

## **ROZPRAWA DOKTORSKA:**

### ***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***

**Klaudia Kwiatkowski**

*Zakład Farmakologii Bólu, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie*

Ból neuropatyczny powstaje w następstwie uszkodzenia lub choroby somatosensorycznego układu nerwowego i przyczynia się do znacznego obniżenia jakości życia pacjentów. Pomimo dostępności wielu różnych środków przeciwbólowych, leczenie tego rodzaju bólu wciąż jest niezwykle trudne, co stanowi bodziec do poszukiwania nowych skutecznych procedur terapeutycznych. Głównym powodem braku efektywnych farmakoterapii jest zróżnicowana etiologia oraz złożone i wciąż nie do końca poznane mechanizmy patofizjologiczne leżące u podstaw bolesnej neuropatii, co podkreśla potrzebę wielokierunkowego podejścia. Na przełomie ostatnich kilku lat dostarczono dowodów eksperymentalnych wskazujących na zaangażowanie interakcji neuroimmunologicznych w powstawanie i utrzymywanie się bólu neuropatycznego. Wydaje się, że szczególne znaczenie w tym procesie mogą mieć chemokiny, co zostało omówione w pracy przeglądowej wchodzącej w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej [Kwiatkowski i Mika, *Pharmacol Rep*, 2018].

Celem badań było określenie roli receptorów chemokinowych z podrodziny CC typu 2 (CCR2) oraz 5 (CCR5), jak również ich endogennych ligandów w rozwoju bólu neuropatycznego. Zaplanowane eksperymenty skupione były na określeniu czy podanie podwójnego antagonisty CCR2 oraz CCR5, wywołuje korzystniejsze efekty niż ich selektywna blokada w zwierzęcym modelu bólu neuropatycznego. Równolegle badano w jaki sposób zastosowana farmakologiczna modulacja wpływa na aktywację komórek glejowych/immunologicznych w układzie nerwowym oraz zachwianą w neuropatii równowagę pomiędzy czynnikami nocyceptywnymi. Ponadto, podjęto próbę określenia wpływu neutralizacji wybranych chemokin na procesy nocycepcji. Z uwagi na to, że efektywność monoterapii bólu neuropatycznego nie jest wystarczająco skuteczna, kolejnym celem było sprawdzenie czy modulacja aktywności CCR2 oraz CCR5, a także ich endogennych ligandów może korzystnie wpływać na przeciwbólowe właściwości leków opioidowych. Badania uwzględniające stosowanie kombinacji leków o różnych mechanizmach działania mogą przyczynić się do opracowania molekularnych podstaw dla terapii skojarzonej przynoszącej silniejsze efekty analgetyczne z mniejszą ilością działań niepożądanych.

Eksperymenty prowadzone były na szczurach rasy Wistar oraz myszach Albino Swiss zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu, Narodowego Instytutu Zdrowia oraz II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie (numery zgód: 1055/2013, 1277/2015, 75/2017). Zastosowany model bólu neuropatycznego polegał na jednostronnym, luźnym podwiązaniu nerwu kulszowego. Badane substancje narzędziowe były podawane jednokrotnie lub wielokrotnie, dwiema drogami: podpajęczynówkowo

lub dootrzewnowo. W badaniach behawioralnych, do oceny nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne, wykorzystano testy von Freya oraz zimnej płytki. Zmiany w poziomie ekspresji mRNA i białka czynników nocyceptywnych określono odpowiednio za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją oraz metody Western blot i Luminex xMAP w homogenatach tkankowych z rdzenia kręgowego i zwojów korzeni grzbietowych oraz w pierwotnych hodowlach komórek glejowych. Do obliczenia istotności statystycznej wykorzystano test t-Studenta oraz analizę wariancji z testem post-hoc.

Wyniki badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej zostały opublikowane w 4 pracach oryginalnych [Kwiatkowski i wsp., *J Neuroimmune Pharmacol*, 2017; *Cytokine*, 2019; *Front Immunol*, 2020; *Int Immunopharmacol*, 2020]. Wykazano, że równolegle z rozwojem nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne, dochodzi do wzrostu ekspresji genów CCR2 i CCR5 na poziomie rdzenia kręgowego oraz zwojów korzeni grzbietowych u szczurów po uszkodzeniu nerwu kulszowego [*J Neuroimmune Pharmacol*, 2017; *Front Immunol*, 2020]. Kolejne eksperymenty, dostarczyły pierwszych dowodów na to, że wielokrotne podpajęczynówkowe podania selektywnego antagonisty CCR2 (RS504393) [*J Neuroimmune Pharmacol*, 2017], selektywnego antagonisty CCR5 (marawiroku) [*Int Immunopharmacol*, 2020] oraz podwójnego antagonisty CCR2/CCR5 (cenicriwiroku) [*Front Immunol*, 2020], osłabiają symptomy bólu neuropatycznego poprzez hamowanie aktywacji komórek IBA-1-pozytywnych, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia produkcji ważnych czynników nocyceptywnych w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych. Ponadto dowiedliśmy, że oprócz interleukin, ważnymi modulatorami transmisji bólowej w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym są również chemokiny, w szczególności CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11 [*Int Immunopharmacol*, 2020]. Przeprowadzone badania behawioralne wykazały, że chemokiny CCL2 i CCL7, ale nie CCL12, podane zwierzętom kontrolnym wywołują nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne, a ponadto ich neutralizacja powoduje analgezję u myszy neuropatycznych [*Cytokine*, 2019].

Podejście farmakologiczne wykorzystujące substancję celującą zarówno w CCR2, jak i CCR5 pozwala zmniejszyć symptomy bólowe. Te korzystne efekty odzwierciedlają również wyniki analizy poziomu mRNA i białka. W szczurzym modelu bólu neuropatycznego wykazano, że cenicriwirok, w porównaniu do selektywnych antagonistów badanych receptorów, w większym stopniu obniża ekspresję pronocyceptywnych chemokin i interleukin zarówno w rdzeniu kręgowym jak i zwojach korzeni grzbietowych [*Front Immunol*, 2020; *Int Immunopharmacol*, 2020]. Co ważne z klinicznego punktu widzenia, po raz pierwszy wykazaliśmy, że podpajęczynówkowe podania cenicriwiroku nasilają przeciwbólowe działanie morfiny i buprenorfiny. Obserwowane efekty mogą wynikać z jego wpływu na ekspresję receptorów opioidowych ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  i nocyceptynowego) w zwojach korzeni grzbietowych oraz z hamowania produkcji pronocyceptywnych czynników przez mikroglej, makrofagi oraz komórki satelitarne [*Front Immunol*, 2020].

Kolejnym krokiem w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena analgetycznych właściwości obwodowego podania selektywnych antagonistów CCR2 (RS504393), CCR5 (marawiroku) oraz podwójnego antagonisty CCR2/CCR5 (cenicriwiroku). Co ważne, nasze wyniki dowiodły, że po podaniach dootrzewnowych spośród trzech testowanych antagonistów, zdecydowanie najlepsze właściwości przeciwbólowe wykazuje cenicriwirok, a dodatkowo nasila działanie leków opioidowych

[*Int Immunopharmacol*, 2020]. Przedstawione osiągnięcie niewątpliwie stanowi ważny punkt wyjścia do poszukiwania nowatorskich rozwiązań w terapii bólu neuropatycznego. Coraz więcej danych literaturowych wskazuje na doskonale efekty przeciwbólowe związków nakierowanych na więcej niż jeden cel molekularny. Korzyści z tego podejścia mogą wynikać z jednoczesnego dostępu do dwóch receptorów w tej samej dawce, a tym samym ze zmiany farmakokinetyki i farmakodynamiki, co w konsekwencji prowadzi do lepszych efektów przeciwbólowych. Biorąc pod uwagę, że receptory opioidowe mogą tworzyć heterodimery z receptorami chemokinowymi, łączne podania agonistów receptorów opioidowych z antagonistami receptorów chemokinowych wydają się być nową ciekawą strategią w uśmierzaniu bólu przewlekłego. Mając na uwadze, że cenicriwirok jest aktualnie testowany w końcowych fazach badań klinicznych dotyczących leczenia dorosłych zakażonych wirusem HIV i leczenia niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby, jego dobre właściwości analgetyczne po podaniach obwodowych wydają się być obiecujące. Otrzymane wyniki doświadczeń mogą posłużyć jako eksperymentalne podstawy do opracowania skutecznej terapii bólu neuropatycznego z zastosowaniem cenicriwiroku, co jednak wymaga dalszych wnikliwych badań.

**Określenie roli systemów chemokinowych w rozwoju i utrzymywaniu się bólu neuropatycznego umożliwia dokładniejsze poznanie różnorodnych mechanizmów jego powstawania oraz wskazuje nowe cele dla przyszłej farmakoterapii. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej sugerują, że CCR2 oraz CCR5, łącznie z ich endogennymi ligandami są kluczowe w transmisji nocyceptywnej. Farmakologiczna modulacja ich aktywności może stanowić całkowicie nowe podejście w terapii bólu neuropatycznego, wykazujące lepsze efekty przeciwbólowe i mniej działań niepożądanych w porównaniu z dostępnymi analgetykami, szczególnie w skojarzeniu z opioidami. Podsumowując, wielokierunkowa strategia leczenia oparta na modulacji interakcji neuronalno-glejowych poprzez zmianę aktywności chemokin z podrodziny CC i ich receptorów może w sposób istotny wpłynąć na poprawę jakości życia pacjentów cierpiących z powodu bólu neuropatycznego.**

#### **Spis artykułów naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej:**

1. Kwiatkowski K, Mika J. *The importance of chemokines in neuropathic pain development and opioid analgesic potency*. *Pharmacol Rep*. 2018; 70:821-830. doi:10.1016/j.pharep.2018.01.006. **IF<sub>2018</sub>=2.761, MNiSW<sub>2017</sub>=25**
2. 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; 12:402-419. doi:10.1007/s11481-017-9729-6. **IF<sub>2017</sub>=3.664, MNiSW<sub>2017</sub>=35**
3. Kwiatkowski K, Popiołek-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; 119:202-213. doi:10.1016/j.cyto.2019.03.007. **IF<sub>2019</sub>=2.952, MNiSW<sub>2019</sub>=100**
4. Kwiatkowski K, Pawlik K, Ciapała K, Piotrowska A, Makuch W, Mika J. *Bidirectional action of cenicriviroc, a CCR2/CCR5 antagonist, results in alleviation of pain-related behaviors and potentiation of opioid analgesia in rats with peripheral neuropathy*. *Front Immunol*. 2020; 11:615327. doi:10.3389/fimmu.2020.615327. **IF<sub>2020</sub>=7.561, MNiSW<sub>2019</sub>=140**
5. 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. doi:10.1016/j.intimp.2020.106540. **IF<sub>2020</sub>=4.932; MNiSW<sub>2019</sub>=70**

## DOCTORAL DISSERTATION:

### *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*

**Klaudia Kwiatkowski**

*Pharmacology of Pain Department, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences in Krakow*

Neuropathic pain is caused by damage to or disease of the somatosensory nervous system and significantly reduces patients' quality of life. Despite the availability of many different analgesics, treating this type of pain remains extremely difficult, which has prompted the search for new effective therapeutic approaches. The main reasons for the lack of effective pharmacotherapy options are the varied aetiology and the complex and incompletely understood pathophysiological mechanisms underlying painful neuropathy, which highlight the need for a multidirectional approach. In the last few years, experimental evidence has suggested the involvement of neuroimmune interactions in the development and maintenance of neuropathic pain. It seems that chemokines may play a specific role in this process, as discussed in a review article [Kwiatkowski and Mika, *Pharmacol Rep*, 2018], which is part of this doctoral dissertation.

The aim of this research was to determine the role of the chemokine receptors type 2 (CCR2) and 5 (CCR5), as well as their endogenous ligands, in the development of neuropathic pain. The proposed experiments focused on determining whether the administration of a dual antagonist of CCR2 and CCR5 provided more beneficial effects than their selective blockade in an animal model of neuropathic pain. At the same time, we investigated how the applied pharmacological modulation influenced the activation of glial/immune cells in the nervous system and how it disturbed the balance between nociceptive factors under neuropathy. Furthermore, we sought to determine the effect of targeted chemokine neutralization on nociception. Since the effectiveness of monotherapy for neuropathic pain is insufficient, another goal was to determine whether the modulation of CCR2 and CCR5 activity, as well as their endogenous ligands, may improve the analgesic effects of opioid drugs. Studies investigating the use of combinations of drugs with different mechanisms of action may reveal the molecular basis for combination therapy that results in stronger analgesic effects and fewer side effects.

The experiments were performed on Wistar rats and Albino Swiss mice in accordance with the guidelines of the International Society for the Study of Pain, the National Institute of Health and the 2<sup>nd</sup> Local Ethical Committee for Animal Experiments at the Maj Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences in Krakow (consent numbers: 1055/2013, 1277/2015, 75/2017). The model of neuropathic pain used was based on unilateral, loose ligation of the sciatic nerve. The tested pharmacological tools were administered once or repeatedly via two methods: intrathecally or intraperitoneally. For behavioural studies, the von Frey and cold plate tests were used to assess hypersensitivity

to mechanical and thermal stimuli. Changes in mRNA expression and protein levels of nociceptive factors in tissue homogenates obtained from spinal cord and dorsal root ganglia and in primary glial cell cultures were determined by reverse transcription polymerase chain reaction and Western blot and Luminex xMAP methods, respectively. Student's t-test and analysis of variance with the post-hoc test were used to calculate the statistical significance.

The research results presented in this doctoral dissertation were published in 4 original papers [Kwiatkowski et al., *J Neuroimmune Pharmacol*, 2017; *Cytokine*, 2019; *Front Immunol*, 2020; *Int Immunopharmacol*, 2020]. In parallel with the development of hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli, there is an increase in the expression of the CCR2 and CCR5 genes in the spinal cord and dorsal root ganglia following sciatic nerve injury in rats [*J Neuroimmune Pharmacol*, 2017; *Front Immunol*, 2020]. Subsequent experiments provided the first evidence that repeated intrathecal administration of a selective CCR2 antagonist (RS504393) [*J Neuroimmune Pharmacol*, 2017], a selective CCR5 antagonist (maraviroc) [*Int Immunopharmacol*, 2020] and a dual CCR2/CCR5 antagonist (cenicriviroc) [*Front Immunol*, 2020] reduces the symptoms of neuropathic pain by inhibiting the activation of IBA-1-positive cells, which in turn leads to reduced production of important nociceptive factors in the spinal cord and dorsal root ganglia. Furthermore, we indicated that apart from interleukins, chemokines, particularly CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, and CCL11, are also important modulators of pain transmission in the central and peripheral nervous systems [*Int Immunopharmacol*, 2020]. Behavioural studies have shown that when administered to naive animals, CCL2 and CCL7, but not CCL12, cause hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli, and their neutralization has an analgesic effect on neuropathic mice [*Cytokine*, 2019].

The pharmacological approach of targeting both CCR2 and CCR5 can attenuate symptoms associated with pain. These positive analgesic effects are also reflected in the analysis of the mRNA and protein levels. In a rat model of neuropathic pain, cenicriviroc reduces the expression of pronociceptive chemokines and interleukins in the spinal cord and dorsal root ganglia to a greater extent compared to selective antagonists of the studied receptors [*Front Immunol*, 2020; *Int Immunopharmacol*, 2020]. We have shown for the first time that intrathecal administration of cenicriviroc potentiates the analgesic effects of morphine and buprenorphine, which is a clinically important result. The observed effects may result from its influence on the expression of opioid receptors ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  and nociceptin) in the dorsal root ganglia and the inhibition of pronociceptive factor production by microglia, macrophages and satellite cells [*Front Immunol*, 2020].

The next step in this doctoral dissertation research was the evaluation of the analgesic effects of the peripheral administration of selective CCR2 (RS504393) and CCR5 (maraviroc) antagonists and the dual CCR2/CCR5 antagonist (cenicriviroc). Importantly, our results showed that following intraperitoneal administration of the three tested antagonists, cenicriviroc exhibits the best analgesic properties by far and enhances the effect of opioid drugs [*Int Immunopharmacol*, 2020]. This discovery is undoubtedly an important

starting point in the search for innovative neuropathic pain treatment approaches. A growing body of evidence from the literature indicates the excellent analgesic effects of compounds with multiple molecular targets. The benefits of this approach may result from simultaneous access to two receptors achieved by the same dose, which leads to changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics, and consequently enhances the analgesic effects. Given that opioid receptors can form heterodimers with chemokine receptors, the combined administration of opioid agonists with chemokine antagonists appears to be a new interesting strategy for the relief of chronic pain. Given that cenicriviroc is currently in the final phase of clinical trials for adult HIV infection and nonalcoholic steatohepatitis treatments, its peripheral analgesic properties are promising. Although the results obtained from the experiments can serve as an experimental basis for the development of cenicriviroc as an effective treatment for neuropathic pain, this approach requires further in-depth research.

**Elucidating the role of chemokine systems in the development and maintenance of neuropathic pain enables a more detailed understanding of the various mechanisms underlying its pathogenesis and the identification of new targets for future pharmacotherapy. The results presented in this doctoral dissertation indicate that CCR2 and CCR5, together with their endogenous ligands, are crucial for nociceptive transmission. Pharmacological modulation of their activity may constitute a completely novel approach in the treatment of neuropathic pain, especially in combination with opioids, possibly leading to improved analgesic effects and fewer side effects compared to those of the available analgesics. In conclusion, a multidirectional treatment strategy based on the modulation of neuronal-glial interactions via changes in the activity of CC chemokines and their receptors may significantly improve the quality of life of patients suffering from neuropathic pain.**

#### **List of scientific articles constituting the basis of the doctoral dissertation:**

1. **Kwiatkowski K, Mika J.** *The importance of chemokines in neuropathic pain development and opioid analgesic potency.* Pharmacol Rep. 2018; 70:821-830. doi:10.1016/j.pharep.2018.01.006. **IF<sub>2018</sub>=2.761, MNiSW<sub>2017</sub>=25**
2. **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; 12:402-419. doi:10.1007/s11481-017-9729-6. **IF<sub>2017</sub>=3.664, MNiSW<sub>2017</sub>=35**
3. **Kwiatkowski K, Popiołek-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; 119:202-213. doi:10.1016/j.cyto.2019.03.007. **IF<sub>2019</sub>=2.952, MNiSW<sub>2019</sub>=100**
4. **Kwiatkowski K, Pawlik K, Ciapała K, Piotrowska A, Makuch W, Mika J.** *Bidirectional action of cenicriviroc, a CCR2/CCR5 antagonist, results in alleviation of pain-related behaviors and potentiation of opioid analgesia in rats with peripheral neuropathy.* Front Immunol. 2020; 11:615327. doi:10.3389/fimmu.2020.615327. **IF<sub>2020</sub>=7.561, MNiSW<sub>2019</sub>=140**
5. **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. doi:10.1016/j.intimp.2020.106540. **IF<sub>2020</sub>=4.932; MNiSW<sub>2019</sub>=70**