

Prof. dr hab. n. med. Ewa Obuchowicz
Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Kwiatkowski

New strategies in neuropathic pain pharmacotherapy based on the modulation of the functions of chemokine receptors.

Nowe strategie w farmakoterapii bólu neuropatycznego oparte na modulacji funkcji receptorów chemokinowych.

Badania, które są podstawą przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej dotyczyły roli układu chemokinowego w rozwoju i utrzymywaniu się bólu neuropatycznego. W zwierzęcym modelu bolesnej neuropatii oceniono efekty modulacji rec. chemokinowych CCR2 i CCR5 w aspekcie patomechanizmu i terapii bólu neuropatycznego.

Uważam, że wybór tematu pracy jest uzasadniony. Nie mamy bowiem skutecznych leków w walce z bólem neuropatycznym, ponieważ jego patomechanizm nie został dotychczas w pełni poznany. Konieczne jest zatem prowadzenie badań, których wyniki pozwolą na zaproponowanie nowych punktów uchwytu działania leków lub wskażą możliwości wprowadzenia bardziej skutecznej terapii skojarzonej. Takie były cele doświadczeń Pani mgr, które dotyczyły roli wybranych ligandów receptorów chemokinowych CCR2 i CCR5 w procesach nocycypcji oraz efektów modulacji wymienionych receptorów w bolesnej neuropatii. Założenia projektu badawczego realizowanego przez Panią mgr nawiązują do stwierdzenia, że istotne znaczenie dla patomechanizmu bólu neuropatycznego mają interakcje neuro-immunologiczne, w których pośredniczą chemokiny i cytokiny.

Rozprawa doktorska została przygotowana **na podstawie pięciu prac** (czterech prac oryginalnych i jednej przeglądowej) opublikowanych w latach 2017 – 2020 w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania; *Journal of Neuroimmune Pharmacology* (IF=3.664), *Cytokine* (IF=2.952), *Frontiers in Immunology* (IF=7.561), *International Immunopharmacology* (IF=4.932), *Pharmacological Reports* (IF=2.761). **Łączny impact factor 21.87 (pkt MNiSW=370)** Opublikowanie badań w takich czasopismach niewątpliwie potwierdza ich interesującą tematykę,

prawidłowe zaplanowanie i przeprowadzenie, jak również właściwą interpretację uzyskanych wyników.

Ważną częścią cyklu prac będącego podstawą rozprawy jest praca przeglądowa, w której Autorka omówiła mechanizmy bólu neuropatycznego zwracając szczególnie uwagę na rolę chemokin w bolesnej neuropatii i kwestię wpływu chemokin na działanie leków opioidowych. Publikacja ta świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym jej Autorki do prowadzenia badań.

Projekt badawczy został zrealizowany w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN pod kierunkiem eksperta w badaniach nad bólem, prof. dr hab. n. med. Joanny Miki, która od szeregu lat konsekwentnie zajmuje się zmianami neuroimmunologicznymi towarzyszącymi bolesnej neuropatii. Badania zostały sfinansowane z grantów uzyskanych w ramach konkursów NCN: Harmonia 5, Opus 11 oraz Preludium 15. Pani mgr Kwiatkowski jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach, a pozostali współautorzy złożyli oświadczenia potwierdzające Jej istotny udział w opracowaniu koncepcji badań, ich realizacji oraz przygotowaniu prac do druku. Warto podkreślić, że ten etap pracy naukowej zakończony przygotowaniem rozprawy doktorskiej był kontynuacją badań, których efektem było uzyskanie przez Kandydatkę tytułu magistra, co świadczy o Jej zainteresowaniu patomechanizmem i terapią bólu neuropatycznego. W tych wcześniejszych badaniach z Jej udziałem wykazano wzrost ekspresji CCR5 na poziome rdzenia kręgowego po uszkodzeniu nerwu obwodowego, a na podstawie badań behawioralno-biochemicznych po raz pierwszy stwierdzono, że marawirok (antagonista rec. CCR5) osłabia symptomy bólu neuropatycznego i nasila działanie przeciwbólowe opioidów.

Rozprawa została przygotowana zgodnie z zaleceniami Komisji Rady ds. Prowadzenia Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora Instytutu Farmakologii im. J. Maja PAN i zawiera spis artykułów stanowiących podstawę rozprawy, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w j. polskim i angielskim. W bardzo dobrze zredagowanych podrozdziałach *Wprowadzenia* Autorka omawia ważne zagadnienia, które dobrze uzasadniają wybór tematu badań. Przedstawia informacje dotyczące etiopatogenezy bólu neuropatycznego, odnosi się do znaczenia interakcji neuroimmunologicznych z udziałem cytokin i chemokin, po czym przechodzi do charakterystyki receptorów chemokinowych CCR2 i CCR5 oraz ich endogennych ligandów min. w aspekcie ich roli w transmisji nocyceptywnej. Zwraca uwagę na niską skuteczność farmakoterapii w bólu neuropatycznym i możliwość uzyskania silniejszej analgezji opioidowej w wyniku modulacji układów chemokinowych. Na taki efekt wskazują również prace wcześniej zrealizowane w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii PAN. Tekst *Wprowadzenia* ilustrują trzy dobrze opracowane ryciny.

Cel główny i cztery cele szczegółowe badań zostały jasno sprecyzowane. Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy

IF PAN w Krakowie (kopie Uchwał zostały załączone). Badania *in vivo* zostały przeprowadzone na zwierzętach (szczury szczepu Wistar, myszy szczepu Albino Swiss) w modelu bólu neuropatycznego polegającym na podwiązaniu nerwu kulszowego lub na zwierzętach naiwnych. Pani mgr zapewne dobrze opanowała warsztat badawczy, gdyż wcześniej, przygotowując pracę magisterską, uczestniczyła w eksperymentach biochemiczno-behawioralnych realizowanych w tym samym modelu doświadczalnym. Stopień nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne oceniano odpowiednio przy użyciu testu von Freya oraz zimnej płytki. Substancje narzędziowe podawano u myszy jednorazowo podpajęczynówkowo lub dootrzewnowo, a u szczurów wielokrotnie podpajęczynówkowo przez zaimplantowaną kaniulę. W homogenatach tkankowych z rdzenia kręgowego (odcinka lędźwiowego L4-L6) i/lub zwojów korzeni grzbietowych oceniano zmiany w czynnikach nocycyptywnych na poziomie ekspresji mRNA (metodą RT-qPCR) i białka (metodą Western-blot i Luminex xMAP). W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na stymulowanych lub niestymulowanych LPS pierwotnych hodowlach mikrogleju lub astrogleju pozyskanych z kory mózgowej jednodniowych noworodków szczurzych analizowano ekspresję mRNA dla wybranych chemokin. Opis metodologii badań ilustrują dwie ładnie opracowane ryciny. Analiza statystyczna wyników została właściwie przeprowadzona.

Doświadczenia zostały dobrze zaplanowane. Na uwagę zasługuje kompleksowe podejście eksperymentalne dla weryfikacji postawionych hipotez badawczych. Na przykład, żeby wykazać rolę endogennych ligandów rec. CCR2 w bolesnej neuropatii analizowano najpierw zmiany w ich ekspresji na poziomie rdzenia kręgowego u myszy neuropatycznych. Następnie u myszy naiwnych oceniano po jednorazowym podaniu podpajęczynówkowym efekty pro-bólowe chemokin, których ekspresja była zwiększona w neuropatii, jak również u myszy neuropatycznych efekty przeciwbólowe po podaniu podpajęczynówkowym przeciwciał skierowanych przeciwko działającym pro-bólowo chemokinom. Uzyskane w ten sposób spójne wyniki pozwoliły na wyciągnięcie dobrze uzasadnionych wniosków.

W podrozdziale *Główne zagadnienia doktoratu* Autorka przy każdej publikacji załączonej w wersji oryginalnej przedstawiła, w starannie przemyślanej formie, najważniejsze wyniki danej serii doświadczeń i ich znaczenie. Pięć zamieszczonych własnych rycin dobrze ilustruje schematy lub założenia badań.

Doświadczenia przeprowadzone przez Panią mgr przyniosły szereg wyników, które mają istotną wartość merytoryczną, a co więcej, część z nich ma charakter nowatorski. Bardzo ważnym wynikiem badań, o potencjalnym znaczeniu praktycznym jest stwierdzenie, że w bólu neuropatycznym podany jednorazowo obwodowo cenicriwirok – antagonistą rec. CCR2 i CCR5 działa przeciwbólowo silniej niż selektywni antagoniści rec. CCR2 lub CCR5, odpowiednio – RS504393 lub marawirok oraz nasila działanie analgetyczne morfiny i buprenorfiny. Spośród

wymienionych związków ceniciwirok po podaniu ośrodkowym indukował najsilniejsze zmiany w ekspresji chemokin (ligandów rec. CCR2 i/lub CCR5) w rdzeniu kręgowym i/lub zwojach rdzenia kręgowego u szczurów neuropatycznych. Uzyskane przez Panią mgr wyniki mają tym większe znaczenie, że marawirok jest już zarejestrowany jako lek w terapii zakażeń wirusem HIV, a ceniciwirok jest w ostatniej fazie badań klinicznych. Doświadczenia, w których oceniano działanie analgetyczne wspomnianych antagonistów były zainspirowane wcześniejszymi badaniami, w których wykazano zmiany w podrodziny chemokin CC towarzyszące bolesnej neuropatii. Zaobserwowano następujące zmiany 1). u szczurów neuropatycznych wzrost ekspresji CCR2 i CCR5 na poziomie rdzenia kręgowego i zwojów korzeni grzbietowych; 2). wzrost ekspresji chemokin: CCL2 (ligand rec. CCR2) oraz CCL7 i CCL12 (ligandy rec. CCR2 i CCR5) na poziomie rdzenia kręgowego u myszy neuropatycznych; u myszy kontrolnych nadwrażliwość na bodźce termiczne i mechaniczne po podaniu ośrodkowym chemokin CCL2 i CCL7, a po ich neutralizacji analgezję u myszy neuropatycznych i silniejszy efekt przeciwbólowy opioidów; 3). po raz pierwszy po wielokrotnym podaniu ośrodkowym analgetyczne działanie wymienionych wyżej antagonistów rec. CCR2 i/lub CCR5 związane z hamowaniem aktywacji mikrogleju/makrofagów, komórek satelitarnych. Ponadto wyniki badań wzbogaciły wiedzę na temat znaczenia aktywacji kom. glejowych dla transmisji bólowej oraz roli pro-nocyceptywnych interleukin i chemokin z podrodziny CC.

W dobrze napisanej dyskusji Autorka odnosząc się do dostępnego piśmiennictwa analizuje uzyskany materiał doświadczalny. Przedstawia wyniki, które wskazują na udział badanych cytokin pro-nocyceptywnych (IL-1beta, IL-18, IL-6) i chemokin (CCL2 – ligand rec. CCR2; CCL5, CCL3, CCL4, CCL11 – ligandy rec. CCR5; CCL7 i CCL12 – ligandy rec. CCR2 i CCR5) w złożonym patomechanizmie bólu neuropatycznego. Autorka wykazała, że z tej grupy endogennych substancji kluczową rolę w rozwoju bolesnej neuropatii odgrywa CCL2 i CCL7. Omawia wyniki badań, w tym również wcześniejszych badań przeprowadzonych przez zespół z którym pracowała, które dowodzą, że sygnalizacja opioidowa zależna jest od chemokin, w tym ligandów rec. CCR2 i CCR5, a następnie przedstawia potencjalne możliwości zastosowania przeciwciał neutralizujących chemokiny CCL2 i CCL7 lub antagonisty rec. CCR2 i CCR5 w monoterapii bólu neuropatycznego bądź celem nasilenia analgezji opioidowej. Te interesujące nowe rozwiązania terapeutyczne opierają się przede wszystkim na nowatorskich badaniach Pani mgr, ale znajdują również poparcie w wynikach prac doświadczalnych innych autorów.

Całość opracowania kończą podrozdziały *Podsumowanie wyników* i *Wnioski końcowe*.

Bibliografia liczy 166 pozycji. Autorka cytuje aktualne piśmiennictwo do 2020 roku.

Pytania:

1. Czym można by tłumaczyć fakt, że badane związki: RS504393, marawirok i cenicriwirok podane wielokrotnie podpajęczynówkowo u szczurów neuropatycznych podobnie hamowały rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej po mimo zróżnicowanego efektu na ekspresję badanych chemokin, natomiast u myszy neuropatycznych po jednorazowym podaniu podpajęczynówkowym lub dootrzewnowym cenicriwirok działał najsilniej ? Czy planowana jest również ocena działania cenicriwiroku po wielokrotnym podaniu dootrzewnowym ?
2. Obserwacje kliniczne wskazują, że buprenorfina jest bardziej skuteczna w terapii bolesnej neuropatii, niż morfina, która podana kilkakrotnie wywołuje hiperalgezę. Czy różnice te można wiązać z innym wpływem wymienionych opioidów na chemokiny i cytokiny ?

W ostatniej części recenzji chciałam zwrócić uwagę na dorobek naukowy Kandydatki. Pani mgr jest współautorką 16 prac opublikowanych w latach 2014 – 2020 w czasopismach o wysokim współczynniku IF (łącznie IF=55.128; pkt MNiSW=821). Otrzymała stypendium prezesa Polskiej Akademii Nauk, stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej oraz stypendium z funduszu Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego przyznawane przez MNiSW. Te naukowe osiągnięcia, tak jak przedstawiona do oceny bardzo dobrze przygotowana rozprawa doktorska, niewątpliwie świadczą o Jej dużym zainteresowaniu pracą badawczą, dużym zaangażowaniu w prowadzone badania i umiejętnościach predysponujących do pracy naukowej.

Podsumowując, rozprawę mgr Klaudii Kwiatkowskiej oceniam bardzo wysoko. Podstawą rozprawy jest spójny tematycznie cykl prac, w których Autorka przedstawiła jednoznaczne wyniki dotyczące znaczenia interakcji neuroimmunologicznych z udziałem pewnych chemokin i interleukin dla patomechanizmu bólu neuropatycznego, jak również propozycje nowych strategii terapeutycznych opartych na modulacji funkcji rec. CCR2 i CCR5. Na uwagę zasługuje zarówno ciekawy, dobrze uzasadniony pomysł zrealizowanego projektu, właściwy warsztat badawczy, nowatorski charakter części badań, umiejętność analizy wyników i wyciągania wniosków, co zaowocowało opublikowaniem pięciu prac w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Z przyjemnością stwierdzam, że praca mgr Klaudii Kwiatkowskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk i mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN wniosek o dopuszczenie Pani mgr do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na istotną wartość merytoryczną pracy, nowatorski charakter części wyników i bardzo staranną formę przedłożonej do recenzji rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Katowice 14 grudnia 2021 r.

/-/ prof. Ewa Obuchowicz