



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Farmakodynamiki

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Magdalena Bujalska-Zadrozny

Zakład Farmakodynamiki

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Ul. Banacha 1b

02-097 Warszawa

Warszawa, 24.06.2021r.

RECENZJA

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu Pani mgr Joanny Bogackiej pt. „Znaczenie farmakologicznej modulacji receptora chemokinowego z rodziny C-C typu 4 (CCR4) w bólu neuropatycznym o różnej etiologii” wykonanej w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk im. Jerzego Maja w Krakowie, pod kierunkiem dwóch promotorów: prof. dr hab. n. med. Joanny Mika (dyscyplina: nauki farmaceutyczne) oraz dr hab. n. med. Anny Przeklasy-Muszyńskiej (dyscyplina: nauki medyczne).

W medycynie ból jest uważany za ważny objaw ostrzegawczy, wskazujący na istnienie odchylenia od prawidłowej czynności ustroju. Poza dobroczynnymi następstwami istnienia bólu, jego występowanie może mieć także aspekty negatywne. Generalnie wszelkie bóle, które straciły już swoje znaczenie informacyjne, które są niepotrzebnie nasilone uznaje się za szkodliwe i jako takie wymagające przynajmniej prób uśmierzania. Negatywne cechy występowania bólu są charakterystyczne szczególnie dla bólu stanowiącego przedmiot recenzowanej pracy doktorskiej, czyli neuropatycznego (BN).

Skuteczność terapii BN jest często odzwierciedleniem stopnia poznania jego patomechanizmu. Dlatego tak istotne jest także badanie tych przyczyn BN, które dotąd nie były brane pod uwagę, ponieważ mogą one stanowić punkt uchwytu dla nieznanymi dotąd a potencjalnie skutecznych leków uśmierzających ból.

W ten nurt badawczy doskonale wpisuje się praca doktorska pani Joanny Bogackiej, w której Autorka podjęła się zbadania znaczenia niektórych syntetyzowanych w gleju chemokin w procesach generowania BN oraz możliwości łagodzenia tego rodzaju bólu przez modyfikację czynności jednego z receptorów dla chemokin - CCR4.

Przykłady procesów chorobowych, w których chemokiny odgrywają istotną rolę stanowią zwłaszcza procesy przebiegające ze stanem zapalnym oraz zakażenia. Co jednak jest najważniejsze z punktu widzenia recenzowanej rozprawy doktorskiej, to odkrywany

stopniowo fakt m.in. przez zespół kierowany przez panią prof. Joannę Mikę, że aktywacja nieneuronalnych komórek układu nerwowego odgrywa ważną rolę w rozwoju bólu neuropatycznego. Dotyczy to szczególnie komórek mikrogleju i astrogleju oraz komórek migrujących w stanach patologicznych (np. po uszkodzeniu nerwów obwodowych) takich jak neutrofile, limfocyty i makrofagi.

Dane przytaczane przez Doktorantkę pozwalają niewątpliwie sądzić, że oddziaływanie na receptory chemokinowe może stanowić obiecującą opcję terapeutyczną w zwalczaniu bólu neuropatycznego nie tylko jako działanie samo w sobie, ale także jako element farmakoterapii skojarzonej wraz z przeważnie niezbyt silnie działającymi na bóle neuropatyczne w monoterapii opioidami.

W świetle braku wcześniejszych badań znaczenia receptora CCR4 w procesach nocyciepcji a także pilnej potrzeby wynajdywania nowych środków łagodzących bóle neuropatyczne, prezentowane podejście badawcze uważam za **ważne i aktualne**.

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi zestaw trzech prac oryginalnych poprzedzonych 69-o stronicowym maszynopisem.

Maszynopis scalający całość wyników badań zawartych w publikacjach jest podzielony na 12 rozdziałów, trzy dodatkowe rozdziały nie zostały ponumerowane. Tytuły niektórych rozdziałów i podrozdziałów a także numery stron w tekście różnią się od tytułów i stron rozdziałów zmieszczonych w spisie treści.

W nie numerowanym dziale **"Spis głównych skrótów wykorzystywanych w rozprawie doktorskiej"** na pochwałę zasługuje rzadko spotykane w pracach doktorskich jednoczesne zamieszczenie zarówno rozwinięć skrótów będących akronimami utworzonymi oryginalnie w języku angielskim jak i ich tłumaczeń polskich. W dziale dały się zauważyć niewielkie usterki, np. poprawnym tłumaczeniem dla "NF- κ B" / "nuclear Factor Kappa B" jest "Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-kappa B" a nie "kompleks białkowy działający jako czynnik transkrypcyjny".

Kolejne dwa nienumerowane działy pracy to "Streszczenie w języku polskim" a potem "Streszczenie w języku angielskim". Streszczenia te nie budzą zastrzeżeń.

Rozdział **"1. Spis publikacji wchodzących w skład doktoratu"** zawiera błędy w cytowaniach. Otóż tytuł czasopisma, w którym zamieszczono artykuł nr 2 ("Neuroscience") zamieniono z tytułem czasopisma, w którym zamieszczono artykuł nr 3 ("Frontiers in Immunology"). W ten sposób błędnie zakwalifikowano pracę drugą "CCR4 Antagonist (C021) Administration (...)" jako opublikowaną w "Neuroscience", zaś artykuł trzeci "Blockade of CCR4 (...)" jako wydrukowany we "Frontiers in Immunology".

Łączna wartość Impact Factor dla tych trzech publikacji wynosi **11,404**, zaś łączna ilość punktów MNiSW **380** pkt. W obliczeniu łącznej wartości IF - Autorce wyszło 15,835. Czyżby pomyliła dane z całkowitym IF swojego dorobku naukowego?

Wstęp Doktorantka poświęciła szeroko pojętym zagadnieniom związanych z bólem - jego definicją, klasyfikacją, dość dokładnie omówionymi etapami przetwarzania bodźców bólowych ale przede wszystkim zagadnieniom związanym z bólem neuropatycznym (sekcja 2.1., 2.2.). Kolejny podrozdział wstępu (2.3.) poświęcono farmakoterapii bólu neuropatycznego. Omówiono tu pokrótce podstawowe grupy środków stosowanych w celu uśmierzania BN a także graficznie przedstawiono (Ryc. 2 na str. 19) strategię postępowania przeciwbólowego w BN w oparciu o tzw. drabinę analgetyczną WHO.

W dalszej części podrozdziału Autorka omawia dwa opioidy mające obecnie (w monoterapii) stosunkowo niewielkie znaczenie w uśmierzaniu BN - morfinę oraz buprenorfinę.

Treść następnego podrozdziału (2.4.) stanowi omówienie neuroimmunologicznego podłoża neuropatii w OUN. Na pochwałę zasługuje dokładne opisanie przez Autorkę znaczenia poszczególnych rodzajów komórek pozaneuronalnych (neutrofile, limfocyty, makrofagi), a zwłaszcza glejowych (astroglej, mikroglej, komórki satelitarne) w procesach nocycepcji i rozwoju bólu neuropatycznego. Treść podrozdziału uzupełnia rycina nr 3 (str. 22) – zatytułowana "Mechanizm bólu neuropatycznego chemokin". Autorce chodziło prawdopodobnie o tytuł w rodzaju "Mechanizmy bólu neuropatycznego, w których pośredniczą/uczestniczą chemokiny" albo o coś zbliżonego pod względem sensu.

W podrozdziale 2.5. zostały pokrótce omówione powiązania pomiędzy komórkami glejowymi a rozwojem tolerancji na analgetyczne działanie opioidów.

Kończący wstępną część podrozdział 2.6. "Chemokiny a procesy nocycepcji" koncentruje się na receptorach chemokinowych. Doktorantka wskazuje na szczególnie istotną informację, o wykazaniu w ostatnich latach właściwości pronocyceptywnych licznych chemokin oraz udokumentowaniu udziału kilku receptorów chemokinowych w procesach nocyceptywnych.

W dalszym ciągu tekstu Autorka w oparciu o dane piśmiennictwa uzasadnia, dlaczego przedmiotem prac stanowiących podstawę rozprawy stał się receptor chemokinowy z rodziny C-C typu 4 (CCR4) oraz opisuje budowę i działanie tego receptora a także charakteryzuje jego trzy endogenne ligandy (chemokiny CCL2, CCL17 i CCL22) oraz selektywnego antagonistę, czyli użyty przez Autorkę w badaniach związek C021.

Przedstawiony wstęp dobrze koresponduje z **założeniami pracy**. Opracowanie części teoretycznej rozprawy stanowi logiczny ciąg uzupełniających się informacji z podkreśleniem występujących w nim elementów nowości. Doktorantka mimo pewnych braków stylistycznych wykazała umiejętność krytycznego korzystania z piśmiennictwa naukowego, zdolność selekcji i właściwej segregacji danych w odniesieniu do podjętego tematu, jak również zwięzłości opisu. Świadczy to także o dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do rozwiązania podjętego zadania badawczego.

Cele pracy zostały sformułowane pod względem merytorycznym poprawnie, w sześciu punktach z licznymi podpunktami. Warto raz jeszcze zwrócić uwagę, że do tej pory nie przeprowadzono badań dotyczących udziału CCR4 w procesach nocycepcji ani badań wpływu jego ligandów na rozwój neuropatii zatem **praca ma charakter w pełni nowatorski!**

W celu realizacji założeń pracy Autorka przeprowadziła badania o **wysokim stopniu złożoności**, które zostały szczegółowo przedstawione w trzech bardzo dobrych merytorycznie wcześniej wymienionych eksperymentalnych pracach zamieszczonych w renomowanych czasopismach naukowych.

Metodyka: Do badań Doktorantka wykorzystwała szczury rasy Wistar oraz myszy Albino Swiss. W celu realizacji założeń pracy Autorka zaprojektowała i przeprowadziła imponującą liczbę badań eksperymentalnych, wykorzystując dwa modele bólu neuropatycznego: CCI (luźne jednostronne podwiązanie prawego nerwu kulszowego) oraz cukrzycowy model polineuropatii obwodowej po jednorazowym (i.p.) podaniu STZ. Oceniając progi czucia bodźców nocyceptywnych wykorzystwała testy behawioralne mierzące stopień rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne (dotykowe) i termiczne to odpowiednio test von Frey'a i test zimnej płytki. Wpływ podawanych substancji na sprawność motoryczną myszy badała w teście pręta obrotowego (Rotarod).

Syntetyczne omówienia każdego z głównych zagadnień przedstawionych w publikacjach (Pkt.5.1-5.5) kończą się wnioskami. Te ostatnie ujęte zbiorczo można sprowadzić do twierdzenia, że CCR4, to wartościowy cel poszukiwań przyszłych leków przeciwbólowych nadających się do zwalczania w bólu neuropatycznego, modulacja lub blokada tego receptora może mieć potencjalne zastosowanie terapeutyczne w postaci wynalezienia nowych koanalgetyków (w tym wzmacniających działanie przeciwbólne klasycznych opioidów w bólu neuropatycznym) a ponadto badania nad CCR4 poszerzają rozumienie przez naukę patomechanizmów bólu neuropatycznego o różnej etiologii. Warto też zwrócić uwagę, że z klinicznego punktu widzenia szczególnie istotne jest wykazanie antynocyceptywnego działania antagonisty CCR4 wprowadzanego do ustroju drogą dootrzewnową, ponieważ sugeruje to, że w razie wprowadzenia C021 lub innych tego rodzaju związków do leczenia nie trzeba ich będzie podawać do OUN.

W pierwszej części **dyskusji** (rozdział 6) Doktorantka uzasadnia fakt, że wyciszenie (hamowanie aktywacji) komórek mikrogleju w neuropatii może być nową strategią leczenia bólu neuropatycznego, Udowodnienie przez Doktorantkę po raz pierwszy, że antagonistą CCR4 (związek C021) obniża ilości cytokin z rodziny IL-1 (IL-1 β i IL-18) ale nie IL-6 i IL-10 prowadzi Doktorantkę do wniosku, iż za działanie przeciwbólne antagonisty CCR4 może odpowiadać osłabienie przezeń aktywacji interleukin z rodziny IL-1.

W dalszej części dyskusji Doktorantka dokładnie i logicznie analizuje całość uzyskanych wyników. Bardzo ciekawa jest część dotycząca zagadnień związanych z możliwym zastosowaniem związków modulujących receptor CCR4 jako środków nasilających działanie opioidów i hamujących rozwój tolerancji. Rola, jaką odgrywa CCR4 i jego endogenne ligandy (CCL2, CCL17, CCL22) w bólu neuropatycznym nie była jednak do tej pory badana (Autorka w stwierdzającym ten fakt zdaniu na str. 42 opuściła słowo "nie" zmieniając tym samym sens całości).

Ostatni, szeroko omówiony w dyskusji wątek stanowi zagadnienie znaczenia CCR4 dla rozwoju ważnej z klinicznego punktu widzenia neuropatii cukrzycowej oraz możliwości zastosowania antagonistów tego receptora w jej przebiegu. Autorka analizuje także fakt relatywnie niskiej skuteczności leków opioidowych w bólu towarzyszącym neuropatii cukrzycowej.

W dyskusji zwraca uwagę zdolność Doktorantki do wnikliwej i krytycznej analizy wyników oraz ich interpretacji, wnioskowania dotyczącego przyczyn obserwowanych zjawisk, a także szczegółowego uzasadniania przyjętych w pracy rozwiązań.

Dyskusja została przeprowadzona pod względem merytorycznym bardzo dobrze, co więcej uwzględniono w niej wszystkie ważniejsze wątki pracy.

Po zamknięciu dyskusji Doktorantka sformułowała (w rozdziale 7) siedem **wniosek** rozbudowanych o liczne podpunkty, co doprowadziło do stworzenia tekstu dość zwięzłego podsumowującego wyniki przeprowadzonych badań. Wnioski te nie budzą zastrzeżeń; zostały one przedstawione w precyzyjny sposób i właściwie odzwierciedlają uzyskane wyniki.

Rozdział "8. **Podsumowanie**" w zwięzłej, opisowej formie w dużej mierze powtarza informacje zawarte w nienumerowanym dziale "Streszczenie w języku polskim".

Kolejny, dziewiąty rozdział rozprawy stanowi **wykaz piśmiennictwa** (tu jako "Bibliografia"). Rozdział ten wymienia 296 publikacji zagranicznych i krajowych uszeregowanych - jak się należy domyślać - w kolejności pierwszego powoływania się na daną pozycję w tekście.

Przegląd listy piśmiennictwa ocenianej rozprawy doktorskiej upewnia, że Doktorantka dokonała dokładnego przeglądu ogromnej części dostępnych pozycji z zakresu wymaganego przez tematykę pracy, korzystając także z najnowszych publikacji. Tak szeroki dobór piśmiennictwa pośrednio potwierdza dobre teoretyczne przygotowanie Autorki do podjętego zadania badawczego oraz wskazuje na posiadanie przez Doktorantkę umiejętności krytycznego korzystania z piśmiennictwa naukowego, zdolności selekcji i właściwej segregacji danych w odniesieniu do podjętego tematu.

W kolejnym, dziesiątym już rozdziale "**Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej**" zamieszczono w całości kolejno stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej trzy prace eksperymentalne. Prace te nie będą oddzielnie szerzej komentowane aby uniknąć powtórzeń. Doktorantka bowiem doskonale omówiła wyniki zawarte w tych pracach w opisowej części rozprawy łącząc je w logiczny ciąg informacji wprowadzający czytelnika w zagadnienie.

W publikacjach na uwagę zasługują prawidłowo zaplanowane i wykonane badania o wysokim stopniu trudności. Dużej manualnej wprawy wymagały nie tylko procedury związane operacyjne podwiązania nerwu kulszowego ale i precyzyjnego umieszczenia kaniuli do podania podpajęczynówkowego. Czy doktorantka weryfikowała miejsce umieszczenia kaniuli np. podając po zakończeniu badań barwnik lub przeprowadzała sekcję? Doktorantka uzyskała bardzo ciekawe wyniki odnośnie działania antagonisty rec. CCR4. Zaciekawienie wzbudza dlaczego wybrała ten receptor z całej grupy rec. CCR? Czy w piśmiennictwie są dostępne jakieś badania porównawcze co do blokowania innych typów rec. CCR?

Pracę doktorską Pani mgr Joanny Bogackiej oceniam od strony merytorycznej bardzo wysoko.

Podkreślam, że rozprawa ma charakter **nowatorski** i kieruje uwagę naukowców na grupę związków (antagoniści CCR4) potencjalnie cennych przynajmniej we wspomaganiu uśmierzania bólu neuropatycznego. Na uwagę zasługują prawidłowo zaplanowane i wykonane badania oraz wysoki stopień ich złożoności i trudności w wykonaniu.

Wszystkie trzy prace eksperymentalne zawarte w rozprawie zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym o wysokim współczynniku wpływu (łączny IF po ponownym przeliczeniu 11,404). Łączna suma punktów MNiSW w

przypadku tych prac wynosi 380 (dane j.w.). Całkowity IF dorobku naukowego Doktorantki wynosi prawdopodobnie 15,835.

Przedstawiając powyższą ocenę kieruję do Wysokiej Rady Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Joanny Bogackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje także o **wyróżnienie pracy**.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakodynamiki

Elmija
prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Magdalena Bujalska-Zadrozny