek GFAP-pozytywnych. Wyniki badań farmakologicznych potwierdziły te obserwacje, gdyż jak wykazaliśmy wielokrotne podanie u myszy minocykliny (inhibitora mikrogleju) oraz pentoksyfiliny (inhibitora cytokin), ale nie fluorocytrynianu (inhibitora astrogleju) osłabiają objawy bólu neuropatycznego. Dodatkowo zaobserwowaliśmy niekorzystny wpływ aktywacji komórek mikrogleju na efekty przeciwbólowe morfiny, natomiast minocyklina i pentoksyfilina silnie opóźniały rozwój tolerancji morfinowej. Zahamowanie aktywacji mikrogleju może istotnie wpłynąć na wzrost efektywności leków przeciwbólowych stosowanych w klinice w terapii bólu neuropatycznego. W kolejnej pracy (*Mika i wsp., 2010 Neuroscience*) pokazaliśmy,

że podania minocykliny obniżają silny wzrost mRNA *prodynorfiny*, peptydu opioidowego, którego działania nieopiodowe przyczyniają się do rozwoju neuropatii. Uzyskane wyniki wskazujące na modulacje systemów opioidowych przez minocyklinę skłoniły nas do dalszych poszukiwań jej mechanizmów działania. Włączyłam się również w realizację zadań w ramach grantu POIG DeMeTer, których celem było określenie roli komórek glejowych w skuteczności antydepresantów stosowanych w bólu neuropatycznym. W publikacji, która ukazała się w *Neuroscience* w 2015 pokazaliśmy, że doksepina i amitryptylina prowadzą do obniżenia progu wrażliwości bólowej u zwierząt zdrowych. Dzięki podaniom ondansetronu (antagonista 5-HT3R) i johimbiny (antagonista receptorów  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ , 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT2A, 5-HT2B, D2 i 5-HT1A) zaproponowaliśmy mechanizm działania antydepresantów w bólu neuropatycznym. Celem kolejnych badań było określenie wpływu podania leków przeciwdepresyjnych, takich jak: amitryptylina, doksepina, milnacipran, wenlafaksyna i fluoksetyna na nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne w 7 dniu po uszkodzeniu nerwu kulszowego u szczurów oraz wpływ ich podania na stopień aktywacji mikrogleju/makrofagów (IBA-1) i astrogleju (GFAP) w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych. Wyniki opublikowane w *Eur J of Pharmacology* w 2015 roku wskazują, że wszystkie badane związki zmniejszają nadwrażliwość na bodźce mechaniczne, natomiast odmiennie wpływają na hamowanie nadwrażliwości na bodźce termiczne oraz stopień aktywacji mikrogleju. Jak zaobserwowaliśmy jedynie fluoksetyna zmniejsza poziom białka IBA-1 w rdzeniu kręgowym i DRG w 7 dniu po podwiązaniu nerwu kulszowego u szczurów. Podanie amitryptyliny, milnacipranu i wenlafaksyny spowodowało wzrost aktywacji komórek IBA1-pozytywnych w rdzeniu kręgowym i/lub w zwojach korzeni grzbietowych. Wszystkie zastosowane leki przeciwdepresyjne nie wpływały na poziom białka astrocytów – GFAP. Jako pierwsi dowiedliśmy, że wielokrotne podania minocykliny zwiększyły przeciwbólowe działanie pojedynczych dawek amitryptyliny i milnacipranu, ale nie wpływały na efekt podania fluoksetyny. Równolegle prowadziłam badania, których wyniki były tematem mojej pracy magisterskiej. W oparciu o dane literaturowe wprowadziłam do badań farmakologicznych i molekularnych w naszym laboratorium nowy model bólu neuropatycznego - model neuropatii cukrzycowej wywołanej podaniem streptozotocyny (model STZ), co umożliwiło prowadzenie badań nad mechanizmami zaangażowanymi w rozwój choroby cywilizacyjnej, którą niewątpliwie jest cukrzyca. Jednym z ważnych problemów pojawiających się w jej rozwoju jest ból neuropatyczny, który powstaje w konsekwencji metabolicznego uszkodzenia nerwów obwodowych. W badaniach porównano dwa modele bólu neuropatycznego - mechaniczne uszkodzenie nerwu kulszowego (model CCI) oraz model neuropatii cukrzycowej wywołanej podaniem streptozotocyny STZ (model STZ). Zarówno uszkodzeniu nerwów, jak i podaniu streptozotocyny towarzyszy występowanie symptomów charakterystycznych dla bólu neuropatycznego, takich jak: nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne. Podobnie również zachodziła aktywacja mikrogleju, będąca prawdopodobnie przyczyną osłabienia działania morfiny w obydwu modelach. Przebieg krzywej dawka–efekt dla morfiny był podobny w obydwu modelach. Podanie inhibitora mikrogleju – minocykliny zwiększa efektywności morfiny zarówno po uszkodzeniu nerwu kulszowego, jak i podaniu streptozotocyny. W badaniach wykazaliśmy zróżnicowanie odpowiedzi endogennych układów opioidowych na uszkodzenie, wzrost poziomu mRNA *prodynorfiny* zaobserwowaliśmy tylko w modelu CCI, natomiast w modelu STZ wrastała

jedynie ekspresja mRNA *proenkefaliny*. Badania przeprowadzono na lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego u myszy. Obserwowane różnice umożliwiają zrozumienie molekularnych mechanizmów zachodzących w systemach opioidowych w bólu przewlekłym a uwzględnienie interakcji komórek mikrogleju z neuronami może wyznaczyć nowe drogi poszukiwania skuteczniejszej metody farmakoterapii bólu. Wprowadzenie do Zespołu nowego modelu neuropatii – modelu streptozotocynowego otworzyło możliwość dalszej analizy zmian towarzyszących rozwojowi neuropatii cukrzycowej, której wyniki zawarte są w licznych pracach których jestem również współautorem.

Jak wynika z badań opublikowanych w ramach mojej pracy doktorskiej w bólu neuropatycznym dochodzi do zaburzenia pomiędzy czynnikami neuroimmunologicznymi. Poszerzyliśmy zatem pole poszukiwań o zbadanie roli chemokin w dwóch modelach bólu neuropatycznego: mechanicznego uszkodzenia nerwu kulszowego, jak również neuropatii cukrzycowej. Badania wykazały, że w dniu siódmym od podania streptozotocyny dochodzi do wzrostu poziomu glukozy we krwi z jednoczesnym niewielkim spadkiem masy ciała zwierząt oraz pojawieniem się nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne. W publikacji Zychowska i wsp., 2013 w *Journal of Neuroimmunology* wykazaliśmy, że w neuropatii cukrzycowej równolegle z symptomami bólowymi dochodzi do aktywacji mikrogleju. STZ zwiększa poziom ekspresji IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL12p70, IL-17, IFN $\gamma$ , sTNFRII. Minocyklina równolegle z przeciwbólowym działaniem hamuje aktywację mikrogleju oraz zwiększa efektywność morfiny po podaniu STZ, jak również podnosi poziom przeciwzapalnych czynników, takich jak: IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-10, sTNFRII. Zatem wpływ minocykliny na czynniki zmieniające się w neuropatii cukrzycowej mogą mieć znaczenie w znalezieniu skutecznej terapii bólu. W pracy *Zychowska i wsp., 2015* opublikowanej w *Journal of Diabetes Research* zaobserwowaliśmy, że w dniu 7 od podania streptozotocyny dochodzi do wzrostu poziomu białka CXCL1, CXCL5, CXCL9 i CXCL12, a nardzeniowe ich podanie powoduje rozwój nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne, co potwierdziło probólowe działanie badanych chemokin. Otrzymane rezultaty zainspirowały nas do określenia roli kolejnych chemokin w modelu neuropatii. Nieznana dotąd rola liganda dla receptora chemokinowego XCR1 (XCL1) skłoniła nas do dalszych badań, których wyniki zostały opublikowane przez *Zychowska i wsp.* w 2016 w *Anesthesiology*. Podanie streptozotocyny (STZ) spowodowało rozwój nadwrażliwości na bodźce termiczne i mechaniczne, równolegle zaobserwowaliśmy aktywację komórek mikrogleju do 14 dni od podania STZ. Dodatkowo odnotowaliśmy wzrost poziomu białka chemokiny XCL1 oraz jej receptora XCR1. Następnie wykazaliśmy, że wielokrotne podania minocykliny nie tylko zmniejszają rozwój nadwrażliwości bólowej, ale także zapobiegają aktywacji mikrogleju oraz hamują wzrost poziomu XCL1 i XCR1. Ponadto udowodniliśmy, że jednorazowe podpajęczynówkowe podanie XCL1 myszom zdrowym wywołuje symptomy bólu neuropatycznego, co koreluje ze wzrostem markera aktywacji mikrogleju. Co ciekawe podanie neutralizujących przeciwciał skierowanych do XCL1 przed nardzeniowym podaniem tej chemokiny zapobiega zarówno rozwojowi symptomów bólu, jak i aktywacji komórek mikrogleju. Również podanie neutralizujących przeciwciał skierowanych do XCL1 myszom z rozwiniętą neuropatią cukrzycową zmniejszało nadwrażliwość bólową w dniu 7 po podaniu streptozotocyny. Zatem w badaniach wykazaliśmy, po raz pierwszy, ważną rolę interakcji XCL1/XCR1 na poziomie rdzenia kręgowego w rozwoju neuropatii cukrzycowej. Ponadto

dostarczono dowodów, że minocyklina obniżając poziom XCL1/XCR1 zmniejsza nadwrażliwość na bodźce bólowe w modelu neuropatii cukrzycowej. Kolejną chemokina, której udział w neuropatii cukrzycowej nie został wyjaśniony, a stał się celem naszych badań, był ligand receptora CCR8, czyli CCL1. W 2017 roku (*Zychowska i wsp., 2017 International Immunopharmacology*) wykazaliśmy wzrost poziomu białka CCL1 i IBA1, ale nie CCR8 i GFAP w łądźwiowym odcinku rdzenia kręgowego po podaniu STZ. Barwienie immunofluorescencyjne ujawniło, że główną lokalizacją CCR8 są neurony, będące źródłem rdzeniowego CCL1. W hodowli komórek mikrogleju stymulowanych LPS ujawniono spadek poziomu białka CCL1 i CCR8, natomiast w hodowlach komórek astrogleju zmian w poziomie badanych czynników nie odnotowaliśmy. Nasze wyniki potwierdzają hipotezę, że CCL1 odgrywa ważną rolę jako mediator w interakcjach neuroimmunologicznych, a interakcje CCL1/CCR8 odgrywają ważną rolę w rozwoju bólu neuropatycznego w cukrzycy. U myszy zdrowych podopajęczynówkowe podanie CCL1 wywołuje nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne, natomiast podanie przeciwciał neutralizujących CCL1 zmniejsza symptomy bólowe w modelu cukrzycowym. Również co ciekawie wielokrotne podania przeciwciał neutralizujących CCL1 poprawia skuteczność morfiny i buprenorfiny, co niewątpliwie wskazuje na ważny udział interakcji CCL1-CCR8 w rozwoju neuropatii cukrzycowej i skuteczności opioidów.

Kolejnym etapem badań realizowanych w ramach mojej pracy doktorskiej prowadzonej pod kierunkiem Prof. dr hab. Joanny Mika było odkrywanie mechanizmów działania minocykliny oraz jej wpływu na czynniki neuroimmunologiczne (*Rojewska i wsp., 2014, J. of Neuroimmunology; Rojewska i wsp., 2014 Neuropharmacology*). Poznanie interakcji pomiędzy układem nerwowym a układem immunologicznym jest niezmiernie istotne dla zrozumienia przyczyn rozwoju bólu, jak i możliwości ingerencji w te procesy. Zaktywowane komórki mikrogleju zaczynają produkować również wiele związków prozapalnych o właściwościach pronocyceptywnych takich jak cytokiny (interleukiny, chemokiny). Mediatorzy te jak wykazaliśmy działając zarówno na komórki układu immunologicznego jak i nerwowego, modulują odpowiedź bólową, a także wpływają na efektywność leków przeciwbólowych. Wykazaliśmy, że w wyniku uszkodzenia tkanki dochodzi do zmian aktywności komórek glejowych, a zwłaszcza mikrogleju oraz do zaburzenia równowagi pomiędzy czynnikami algezji i analgezji, co powoduje rozwój bólu neuropatycznego. Jak wykazały nasze badania, minocyklina będąca inhibitorem mikrogleju przywraca równowagę zachwianą w bólu neuropatycznym po uszkodzeniu nerwów obwodowych. W większym stopniu hamuje ekspresję czynników nasilających ból. Zarówno badania kliniczne, jak i eksperymentalne prowadzone w ostatnich latach wskazują na ważny udział czynników neuroimmunologicznych w powstawaniu i utrzymywaniu się symptomów bólu neuropatycznego. Wiadomo, że na poziomie rdzenia kręgowego aktywowane komórki mikrogleju uwalniają pronocyceptywne cytokiny. Badania *in vitro* (*Rojewska i wsp., 2014 J. of Neuroimmunology*) na komórkach mikrogleju stymulowanych LPS wykazały zwiększoną ekspresję mRNA *MMP-9*, *TIMP-1*, *IL-1 $\beta$* , *IL-1 $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10* i *IL-18*. W badaniach *in vivo* zaobserwowaliśmy, że uszkodzenie nerwu obwodowego powoduje wzrost ekspresji mRNA markera mikrogleju *CD40*, a także czynników pronocyceptywnych *MMP-9*, *TIMP-1*, *MMP-2*, *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-18* oraz *IL-10* w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych. Wzrost mRNA dla przeciwbólowej *IL-1 $\alpha$*  odnotowaliśmy na poziomie DRG. Ciekawe zatem było

sprawdzenie czy podania minocykliny wpływają na regulowanie poziomu czynników pronocyceptywnych i antynocyceptywnych na poziomie rdzenia kręgowego i DRG. Przeprowadzona analiza wykazała, że wielokrotne dootrzewnowe podania minocykliny hamują podniesiony po uszkodzeniu nerwu kulszowego poziom ekspresji mRNA *CD40*; probólowych czynników takich jak *IL-6*, *IL-18* oraz *MMP-9*. W niewielkim stopniu wpływa na poziom ekspresji mRNA czynników przeciwzapalnych *IL-10*, *MMP-2* oraz *TIMP-1* w DRG (*Rojewska i wsp., 2014 J. of Neuroimmunology*). Nasze badania wykazały, że minocyklina przywraca do wartości kontrolnych poziom niektórych czynników zmienionych po uszkodzeniu nerwu. Moja rozprawa doktorska potwierdza istotny wpływ czynników neuroimmunologicznych na modulację procesu powstawania bólu. Poznanie interakcji pomiędzy układem nerwowym a układem immunologicznym jest niezmiernie istotne dla zrozumienia przyczyn rozwoju bólu jak i możliwości ingerencji w te procesy. Całość wyników wskazuje na duże znaczenie terapeutyczne minocykliny oraz pokazuje nowe punkty uchwytu, co może pomóc w opracowaniu nowej strategii walki z bólem. Jednakże, za moje najważniejsze osiągnięcie uważam badania, w których wykazaliśmy, że minocyklina nasila przeciwbólowy efekt niskich dawek ligandów receptora opioidowego kappa - dynorfiny A oraz U50,488H (*Rojewska i wsp., 2015 Neuropharmacology*). Podanie dynorfiny A w wysokiej dawce (15 nmol) wywołało wiotki paraliż. Równoległe do paraliżu zaobserwowaliśmy wzrost poziomu mRNA interleukin *IL-1beta* oraz *IL-6*. Natomiast u szczurów, które otrzymywały wielokrotnie minocyklinę, nie zaobserwowaliśmy pogorszenia funkcji motorycznych ani wiotkiego paraliżu po podaniu dynorfiny. Ponadto, nasilona podpajęczynówkowym podaniem dynorfiny ekspresja mRNA *IL-1beta* i *IL-6* w rdzeniu kręgowym oraz *IL-1beta* w DRG, powraca do wartości kontrolnych po podaniach minocykliny co wskazuje na modulacyjne działanie tego leku na poziom prozapalnych cytokin w neuropatii. Również po raz pierwszy opisaliśmy, że selektywny inhibitor *MMP-9* w badaniach behawioralnych wykazuje przeciwbólowe działanie oraz, że jego podanie zapobiega wiotkiemu paraliżowi wywołanemu podaniem wysokiej dawki dynorfiny. Podobne efekty minocykliny i inhibitora *MMP-9* wskazują na ich działanie poprzez *MMP-9*. Zatem udowodniliśmy, że minocyklina i inhibitor *MMP-9* oprócz przeciwbólowego działania, wykazują również neuroprotektoryjne właściwości. Badania z wykorzystaniem profilowania ekspresji genów, jak i analizy metodą spektrometrii masowej wskazują, że w bólu neuropatycznym dochodzi do silnej aktywacji niektórych genów neuronalnych, jak również genów związanych z odpowiedzią komórek immunologicznych, w tym z aktywacją mikrogleju. Szerokie spektrum działania minocykliny, jak również jej istotny wpływ na rozwój bólu neuropatycznego skłoniły nas do zastosowania jej w naszych badaniach oraz do przeprowadzenia szczegółowej analizy zmian metodami behawioralnymi oraz biochemicznymi (metodą mikromacierzy DNA oraz RT-qPCR) po jej podaniu (*Rojewska i wsp., 2014 Molecular Pain*). Wielokierunkowe działanie minocykliny skłoniło nas do dalszych poszukiwania mechanizmów jej farmakologicznego działania. W tym celu postanowiliśmy sprawdzić czy jej podania wpływają na geny, które ulegają zmianie po uszkodzeniu nerwów obwodowych. Wyniki naszych badań, w których zastosowano metodę mikromacierzy DNA wykazały, że z 22500 badanych transkryptów poziom abundancji 93 transkryptów ulega zmianie po uszkodzeniu nerwu kulszowego, z czego na zmiany 54 nie wpływały wielokrotne podania minocykliny, natomiast poziom 39 transkryptów był silnie przez nią modulowany. Do dalszych badań wybraliśmy dwie grupy genów. Pierwsza to

geny, których relatywny poziom abundancji wzrasta w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego po stronie uszkodzenia, natomiast podania minocykliny odwracają lub osłabiają te zmiany. Druga grupa charakteryzuje się spadkiem relatywnego poziomu abundancji w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego i odwracaniem tych spadków przez minocyklinę. Po dalszej analizie wytypowaliśmy 7 genów, których zmiany poziomu mRNA w rdzeniu kręgowym potwierdziliśmy wykorzystując metodę RT-qPCR oraz dodatkowo zmiany wykazaliśmy w DRG. Dalszej analizie podległy trzy transkrypty: 3-monooksygenazy kinureny, apolipoproteiny3b oraz receptora Clec7a (dektyny 1), których poziom abundancji rośnie po uszkodzeniu, a podania dootrzewnowe minocykliny powodują, że nie dochodzi do tak podniesionego poziomu abundancji tych genów (**Rojewska i wsp., 2014 Molecular Pain**). O roli większości transkryptów w bólu neuropatycznym nie wiadomo nic, co skłania mnie do dalszych badań oraz otwiera interesujące możliwości szukania nowych mechanizmów dla skutecznej terapii bólu. Całość wyników odkrywa nowe punkty uchwytu działania minocykliny, co może mieć znaczenie terapeutyczne. W efekcie powyższej analizy wskazano na ważną rolę szlaku kinureninowego w rozwoju bólu neuropatycznego i w tym kierunku prowadzone są dalsze badania będące tematem mojego grantu SONATA.

Potrzeba dokładniejszych badań by zrozumieć patomechanizm bólu neuropatycznego, jak również zależności pomiędzy chemokinami a innymi czynnikami zapalnymi będącymi podłożem neuropatii powstającej na skutek uszkodzenia nerwów obwodowych skłoniły nas do dalszych wnikliwych badań z chemokinami w roli głównej. Jak wynika z badań prowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej, w bólu neuropatycznym dochodzi do aktywacji wielu czynników neuroimmunologicznych, w tym interleukin. Dlatego włączyłam się w badania mające na celu określenie wpływu antagonisty receptora IL-1 (IL-1RA) na rozwój bólu neuropatycznego i działanie opioidów (**Pilat i wsp., 2015 Eur J Pharmacol**). W doświadczeniach wykazaliśmy, że jednorazowe nardzeniowe podanie IL-1RA obniża nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne oraz nasila analgetyczne efekty morfiny i buprenorfiny. Ponadto zaobserwowaliśmy zwiększenie ekspresji IL-1RA i receptora IL-1 typu I w rdzeniu kręgowym a także obniżenie ekspresji IL-1alfa i podwyższenie IL-1beta. Otrzymane rezultaty sugerują, że przywrócenie aktywności przeciwbólowej opioidów przez blokowanie ścieżki IL-1 może mieć wpływ na obniżone działanie opioidów w terapii bólu neuropatycznego. W pracy **Kwiatkowski i wsp., 2015** wykazaliśmy, że podania antagonisty CCR5 marawiroku wpływają na rozwój bólu oraz efektywność opioidów w modelu podwiązania nerwu kulszowego (**Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**). Dodatkowo w badaniach wykazaliśmy, że obniża podniesiony po uszkodzeniu poziom białka IBA-1 i GFAP, jak również CCR5 w rdzeniu kręgowym i DRG. Ponadto, jak wynika z naszych badaniach uszkodzenie nerwów obwodowych powoduje wzrost mRNA CCR5 oraz ligandów takich jak: CCL3, CCL4, CCL5 w rdzeniu kręgowym, a podania marawiroku osłabiają te zmiany. Podsumowując, nasze wyniki sugerują modulację farmakologiczną CCR5 przez marawirok jako nowe podejście terapeutyczne do jednoczesnego leczenia pacjentów leczonych opioidami z powodu neuropatii. Dlatego wydaje się słuszny wybór tematyki mojej pracy naukowej, w której zajmuję się badaniem endogennych czynników inicjujących i regulujących stany bólu neuropatycznego oraz neuroimmunologiczne interakcje w tych procesach. W bólu neuropatycznym zaktywowane komórki mikrogleju uwalniają czynniki nocycyptywne (np. interleukiny, chemokiny), których

wysoki poziom jest przyczyną spadku efektywności opioidów w terapii bólu neuropatycznego. Jak wskazują nasze wcześniejsze badania istotnym glejowym modulatorem bólu neuropatycznego jest chemokina CCL2, działająca przez receptor CCR2. Dlatego wiodącym celem badań stało się określenie zmian w czasie w poziomie mRNA/białka markerów mikrogleju/makrofagów (CD40/IBA-1), CCL2 oraz CCR2 w rdzeniu kręgowym i DRG u szczurów po podwiązaniu nerwu kulszowego. Kolejnym celem było określenie wpływu wielkokrotnych podpajęczynówkowych podań RS504393 (antagonisty CCR2) na symptomy bólu neuropatycznego (*Kwiatkowski i wsp., Neuroimmune Pharmacol. 2017*). W badaniach *in vitro*, w pierwotnych hodowlach mikrogleju, wykazaliśmy, że poziom mRNA/białka CCL2/CCR2 był istotnie wyższy po stymulacji lipopolisacharydem (LPS), natomiast minocyklina zapobiega tym zmianom. W hodowlach pierwotnych astrocytów stymulowanych LPS odnotowaliśmy wzrost ekspresji CCL2, któremu również zapobiegło wcześniejsze podanie minocykliny. Nasze badania wykazały, że w 7 dni po CCI dochodzi do nadekspresji IBA-1, CCL2 i CCR2 w rdzeniu kręgowym. Dodatkowo badania behawioralne udowodniły, że podania RS504393 hamują mechaniczną i termiczną nadwrażliwość, oraz nasilają efektywność morfiny i buprenorfiny 7 dni po uszkodzeniu. Badania biochemiczne dowiodły, że RS504393 znacząco obniża poziom pronocyceptywnych IL-1beta, IL-18, IL-6 oraz iNOS oraz podwyższa poziom antynocyceptywnych IL-1alfa oraz IL-18BP. Przedstawione wyniki badań dostarczyły nowych dowodów na kluczową rolę CCL2/CCR2 w mechanizmie bólu neuropatycznego oraz sugerują, że zlokalizowany na powierzchni mikrogleju CCR2 jest nowym, ciekawym punktem uchwytu dla farmakologicznej modulacji bólu neuropatycznego. W trakcie rozwoju bólu neuropatycznego dochodzi do zmian w funkcjonowaniu wielu białek, między innymi chemokin. Wciąż jednak brakuje wiedzy na temat receptorów i ligandów z grupy CXC w rozwoju neuropatii. Dlatego też celem naszych badań było określenie roli receptora CXCR3 i jego ligandów w modelu bólu neuropatycznego. W badaniach *Piotrowska i wsp. (Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018)* wykazaliśmy, że CXCR3 i jego ligandy pełnią ważną rolę w neuroimmunologicznej interakcji w patomechanizmie bólu neuropatycznego. Wykazaliśmy, że zarówno poziom CXCR3, jak i jego endogennych ligandów zmienia się w przebiegu neuropatii w rdzeniu kręgowym oraz w zwojach korzeni grzbietowych, co sugeruje, że badane białka są zaangażowane w rozwój i utrzymywanie bólu neuropatycznego. Dodatkowo pokazaliśmy, że podpajęczynówkowe podania każdego z ligandów CXCR3 powodowały silny rozwój nadwrażliwości na bodziec mechaniczny i termiczny u zdrowych myszy. Natomiast podanie przeciwciał neutralizujących te chemokiny zmniejszyło objawy bólu neuropatycznego u myszy w modelu CCI. Wyniki badań pokazały, że wielokrotne podpajęczynówkowe podania antagonisty CXCR3, NBI-74330, zmniejszają objawy bólu neuropatycznego po uszkodzeniu nerwu kulszowego oraz podnoszą efektywność morfiny. Co ciekawe u zdrowych zwierząt NBI-74330, nie wpływa na zachowania bólowe. Dodatkowo dowiedliśmy, że NBI-74330 podnosi poziom receptora CXCR3, oraz zmniejsza poziom jego endogennych ligandów w rdzeniu kręgowym i DRG. Badanie immunofluoroscencyjne wykazało, że ekspresja receptorów CXCR3 zachodzi przede wszystkim w neuronach. Ponadto wykazaliśmy, że poziom ligandów CXCR3, CXCL10 i CXCL11 jest silnie obniżony przez NBI-74330 po stymulacji lipopolisacharydem, a źródłem komórkowym dla CXCL4 są



wyłącznie komórki mikrogleju, a nie astrocyty. Przedstawione wyniki wskazują na ważną rolę jaką pełni sygnalizacja związana z receptorem CXCR3 w patomechanizmie bólu neuropatycznego oraz wskazują nową drogę dla poszukiwań efektywnej terapii bólu neuropatycznego. Kolejnym celem naszych badań stało się zbadanie roli CXCR2 w procesach nocycypcji. W *Front Immunology (Piotrowska i wsp., 2019)* wykazaliśmy, że podpajęczynówkowe podanie CINC (chemoatraktant indukowany przez cytokiny neutrofilii; CXCL1-3) wywołuje rozwój nadwrażliwości na bodźce bólowe u myszy zdrowych. Badania biochemiczne dowiodły, że po uszkodzeniu wzrasta poziom mRNA CXCR2. Podpajęczynówkowe podanie przeciwciała neutralizującego CXCL3 zmniejsza nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne w dniu 7 po uszkodzeniu nerwu. Również jak ukazują nasze badania podania selektywnego antagonisty CXCR2, NVP CXCR2 20 łagodzą objawy bólowe oraz obniżają zwiększony po uszkodzeniu nerwu kulszowego poziom CXCL3. Wyniki te sugerują niezmiernie ważną rolę CXCR2 w neuropatii związaną z modulacją CXCL3, co może stać się potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu bólu.

Ciekawą substancją o innym mechanizmie działania niż minocyklina jest toksyna botulinowa A. Ogólnie uważa się, że wykazuje ona swoje efekty poprzez modulację funkcji neuronalnych, w przeciwieństwie do minocykliny, której jednym z głównych mechanizmów działania jest hamowanie aktywacji mikrogleju. Wcześniejsze badania naszego zespołu wskazują, że w szczurzym modelu bólu neuropatycznego podawanie toksyny botulinowej A w podszewkę łapy wywołuje efekt przeciwbólowy podobny do tego obserwowanego w przypadku wielokrotnych podań minocykliny (*Mika i wsp., 2011 Neuroscience*). Analiza zmian w aktywacji różnych komórek glejowych wywołanych uszkodzeniem nerwu kulszowego wykazała, że w rdzeniu kręgowym dochodzi do aktywacji mikrogleju, natomiast w zwojach korzeni grzbietowych zachodzą silne zmiany w poziomie mRNA markerów komórek satelitarnych, makrofagów i leukocytów oraz wzrost poziomu mRNA *NOS1* i *NOS2*. Na poziomie molekularnym zaobserwowaliśmy, że BoNT/A hamuje podniesiony po uszkodzeniu poziom aktywacji komórek C1q-pozytywnych w rdzeniu kręgowym i DRG. Ponadto obniża poziom ekspresji mRNA *NOS1*, *prodynorfiny*, *pronocyceptyny* oraz *proenkefaliny* w DRG. Obniżenie neuroimmunologicznych interakcji przez BoNT/A wydaje się być kluczowe dla utrzymujących się przeciwbólowych efektów BoNT/A w neuropatii i stanowi ważną przesłankę do stosowania tej substancji w terapii bólu neuropatycznego. Kontynuacją wyżej opisanych badań jest publikacja wchodząca w skład rozprawy habilitacyjnej (*Zychowska i wsp., 2016*).

W ramach współpracy z zespołem Prof. Jerzego Wordliczka prowadziliśmy badania mające na celu zbadanie wpływu metforminy, metamizolu oraz limecykliny na efekty przeciwbólowe oraz aktywację mikrogleju w modelu zwierzęcym bólu neuropatycznego. Tematyka badań jest ważna z uwagi na to, że ból neuropatyczny jest w dalszym ciągu dużym problemem terapeutycznym i wyzwaniem dla lekarzy zajmujących się leczeniem tej grupy pacjentów. Zasadne jest na chwilę obecną rozszerzenie badań farmakologicznych dotyczących metamizolu, który wykazuje działanie plejotropowe, ponieważ pozwoli to ustalić potencjalny wpływ tego leku na patomechanizm bólu neuropatycznego. Pierwsze badania przeprowadzono na myszach po podwiązaniu nerwu kulszowego (*Zajczkowska i wsp., 2018 Pharmacol Biochem Behav*). Wykazaliśmy, że w 7 dniu po uszkodzeniu nerwu kulszowego metamizol podawany wielokrotnie wykazuje działanie przeciwbólowe, co potwierdzono w

testach von Frey i zimnej płytki. Do badań biochemicznych wykorzystaliśmy metodę RT-qPCR oraz Western Blot, w celu określenia profilu zmian w ekspresji czynników probólowych. Równolegle ze zmniejszeniem symptomów bólowych odnotowaliśmy zmniejszenie mRNA i poziomu białka markera mikrogleju w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego w 7 dniu po CCI. Nie zaobserwowaliśmy wpływu metamizolu na poziom mRNA i białka markera astrocytów GFAP w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego w 7 dniu po CCI. Następnie w badaniach biochemicznych wykazaliśmy, że podania metamizolu zmniejszają podniesiony po uszkodzeniu nerwu kulszowego poziom mRNA i białka czynników pronocyceptywnych, takich jak: IL-1beta, XCL1 oraz CCL2. Ponadto odnotowaliśmy, że na poziomie rdzenia kręgowego metamizol nie wpływa na poziom ekspresji mRNA czynników antynocyceptywnych, takich jak: *IL-1alfa*, *IL-1Ra* i *IL-18BP* oraz nie wykazaliśmy zmian po jego podaniu w poziomie mRNA i białka receptorów opioidowych: MOP, DOP, KOP oraz peptydów opioidowych POMC, PDYN i PNOB w rdzeniu kręgowym. Przeprowadzone badania wykazały wpływ metamizolu na zmniejszenie poziomu ekspresji mRNA *TRPV1*, mRNA *PENK* oraz poziomu białka NOP. W badaniach behawioralnych odnotowaliśmy, że wielokrotne podania metamizolu nasilają analgetyczny mechanizm działania oksykodonu, ale nie buprenorfiny w 7 dniu po podwiązaniu nerwu kulszowego. Kolejne badania mające na celu lepsze poznanie mechanizmu działania metamizolu przeprowadziliśmy na szczurach w modelu podwiązania nerwu kulszowego. W publikacji, która ukazała się niedawno (*Zajączkowska i wsp., 2020 Pharamcological Reports*) wykazaliśmy, że wielokrotne podania metamizolu zmniejszają nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne w 2 i 7 dniu po uszkodzeniu nerwu kulszowego. Badania biochemiczne pokazały, że metamizol zmniejsza podniesiony po uszkodzeniu poziom mRNA interleukin probólowych: *IL-1beta*, *IL-6*, i *IL-18* oraz chemokin: *CCL2*, *CCL4*, i *CCL7* w DRG. Nie odnotowaliśmy wpływu metamizolu na poziom mRNA i białka markera mikrogleju i astrogleju. Przedstawione wyniki badań stanowią nowy krok w kierunku zrozumienia działania metamizolu w bólu neuropatycznym oraz dostarczają dowodów, że metamizol wykazuje korzystne działanie przeciwbólne poprzez modulowanie złożonych interakcji neuroimmunologicznych na poziomie DRG.

W naszym Zespole prowadzone są również badania dotyczące roli MAPKs w transmisji nocyceptywnej. Wykazaliśmy, że modulacja szlaków wewnątrzkomórkowych takich jak p38MAPK przez minocyklinę przynosi korzystne efekty przeciwbólne. W dalszych badaniach podaliśmy inhibitor NF- $\kappa$ B – partenolid oraz inhibitor MEK1/2 - U0126. Okazało się, że obie te substancje również obniżają stopień nadwrażliwości na bodźce termiczne i mechaniczne oraz nasilają efekty analgetyczne morfiny (*Popiolek-Barczyk i wsp., 2014 Pharmacol Rep.*). Dodatkowo w badaniach wykazaliśmy, że wielokrotne, podpajęczynówkowe podania PTL i U0126 podniosły poziom mRNA receptorów opioidowych *MOP* i *DOP* w rdzeniu kręgowym 7 dni po uszkodzeniu nerwu. Następnie kontynuowałam badania dotyczące określenia działania PD98059 (inhibitor MEK1/2) na procesy nocycepcji i efektywność morfiny/buprenorfiny w zwierzęcym modelu bólu neuropatycznego. Kontynuując badania poszukania roli wewnątrzkomórkowych ścieżek w transmisji nocyceptywnej, zostałam współautorem pracy opublikowanej w *Neural Plasticity (Popiolek-Barczyk, i wsp., Neural Plasticity 2015)*, w której wykazaliśmy przeciwbólne efekty partenolidu (PTL; inhibitor NF- $\kappa$ B) oraz wpływ na poziom ekspresji markerów fazy

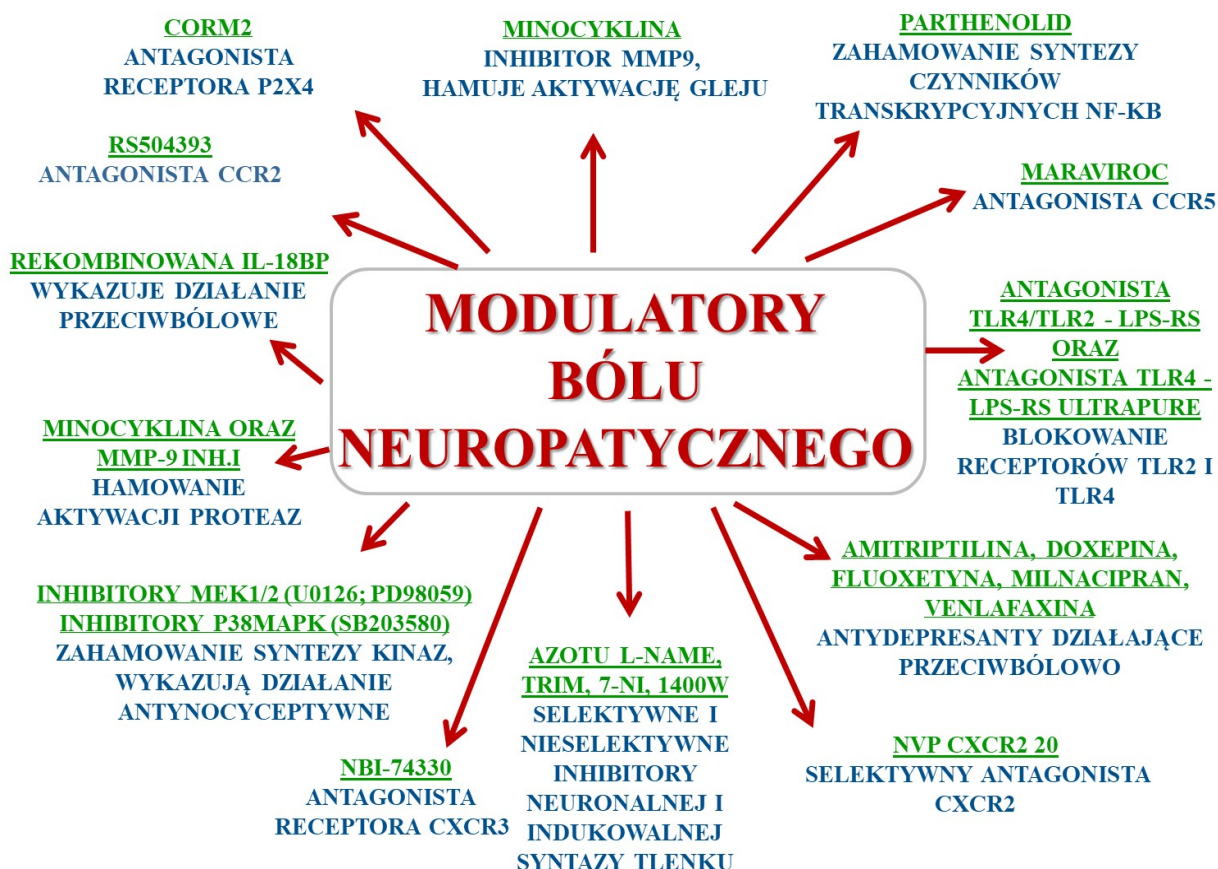
M1 i M2 aktywacji mikrogleju i szlaków wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w ekspresję tych czynników. Nasze kolejne badania wykazały, że modulacja szlaków wewnątrzkomórkowych takich jak p38MAPK przez minocyklinę przynosi ulgę w bólu. W dalszych eksperymentach badaliśmy inhibitor NF- $\kappa$ B parthenolide oraz U0126 inhibitor MEK1/2. Okazało się, że obie te substancje również obniżają rozwój bólu neuropatycznego oraz nasilają efekty analgetyczne morfiny (*Popiolek-Barczyk i wsp., 2014 Pharmacol Rep.*).

Włączyłam się także w nurt badań dotyczących farmakologicznej modulacji receptorów zlokalizowanych na mikrogleju. Celem było określenie roli TLR4 w modelu bólu neuropatycznego, a także zbadanie wpływu podania antagonisty tego receptora na procesy nocycepcji. W pracy *Jurga i wsp. 2015 w Neural Plasticity* wykazaliśmy, że stymulacja receptorów TLR przy użyciu egzogennych ligandów, może prowadzić do rozwoju bólu neuropatycznego, jednak dokładny mechanizm nie został jeszcze wyjaśniony. Do farmakologicznej modulacji receptorów TLR2 i TLR4 wykorzystano antagonistów TLR2 i TLR4 (LPS-RS (lipopolisacharyd z *Rhodobacter sphaeroides*) oraz selektywnego antagonistę TLR4 (LPS-RS Ultrapure). Również brakuje danych dotyczących roli cząsteczek adaptorowych ścieżek sygnałowych receptorów TLR (MyD88 i TRIF) w szczurzym modelu bólu neuropatycznego. Wiadomo, że stymulacja TLR2 aktywuje zależną od MyD88 ścieżkę sygnałową, natomiast stymulacja TLR4 ścieżki zależne zarówno od MyD88 i TRIF. Jak wykazaliśmy w badaniach w modelu bólu neuropatycznego zachodzą zależne od czasu zmiany zarówno na poziomie mRNA jak i białka dla receptorów *TLR2* i *TLR4* oraz ich cząsteczek adaptorowych MyD88 i TRIF. Zaobserwowaliśmy także różnice w zmianach poziomu receptorów TLR4 i TLR2, co sugeruje szybszą aktywację w odpowiedzi na uszkodzenie nerwu ze strony receptora TLR4. Analiza zmian biochemicznych nie pozwoliła jednak na jednoznaczne potwierdzenie, która ścieżka sygnałowa odgrywa istotniejszą rolę w transmisji nocyceptywnej. Zastosowanie dwóch antagonistów o odmiennej specyficzności umożliwiło wykazanie różnic w udziale poszczególnych receptorów oraz wskazało potencjalną ścieżkę sygnałową biorącą udział w transmisji nocyceptywnej. Jak wiadomo skuteczność opioidów stosowanych w praktyce klinicznej jest ograniczona w neuropatii, dlatego postanowiono sprawdzić czy podanie antagonistów receptorów TLR2/TLR4 łącznie z opioidami będzie zwiększało ich przeciwbólową skuteczność. Uzyskane wyniki wykazały, że wielokrotne podania antagonistów receptorów TLR2/TLR4 w dniu 7 po podwiązaniu nerwu kulszowego istotnie nasilają działanie buprenorfiny, ale nie morfiny. Zarówno badania behawioralne, jak i biochemiczne wykazały, że receptory TLR, szczególnie TLR4 zlokalizowane na mikrogleju i makrofagach, mogą odgrywać znaczącą rolę w procesach nocycepcji. Jak wykazaliśmy w pracy *Jurga i wsp., Pharm Biol. 2018* podpajęczynówkowe podanie antagonisty TLR4 (LPS-RS ULTRAPURE; LPS-RSU) zmniejsza nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne pomimo zwiększonej aktywacji komórek IBA-1 dodatnich w zwojach korzeni grzbietowych (DRG). Ponadto udowodniliśmy, że antagonistę TLR4 zmieniał stosunek poziomu IL-18/IL-18BP i MMP-9/TIMP-1 na korzyść wzrostu poziomu czynników antynocyceptywnych IL-18BP i TIMP-1 i dodatkowo podnosił poziom IL-6, która w neuropatii wykazuje dualistyczne właściwości. Nasze wyniki dostarczają dowodów, że antagonistę TLR4 wykazuje właściwości przeciwbólowe oraz przywraca zachwianą w neuropatii równowagę między czynnikami pro- i antynocyceptywnymi. Sugeruje to możliwość wykorzystania tego mechanizmu w poszukiwaniu lepszej terapii bólu

neuropatycznego. Celem kolejnych badań było określenie wpływu farmakologicznej modulacji receptorów purynergicznych P2X4 zlokalizowanych na mikrogleju, na poziom pronocyceptywnych i antynocyceptywnych interleukin w bólu neuropatycznym oraz na efektywność leków przeciwbólowych. Jako współautor publikacji *Jurga i wsp., 2015 (Pharmacological Reports)* wykazałam, że równolegle do rozwoju bólu neuropatycznego wzrasta poziom P2X4R w rdzeniu kręgowym po uszkodzeniu nerwu kulszowego, co jest skorelowane ze wzrostem poziomu aktywacji komórek IBA-1- i GFAP-pozytywnych. W badaniach farmakologicznych wykazaliśmy, że wielokrotne podjęczynówkowe podania antagonisty P2X4R (CORM-2) wykazują silne efekty analgetyczne po uszkodzeniu nerwu kulszowego. CORM-2 zapobiega aktywacji mikrogleju i astrogleju w rdzeniu kręgowym. Ponadto, zastosowanie tego antagonisty zmniejsza podniesiony po uszkodzeniu poziom czynników pronocyceptywnych: IL-1beta, IL-18, IL-6 i MMP-9 w rdzeniu kręgowym, a jednocześnie podwyższa poziom działającej antynocyceptywnie IL-1Ra. Ponadto, jak udowodniliśmy w badaniach, CORM-2 zapobiega aktywacji szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego: p-p38 MAPK, pNFκB, PI3K, pAkt oraz istotnie nasila aktywację pERK1/2. CORM-2 poprzez działanie przeciwbólowe oraz zwiększające analgetyczne działanie morfiny i buprenorfiny, może stać się nowym orężem w walce z bólem neuropatycznym. Badania dotyczące próby hamowania endogennych neuropeptydowych systemów aktywowanych uszkodzeniem układu nerwowego kontynuowałam w ramach współpracy z Prof. Lipkowskim z Instytutu Mossakowskiego z Warszawy oraz Prof. Balletem Uniwersytetu Vrije w Brukseli w ramach grantu Maestro Prof. B. Przewłockiej. Celem badań których wyniki ukazały się w publikacji w pracy *J Med Chem* w 2016 było zbadanie działania przeciwbólowego nowo zsyntetyzowanych związków-hybrid w dwóch mysich modelach neuropatii: po luźnym jednostronnym podwiązaniu nerwu kulszowego (CCI) oraz cukrzycowej po podaniu streptozotocyny (STZ). Badane związki zsyntetyzowane zostały przez zespół badawczy Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii i Nauk Bioinżynieryjnych Uniwersytetu Vrije w Brukseli. Innowacyjność badanych związków polega na połączeniu w cząsteczce leku dwóch aktywnych farmakofor: ligandu dla receptora nocyceptynowego oraz agonisty receptorów opioidowych. Założeniem takiej konstrukcji związku jest jednoczesny wpływ na aktywność endogennego przeciwbólowego systemu opioidowego oraz systemu nocyceptynowego, który w przewlekłych stanach bólowych może działać probólowo. W obydwu mysich modelach bólu neuropatycznego wykazaliśmy silne przeciwbólowe działanie nowo zsyntetyzowanych hybrid takich jak ligand dla receptora nocyceptynowego (farmakofor 1) oraz agonista receptorów opioidowych (farmakofor 2). Przebadane hybrydy mogą stać się potencjalnymi lekami w terapii bólu neuropatycznego ponieważ analiza efektów bifunkcyjnych związków złożonych z agonisty opioidowego i antagonisty receptora wykazuje ich przeciwbólowe działanie. Podsumowując przeprowadzone badania dowiodły, że podanie powyższych substancji narzędziowych (**Rycina 2**) powoduje przeciwbólowe działanie w zwierzęcych modelach neuropatii.

Również wyniki naszych badań jednoznacznie wskazują, że modulacja zmian neuroimmunologicznych może poprawić efektywność leków przeciwbólowych w terapii bólu neuropatycznego. Obecnie uważa się, że zastosowanie politerapii bólu neuropatycznego w porównaniu z monoterapią jest korzystniejsze i pozwala na ograniczenie dawek przyjmowanych leków, a tym samym zmniejszenie efektów niepożądanych. Nasze wyniki

wskazują na możliwość zastosowania w przyszłości skojarzonej terapii stosowanych w klinice opioidowych leków przeciwbólowych z lekami nieopiodowymi minocykliną, partenolidem i marawirokiem. Zastosowanie przez nas w badaniach selektywnych narzędzi farmakologicznych ingerujących w różnorodne ścieżki sygnałowe umożliwiło poznanie nowych mechanizmów bólu neuropatycznego. Eksperymentalne i kliniczne badania mechanizmów i leczenia neuropatii omówione zostały w pracach przeglądowych, których jestem współautorem (*Mika i wsp., 2013 Pharmacol Rep.; Mika i wsp., 2013 Eur J Pharmacol.; Zychowska i wsp., 2013 Pharmacol Rep., Mika i wsp., 2012 Ból; Rojewska i wsp., 2013 Ból; Rojewska i wsp., 2018; Ciapala i Rojewska, 2019*) a szczegółowy wykaz osiągnięć zamieszczony został w tabeli 2.



Rycina 2. Modulatory bólu neuropatycznego.

**Tabela 2 przedstawia wykaz osiągnięć naukowych habilitanta**

<b><i>Wykazanie przeciwbólowego i neuroprotektynowego mechanizmu działania minocykliny w neuropatii</i></b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mika J, Osikowicz M, <b>Rojewska E</b>, Korostynski M, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R, Przewlocka B. Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. <i>Eur J Pharmacol.</i> 2009 Nov 25;623(1-3):65-72.</li> <li>2. Mika J, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Przewlocka B. Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. <i>Neuroscience.</i> 2010 Feb 17;165(4):1420-8.</li> <li>3. Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, <b>Rojewska E</b>, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. <i>Eur J Pharmacol.</i> 2013 Sep 15;716(1-3):106-19.</li> <li>4. <b>Rojewska E</b>, Korostynski M, Przewlocki R, Przewlocka B, Mika J. Expression profiling of genes modulated by minocycline in a rat model of neuropathic pain. <i>Mol Pain.</i> 2014 Jul 19;10:47.</li> <li>5. <b>Rojewska E</b>, 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. <i>J Neuroimmunol.</i> 2014 Dec 15;277(1-2):57-66.</li> <li>6. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. <i>J Neuroimmunol.</i> 2013 Sep 15;262(1-2):35-45.</li> <li>7. <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Minocycline prevents dynorphin-induced neurotoxicity during neuropathic pain in rats. <i>Neuropharmacology.</i> 2014 Nov;86:301-10.</li> <li>8. <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Minocycline prevents dynorphin-induced neurotoxicity during neuropathic pain in rats. <i>Neuropharmacology.</i> 2014 Nov;86:301-10.</li> </ol>
<b><i>Określenie roli czynników immunologicznych w modelu neuropatii cukrzycowej (STZ)</i></b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Rojewska E</b>, 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. <i>Front Immunol.</i> 2018 Mar 12;9:494.</li> <li>2. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, 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. <i>Int Immunopharmacol.</i> 2017 Nov;52:261-271.</li> <li>3. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Pilat D, Mika J. The role of some chemokines from the CXC subfamily in a mouse model of diabetic neuropathy. <i>J Diabetes Res.</i> 2015;2015:750182.</li> <li>4. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. <i>J Neuroimmunol.</i> 2013 Sep 15;262(1-2):35-45.</li> </ol>
<b><i>Wskazanie roli BoNT/A w mechanizmach modulacji bólu</i></b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Rojewska E</b>, Piotrowska A, Popiolek-Barczyk K, Mika J. Botulinum Toxin Type A-A Modulator of Spinal Neuron-Glia Interactions under Neuropathic Pain Conditions. <i>Toxins (Basel).</i> 2018 Apr 2;10(4): pii: E145.</li> <li>2. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Luvisetto S, Pavone F, Marinelli S, Przewlocka B, Mika J. Dataset of botulinum toxin A influence on interleukins under neuropathy. <i>Data Brief.</i> 2016 Nov 15;9:1020-1023..</li> <li>3. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Luvisetto S, Pavone F, Marinelli S, Przewlocka B, Mika J. Participation of pro- and anti-nociceptive interleukins in botulinum toxin A-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain. <i>Eur J Pharmacol.</i> 2016 Nov 15;791:377-388.</li> <li>4. Mika J, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Korostynski M, Luvisetto S, Marinelli S, Pavone F, Przewlocka B. The effect of botulinum neurotoxin A on sciatic nerve injury-induced neuroimmunological changes in rat dorsal root ganglia and spinal cord. <i>Neuroscience.</i> 2011 Feb 23;175:358-66.</li> </ol>
<b><i>Wykazanie ważnej roli ścieżki kinureninowej w bólu neuropatycznym</i></b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Rojewska E</b>, Ciapała K, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. <i>Pharmacol Rep.</i> 2019 Feb;71(1):139-148. doi: 10.1016/j.pharep.2018.10.002. Epub 2018 Oct 6. PubMed PMID: 30550994</li> <li>2. <b>Rojewska E</b>, Piotrowska A, Jurga A, Makuch W, Mika J. Zaprinast diminished pain and enhanced opioid analgesia in a rat neuropathic pain model. <i>Eur J Pharmacol.</i> 2018 Nov 15;839:21-32.</li> <li>3. <b>Rojewska E</b>, 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,</li> </ol>

<p>Significantly Diminishes Neuropathic Pain in a Rat Model. <i>Front Pharmacol.</i> 2018 Jul 11;9:724.</p> <p>4. <b>Rojewska E</b>, Ciapała K, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. <i>Pharmacol Rep.</i> 2019 Feb;71(1):139-148.</p>
<p><b><i>Wykazanie ważnej roli chemokin w bólu neuropatycznym</i></b></p>
<p>1. Kwiatkowski K, Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, <b>Rojewska E</b>, 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. <i>Cytokine.</i> 2019 Jul;119:202-213.</p> <p>2. <b>Rojewska E</b>, Ciapała K, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. <i>Pharmacol Rep.</i> 2019 Feb;71(1):139-148.</p> <p>3. Piotrowska A, <b>Rojewska E</b>, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Dataset of (±)-NBI-74330 (CXCR3 antagonist) influence on chemokines under neuropathic pain. <i>Data Brief.</i> 2018 Oct 26;21:1145-1150.</p> <p>4. Piotrowska A, <b>Rojewska E</b>, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W, Zychowska M, Mika J. Pharmacological blockade of CXCR3 by (±)-NBI-74330 reduces neuropathic pain and enhances opioid effectiveness - Evidence from in vivo and in vitro studies. <i>Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.</i> 2018 Oct;1864(10):3418-3437.</p> <p>5. <b>Rojewska E</b>, 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. <i>Front Immunol.</i> 2018 Mar 12;9:494.</p> <p>6. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, 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. <i>Int Immunopharmacol.</i> 2017 Nov;52:261-271.</p> <p>7. Kwiatkowski K, Piotrowska A, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Mika J. The RS504393 Influences the Level of Nociceptive Factors and Enhances Opioid Analgesic Potency in Neuropathic Rats. <i>J Neuroimmune Pharmacol.</i> 2017 Sep;12(3):402-419.</p> <p>8. Piotrowska A, Kwiatkowski K, <b>Rojewska E</b>, Slusarczyk J, Makuch W, Basta-Kaim A, Przewlocka B, Mika J. Direct and indirect pharmacological modulation of L2/CCR2 pathway results in attenuation of neuropathic pain - In vivo and in vitro evidence. <i>J Neuroimmunol.</i> 2016 Aug 15;297:9-19.</p> <p>9. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Piotrowska A, Kreiner G, Mika J. Microglial Inhibition Influences XCL1/XCR1 Expression and Causes Analgesic Effects in a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. <i>Anesthesiology.</i> 2016 Sep;125(3):573-89.</p>
<p><b><i>Przedstawienie molekularnych i farmakologicznych dowodów na ważną rolę czynników immunologicznych w modelach bólu neuropatycznego o różnej etiologii (CCI oraz STZ)</i></b></p>
<p>1. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. <i>J Neuroimmunol.</i> 2013 Sep 15;262(1-2):35-45.</p> <p>2. Makuch W, Mika J, <b>Rojewska E</b>, 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. <i>Neuropharmacology.</i> 2013 Dec;75:445-57..</p> <p>3. Popiolek-Barczyk K, Makuch W, <b>Rojewska E</b>, Pilat D, Mika J. Inhibition of intracellular signaling pathways NF-κB and MEK1/2 attenuates neuropathic pain development and enhances morphine analgesia. <i>Pharmacol Rep.</i> 2014 Oct;66(5):845-51.</p> <p>4. Mika J, Popiolek-Barczyk K, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Starowicz K, Przewlocka B. mDelta-opioid receptor analgesia is independent of microglial activation in a rat model of neuropathic pain. <i>PLoS One.</i> 2014 Aug 8;9(8):e104420.</p> <p>5. <b>Rojewska E</b>, Korostynski M, Przewlocki R, Przewlocka B, Mika J. Expression profiling of genes modulated by minocycline in a rat model of neuropathic pain. <i>Mol Pain.</i> 2014 Jul 19;10:47. doi: 10.1186/1744-8069-10-47. PubMed PMID: 25038616; PubMed Central PMCID: PMC4131481.</p> <p>6. <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Minocycline prevents dynorphin-induced neurotoxicity during neuropathic pain in rats. <i>Neuropharmacology.</i> 2014 Nov;86:301-10.</p> <p>7. Popiolek-Barczyk K, <b>Rojewska E</b>, Jurga AM, Makuch W, Zador F, Borsodi A, Piotrowska A, Przewlocka B, Mika J. Minocycline enhances the effectiveness of nociceptin/orphanin FQ during neuropathic pain. <i>Biomed Res Int.</i> 2014;2014:762930..</p> <p>8. <b>Rojewska E</b>, Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Zychowska M, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. PD98059 Influences Immune Factors and Enhances Opioid Analgesia in Model of Neuropathy. <i>PLoS One.</i> 2015 Oct 1;10(10):e0138583.</p> <p>9. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Pilat D, Mika J. The role of some chemokines from the CXC subfamily in a</p>

<p>mouse model of diabetic neuropathy. J Diabetes Res.2015;2015:750182.</p> <p>10. Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Makuch W, <b>Rojewska E</b>, Jurga AM, Pilat D, Mika J. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy. Neural Plast. 2015;2015:676473.</p> <p>11. Pilat D, Piotrowska A, <b>Rojewska E</b>, Jurga A, Ślusarczyk J, Makuch W, Basta-Kaim A, Przewlocka B, Mika J. Blockade of IL-18 signaling diminished neuropathic pain and enhanced the efficacy of morphine and buprenorphine. Mol Cell Neurosci. 2016 Mar;71:114-24.</p> <p>12. Kwiatkowski K, Piotrowska A, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Mika J. The RS504393 Influences the Level of Nociceptive Factors and Enhances Opioid Analgesic Potency in Neuropathic Rats. J Neuroimmune Pharmacol. 2017 Sep;12(3):402-419.</p> <p>13. Jurga AM, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Mika J. Lipopolysaccharide from Rhodobacter sphaeroides (TLR4 antagonist) attenuates hypersensitivity and modulates nociceptive factors. Pharm Biol. 2018 Dec;56(1):275-286.</p> <p>14. Piotrowska A, Kwiatkowski K, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Mika J. Maraviroc reduces neuropathic pain through polarization of microglia and astroglia - Evidence from in vivo and in vitro studies. Neuropharmacology. 2016 Sep;108:207-19.</p> <p>15. Piotrowska A, Kwiatkowski K, <b>Rojewska E</b>, Ślusarczyk J, Makuch W, Basta-Kaim A, Przewlocka B, Mika J. Direct and indirect pharmacological modulation of CCL2/CCR2 pathway results in attenuation of neuropathic pain - In vivo and in vitro evidence. J Neuroimmunol. 2016 Aug 15;297:9-19.</p>
<p><b><i>Wykazanie jak modulacja czynników neuroimmunologicznych wpływa na efektywność leków przeciwbólowych stosowanych w klinice</i></b></p>
<p>1. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. J Neuroimmunol. 2013 Sep 15;262(1-2):35-45.</p> <p>2. Makuch W, Mika J, <b>Rojewska E</b>, 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 Dec;75:445-57.</p> <p>3. Popiolek-Barczyk K, <b>Rojewska E</b>, Jurga AM, Makuch W, Zador F, Borsodi A, Piotrowska A, Przewlocka B, Mika J. Minocycline enhances the effectiveness of nociceptin/orphanin FQ during neuropathic pain. Biomed Res Int. 2014;2014:762930.</p> <p>4. Kwiatkowski K, Piotrowska A, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Jurga A, Ślusarczyk J, Trojan E, Basta-Kaim A, Mika J. Beneficial properties of maraviroc on neuropathic pain development and opioid effectiveness in rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2016 Jan 4;64:68-78.</p> <p>5. Jurga AM, <b>Rojewska E</b>, Piotrowska A, Makuch W, Pilat D, Przewlocka B, Mika J. Blockade of Toll-Like Receptors (TLR2, TLR4) Attenuates Pain and Potentiates Buprenorphine Analgesia in a Rat Neuropathic Pain Model. Neural Plast. 2016;2016:5238730.</p> <p>6. Pilat D, Piotrowska A, <b>Rojewska E</b>, Jurga A, Ślusarczyk J, Makuch W, Basta-Kaim A, Przewlocka B, Mika J. Blockade of IL-18 signaling diminished neuropathic pain and enhanced the efficacy of morphine and buprenorphine. Mol Cell Neurosci. 2016 Mar;71:114-24.</p>
<p><b><i>Wykazanie znaczenia aktywacji mechanizmów probólowych w endogennych systemach opioidowych w bólu neuropatycznym</i></b></p>
<p>1. Guillemyn K, Kleczkowska P, Lesniak A, Dyniewicz J, Van der Poorten O, Van den Eynde I, Keresztes A, Varga E, Lai J, Porreca F, Chung NN, Lemieux C, Mika J, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Van Duppen J, Przewlocka B, Vanden Broeck J, Lipkowski AW, Schiller PW, Tourwé D, Ballet S. Synthesis and biological evaluation of compact, conformationally constrained bifunctional opioid agonist - neurokinin-1 antagonist peptidomimetics. Eur J Med Chem. 2015 Mar 6;92:64-77.</p> <p>2. Guillemyn K, Starnowska J, Lagard C, Dyniewicz J, <b>Rojewska E</b>, Mika J, Chung NN, Utard V, Kosson P, Lipkowski AW, Chevillard L, Arranz-Gibert P, Teixidó M, Megarbane B, Tourwé D, Simonin F, Przewlocka B, Schiller PW, Ballet S. Bifunctional Peptide-Based Opioid Agonist-Nociceptin Antagonist Ligands for Dual Treatment of Acute and Neuropathic Pain. J Med Chem. 2016 Apr 28;59(8):3777-92.</p>
<p><b><i>Wykazanie roli gleju w skuteczności leków przeciwdepresyjnych w bólu neuropatycznym</i></b></p>
<p>1. Zychowska M, <b>Rojewska E</b>, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. The influence of microglia activation on the efficacy of amitriptyline, doxepin, milnacipran, venlafaxine and fluoxetine in a rat model of neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 2015 Feb 15;749:115-23.</p> <p>2. Mika J, Zychowska M, Makuch W, <b>Rojewska E</b>, Przewlocka B. Neuronal and immunological basis of action of antidepressants in chronic pain - clinical and experimental studies. Pharmacol Rep. 2013;65(6):1611-21. Review.</p>



3. Zychowska M, **Rojewska E**, Przewlocka B, Mika J. Mechanisms and pharmacology of diabetic neuropathy - experimental and clinical studies. *Pharmacol Rep.* 2013;65(6):1601-10. Review.

## 5. KIEROWANIE I UCZESTNICTWO W GRANTACH BADAWCZYCH

### I. Kierownik grantu:

1. Kierownik grantu SONATA 2015/17/D/NZ4/02284 pt. „**Rola szlaku kinureninowego w bólu neuropatycznym w kontekście innowacyjnego podejścia terapeutycznego**” (Okres realizacji: 2016-nadal)

#### *Publikacje:*

1. **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 Feb;71(1):139-148.
2. **Rojewska E**, Piotrowska A, Jurga A, Makuch W, Mika J. Zaprinast diminished pain and enhanced opioid analgesia in a rat neuropathic pain model. *Eur J Pharmacol.* 2018 Nov 15;839:21-32
3. **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 Jul 11;9:724.
4. **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 Feb;71(1):139-148.

### II. Wykonawca grantów:

1. Współwykonawca grantu numer N N405 375937 „**Modulacja aktywacji mikrogleju w bólu neuropatycznym - nowe eksperymentalne podejście do terapii bólu**”. (Okres realizacji: 2008-2012)

#### *Publikacje:*

1. Zychowska M, **Rojewska E**, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J Neuroimmunol.* 2013 Sep 15;262(1-2):35-45. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.06.005. Epub 2013 Jul 17. PubMed PMID: 23870534
2. Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, **Rojewska E**, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2013 Sep 15;716(1-3):106-19. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.072. Epub 2013 Mar 13. Review. PubMed PMID: 23500198
3. Mika J, **Rojewska E**, Makuch W, Korostynski M, Luvisetto S, Marinelli S, Pavone F, Przewlocka B. The effect of botulinum neurotoxin A on sciatic nerve injury-induced neuroimmunological changes in rat dorsal root ganglia and spinal cord. *Neuroscience.* 2011 Feb 23;175:358-66. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.040. Epub 2010 Nov 25. PubMed PMID: 21111791
4. Mika J, **Rojewska E**, Makuch W, Przewlocka B. Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience.* 2010 Feb 17;165(4):1420-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.064. Epub 2009 Dec 1. PubMed PMID: 19961904

5. Mika J, Osikowicz M, **Rojewska E**, Korostynski M, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R, Przewlocka B. Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2009 Nov 25;623(1-3):65-72. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.030. Epub 2009 Sep 17. PubMed PMID: 19766105
6. Mika J, Popiolek-Barczyk K, **Rojewska E**, Makuch W, Starowicz K, Przewlocka B. Delta-opioid receptor analgesia is independent of microglial activation in a rat model of neuropathic pain. *PLoS One.* 2014 Aug 8;9(8):e104420. doi: 10.1371/journal.pone.0104420. eCollection 2014. PubMed PMID: 25105291; PubMed Central PMCID: PMC4126741

**2. Współwykonawca grantu Demeter-1.1.2.5.4 „DEPRESJA - MECHANIZMY - TERAPIA”, pt „Rola gleju w skuteczności leków przeciwdepresyjnych stosowanych w bólu neuropatycznym - poszukiwanie nowych możliwości terapii”.** Kierownik grantu prof. K. Wędzony (Okres realizacji: 2010-2014)

**Publikacje:**

1. **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 Feb;71(1):139-148.
2. **Rojewska E**, Piotrowska A, Jurga A, Makuch W, Mika J. Zaprinast diminished pain and enhanced opioid analgesia in a rat neuropathic pain model. *Eur J Pharmacol.* 2018 Nov 15;839:21-32
3. **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 Jul 11;9:724.
4. **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 Feb;71(1):139-148.

**3. Współwykonawca grantu OPUS numer 2011/03/B/NZ4/00042 pt. „Poszukiwanie nowych punktów uchwytu dla skutecznej terapii bólu neuropatycznego w oparciu o zbadanie i modulację neuroimmunologicznych interakcji w działaniu leków opioidowych”.** Kierownik projektu: prof. dr hab. Joanna Mika (Okres realizacji: 2012-2015)

**Publikacje:**

1. 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 Dec;75:445-57.
2. Zychowska M, **Rojewska E**, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J Neuroimmunol.* 2013 Sep 15;262(1-2):35-45.
3. Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, **Rojewska E**, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2013 Sep 15;716(1-3):106-19.
4. Zychowska M, **Rojewska E**, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. The influence of microglia activation on the efficacy of amitriptyline, doxepin, milnacipran, venlafaxine and fluoxetine in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2015 Feb 15;749:115-23.
5. **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 Dec 15;277(1-2):57-66.
6. Popiolek-Barczyk K, **Rojewska E**, Jurga AM, Makuch W, Zador F, Borsodi A, Piotrowska A, Przewlocka B, Mika J. Minocycline enhances the effectiveness of nociceptin/orphanin FQ during neuropathic pain. *Biomed Res Int.* 2014;2014:762930.

7. **Rojewska E**, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Minocycline prevents dynorphin-induced neurotoxicity during neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology*. 2014 Nov;86:301-10.
8. Popiolek-Barczyk K, Makuch W, **Rojewska E**, Pilat D, Mika J. Inhibition of intracellular signaling pathways NF- $\kappa$ B and MEK1/2 attenuates neuropathic pain development and enhances morphine analgesia. *Pharmacol Rep*. 2014 Oct;66(5):845-51.
9. Mika J, Popiolek-Barczyk K, **Rojewska E**, Makuch W, Starowicz K, Przewlocka B. Delta-opioid receptor analgesia is independent of microglial activation in a rat model of neuropathic pain. *PLoS One*. 2014 Aug 8;9(8):e104420.
10. **Rojewska E**, Korostynski M, Przewlocki R, Przewlocka B, Mika J. Expression profiling of genes modulated by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *Mol Pain*. 2014 Jul 19;10:47.
11. Jurga AM, Piotrowska A, Starnowska J, **Rojewska E**, Makuch W, Mika J. Treatment with a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-2) inhibits neuropathic pain and enhances opioid effectiveness in rats. *Pharmacol Rep*. 2016 Feb;68(1):206-13.
12. **Rojewska E**, Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Zychowska M, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. PD98059 Influences Immune Factors and Enhances Opioid Analgesia in Model of Neuropathy. *PLoS One*. 2015 Oct 1;10(10):e0138583.
13. 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 Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Jan 4;64:68-78.
14. Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Makuch W, **Rojewska E**, Jurga AM, Pilat D, Mika J. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy. *Neural Plast*. 2015;2015:676473.
15. Pilat D, **Rojewska E**, Jurga AM, Piotrowska A, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. IL-1 receptor antagonist improves morphine and buprenorphine efficacy in a rat neuropathic pain model. *Eur J Pharmacol*. 2015 Oct 5;764:240-8.
16. 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;2015:750182.
17. Jurga AM, Piotrowska A, Starnowska J, **Rojewska E**, Makuch W, Mika J. Treatment with a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-2) inhibits neuropathic pain and enhances opioid effectiveness in rats. *Pharmacol Rep*. 2016 Feb;68(1):206-13.
18. Jurga AM, Piotrowska A, Starnowska J, **Rojewska E**, Makuch W, Mika J. Treatment with a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-2) inhibits neuropathic pain and enhances opioid effectiveness in rats. *Pharmacol Rep*. 2016 Feb;68(1):206-13.

4. Współwykonawca grantu PRELUDIUM numer 2012/07/N/NZ3/00379 pt. „Zbadanie znaczenia szlaków wewnątrzkomórkowych w działaniu opioidów w komórkach mikrogleju *in vitro*”. Kierownik projektu: dr Katarzyna Popiołek-Barczyk (Okres realizacji: 2013-2017)

#### **Publikacje:**

1. Popiolek-Barczyk K, **Rojewska E**, Jurga AM, Makuch W, Zador F, Borsodi A, Piotrowska A, Przewlocka B, Mika J. Minocycline enhances the effectiveness of nociceptin/orphanin FQ during neuropathic pain. *Biomed Res Int*. 2014;2014:762930.
2. Mika J, Popiolek-Barczyk K, **Rojewska E**, Makuch W, Starowicz K, Przewlocka B. Delta-opioid receptor analgesia is independent of microglial activation in a rat model of neuropathic pain. *PLoS One*. 2014 Aug 8;9(8):e104420.
3. Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Makuch W, **Rojewska E**, Jurga AM, Pilat D, Mika J. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy. *Neural Plast*. 2015;2015:676473.

5. Współwykonawca grantu PRELUDIUM numer 2012/05/N/NZ4/02416 pt. „**Określenie roli i próba modulacji zmienionych cukrzycą czynników immunologicznych – ich znaczenie dla działania opioidowych leków przeciwbólowych**”. Kierownik projektu: dr Magdalena Żychowska (Okres realizacji: 2013–2016)

**Publikacje:**

1. Zychowska M, **Rojewska E**, Przewlocka B, Mika J. Mechanisms and pharmacology of diabetic neuropathy - experimental and clinical studies. *Pharmacol Rep.*2013;65(6):1601-10. Review. PubMed PMID: 24553008.
2. Zychowska M, **Rojewska E**, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J Neuroimmunol.* 2013 Sep 15;262(1-2):35-45.
3. 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;2015:750182. doi: 10.1155/2015/750182. Epub 2015 Feb 19. PubMed PMID: 25789329; PubMed Central PMCID: PMC4350880.
4. 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 Sep;125(3):573-89.

6. Współwykonawca w grantie OPUS numer 2016/21/B/NZ4/00128 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**”. Kierownik projektu: prof. dr hab. Joanna Mika (Okres realizacji: 2017-2020)

**Publikacje:**

1. Piotrowska A, **Rojewska E**, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W, Zychowska M, Mika J. 2018. Pharmacological blockade of CXCR3 by (±)-NBI-74330 reduces neuropathic pain and enhances opioid effectiveness - evidence from in vivo and in vitro studies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1864(10):3418-37.
2. 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 Sep 26;10:2198.
3. 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 Jul;119:202-213.
4. Piotrowska A, **Rojewska E**, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Dataset of (±)-NBI-74330 (CXCR3 antagonist) influence on chemokines under neuropathic pain. *Data Brief.* 2018 Oct 26;21:1145-1150.
5. **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 Mar 12;9:494.
6. 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 Nov;52:261-271.
7. 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 Sep;12(3):402-419.

8. 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 Nov;52:261-271.
9. Zajackowska R, Popiolek-Barczyk K, Pilat D, **Rojewska E**, Makuch W, Wordliczek J, Mika J. Involvement of microglial cells in the antinociceptive effects of metamizol in a mouse model of neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2018 Dec;175:77-88.
10. Jurga AM, **Rojewska E**, Makuch W, Mika J. Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* (TLR4 antagonist) attenuates hypersensitivity and modulates nociceptive factors. *Pharm Biol.* 2018 Dec;56(1):275-286. doi: 10.1080/13880209.2018.1457061.

7. Adiunkt w projekcie MAESTRO o numerze 2012/06/A/NZ4/00028 pt. „**Aktywacja mechanizmów probólowych w endogennych systemach opioidowych jako ważny element rozwoju bólu neuropatycznego – mechanizmy i punkty uchwytu dla nowych terapii**”. Kierownik projektu: prof. dr hab. Barbara Przewłocka (Okres realizacji: 2013-2017)

**Publikacje:**

1. Mika J, Popiolek-Barczyk K, **Rojewska E**, Makuch W, Starowicz K, Przewłocka B. Delta-opioid receptor analgesia is independent of microglial activation in a rat model of neuropathic pain. *PLoS One.* 2014 Aug 8;9(8):e104420.
2. **Rojewska E**, Makuch W, Przewłocka B, Mika J. Minocycline prevents dynorphin-induced neurotoxicity during neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology.* 2014 Nov;86:301-10.
3. Guillemyn K, Starnowska J, Lagard C, Dyniewicz J, **Rojewska E**, Mika J, Chung NN, Utard V, Kosson P, Lipkowski AW, Chevillard L, Arranz-Gibert P, Teixidó M, Megarbane B, Tourwé D, Simonin F, Przewłocka B, Schiller PW, Ballet S. Bifunctional Peptide-Based Opioid Agonist-Nociceptin Antagonist Ligands for Dual Treatment of Acute and Neuropathic Pain. *J Med Chem.* 2016 Apr 28;59(8):3777-92.
4. **Rojewska E**, Wawrzczak-Bargiela A, Szucs E, Benyhe S, Starnowska J, Mika J, Przewłocki R, Przewłocka B. Alterations in the Activity of Spinal and Thalamic Opioid Systems in a Mice Neuropathic Pain Model. *Neuroscience.* 2018 Oct 15;390:293-302.
5. Guillemyn K, Kleczkowska P, Lesniak A, Dyniewicz J, Van der Poorten O, Van den Eynde I, Keresztes A, Varga E, Lai J, Porreca F, Chung NN, Lemieux C, Mika J, **Rojewska E**, Makuch W, Van Duppen J, Przewłocka B, Vanden Broeck J, Lipkowski AW, Schiller PW, Tourwé D, Ballet S. Synthesis and biological evaluation of compact, conformationally constrained bifunctional opioid agonist - neurokinin-1 antagonist peptidomimetics. *Eur J Med Chem.* 2015 Mar 6;92:64-77.

8. Współwykonawca w grantcie HARMONIA numer 2013/10/M/NZ4/00261 pt. „**Neuronalne i nieneuronalne mechanizmy toksyny botulinowej A w rozwoju bólu neuropatycznego – badania behawioralne i biochemiczne**”. Kierownik projektu: prof. dr hab. Joanna Mika (Okres realizacji: 2014-2018)

**Publikacje:**

1. Piotrowska A, Kwiatkowski K, **Rojewska E**, Slusarczyk J, Makuch W, Basta-Kaim A, Przewłocka B, Mika J. 2016a. Direct and indirect pharmacological modulation of CCL2/CCR2 pathway results in attenuation of neuropathic pain - in vivo and in vitro evidence. *J Neuroimmunol.* 15;297:9-19.
2. Piotrowska A, Kwiatkowski K, **Rojewska E**, Makuch W, Mika J. 2016b. Maraviroc reduces neuropathic pain through polarization of microglia and astroglia - evidence from in vivo and in vitro studies. *Neuropharmacology* 108:207-19.

3. **Rojewska E**, Piotrowska A, Popiolek-Barczyk K, Mika J. Botulinum Toxin Type A-A Modulator of Spinal Neuron-Glia Interactions under Neuropathic Pain Conditions. *Toxins (Basel)*. 2018 Apr 2;10(4). pii: E145. doi: 10.3390/toxins10040145. Review.
4. 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 Sep;12(3):402-419.
5. Jurga AM, **Rojewska E**, Piotrowska A, Makuch W, Pilat D, Przewlocka B, Mika J. Blockade of Toll-Like Receptors (TLR2, TLR4) Attenuates Pain and Potentiates Buprenorphine Analgesia in a Rat Neuropathic Pain Model. *Neural Plast*. 2016;2016:5238730.
6. Pilat D & Piotrowska A, **Rojewska E**, Jurga A, Ślusarczyk J, Makuch W, Basta-Kaim A, Przewlocka B, Mika J. 2016. Blockade of IL-18 signaling diminished neuropathic pain and enhanced the efficacy of morphine and buprenorphine. *Mol Cell Neurosci*. 71:114-24.
7. **Rojewska E**, Piotrowska A, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. *Neuropharmacology*. 2016 Mar;102:80-91.
8. Zychowska M, **Rojewska E**, Makuch W, Luvisetto S, Pavone F, Marinelli S, Przewlocka B, Mika J. Participation of pro- and anti-nociceptive interleukins in botulinum toxin A-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2016 Nov 15;791:377-388.
9. 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 Sep;12(3):402-419.
10. Jurga AM, **Rojewska E**, Makuch W, Mika J. Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* (TLR4 antagonist) attenuates hypersensitivity and modulates nociceptive factors. *Pharm Biol*. 2018 Dec;56(1):275-286.

9. Współwykonawca w grantcie Preludium Nr: UMO-2016/23/N/NZ7/00356 pt. **„Określenie mechanizmów i potencjalnych punktów uchwytu dla terapii bólu neuropatycznego poprzez zbadanie interakcji farmakologicznych pomiędzy substancjami modulującymi aktywność gleju a lekami opioidowymi”**. Kierownik projektu: dr Anna Piotrowska-Murzyn (Okres realizacji: 2017-2020)

**Publikacje:**

1. 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.

10. Współwykonawca w grantcie Preludium Nr: UMO-2018/29/N/NZ7/00287: **„Nowe strategie w farmakoterapii bólu neuropatycznego oparte na modulacji funkcji receptorów chemokinowych CCR2 oraz CCR5”**. Kierownik projektu: mgr Klaudia Kwiatkowski. (Okres realizacji: 2019-2022)

**Publikacje:**

1. 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.

11. Współwykonawca w grantcie STEP7 Nr: 6/1.1.1/2019 Działanie 1.1 "Projekty B+R przedsiębiorstw", Poddziałanie 1.1.1 „Badania przemysłowe i prace rozwojowe realizowane przez przedsiębiorstwa” pt. „Serotonergiczna terapia przeciwbólowa oparta o agonistę receptora 5-HT7 (STEP7)”. Projekt jest realizowany przez konsorcjum naukowe złożone z firmy Celon Pharma S.A oraz Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk. (Okres realizacji: 2020-2023)

## 6. WSPÓŁPRACA NAUKOWA Z JEDNOSTKAMI KRAJOWYMI I ZAGRANICZNYMI

Współprace naukowe zarówno krajowe, jak i zagraniczne to najlepszy środek dla poszerzenia naukowych horyzontów, wymiany pomysłów oraz realizacji innowacyjnych badań. Dzięki nim nabywamy nową wiedzę oraz doświadczenie niezbędne do osiągnięcia pełni swojego potencjału. Współprace łączą różne pokolenia naukowców, podnoszą jakość badań oraz wyznaczają nowe trendy w nauce. Dyskusje pomagają w weryfikacji własnych pomysłów oraz poszukiwaniu innowacyjnych rozwiązań. Dają dostęp do innych laboratoriów naukowych, dzięki czemu umożliwia poznawanie nowych metod badawczych umożliwiając tym samym umożliwiając osiągnięcie bardziej wartościowych wyników oraz opublikowanie ich w lepszych czasopismach. W swojej pracy naukowej chętnie dzielę się swoją wiedzą i doświadczeniem oraz chętnie korzystam z umiejętności innych przy realizacji projektów. Nawiązywałam i nawiązuję współpracę z innymi Zakładami Instytutu Farmakologii, jak również z innymi ośrodkami za granicą.

### WSPÓŁPRACA NAUKOWA Z PLACÓWKAMI KRAJOWYMI:

1. **Centrum Urazowe Medycyny Ratunkowej i Katastrof (CUMRiK), Szpital Uniwersytecki Collegium Medicum, Kraków; ul. Mikołaja Kopernika 50, 30-001 Kraków. Współpraca nieformalna finansowana z działalności statutowej IF-PAN oraz grantu Opus 2016/21/B/NZ4/00128 z prof. dr hab. n med. Jerzym Wordliczkiem i dr n. med. Renatą Zajaczkowską.** Temat współpracy: „Ocena wpływu metforminy, metamizolu oraz limecyliny na aktywację neurogleju w modelu zwierzęcym bólu neuropatycznego”. Celem współpracy jest określenie wpływu metamizolu na symptomy bólu neuropatycznego oraz efektywność analgetyczną opioidów w mysim i szczurzym modelu bólu neuropatycznego.

#### *Wynikiem współpracy są następujące publikacje:*

1. Zajaczkowska R., Popiolek-Barczyk K., Pilat D., **Rojewska E.**, Makuch W., Wordliczek J., Mika J. Involvement of microglial cells in the antinociceptive effects of metamizol in a mouse model of neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2018 Sep 26;175:77-88.
2. Zajaczkowska R, Kwiatkowski K, Pawlik K, Piotrowska A, **Rojewska E**, Makuch W, Wordliczek J, Mika J. Metamizole relieves pain by influencing cytokine levels in dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain [published online ahead of print, 2020 Jul 20]. *Pharmacol Rep.* 2020;10.1007/s43440-020-00137-8.

2. **Zakład Biochemii Mozgu, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk. Współpraca z Prof. Dr hab. Ireną Nalepa oraz dr hab. Grzegorzem Kreiner**

dotyczyła przeprowadzenia eksperymentów w ramach projektów badawczych: OPUS 11 2016/21/B/NZ4/00128, PRELUDIUM 12 2016/23/N/NZ7/00356 oraz PRELUDIUM 5 2012/05/N/NZ4. Celem współpracy było wykazanie zmian poziomu ekspresji wielu chemokin i ich receptorów w modelach neuropatii. W ramach badań dr hab. Grzegorz Kreiner dokonał analizy immunohistochemicznej mającej na celu określenie kolokalizacji receptorów chemokinowych z mikroglejem, astroglejem i neuronami u myszy/szczura po podwiązaniu nerwu kulszowego oraz w modelu neuropatii cukrzycowej.

***Wynikiem współpracy są następujące publikacje:***

1. Żychowska M, **Rojewska E**, Kreiner G, Nalepa I, Przewłocka B, Mika J: Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J Neuroimmunol* 2013; 262: 35-45.
2. Żychowska 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(3):573-89.
3. Żychowska 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.
4. **Rojewska E**, Żychowska 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 morphine. *Front Immunol* 2018; 9:494.
5. Piotrowska A, **Rojewska E**, Pawlik K, Kreiner G, Ciechanowska A, Makuch W, Żychowska M, Mika J: 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(10):3418-3437.
6. Piotrowska A, **Rojewska E**, Pawlik K, 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.

**WSPÓŁPRACA NAUKOWA Z PLACÓWKAMI ZAGRANICZNYMI**

**1. Instytut Biologii Komórkowej i Neurobiologii (Istituto di Biologia Cellulare e Neurobiologia) Via del Fosso di Fiorano 64/65, 00143, CNR, Rzym, Włochy.** Współpraca nieformalna z zespołem prof. Flamini Pavone w ramach umowy grantu Harmonia 2013/10/M/NZ4/00261, przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz działalności statutowej Zakładu Farmakologii Bólu IF PAN. Temat współpracy: „Neuronalne i nieneuronalne mechanizmy toksyny botulinowej A w rozwoju bólu neuropatycznego - badania behawioralne i biochemiczne”. Celem badań jest poznanie mechanizmów analgetycznych efektów toksyny botulinowej A w rozwoju bólu neuropatycznego oraz jej oddziaływanie na interakcję neuron-glej.

***Wynikiem współpracy są następujące publikacje:***

1. Mika J, **Rojewska E**, Makuch W, et al. The effect of botulinum neurotoxin A on sciatic nerve injury-induced neuroimmunological changes in rat dorsal root ganglia and spinal cord. *Neuroscience*. 2011;175:358-366.
2. Żychowska M, **Rojewska E**, Makuch W, et al. Participation of pro- and anti-nociceptive interleukins in botulinum toxin A-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2016;791:377-388.
3. **Rojewska E**, Piotrowska A, Popiolek-Barczyk K, Mika J. Botulinum Toxin Type A-A Modulator of Spinal Neuron-Glia Interactions under Neuropathic Pain Conditions. *Toxins (Basel)*. 2018 Apr 2;10(4). pii: E145.

**2. Instytut Biochemii, Centrum Badań Biologicznych, Węgierska Akademia Nauk, Szeged, Węgry.** Współpraca na podstawie porozumienia pomiędzy Polską i Węgierską



Akademią Nauk z zespołem prof. Sandora Benyhe w ramach grantu Maestro 2012/06/A/NZ4/00028 (kierownik prof. dr hab. B. Przewłocka), przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki. Temat współpracy: „Aktywacja mechanizmów probólowych w endogennych systemach opioidowych, jako ważny element rozwoju bólu neuropatycznego - mechanizmy i punkty uchwytu dla nowych terapii”.

***Wyniki współpracy zostały opublikowane w publikacji:***

1. **Rojewska E**, Wawrzczak-Bargiela A, Szucs E, Benyhe S, Starnowska J, Mika J, Przewlocki R, Przewłocka B. Alterations in the Activity of Spinal and Thalamic Opioid Systems in a Mice Neuropathic Pain Model. *Neuroscience*. 2018 Oct 15;390:293-302.

**3. Vrije Universiteit Brussel, Laboratorium Chemii Organicznej, Wydział Chemii i Biotechnologii, Bruksela, Belgia.** Współpraca nieformalna z zespołem Prof. Stevena Balleta w ramach grantu Maestro 2012/06/A/NZ4/00028 (kierownik prof. dr hab. Barbara Przewłocka), przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki. Temat współpracy: „Aktywacja mechanizmów probólowych w endogennych systemach opioidowych, jako ważny element rozwoju bólu neuropatycznego - mechanizmy i punkty uchwytu dla nowych terapii”. Celem współpracy była synteza związków hybrydowych spełniających założenia hipotezy o wzroście aktywności układów probólowych w bólu neuropatycznym przez grupę prof. S. Balleta z Brukseli.

***Wyniki powstałe w ramach współpracy zostały włączone do publikacji:***

1. Guillemyn K, Starnowska J, Lagard C, Dyniewicz J, **Rojewska E**, Mika J, Chung NN, Utard V, Kosson P, Lipkowski AW, Chevillard L, Arranz-Gibert P, Teixidó M, Megarbane B, Tourwé D, Simonin F, Przewłocka B, Schiller PW, Ballet S. Bifunctional Peptide-Based Opioid Agonist-Nociceptin Antagonist Ligands for Dual Treatment of Acute and Neuropathic Pain. *J Med Chem*. 2016;59(8):3777-3792.

## **7. WYKŁADY NA KRAJOWYCH I MIĘDZYNARODOWYCH KONFERENCJACH NAUKOWYCH**

**W latach 2008-2017 wygłosiłam 6 wykładów na konferencjach krajowych i międzynarodowych:**

1. **Rojewska E.**, Piotrowska A., Jurga AM., Makuch W., Przewłocka B., Mika J. Minocycline affects neuropathic pain by regulation of kynurenic pathway - role of microglial cells. 13-sty Międzynarodowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego. 28.08-31.08. 2017 Warszawa, Polska.
2. **Rojewska E.**, Piotrowska A., Przewłocka B., Mika J. Modulation of the kynurenine pathway in search for antinociceptive agents. Focus on kynurenine 3-monooxygenase. Interdisciplinary junior scientists workshop on neuropharmacology and molecular biology. 29.03 – 01.04. 2017 Białka Tatrzańska, Polska.
3. **Rojewska E.**, Makuch W., Przewłocka B., Mika J. The influence of minocycline on immune factors during neuropathic pain. XV Zjazd Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, 26-28.06.2014 Wrocław, Polska.
4. **Rojewska E.**, Korostyński M., Przewłocki R., Przewłocka B., Mika J. Poszukiwanie nowych punktów uchwytu dla terapii bólu neuropatycznego - mikromacierze DNA.

(The search for new mechanism for treatment of neuropathic pain - DNA microarrays). VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Badania Bólu, 25-28.09.2013 Zakopane, Polska.

5. **Rojewska E.** Minocycline – A neuromodulator of neuropathic pain. XXII International Symposium of "Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism" 14-15.06.2013 Kraków, Polska.
6. **Rojewska E.,** Mika J., Osikowicz M., Starowicz K., Przewłocka B. Streptozotocin-induced diabetic conditions are associated with neuropathic pain symptoms in mice. EFIC European Pain School 2008 University of Siena, 15.06-22.06.2008 Siena, Włochy.

## **8. NAGRODY**

1. STYPENDIUM EOC-ENC przyznawane na drodze konkursu na sfinansowanie uczestnictwa w konferencji pt "European Opioid Conference" Ferrara, Włochy, 8-11. 04. 2008.
2. STYPENDIUM IBRO przyznawane na drodze konkursu na sfinansowanie uczestnictwa w szkole dla młodych naukowców "Pain and the Central Nervous System" Siena, Włochy, 15-22. 06 2008.
3. STYPENDIUM przyznane przez Węgierską Akademię Nauk na pobyt naukowy w laboratorium kierowanym przez prof. Annę Borsodi, Zakład Neurobiologii Instytutu Biochemii Węgierskiej Akademii Nauk, Szeged, Węgry; 08-21.10.2011.
4. STYPENDIUM EMBL przyznawane na drodze konkursu na sfinansowanie uczestnictwa w konferencji pt „EMBL Conference Microglia: Guardians of the Brain” 26-29.03.2014. Nagroda przyznana w ramach programu: Corporate Partnership Programme.
5. STYPENDIUM START 2015 dla wybitnych młodych uczonych na początku kariery naukowej posiadających udokumentowane osiągnięcia w swojej dziedzinie badań; przyznane na rok przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej; 01.06.2015-01.06.2016.
6. NAGRODA ZA POZIOM PRAC NAUKOWYCH (QUALITAS) ORAZ ZA LICZBĘ PUBLIKACJI (QUANTITAS) przyznana w latach 2016/2017.

## **9. CZŁONKOSTWO W TOWARZYSTWACH NAUKOWYCH.**

Obecnie jestem członkiem towarzystwa naukowego PTBB – Polskie Towarzystwo Badania Bólu (Polski Oddział IASPu).

## **10. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA I DYDAKTYCZNA**

W trakcie mojej pracy naukowej w Instytucie Farmakologii PAN miałam przyjemność niejednokrotnie sprawować opiekę naukową nad osobami odbywającymi praktyki, jak i przygotowującymi prace magisterską w naszym Instytucie. Już na samym początku mojej pracy, sprawowałam opiekę nad dr Rita Bhimani, która pracowała na wolontariacie w naszym Instytucie. Podczas Jej pobytu wspólnie byliśmy zaangażowane w organizację eksperymentów związanych z badaniem przeciwbólowego działania różnych substancji w bólu neuropatycznym. Nasza współpraca polegała m.in. na nauce różnych technik behawioralnych oraz wspólnym przeprowadzaniu doświadczeń. Równocześnie pomagałam w sprawowaniu opieki nad studentem II roku Uniwersytetu Jagiellońskiego, na kierunku Neurobiologii Grzegorzem Dobrzańskim, który odbywał praktyki studenckie w Zakładzie Farmakologii

Bólu Instytutu Farmakologii Krakowie 04-22.07.2011. Następnie opieką naukową objęłam studenta V roku Neurobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Mateusza Wasylewskiego, który rozpoczął od października 2012 roku doświadczalną część pracy magisterskiej w Zakładzie Farmakologii Bólu IF PAN w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Mika. Mój wkład polegał na merytorycznym wprowadzeniu Studenta w tematykę pracy oraz metody badawcze stosowane w Zakładzie Farmakologii Bólu, wspólnym planowaniu, przeprowadzaniu doświadczeń oraz analizie i opracowaniu otrzymanych wyników. Następnie W roku 2017 byłam opiekunem 3-miesięcznego stażu mgr Katarzyny Ciapała. Praktyki odbywały się w ramach programu stażowego zatytułowanego: „Wysokiej jakości staże zawodowe rozwijające kompetencje dla studentek i studentów kierunków biologicznych i nauk o ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego”. W trakcie stażu nauczyłam mgr Katarzyną Ciapała behawioralnych i biochemicznych metod stosowanych w naszym Zakładzie, co zaowocowało dalszą współpracą w ramach kierowanego przeze mnie grantu oraz wspólnymi publikacjami naukowymi.

### ***Komitet organizacyjny konferencji***

- Członek Komitetu Organizacyjnego konferencji European Opioid Conference (EOC), 13-15.04.2011, Kraków.
- Udział w przygotowaniu XXIX Szkoły Zimowej „Glej” zorganizowanej przez IF PAN, 7-10.02.2012, Kraków.
- Udział w przygotowaniu XXX Szkoły Zimowej „Ból” zorganizowanej przez IF PAN, 19-22.02.2013, Kraków.
- CZŁONEK KOMITETU NAUKOWEGO KONFERENCJI: EFIC Pain School „Translational Pain Research: From Lab to Clinic, Kraków 2017.

### **11. STAŻE NAUKOWE ZAGRANICZNE**

W trakcie mojej pracy naukowej uczestniczyłam w Europejskiej Szkole Bólowej na Uniwersytecie w Sienie we Włoszech, 15.06-22.06.2008. W październiku 2012 miałam przyjemność wyjechać do Akademii w Szeged na Węgry, gdzie poznałam metodę wiązania GTP $\gamma$  oraz przeprowadziłam szereg badań włączonych do pracy doktorskiej.

## 12. PODSUMOWANIE CAŁOŚCI DOROBKU NAUKOWEGO

Łącznie opublikowałam **62** prac (**46** prac oryginalnych, **16** prac przeglądowych). Sumaryczny IF z opublikowanych prac wynosi **163.000**, a index **H=23**. Liczba cytowań (bez autocytowań) wg. Bazy Web of Science Core Collection z dn. 20.10.2020 wynosi **1120**. Według wytycznych MNiSW uzyskałam łącznie **1894 pkt.** Jestem autorem **111** doniesień zjazdowych, a w **27** z nich byłam prezentującym. Ponadto wygłosiłam **6** prezentacji ustnych (Siena 2008, Białka Tatrzańska 2013, Kraków 2013, Zakopane 2013, Wrocław 2014, Warszawa 2017).

Podsumowanie całości dorobku naukowego z podziałem na osiągnięcia przed i po uzyskaniu stopnia doktora zostało przedstawione w tabeli poniżej.

**Tabela 3.** Zbiorczy wykaz najważniejszych osiągnięć naukowych habilitanta (stan na 20.10.2020).

	Przed doktoratem			Po doktoracie		
	Liczba	IF	MNiSW	Liczba	IF	MNiSW
Publikacje oryginalne	5	16.785	142	41	135.306	1610
Publikacje przeglądowe	6	7.014	87	10	3.895	35
<b>RAZEM</b>	<b>11</b>	<b>23.799</b>	<b>229</b>	<b>51</b>	<b>139.201</b>	<b>1665</b>
Streszczenia w materiałach pokonferencyjnych	40			71		
Wykłady naukowe wygłoszone poza IF PAN	1			5		
Udział w projektach grantowych	2			10		
Kierowanie projektami grantowymi				1		
Sumaryczny IF wszystkich opublikowanych prac						<b>163.000</b>
Sumaryczna punktacja KBN/MNiSW wszystkich opublikowanych prac						<b>1894</b>
Całkowita liczba cytowań wg bazy JCR Web of Science						<b>1458</b>
Całkowita liczba cytowań z wył. autocytowań wg bazy JCR Web of Science						<b>1120</b>
H-index						<b>23</b>

Sumaryczny IF prac wchodzących w skład dzieła habilitacyjnego –**32.589/345** MNiSW (**28.694/310** MNiSW z prac oryginalnych i **3.895/35** MNiSW z prac przeglądowych). Punkty IF/MNiSW liczone wg danych dla roku opublikowania pracy na podstawie bazy JCR (Journal Citation Reports) Web of Science i punktacji czasopism publikowanych w odpowiednich latach przez KBN/MNiSW

*Ewelina Rojewska - Mendel*

### 13. Załączniki

Załącznik 1 – Dane kontaktowe

Załącznik 2 – Uwierzytelniony odpis z dyplomu doktorskiego

Załącznik 3 – Analiza bibliometryczna dorobku naukowego przygotowana przez Centrum Informacji Naukowej, Biblioteki i Archiwum Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN

Załącznik 4 – Pełny wykaz wszystkich prac opublikowanych przez habilitanta

Załącznik 5 – Oświadczenia współautorów publikacji będących przedmiotem dzieła habilitacyjnego

Załącznik 6 – Pełne wersje prac stanowiących podstawę habilitacji

Lp. pozycji		Tytuł publikacji		Rok	
1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20
21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30
31	31	31	31	31	31
32	32	32	32	32	32
33	33	33	33	33	33
34	34	34	34	34	34
35	35	35	35	35	35
36	36	36	36	36	36
37	37	37	37	37	37
38	38	38	38	38	38
39	39	39	39	39	39
40	40	40	40	40	40
41	41	41	41	41	41
42	42	42	42	42	42
43	43	43	43	43	43
44	44	44	44	44	44
45	45	45	45	45	45
46	46	46	46	46	46
47	47	47	47	47	47
48	48	48	48	48	48
49	49	49	49	49	49
50	50	50	50	50	50
51	51	51	51	51	51
52	52	52	52	52	52
53	53	53	53	53	53
54	54	54	54	54	54
55	55	55	55	55	55
56	56	56	56	56	56
57	57	57	57	57	57
58	58	58	58	58	58
59	59	59	59	59	59
60	60	60	60	60	60
61	61	61	61	61	61
62	62	62	62	62	62
63	63	63	63	63	63
64	64	64	64	64	64
65	65	65	65	65	65
66	66	66	66	66	66
67	67	67	67	67	67
68	68	68	68	68	68
69	69	69	69	69	69
70	70	70	70	70	70
71	71	71	71	71	71
72	72	72	72	72	72
73	73	73	73	73	73
74	74	74	74	74	74
75	75	75	75	75	75
76	76	76	76	76	76
77	77	77	77	77	77
78	78	78	78	78	78
79	79	79	79	79	79
80	80	80	80	80	80
81	81	81	81	81	81
82	82	82	82	82	82
83	83	83	83	83	83
84	84	84	84	84	84
85	85	85	85	85	85
86	86	86	86	86	86
87	87	87	87	87	87
88	88	88	88	88	88
89	89	89	89	89	89
90	90	90	90	90	90
91	91	91	91	91	91
92	92	92	92	92	92
93	93	93	93	93	93
94	94	94	94	94	94
95	95	95	95	95	95
96	96	96	96	96	96
97	97	97	97	97	97
98	98	98	98	98	98
99	99	99	99	99	99
100	100	100	100	100	100