

Kraków, 3 stycznia 2018 r.

**Wpływ farmakologicznej modulacji wybranych receptorów purynergicznym oraz Toll-
podobnych na rozwój bólu neuropatycznego i efektywność leków opioidowych**

Mgr Agnieszka Magdalena Jurga

Ból neuropatyczny powstaje w wyniku uszkodzenia lub choroby somatosensorycznej części układu nerwowego. Nocycepcja jest procesem adaptacyjnym, spełniającym rolę odruchowo-obronną, umożliwiającym przetrwanie organizmu, natomiast ból neuropatyczny jest wywołany procesem maladaptacyjnym i występuje tylko u części osób, u których doszło do uszkodzenia układu nerwowego. Badania epidemiologiczne dotyczące populacji ogólnej z zastosowaniem walidowanych narzędzi przesiewowych wykazały, iż aktualnie u 7 -8 % dorosłych występuje ból przewlekły o cechach bólu neuropatycznego a jego nasilenie było znamienne wyższe niż w innych rodzajach bólu. Ból neuropatyczny powstaje tylko u określonego odsetka ludzi pomimo bardzo podobnego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego lub nerwów obwodowych. Najczęściej występujące zespoły bólu neuropatycznego spowodowane półpaścem (neuralgia popółpaścowa) i cukrzycą (bolesna polineuropatia cukrzycowa). Rzadziej występujące zespoły bólu neuropatycznego to: neuralgia trójdzielna, neuropatie pourazowe, głównie przetrwały ból pooperacyjny, ból fantomowy i ból ośrodkowy.

Zespół przewlekłego bólu neuropatycznego jest wynikiem końcowym wielu czynników indywidualnych wpływających na jego powstanie, takich jak: etiologia, genotyp, czynniki środowiskowe, dieta, styl życia, co tworzy kombinację patomechanizmów manifestujących się jako fenotyp bólowy.

Ból neuropatyczny jest niewrażliwy na działanie analgetyków nieopiodowych i znacznie mniej wrażliwy na analgetyki opioidowe w porównaniu do bólu receptorowego. U zwierząt doświadczalnych uszkodzenie nerwu powoduje powstanie zachowań bólowych, które obserwuje się prawie u wszystkich osobników. Składa się na to szereg przyczyn, takich jak: genetyczna selekcja zwierząt, powtarzalny model uszkodzenia nerwu, brak doświadczeń bólowych przed uszkodzeniem nerwu, a ponadto u zwierząt nie ma wpływu wyższych funkcji poznawczych ani czynników społeczno - kulturowych.

Patomechanizmy bólu neuropatycznego są zróżnicowane i nie do końca poznane.

Zazwyczaj dzieli się je na obwodowe i ośrodkowe. Mechanizmy obwodowe obejmują nadwrażliwość neuronów obwodowych, wyładowania ektopowe, pączkowanie nowych włókien i powstawanie patologicznych połączeń pomiędzy włóknami. Ważną rolę w tym procesie odgrywają wolne rodniki tleno- i azotcentrowe, jak również ekspresja receptorów waniloidowych z grupy TRPV i receptorów $\alpha 2$ adrenergicznych. Ośrodkowo dochodzi do uszkodzenia zstępujących dróg hamowania bólu, reorganizacji połączeń synaptycznych oraz sensytyzacji ośrodkowej. Znaczącą rolę w chronifikacji bólu neuropatycznego przypisuje się m.in. cytokinom uwalnianym zarówno z komórek Schwanna, jak i z komórek mikrogleju.

Na przestrzeni ostatnich lat rośnie liczba doniesień literaturowych, które przekonywująco sugerują zaangażowanie komórek gleju w rozwój i przebieg bólu neuropatycznego. Aktywacja komórek mikrogleju prowadzi do podniesienia ekspresji receptorów, w tym purynergicznych i Toll-podobnych. Jak wiadomo, zmiany w aktywności ścieżek przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowego, wzrost aktywacji komórek mikrogleju/makrofagów i wydzielaniu czynników pro-nocyceptywnych, prowadzą do osłabienia efektywności opioidów stosowanych w terapii neuropatii. W tej dziedzinie zostały zaprogramowane badania przeprowadzone przez Doktorantkę

Rozprawa zawiera 126 stron, 24 ryciny oraz 11 schematów i 5 tabel. Praca ma układ typowy dla tego typu opracowań. Podzielona została na 7 rozdziałów oraz wykaz zastosowanych skrótów. Praca zawiera streszczenie w języku polski i angielskim, literaturę - 353 aktualne pozycje. Przedstawia także listę 3 publikacji zawierających wyniki uwzględnione w tej rozprawie oraz listę 8 pozostałych publikacji, które ukazały się w czasie trwania studiów doktoranckich. Łączny wskaźnik cytowań dla wszystkich opublikowanych prac wynosi IF=31,2.

Rozdział 1 WPROWADZENIE TEORETYCZNE przedstawione na 27 stronach i zawiera następujące bardzo interesująco i z dużym znanstwem napisane podrozdziały: ból fizjologiczny; ból przewlekły, ze szczególnym uwzględnieniem neuropatycznego; rola gleju w bólu, ze szczególnym uwzględnieniem neuropatii. Wybrane szlaki przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowego w bólu ze szczególnym uwzględnieniem neuropatii: kinazy aktywowane mitogenami, jądrowy czynnik transkrypcyjny κB , kinaza 3-fosfatydiloinozytolu/kinaza białkowa Akt. Wybrane czynniki zaangażowane w procesy bólowe, ze szczególnym uwzględnieniem neuropatii: interleukiny 1β i $1Ra$, interleukiny 18 i 18BP, interleukina 6, interleukina 10, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i ich endogenne inhibitory. Receptory purynergiczne – klasyfikacja i mechanizmy działania oraz rola receptorów purynergicznych w nocycepcji, ze szczególnym uwzględnieniem P2X4R. Receptory Toll-podobne - klasyfikacja i mechanizmy działania oraz rola receptorów Toll-podobnych w nocycepcji, ze szczególnym uwzględnieniem TLR4. Wprowadzenie kończy się podrozdziałem: uzasadnienie przeprowadzonych badań.

Głównym celem rozprawy doktorskiej było zbadanie interakcji neuroimmunologicznych

zachodzących w trakcie rozwoju neuropatii oraz sprawdzenie czy i w jaki sposób zablokowanie wybranych receptorów wpłynie na procesy nocycypcji oraz efektywność leków opioidowych stosowanych w klinice w bólu neuropatycznym. Konstruując schemat eksperymentów Doktorantka skupiła się na przedstawicielach dwóch rodzin receptorów P2X4R purynergicznym oraz receptor TLR4 jako przedstawiciela rodziny Toll-podobnych. Wprowadzenie teoretyczne zostało napisane z ogromną znajomością literatury na temat wielu czynników zaangażowanych w rozwój bólu w zwierzęcych modelach.

W podrozdziale 1.2. Ból przewlekły, ze szczególnym uwzględnieniem neuropatycznego należałoby również wymienić, iż u ludzi rozpoznawany jest również trzeci rodzaj bólu - ból funkcjonalny (np. niespecyficzny ból krzyża, fibromialgia, atypowy ból twarzy, zespół stawu skroniowo-żuchwowego, bóle krocza i inne), w którym patomechanizmy powstawania bólu nie są dokładnie poznane. Rozdział 1 „WPROWADZENIE TEORETYCZNE” z uzasadnieniem przeprowadzonych badań oceniam bardzo wysoko.

W rozdziale drugim Doktorantka przedstawia CELE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ:

1. Zbadanie zmian poziomu P2X4R oraz TLR4 w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych w modelu bólu neuropatycznego
2. Określenie metodami behawioralnymi wpływu antagonistów P2X4R lub TLR4 na rozwój symptomów bólu neuropatycznego
3. Określenie metodami biochemicznymi w modelu bólu neuropatycznego wpływu antagonistów P2X4R i TLR4 na: poziom tych receptorów; stopień aktywność gleju [co określono na podstawie poziomu: białka komórek IBA-1-pozytywnych (mikrogleju/makrofagów) oraz białka komórek GFAP-pozytywnych (astrogleju/komórek satelitarnych)]; poziom wybranych czynników ważnych w nocycypcji; poziom czynników wybranych ścieżek sygnałowych
4. Określenie metodami behawioralnymi w modelu bólu neuropatycznego wpływu antagonistów P2X4R oraz TLR4 na efektywność opioidów: morfiny i buprenorfiny.

Cele pracy zostały przedstawione przez Doktorantkę w sposób bardzo przejrzysty i logicznie zmierzający do realizacji założeń pracy.

W rozdziale trzecim **MATERIAŁ I METODY** Autorka przeprowadziła badania z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych samców szczurów rasy Wistar zgodnie z zaleceniami Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie, wytycznymi Narodowych Instytutów Zdrowia NIH, oraz Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu IASP.

Podpajęczynówkowe podania substancji były możliwe dzięki implantacji kaniul podpajęczynówkowych zgodnie z metodą opisaną przez Yaksh i Rudy.

Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone z wykorzystaniem modelu bólu neuropatycznego z luźnym, jednostronnym podwiązaniem nerwu kulszowego (CCI).

Substancje które zostały użyte w eksperymentach i drogach podania:

- **CORM-2** (CO Releasing Molecule 2) - selektywny antagonistą P2X4R.
- **LPS-RS Ultrapure** (*Lipolysaccharide from Rhodobacter Sphaeroides*) - Selektywny, kompetycyjny antagonistą TLR4

oraz

- **stosowane w klinice leki opioidowe**

- **Morfina** - Agonista receptorów opioidowych μ , κ , δ
- **Buprenorfina** – częściowy agonista receptora opioidowego μ , nocyceptynowego oraz antagonistą receptora opioidowego κ

Opisane powyżej substancje podawane były **podpajęczynówkowo** przez zaimplantowane kaniule polietylenowe. Wielokrotne podania CORM-2 lub LPS-RSU trwały łącznie **9 dni**. Opioidy (morfina lub buprenorfina) podawane były jednorazowo, podpajęczynówkowo w dniu 7 po CCI w jednakowych dawkach. Podanie opioidu poprzedzone było podaniem odpowiedniego antagonisty. Operację podwiązania nerwu przyjęto za dzień 0.

Zastosowane w pracy testy behawioralne to nadwrażliwość na bodźce mechaniczne test von Frey'a oraz nadwrażliwość na bodziec termiczny – test zimnej płytki. Analiza biochemiczna poziomu mRNA: metoda ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, real-time qRT-PCR. Analiza biochemiczna poziomu białka: metoda Western blot. Analizie poddano tkankę pobraną z części lędźwiowego odcinka rdzenia kręgowego i zwojów korzeni grzbietowych odcinka lędźwiowego (L4-L6) po stronie uszkodzenia.

Oceniając rozdział 3 MATERIAŁ I METODY uważam, że przedstawiony został w sposób bardzo przejrzysty, metodyka badań została wybrana i zaprogramowana prawidłowo, co świadczy o rozległej wiedzy Doktorantki w tym zakresie. Zarówno parametry oceny, jak i metody statystyczne zastosowane w badaniach Doktorantki zostały wybrane prawidłowo, a ich zastosowanie warunkowało uzyskanie wiarygodnych wyników.

W rozdziale 4 WYNIKI Autorka przedstawiła w 4 podrozdziałach:

- Wpływ podwiązania nerwu kulszowego u szczura na rozwój objawów bólu neuropatycznego, a także na poziom aktywacji markerów mikrogleju/makrofagów, astrogleju/komórek satelitarnych oraz poziom P2X4R w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych w dniach 2, 7 i 14 po operacji
- Wpływ podpajęczynówkowych podań antagonisty P2X4R na zmiany poziomu nadwrażliwości, aktywacji gleju, poziomu P2X4R oraz czynników nocyceptynowych w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych w szczurzym modelu bólu neuropatycznego w dniu 7

- Wpływ podwiązania nerwu kulszowego u szczura na poziom mRNA i białka TLR4 oraz jego cząsteczek adaptorowych w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych w dniach 2, 7 i 14 po operacji
- Wpływ wielokrotnych podpajęczynówkowych podań antagonisty TLR4 na zmiany poziomu nadwrażliwości, aktywacji gleju, poziomu TLR4 oraz czynników nocycyptywnych w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych w szczurzym modelu podwiązania nerwu kulszowego w dniu 7

Wyniki badań behawioralnych wykazały, że jednostronne podwiązanie nerwu kulszowego prowadzi do rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne oraz równoległe do rozwoju bólu neuropatycznego wzrasta poziom zarówno P2X4R jak i TLR4 w rdzeniu kręgowym. Autorka wykazała, że **obaj zastosowani** antagoniści receptorów P2X4R czyli **CORM-2** oraz TLR4 **LPS-RS Ultrapure** wykazują **podobne efekty analgetyczne** po wielokrotnych podaniach podpajęczynówkowych w dniu 7 po CCI.

Interesującym jest, że **CORM-2** nasila efekt analgetyczny podanych jednorazowo w dniu 7 po CCI opioidów, zarówno **morfiny** jak i **buprenorfiny**, natomiast **LPS-RS Ultrapure** tylko **buprenorfiny**. Wykazane zmiany pozwalają na stwierdzenie, że **skutki aktywacji P2X4R w neuropatii obserwowane są głównie w rdzeniu kręgowym, gdzie spośród komórek układu odpornościowego przeważa mikroglej, a neuroimmunologiczne konsekwencje blokady TLR4 widoczne są głównie w zwojach korzeni grzbietowych, gdzie dominującą populacją posiadającą te receptory na swojej powierzchni są makrofagi**. Obie substancje modulują również poziom czynników nocycyptywnych, choć w odmienny sposób, dlatego ich dalsze badanie w kontekście bólu neuropatycznego może przynieść obiecujące rezultaty. **Istotną przewagą antagonisty P2X4R nad TLR4 jest zdolność do nasilenia efektywności obu badanych opioidów, stosowanych w klinice w terapii bólu**. Podpajęczynówkowe podania LPS-RSU, antagonisty TLR4, nasila działanie przeciwbólowe buprenorfiny, ale nie morfiny.

Rozdział 5 „DYSKUSJA” Autorka logicznie interpretuje uzyskane w badaniach własnych wyniki w oparciu o cytowane pozycje aktualnego piśmiennictwa. Cytowane w pracy piśmiennictwo obejmuje 353 pozycje! W dyskusji autorka wykazała, że posiada nie tylko nowoczesną wiedzę w zakresie mechanizmów powstawania bólu, ale także zdolność logicznego jej wykorzystania.

Rozdział 6 „WNIOSKI” Wysunięte przez Doktorantkę wnioski są spójne z postawionymi celami pracy oraz wynikami przeprowadzonych badań i zawierają:

- Wnioski szczegółowe dotyczące roli **P2X4R** w neuropatii
- Wnioski szczegółowe dotyczące roli **TLR4** w neuropatii

Oraz

- Wnioski końcowe pracy doktorskiej

Rozprawa doktorska jest napisana poprawnym językiem w sposób przejrzysty, lecz

niełatwym do zrozumienia. Doktorantka wykazała się umiejętnością zaprogramowania badań i ich przeprowadzenia w oparciu o właściwą metodykę, umiejętnością interpretowania uzyskanych wyników i posługiwania się piśmiennictwem. Pracę wzbogacają znacznie bardzo dobre schematy graficzne autorstwa Doktorantki, które pomagają w zrozumieniu trudnej tematyki.

Nie znalazłem w pracy istotniejszych błędów wpływających na treść pracy. Dyskusyjne jest np. tłumaczenie definicji bólu jako „niekomfortowe doznanie” zamiast powszechnie stosowanego „nieprzyjemne doznanie czuciowe”. Proponuje również wykreślić włókna A α ze zdania dotyczącego przewodzenia bodźców otrzymanych z mechanoreceptorów oraz proprioreceptorów, które przewodzone są włóknami o dużej średnicy i pozostawić tylko włókna A β . Ponadto buprenorfina klasyfikowana jest jako częściowy agonistą receptorów μ . Uwagi te można uznać za dyskusyjne i nie mają żadnego wpływu na bardzo wysoką ocenę pracy doktorskiej.

Podsumowując uważam, że **przedstawiona do recenzji praca pt. „Wpływ farmakologicznej modulacji wybranych receptorów purynergicznych oraz Toll-podobnych na rozwój bólu neuropatycznego i efektywność leków opioidowych” spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawie doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych, przeto mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie o dopuszczenie mgr Agnieszki Magdaleny Jurgi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Metody zastosowane w badaniach, sposób oceny uzyskanych wyników, rzetelna ich analiza, jak również kliniczna przydatność uzyskanych wyników skłaniają mnie do złożenia wniosku o wyróżnienie tej pracy przez **Wysoką Radę Naukową Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie.**

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn.zm.)

Prof. dr hab. med. Jan Dobrogowski

