

prof. dr hab. Barbara Zabłocka
Pracownia Biologii Molekularnej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN
ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa
tel: 22-60 86 486
e-mail: bzablocka@imdik.pan.pl

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr Joanny Bogackiej
pt. „Znaczenie farmakologicznej modulacji receptora chemokinowego z rodziny C-C typu 4 (CCR4) w bólu neuropatycznym o różnej etiologii”

Oceniana interdyscyplinarna praca doktorska została wykonana w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie pod kierunkiem promotorów prof. dr hab. n. med. Joanny Miki (n. farmakologiczne) oraz dr hab. n. med. Anny Przeklasa-Muszyńskiej (n. medyczne).

Ból neuropatyczny to ból, który powstaje w wyniku uszkodzenia lub zaburzenia działania układu nerwowego. Dotyka niemal 10 % ludności, negatywnie wpływając na wszystkie aspekty życia, znacznie obniżając jego jakość. Niestety, szacuje się, że tylko u 50% cierpiących z powodu bólu neuropatycznego chorych udaje się uzyskać zmniejszenie bólu o 30–50%; u pozostałych pacjentów nie udaje się uzyskać poprawy za pomocą żadnego ze stosowanych leków (Varshney V et al. *Ann Transl Med.* 2021;9(2):187. Butera J.A. *J. Med. Chem.* 2007; 11: 2543–2546). Zatem mimo niewątpliwego postępu medycyny i badań prowadzonych na całym świecie ból neuropatyczny jest w dalszym ciągu dużym problemem terapeutycznym. To zagadnienie jest przedmiotem badań zespołu prof. Joanny Miki, w którym powstała oceniana rozprawa doktorska.

Praca doktorska Pani mgr Joanny Bogackiej została przedstawiona jako zbiór trzech spójnych tematycznie prac doświadczalnych opublikowanych na łamach następujących czasopism z listy filadelfijskiej:

1. Bogacka J, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Rojewska E, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, Mika J. CCR4 antagonist (C021) influences the level of nociceptive factors and enhances the analgesic potency of morphine in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2020 Aug 5;880:173166. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173166. IF 3.263, MNiSW 100
2. Bogacka J, Ciapała K, Pawlik K, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, Mika J. Blockade of CCR4 Diminishes Hypersensitivity and Enhances Opioid Analgesia - Evidence from a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *Neuroscience.* 2020 Aug 10;441:77-92. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.06.025. IF 3.056, MNiSW 140

3. Bogacka J, Ciapała K, Pawlik K, Kwiatkowski K, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, Mika J. CCR4 Antagonist (C021) Administration Diminishes Hypersensitivity and Enhances the Analgesic Potency of Morphine and Buprenorphine in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Front Immunol.* 2020 Jul 14;11:1241. doi: 10.3389/fimmu.2020.01241. IF 5.085, MNiSW 140

Wszystkie wymienione powyżej czasopisma są bardzo dobrze rozpoznawalne w środowisku biologów, farmakologów i immunologów zajmujących się zagadnieniami poszukiwania, oraz badania mechanizmów działania i testowania nowych cząsteczek w kierunku leków, i cieszą się dobrą opinią. Ponadto należy zwrócić uwagę na fakt, że we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Znajduje to pełne potwierdzenie w oświadczeniach współautorów (przedstawionych na stronach 113-122), zgodnie z którymi wkład Pani mgr Joanny Bogackiej w powstawanie artykułów dotyczył udziału w tworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonywaniu większości doświadczeń, opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do publikacji, co świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Autorki. Jednocześnie skład autorski tych publikacji wskazuje na duże wsparcie i współdziałanie zespołu badawczego w realizacji badań, których wyniki zawarte są w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Ponieważ we współczesnym świecie realizacja zaawansowanych badań możliwa jest wyłącznie pod warunkiem posiadania odpowiednich środków finansowych, należy podkreślić rolę dwóch projektów, które umożliwiły prowadzenie prac badawczych i udział doktorantki: NCN OPUS 2016/21/B/NZ4/00128, kierownik prof. dr hab. Joanna Mika oraz InterDokMed POWR.03.02.00-00-1013/16.

Warto zwrócić uwagę, że pod względem formalnym niniejszy doktorat oparto na bardzo czytelnym zestawie trzech opublikowanych artykułów, co w jednoznaczny sposób umożliwia ocenę zakresu wykonanych przez Doktorantkę prac badawczych.

Rozprawa doktorska składa się m. in. ze streszczeń w języku polskim i angielskim, 40. stronicowego omówienia i dyskusji wyników wraz z bibliografią (18 stron, 296 pozycji), kopii trzech opublikowanych prac oryginalnych oraz zawiera oświadczenia współautorów i kopie zgód II Lokalnej Komisji Etycznej do Badań na zwierzętach w Krakowie. Doktorantka posługuje się poprawnym stylistycznie językiem, a podczas lektury pracy nie dostrzegłem zasadniczych błędów edytorskich czy uchybień stylistycznych, a nieliczne zasygnalizowałam w dalszej części recenzji.

Publikacje będące podstawą dysertacji, są bardzo dobrze i starannie przygotowane, zawierają przejrzystą, właściwie dobraną do prezentowania określonego typu wyników dokumentację graficzną oraz szczegółowo opisane modele i metody badawcze.

Podobnie wysoką jakością jak publikacje odznacza się autoreferat i jego streszczenie. Autorka potrafiła w bardzo przystępnej, syntetycznej formie przedstawić mechanizmy rozwoju bólu neuropatycznego oraz dostępne terapie, naświetlić cele i przebieg badań oraz podkreślić ważność uzyskanych wyników, wskazując na wkład w badania podstawowe jak i nowy cel terapeutyczny.

Pani Doktorantka w trakcie badań postawiła sobie za cel wyjaśnienie udziału receptora chemokinowego CCR4 i jego ligandów w modulacji bólu neuropatycznego i rozwoju tolerancji morfinowej w modelu neuropatii cukrzycowej oraz uszkodzenia nerwu kulszowego u myszy z wykorzystaniem związku C021 - agonisty tego receptora. Wybór ów wynika z dobrze uzasadnione założenia, że receptory chemokinowe mogą być dobrym celem terapii bólu neuropatycznego.

W trakcie badań Pani mgr Bogacka wykorzystwała szereg technik behawioralnych, biochemicznych i molekularnych które doprowadziły do dobrze uzasadnionej konkluzji, że blokada sygnalizacji CCL17/CCL22/CCL2/CCR4 przynosi korzystne efekty w procesach nocycyptywnych. Wniosek ten oparty jest o szereg spostrzeżeń m.in. 1). Jednokrotne podanie C021(i.t. oraz i.p.) zmniejsza wrażliwość w testach von Freya i zimnej płytki u zwierząt naiwnych traktowanych chemokiną CCL2 jak i nasila efektywność opioidów (morfina lub buprenorfina) badanych 7. dnia po wywołaniu bólu. 2). Wielokrotne podania C021 obniżają stopień aktywacji mikrogleju/makrofagów 12 dni po uszkodzeniu nerwu oraz zapobiegają zwiększaniu się obecności białka CCL2 w rdzeniu kręgowym. 3). Podanie agonisty receptora CCR4 wywołuje zadowalające skutki również po uszkodzeniu nerwu w modelu neuropatii cukrzycowej. 3). Interesujące jest spostrzeżenie sugerujące udział sygnalizacji CCL2/CCR4 a nie CCL2/CCR2 e transmisji nocycyptywnej.

Zadaniem recenzenta jest jednakże nie tylko przytakiwanie recenzentom w czasopismach naukowych, ale także próba oceny istotności osiągnięcia i jakości sposobu ich prezentacji. Co nie oznacza oczywiście, że recenzent rozprawy nie może popełniać błędów.

Badania Pani Doktorantki dotyczą komórek mikrogleju i hipotezy, że ich wyciszenie w neuropatii może być nowa strategia leczenia tego rodzaju bólu. Komorkom mikrogleju przypisuje się wiele cech i funkcji, m.im. udział w gojeniu ran i regeneracji tkanki. Ciekawa jestem opinii Pani magister na temat połączenia strategii wyciszenia jednej, a pozostawienia innych, „dobrych” dla komórek funkcji mikrogleju.

W pracy Bogacka et al. *Neuroscience* 441(2020) 77-92 na Fig. 1G przedstawiony jest wynik WB białka CCR4 oraz CCL2 uzyskany w oparciu o Mouse Inflammation Antibody Array. Obraz WB jest mało czytelny ale densytometria nie wykazała różnic pomiędzy grupą N a STZ, jednak nie widzę różnicy intensywności w teście CCL2, natomiast wykres wskazuje na istotny statystycznie wzrost po indukcji cukrzycy. Być może zdjęcie zostało niefortunny wybrane, bowiem testowanych była duża liczba zwierząt w każdej grupie, a odchylenie standardowe jest niewielkie.

Wprawdzie w Omówieniu wyników, w rozdziale 7 pt Wnioski Autorka syntetycznie podsumowała badania podkreślając największe osiągnięcia recenzowanej pracy, ale, w mojej ocenie, nie dość wyraźnie przedstawiła wnioski płynące w tych badań. Rozdział 7 rozprawy zdecydowanie zatytułowałabym Podsumowanie badań. Wnioski są natomiast przedstawione w ostatnim akapicie rozdziału 8, właśnie pt. Podsumowanie: 1. „CCR4 bierze udział w patogenezie bólu neuropatycznego o różnej etiologii” oraz „Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę, że blokada sygnalizacji

CCL17/CCL22/CCL2/CCR4 przynosi korzystne efekty w procesach nocyceptywnych oraz zwiększa analgetyczne działanie opioidów”.

Prezentowane są niezwykle obiecujące wyniki, zwłaszcza dla wszystkich walczących z przewlekłym bólem neuropatycznym. Dane są aż zaskakująco jednoznacznie pozytywne. Zastanawiam się, jeśli blokowanie CCR4 jest tak skuteczne w redukcji bólu neuropatycznego w różnych modelach badawczych, to czy cząsteczka C021 spełnia kryteria do rozwoju w kierunku leku? Ile takich obiecujących punktów uchwytu do modulacji redukcji bólu przez opioidy jak CCR4 zostało dotychczas wytypowanych i jakie są ich losy?

Drobne uchybienia:

Numeracja stron w spisie treści nie odpowiada rzeczywistemu umieszczeniu poszczególnych rozdziałów,

Str 15 Fosfolipaza C oznaczana jest zwykle skrótem PLC a nie PKC

Nie w pełni zrozumiałe jest ostatnie zdanie na str. 42.

Niniejsze uwagi, mają charakter marginalny i nie umniejszają zupełnie wartości rozprawy.

Na wyróżnienie zasługują bardzo dobrze dobrane modele doświadczalne oraz techniki doświadczalne. Wysoka jakość opublikowanych prac będących podstawą rozprawy doktorskiej wskazuje, że Doktorantka doskonale opanowała techniki behawioralne, biochemiczne i molekularne a stosując je w pełni wywiązała się z zadań, jakie zostały postawione w celu pracy.

Recenzowana praca napisana została w sposób wskazujący na dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną, dążenie do rozwiązywania problemów o charakterze aplikacyjnym oraz umiejętność interpretacji wyników, ich syntetycznego przedstawienia oraz interesującą, wnikliwą i twórczą dyskusję.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska to dobra, rzetelna i wartościowa praca, a uzyskane wyniki trzeba uznać za nowatorskie. Napisana jest bardzo dobrym językiem, zaplanowane doświadczenia są przeprowadzone i opisane skrupulatnie. Wnioski z badań własnych wywodzone są ostrożnie. Dyskusja jest dojrzała, wielopłaszczyznowa i powściągliwa. Autorka unika nadinterpretacji i nadmiernego generalizowania wniosków. Zatem z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi art. 13 pkt 1 i 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN o dopuszczenie pani mgr Joanny Bogackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, dnia 10 czerwca 2021 roku.

