

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Krajnik,
Kierownik Katedry Opieki Paliatywnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Agaty Ciechanowskiej**

pt. „Comparison of immunological changes occurring after injury to the central and peripheral nervous systems and investigation of the influence of pharmacological modulation of selected chemokines on nociceptive transmission in mice” wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Miki.

Zgodnie z definicją Międzynarodowego Towarzystwa Badań nad Bólem, ból to nieprzyjemne doznanie czuciowe i emocjonalne związane z, lub przypominające to związane z faktycznym lub potencjalnym uszkodzeniem tkanek. Przyjmuje się, że ból przewlekły to ból, który utrzymuje się po normalnym czasie zdrowienia, co oznacza, że nie pełni żadnej roli ostrzegawczej, jaką przypisuje się nocycepcji w sytuacjach ostrych. Ocenia się, że ból przewlekły dotyka około 20% ludzi na świecie i jest powodem 15-20% wizyt u lekarza. Często prowadzi do wielowymiarowego cierpienia, do szeregu ograniczeń w życiu codziennym, a także do zwiększenia obciążenia finansowego dla chorego i społeczeństwa. Według najnowszego podejścia do klasyfikacji chorób, ból przewlekły został przedstawiony jako konkretne rozpoznanie kliniczne, będące albo chorobą samą w sobie (ból przewlekły pierwotny) albo zespołem towarzyszącym innemu schorzeniu (ból przewlekły wtórny). Międzynarodowe Towarzystwo Badań nad Bólem definiuje ból przewlekły jako ten utrzymujący się dłużej niż 3 miesiące. Co ważne, coraz częściej podkreśla się, że ból jest osobistym doświadczeniem, na które wpływają w różnym stopniu czynniki biologiczne, psychosocjalne, a w ostatnim czasie bada się też znaczenie czynników duchowych. Wskazuje się na to, iż tego, co oznacza dla niego ból, człowiek uczy się przez swoje życie oraz że należy respektować to, jak chory doświadcza swój ból i dostrzegać jego wpływ na funkcjonowanie i dobrostan człowieka.

Ból nie jest więc tożsamy z nocycępcją, niemniej poznanie jej mechanizmów jest podstawą poszukiwań optymalnych terapii mających na celu łagodzenie bólu. Jednym z wyzwań dla medycyny bólu pozostaje ból neuropatyczny, czyli ten spowodowany uszkodzeniem lub chorobą somatosensorycznej części układu nerwowego. Do najczęstszych zespołów obwodowego bólu neuropatycznego zalicza się bolesną neuropatię cukrzycową, neuralgię trójdzielną i popółpaścową, przetrwały ból pooperacyjny i pourazowy, zespół wielobjawowego bólu miejscowego, ból neuropatyczny w chorobie nowotworowej i w przebiegu infekcji wirusem HIV, a także bóle po amputacji. Ból ośrodkowy występuje znacznie rzadziej i zalicza się do niego ośrodkowy ból pourazowy, pourazowy ból rdzeniowy, ośrodkowy ból w chorobie Parkinsona, w innych chorobach neurozwyrodnieniowych, w jamistości rdzenia i w stwardnieniu rozsianym. W przypadku stanu po urazowym uszkodzeniu mózgu (TBI, ang. Traumatic Brain Injury) ból może wynikać z równoczesnych obrażeń (takich jak skręcenia, złamania, zranienia) lub zmian o charakterze neuropatycznym (takich jak uszkodzenie rdzenia kręgowego lub nerwu obwodowego), albo bezpośrednio z TBI (bóle głowy, skostnienia heterotopowe, spastyczność). Niedawne badanie opublikowane w *The Journal of Head Trauma Rehabilitation* (w oficjalnym czasopiśmie Brain Injury Association of America) wskazało na to, iż przewlekły ból obejmujący bóle głowy lub bóle w dowolnym miejscu ciała, które występują przez ponad połowę dni w ciągu trzech miesięcy, dotyka około 60% osób żyjących po TBI, nawet do 30 lat po urazie. Spośród ponad 3800 respondentów, 46% zgłosiło ból przewlekły obecnie, 14% - ból przewlekły w przeszłości (po TBI), z czego 32,5% uczestników z obecnym przewlekłym bólem zgłaszało ciągły ból. W porównaniu z uczestnikami, którzy nie zgłaszali przewlekłego bólu po TBI lub tylko przewlekły ból w przeszłości, osoby z obecnym bólem przewlekłym miały znacznie gorsze wyniki we wszystkich trzech pomiarach wyników uwzględnionych w ankiecie: motorycznej i poznawczej ocenie Functional Independence Measure, Disability Rating Scale i Glasgow Outcome Scale – Extended. Badacze podkreślają, iż pomimo że badanie nie miało charakteru podłużnego, to dane sugerują, iż przewlekły ból występuje w różnym czasie po urazie i że może zakłócać rekonwalescencję i rehabilitację, co wymaga jego proaktywnej oceny i leczenia.

Podsumowując, ból przewlekły, a zwłaszcza ból neuropatyczny ośrodkowy i obwodowy stanowi bardzo duże wyzwanie w odniesieniu zarówno do jego diagnozowania, jak i leczenia, pomimo coraz większej wiedzy na temat jego mechanizmów powstawania i sensytyzacji oraz badań nad skutecznością i bezpieczeństwem leków stosowanych w jego leczeniu.

Podjęcie przez Doktorantkę badań w zakresie porównania zmian immunologicznych po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego oraz zbadanie wpływu farmakologicznej modulacji wybranych chemokin na transmisję nocycyptywną u myszy jest niewątpliwie cennym działaniem w tym deficytowym obszarze naukowym. Na rozprawę doktorską składa się pięć artykułów oryginalnych opublikowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, o łącznej wartości Impact Factor = 22.695 oraz 580 punktów MEN.

Trzy pierwsze prace opisują badania z wykorzystaniem modelu urazowego uszkodzenia mózgu, prowadzone we współpracy międzynarodowej w ramach projektu grantowego ERA-NET NEURONCOFUND/1/LEAP/15/1. Badano w kilku punktach czasowych zmiany ekspresji mRNA/białka markerów komórkowych, czynników układu dopełniacza, chemokin z rodziny MIP-1 (CCL3, CCL4, CCL9) i ich receptorów (CCR1, CCR5) oraz XCL1 i jej receptorów (XCR1, ITGA9) w korze, wzgórzu, prążkowie i/lub hipokampie. Ponadto oceniano źródła komórkowe wybranych czynników immunologicznych i określano lokalizacje ich receptorów. Dwie kolejne prace opisują badania z wykorzystaniem modelu uszkodzenia nerwu obwodowego, prowadzone w ramach dwóch projektów grantowych: Opus 2016/21/B/NZ4/00128, a następnie Opus 2021/43/B/NZ7/00230. Określono w nich w kilku punktach czasowych zmiany ekspresji mRNA/białka markerów komórkowych, chemokin z rodziny MIP-1 i ich receptorów oraz XCL1 i jej receptorów w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego. Oceniano również wpływ neutralizacji chemokin i blokady ich receptorów na procesy nocycypcji w modelu bólu neuropatycznego, a także na przeciwbólowe działanie leków opioidowych.

W dwóch pierwszych pracach opublikowanych w *International Journal of Molecular Sciences* oraz w *Immunobiology* wykazano, że w zależności od czasu i badanego obszaru, różne typy komórek odgrywają rolę po uszkodzeniu mózgu. Szczególnie ciekawe wydaje się być wykazanie silnej aktywacji astrogleju oraz mikrogleju/makrofagów po raz pierwszy we wszystkich 4 badanych strukturach mózgu. W dalszej części eksperymentów pokazano, iż wśród inicjatorów klasycznej drogi aktywacji układu dopełniacza cały kompleks C1, a dla drogi lektynowej fikolina A, odgrywają rolę po uszkodzeniu mózgu we wszystkich badanych strukturach mózgu. Wykazano również zmiany ekspresji chemokin z rodziny MIP-1 (CCL3, CCL4, CCL9) na poziomie kory, prążkowie i hipokampa po uszkodzeniu mózgu. W trzeciej pracy opublikowanej w *Pharmacological Report*, Doktorantka starała się określić zaangażowanie chemokiny XCL1 i jej receptorów (XCR1, ITGA9) w zmiany zachodzące po uszkodzeniu mózgu. Po raz pierwszy wykazano podniesienie poziomu XCL1 w korze

mózgowej, hipokampie i wzgórzu zarówno w fazie wczesnej jak i późnej. Sugeruje to potencjalne znaczenie wykorzystania receptorów dla tej chemokiny jako punktów uchwytu dla farmakoterapii po urazowym uszkodzeniu mózgu. W czwartej pracy opublikowanej w Brain Science wykazano w pierwszym tygodniu po uszkodzeniu nerwów obwodowych aktywację mikrogleju/makrofagów oraz astrogleju, którego poziom pozostawał podniesiony aż do 35 dnia. Wykazano również zmiany ekspresji CCL3 i CCL9 na poziomie rdzenia kręgowego po uszkodzeniu nerwu kulszowego. W badaniach behawioralnych dowiedziono antynocycyptycznego działania blokady CCL3 i CCL9 przez przeciwciała neutralizujące. Ponadto wykazano, że tego typu blokada nasila przeciwbólowe działanie morfiny. Po raz pierwszy dowiedziono, iż podanie podpajęczynówkowe antagonisty CCR1 i antagonistów CCR5 poprawia efektywność morfiny oraz zmniejsza nadwrażliwość bólową rozwiniętą w bólu neuropatycznym wywołanym podwiązaniem nerwu kulszowego. W piątej pracy opublikowanej we Frontiers in Immunology Doktorantka określała zaangażowanie chemokiny XCL1 i jej receptorów (XCR1, ITGA9) w zmiany zachodzące w rdzeniu kręgowym po podwiązaniu nerwu kulszowego. W badaniach immunohistochemicznych wykazano, że XCL1 jest wytwarzana przez astroglej, a jej oba receptory zlokalizowane są na neuronach. Stwierdzono również, że szybki i znaczący wzrost ekspresji XCL1 utrzymuje się na poziomie rdzenia kręgowego aż do 5 tygodni po uszkodzeniu nerwu. Pokazano również, że podanie zdrowym myszom podpajęczynówkowo XCL1, wywołujące nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne, jest osłabiane przez podanie antagonisty XCR1 (vMIP-II) lub przeciwciała neutralizującego ITGA9 (YA4). Wykazano, że po podwiązaniu nerwu kulszowego blokowanie XCL1 oraz jej receptorów nie tylko łagodzi ból, ale nasila działanie analgetyczne opioidów. Interesujące, że w różny sposób, gdyż blokada XCR1 korzystnie wpływa na analgezę wywołaną buprenorfiną, ale nie morfiną, podczas gdy blokada ITGA9 nasila działanie przeciwbólowe obu opioidów.

W mojej ocenie wszystkie publikacje zawarte w cyklu są bardzo wartościowe i spójne. Rozprawa doktorska prezentuje dogłębną ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Warty podkreślenia jest sposób przedstawienia problematyki i dotychczasowych osiągnięć nauki w bardzo przejrzysty i interesujący sposób. Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przemawia za tym pozycja pierwszego autora we wszystkich wysoko cenionych publikacjach cyklu, prowadzenie badań międzynarodowych w ramach grantów badawczych, znajomość i zastosowanie szerokiego wachlarza metod badawczych. W mojej ocenie rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka

pokazała, że aktywne komórki immunologiczne i glejowe mogą mieć kluczowe znaczenie w zmianach będących skutkiem uszkodzenia układu nerwowego i że ważną częścią terapii mogą stać się leki wpływające na funkcje neutrofilii, makrofagów, mikrogleju i astrogleju w ośrodkowym układzie nerwowym. Niewątpliwie bardzo duże znaczenie ma pokazanie potencjału dla zastosowania leczenia opartego na hamowaniu aktywacji inicjatorów układu dopełniacza (C1q i fikoliny A), chemokin (XCL1, CCL3) i blokowania ich receptorów (CCR1, CCR5, XCR1, ITGA9) u chorych po uszkodzeniach mózgu i nerwów obwodowych. Zwłaszcza ciekawe i nowatorskie było wykazanie wpływu blokowania XCL1 i jej receptorów na działanie analgetyczne morfiny i buprenorfiny. Ma to znaczenie dla praktyki klinicznej ze względu na zmniejszoną efektywność opioidów w bólu neuropatycznym w porównaniu z bólem nocyceptywnym. Zarówno wartość poznawcza, jak i potencjalny wpływ tych publikacji na kolejne badania oraz w dalszej perspektywie na samą praktykę kliniczną mogą przyczynić się do poprawy opieki nad pacjentami. Końcowe wyniki i wnioski, które Doktorantka prezentuje w podsumowaniu wersji drukowanej dysertacji są spójne z założeniami pracy i osiągniętymi rezultatami. Byłoby ciekawe, gdyby Doktorantka przedstawiła w czasie obrony doktorskiej immunologiczne podobieństwa i różnice pomiędzy uszkodzeniami obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego.

Uwagi formalne do przedstawionej wersji drukowanej rozprawy doktorskiej: praca została przygotowana niezwykle skrupulatnie i przejrzysto, stąd można w niej znaleźć jedynie pojedyncze błędy edytorskie. W tabeli 8 pomyłkowo wpisano dwukrotnie XCL1, zamiast XCL1 i XCR1. W podrozdziale „Terapia” sugerowałabym podanie lidokainy jako przykładu środka znieczulenia miejscowego – kapsaicyna należy do leków działających powierzchniowo, ale ze względu na mechanizm działania nie można zaliczyć jej do środków znieczulających miejscowo. Dobrze by było uzupełnić o grupy innych niż te wymienione koanalgetyków, na przykład o antagonistów NMDA, czy też agonistów receptora alfa2-adrenergicznego. Doktorantka użyła też określenia, iż „istotną grupę leków stanowią leki wspomagające, zwane także koanalgetykami, które często są także stosowane w celu nasilenia działania leków przeciwbólowych oraz zmniejszania ich efektów niepożądanych”. Należałoby uściślić, że do leków wspomagających zaliczamy dwie grupy środków: 1/ koanalgetyki czyli adjuwanty analgetyczne, oraz 2/ leki stosowane w celu zapobiegania i leczenia objawów niepożądanych związanych ze stosowaniem analgetyków. Te drobne uwagi formalne nie wpływają na ocenę merytoryczną pracy.

Podsumowując, naukowe osiągnięcie „Comparison of immunological changes occurring after injury to the central and peripheral nervous systems and investigation of the influence of

pharmacological modulation of selected chemokines on nociceptive transmission in mice” autorstwa mgr Agaty Ciechanowskiej oceniam bardzo wysoko, jako dzieło, które wnosi bardzo istotne elementy zarówno poznawcze, jak i ważne z punktu widzenia praktyki klinicznej. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2023, poz. 742). Na podstawie powyższej oceny wnioskuję zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Agaty Ciechanowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Ponadto mam zaszczyt wnioskować do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy. Wniosek o wyróżnienie motywuję bardzo wysokim poziomem naukowym dysertacji oraz potencjalnym znaczeniem praktycznym rozprawy, która wpisuje się w starania o poszukiwanie optymalnego leczenia osób po uszkodzeniach mózgu i nerwów obwodowych.

Bydgoszcz, 29.02.2024

Prof. dr hab. med. Małgorzata Krajnik