

Warszawa, 15 lutego 2024

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Agaty Ciechanowskiej

zatytułowanej

Porównanie zmian immunologicznych po uszkodzeniu ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego oraz zbadanie wpływu farmakologicznej modulacji wybranych chemokin

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Ciechanowskiej wykonana została pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. n. med. Joanny Miki w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej wiodącym tematem badań było potencjalne zaangażowanie komórek glejowych w procesy wywoływania nadwrażliwości bólowej spowodowanej wybranymi uszkodzeniami zarówno ośrodkowego jak i obwodowego układu nerwowego. Uszkodzeniom układu nerwowego zazwyczaj towarzyszą zmiany o podłożu neuroimmunologicznym, zaś komórki glejowe (mikroglej, astrocyty) biorą udział w czynnej odpowiedzi komórkowej na bodźce patologiczne, zatem wybór komórek do badań nad reakcjami immunomodulacyjnymi przebiegającymi w tkance nerwowej jest w pełni uzasadniony i stanowi bardzo ciekawe i istotne zagadnienie naukowe. Oprócz komórek glejowych w badaniach zostały uwzględnione pomiary markerów związanych z klasycznymi komórkami odpowiedzi immunologicznej, t.j. neutrofilami oraz limfocytami T Cd8+. Główny cel pracy zakładał stworzenie eksperymentalnych podstaw do rozwoju bardziej selektywnej i skutecznej terapii bólu neuropatycznego poprzez zastosowanie terapii skojarzonej, wykorzystującej nie tylko leki przeciwbólowe, ale także substancje farmakologiczne działające immunomodulująco, wpływając przede wszystkim na chemokiny jako główne cząsteczki sygnałowe w procesach neurozapalnych. Opracowanie wymienionych terapii skojarzonych pozwoliłoby zarówno na zastosowanie skuteczniejszych terapii przeciwbólowych, a także na potencjalne zmniejszenie stosowanych dawek terapeutycznych.

Badania wykonywane przez Doktorantkę prowadzone były na hodowlach pierwotnych mikrogleju i astrogleju pochodzącego z myszy neonatalnych. Neurozapalenie in vitro wywoływane było klasyczną metodą suplementowania pożywki hodowlanej lipopolisacharydem bakteryjnym (LPS). Badania in vivo obejmowały dwa dobrze opracowane modele eksperymentalne: zwierzęcy model urazowego uszkodzenia mózgu (ang. *Traumatic Brain Injury* – model TBI), polegający na kontrolowanym stłuczeniu kory mózgowej przy pomocy specjalistycznej aparatury oraz model podwiązania nerwu kulszowego, co pozwalało oceniać badane zmiany zarówno w ośrodkowym, jak i w obwodowym układzie nerwowym.. Zarówno hodowle in vitro, jak i modele in vivo służyły do zbadania ekspresji spektrum chemokin, pełniących rolę mediatorów stanu zapalnego. W przeprowadzonych badaniach przeanalizowane zostało wydzielanie chemokin sklasyfikowanych w kilku grupach, rozróżnianych na podstawie budowy cząsteczek.

Uzyskane wyniki przeprowadzonej pracy badawczej zostały opublikowane, stanowiąc bardzo logiczną, konsekwentną i dobrze opracowaną sekwencję badań nad możliwością stosowania terapii celowanej, w której punktami uchwytu byłyby wybrane chemokiny i ich receptory w leczeniu bólu neuropatycznego. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska oparta jest na zbiorze 5 prac oryginalnych, które ukazały się w latach 2020-2023 w renomowanych czasopismach o znaczącym współczynniku oddziaływania i wysokiej punktacji MEN (odpowiednio dwie z punktacją wynoszącą 140 i trzy z punktacją 100 punktów, co jest zdecydowanie wyróżniającym się osiągnięciem). Sumaryczny współczynnik oddziaływania wynosi 22.695. Trzy spośród prac oryginalnych wchodzących w skład zbioru zawierają wyniki badań prowadzonych we współpracy międzynarodowej, z zespołem włoskim z Instytutu Badań Farmakologicznych im. Mario Negri w Mediolanie, gdzie m.in. wykonywany był zwierzęcy model mechanicznego uszkodzenia mózgu. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich pięciu publikacjach wchodzących w skład zbioru, Doktorantka występuje jako wiodący, pierwszy Autor.

Zbiór publikacji poprzedzony został obszernym (liczącym 42 strony) opisem, składającym się ze spisu treści, wykazu skrótów, 15-stronnicowego wprowadzenia, opisu metod badawczych oraz syntetycznego opisu zagadnień oraz wyników zawartych w

poszczególnych publikacjach, które w całości zamieszczone zostały w dysertacji. Co więcej, po rozdziale zawierającym prace oryginalne następuje licząca 14 stron część poświęcona dyskusji, co wydaje się być bardzo logicznym układem, zdecydowanie ułatwiającym podążanie za wynikami uzyskiwanymi w ramach tematu wiodącego pracy naukowej. Część merytoryczna podsumowana została spójnymi wnioskami końcowymi. W rozprawie umieszczone zostały zgody odpowiednich komisji etycznych (zarówno dla zespołu polskiego, jak i współpracującego zespołu włoskiego), zezwalające na prowadzenie prac na modelach in vivo, zgodne z zakresem tematyki pracy doktorskiej, a także stosowne oświadczenia współautorów opublikowanych prac oryginalnych.

Pierwsza z prac, realizowana we współpracy międzynarodowej i opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences*, przedstawia wyniki badań nad poziomem markerów wybranych populacji komórek immunologicznych i glejowych, a także inicjatorów oraz enzymów efektorowych klasycznej i lektynowej drogi aktywacji układu dopełniacza w wyniku urazowego uszkodzenia mózgu u myszy. Przeanalizowano ekspresję wybranych inicjatorów układu dopełniacza C1 (w tym C1q, C1r, C1s) oraz czynników zaangażowanych w potencjalną aktywację alternatywnej drogi lektynowej (kolektyna 11, fikolina A oraz fikolina B) w wybranych rejonach mózgu, takich jak kora, prążkowie, wzgórze oraz hipokamp. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że w szczególności komórki mikrogleju mogą być w dużej mierze odpowiedzialne za biosyntezę inicjatorów szlaku klasycznego (a w bardzo niewielkim stopniu szlaku lektynowego), zaś kompleks C1 dopełniacza oraz fikolina A mogą stanowić punkty uchwytu dla opracowywania nowych strategii terapeutycznych w zapobieganiu skutkom neurozapalenia wynikającego z uszkodzenia mózgu,

Procesy inicjowane mechanicznym uszkodzeniem mózgu stanowiły także podstawę pracy badawczej opublikowanej w drugiej z prac składających się na przedstawioną rozprawę doktorską. W zastosowanym mysim modelu eksperymentalnym zbadano poziom chemokin z rodziny MIP-1 oraz ich receptorów w czterech uprzednio badanych rejonach mózgu, odpowiednio 24 godziny i 7 dni po urazie. Jak wykazano, ze względu na zachodzące zmiany w ich ekspresji, dwie chemokiny z rodziny MIP-1 (CCL4 i CCL3) i ich receptory (CCR1 i CCR5) mogą być brane pod uwagę jako cel przy opracowywaniu potencjalnych terapii farmakologicznych.

W trzeciej z prac zawartych w dysertacji doktorskiej badany był udział chemokiny XCL1 w rozwoju uszkodzenia mózgu wywołanego jego mechanicznym urazem, a także zmiany jej poziomu w hodowlach pierwotnych mikrogleju i astrogleju mysiego stymulowanego za pomocą LPS w celu wywołania skutków naśladujących in vitro procesy neurozapalne. Co bardzo interesujące, wykazano, że stymulacja przy zastosowaniu LPS komórek astrogleju, ale nie mikrogleju powoduje zwiększoną ekspresję XCL1, co wskazuje na znaczącą rolę różnych typów komórek glejowych w indukcji i rozwoju procesów zapalnych. Na podstawie uzyskanych wyników można wysnuć wniosek, że obydwa receptory badanej chemokiny-nie tylko klasyczny receptor XCR1, ale także niedawno zidentyfikowany w tej roli receptor ITGA9- mogą stanowić istotne punkty uchwytu dla interwencji farmakologicznej po urazowym uszkodzeniu mózgu.

Kolejne dwie publikacje prezentują wyniki uzyskane przy zastosowaniu mysiego modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego. Pierwsza z nich jest kontynuacją badań nad ekspresją chemokin z rodziny MIP-1, które-jak dowiedziono-mają silne właściwości pronocyceptywne u zdrowych myszy. Ponieważ patofizjologia bólu neuropatycznego pozostaje wciąż niepoznana, Autorzy postanowili zweryfikować, czy chemokiny z rodziny MIP-1 mogą być zaangażowane w procesy uruchamiane w następstwie urazu nerwu kulszowego. Zbadano zatem poziom mRNA wybranych chemokin w rdzeniu kręgowym odpowiednio 24 godziny i 7 dni po wywołaniu urazu, a także zastosowano blokadę receptorów badanych chemokin poprzez jednokrotne podanie farmakologicznych antagonistów wybranych receptorów, w tym J113863 dla CCR1, TAK-220 oraz AZD-5672 dla CCR5. Uzyskane wyniki pozwoliły Autorom wyciągnąć bardzo istotny z punktu widzenia opracowywania nowych terapii wniosek, że farmakologiczna blokada zarówno CCL3, jak i CCR1 oraz CCR5 może być korzystna w przypadku terapii skojarzonej z lekami opioidowymi.

Druga z prac wykonanych na mysim modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego dotyczyła wcześniej badanej chemokiny XCL1 oraz jej receptorów, tym razem w rdzeniu kręgowym. Istotnym osiągnięciem było wykazanie, że neutralizacja XCL1 za pomocą przeciwciał oraz blokada obydwu receptorów za pomocą vMIP-II (antagonista XCR1) i YA4 (przeciwciało neutralizujące ITGA9) zmniejsza nadwrażliwość termiczną i mechaniczną u myszy. W ten sposób przeprowadzone badania


pokazały po raz pierwszy, że sygnalizacja XCL1/XCR1 i XCL1/ITGA9 przyczynia się do rozwoju nadwrażliwości bólowej.

Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej cechuje bardzo wysoko istotność postawionych pytań badawczych oraz szeroki wachlarz stosowanych metod, w skład których wchodzi modele badawcze *in vitro* oraz *in vivo*, techniki molekularne, testy behawioralne, a także modulacja badanych ścieżek sygnałowych przy zastosowaniu wybranych związków farmakologicznych. Uzyskane wyniki wnoszą nową, cenną wiedzę do badan podstawowych, a także mają wysoki potencjał aplikacyjny, ze względu na fakt, że efektem każdej z przeprowadzonych prac eksperymentalnych było wskazanie potencjalnych punktów uchwytu do opracowywania nowych czy też skojarzonych terapii przeciwzapalnych i przeciwbólowych.

To co zwraca szczególną uwagę w pracach wchodzących w cykl zbioru będącego podstawą rozprawy doktorskiej, są m.in. znakomitej jakości zdjęcia z mikroskopu konfokalnego, wzbogacone wizualizacją przestrzenną 3D, co pozwala na lepsze zrozumienie i interpretację otrzymywanych wyników, jak to ma miejsce np. w przypadku lokalizacji kompleksu C1 dopełniacza (Ryciny 5, 6 i 8 w pracy nr 1 wchodzącej w skład dysertacji doktorskiej).

Z ogromnym zainteresowaniem zapoznałam się ze wszystkimi pracami oryginalnymi wchodzącymi w skład zbioru stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej. Jak wspomniałam wcześniej, warsztat badawczy jest bardzo szeroki, a uzyskane wyniki bardzo interesujące. Mam w związku z tym do Doktorantki kilka pytań. Pierwsze z nich dotyczy prowadzonych hodowli pierwotnych astrogleju i mikrogleju, które należą do dość trudnych metod badawczych. Komórki izolowane były z mózgow szczerów neonatalnych. Czy Doktorantka może podać, jaki udział procentowy miały frakcje odpowiednio astrocytarna i mikroglejowa w neonatalnym mózgu myszy? Kolejne pytanie dotyczy potencjału aplikacyjnego uzyskanych wyników. Bardzo interesujące wydaje się być zagadnienie, jak bardzo różnią się chemokiny ludzkie i gryzoni, jaki jest aktualny stan wiedzy na ten temat?

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Agaty Ciechanowskiej jest pracą wybitną i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i



nauce (t.j. Dz.U. 2023, poz. 742) i zwracam się do 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.

Biorąc pod uwagę bardzo wysoką jakość przedstawionych badań i ich znaczenie aplikacyjne oraz opublikowanie uzyskanych wyników w postaci 5 prac oryginalnych z pierwszym autorstwem Doktorantki i we współpracy międzynarodowej w renomowanych czasopismach międzynarodowych o znaczącym współczynniku oddziaływania, z przyjemnością wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Dr hab. n. med. Joanna Sypecka, prof. IMDiK PAN