

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Pomimo intensywnych badań problem braku skutecznej terapii bólu neuropatycznego pozostaje do dziś aktualny. Stosowane standardowo w bólu o dużym natężeniu leki opioidowe tracą bowiem efektywność w neuropatii. Badania ostatnich lat dostarczyły przełomowych dowodów na zaangażowanie komórek mikroglejowych, ich receptorów oraz wydzielanych przez nie czynników neuroimmunologicznych w rozwój i przebieg bólu neuropatycznego w modelach zwierzęcych. Opisane w tej pracy **badania miały na celu określenie zmian biochemicznych i behawioralnych obserwowanych w rozwoju bólu neuropatycznego w szczurzym modelu, w tym na spadek efektywności opioidów**. Postanowiono także **określić wpływ farmakologicznej blokady** wybranych receptorów z rodziny **purynergicznych (P2X4R) i Toll-podobnych (TLR4)**, znajdujących się w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych (DRG) głównie na powierzchni komórek mikrogleju/makrofagów na zaburzenia neuroimmunologiczne w neuropatii.

Doświadczenia przeprowadzono na samcach szczurów rasy Wistar zgodnie z zaleceniami II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Instytutu Farmakologii PAN oraz zasadami podanymi przez NIH i IASP (Zimmermann, 1983). Zwierzęta zostały poddane zabiegowi **implantacji kaniul** oraz luźnego, jednostronnego **podwiązania nerwu kulszowego (model CCI)** zgodnie z opracowanymi metodami (Bennett i Xie, 1988; Yaksh i Rudy, 1976). Eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem podpajęczynówkowych podań antagonistów: **CORM-2** dla P2X4R oraz **LPS-RS Ultrapure** dla TLR4. Do określenia wpływu podań zastosowano dwa testy behawioralne pozwalające na ocenę poziomu nadwrażliwości na bodziec mechaniczny i termiczny (testy **von Frey'a** i **zimnej płytki**) oraz dwa testy biochemiczne w celu analizy zmian poziomu mRNA (**qRT-PCR** w czasie rzeczywistym) oraz poziomu białka (**Western blot**) w lędźwiowym (L4-L6) odcinku grzbietowego **rdzenia kręgowego i DRG**.

Wyniki badań behawioralnych wykazały, że jednostronne podwiązanie nerwu kulszowego prowadzi do rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne w dniach 2, 7 i 14 po CCI. Wyniki badań molekularnych wykazały, że równolegle do rozwoju bólu neuropatycznego wzrasta poziom zarówno P2X4R jak i TLR4 w rdzeniu kręgowym po CCI co jest skorelowane ze wzrostem poziomu aktywacji komórek IBA-1- i GFAP-pozytywnych. Wykazana zmiana poziomu receptorów wskazuje, że są one zaangażowane w mechanizmy prowadzące do rozwoju bólu w szczurzym modelu neuropatii. W badaniach farmakologicznych wykazano, że **obaj zastosowani** antagoniści czyli **CORM-2** oraz **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**.

Dalsze badania wskazują również na odmienne efekty molekularne badanych substancji. Wielokrotne podpajęczynówkowe podania CORM-2 zapobiegły podniesieniu poziomu IBA-1 w rdzeniu kręgowym oraz GFAP w obu badanych strukturach. Ponadto, zastosowanie tego antagonisty zapobiegło podniesieniu poziomu czynników pronocyceptywnych: IL-1 β w rdzeniu kręgowym oraz IL-18, IL-6 i MMP-9 w obu badanych strukturach, natomiast zaobserwowano jednocześnie podwyższenie poziomu antynocyceptywnego IL-1Ra w rdzeniu kręgowym. Ponadto, CORM-2 zapobiegł aktywacji szlaków przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego: p-p38 MAPK, pNF κ B, PI3K, pAkt oraz istotnie nasilił aktywację pERK1/2. Większość zmian po zastosowaniu antagonisty P2X4R obserwowano w rdzeniu kręgowym. W przeciwieństwie, zastosowanie wielokrotnych, podpajęczynówkowych podań LPS-RS Ultrapure nie wpłynęło na poziom IBA-1 ani GFAP w tej strukturze. Co więcej, poziom IBA-1 został istotnie podniesiony w zwojach korzeni grzbietowych po zastosowaniu tego antagonisty, który jednocześnie przywrócił zaburzoną po CCI równowagę pomiędzy czynnikami pro- i antynocyceptywnymi: IL-18/IL-18BP oraz MMP-9/TIMP-1 w zwojach korzeni grzbietowych. LPS-RS Ultrapure nie miał wpływu na modulację poziomu badanych, istotnych w neuropatii, przedstawicieli ścieżek przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego, biorąc jednak pod uwagę silne właściwości analgetyczne tego związku dalsze badania powinny być kontynuowane celem wyjaśnienia molekularnego działania tej substancji. Co ciekawe, większość zmian po podpajęczynówkowym podaniu antagonisty TLR4 obserwowano w zwojach korzeni grzbietowych, co również wymaga dalszych wnikliwych badań.

Wyniki ujęte w mojej rozprawie doktorskiej poszerzają wiedzę na temat udziału przedstawicieli dwóch rodzin receptorów w rozwoju bólu neuropatycznego. 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 nocyceptywnych, 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 standardowo w klinice w terapii bólu.** Podsumowując, stosowane aktualnie terapie przeciwbólowe mają ograniczoną skuteczność w neuropatii, prawdopodobnie głównie dlatego, że są celowane w aktywność neuronalną. Stąd, biorąc pod uwagę rezultaty zebrane w tej pracy, a także cytowane badania przedkliniczne innych zespołów, można wnioskować o obiecującej roli, jaką może w tych zjawiskach odegrać zahamowanie aktywacji komórek mikrogleju/makrofagów poprzez konkretne receptory zlokalizowane na ich powierzchni.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Despite being continually investigated, the problem of an effective therapy of neuropathic pain remains actual. Drugs which are commonly used in clinics as severe pain analgesics lose their effectiveness in neuropathy. Results released within the scope of recent years provided groundbreaking evidence for the engagement of microglial cells, their receptors and neuroimmunological factors expressed by these structures in the development and maintenance of neuropathic pain in animal models. Experiments described in this dissertation were performed in order to assess **biochemical and behavioral changes observed in the development of neuropathic pain in a rat model, including the reduction of opioid effectiveness**. The additional aim of the investigation was to define **the influence of pharmacological antagonism** of chosen receptors from **purinergic (P2X4R)** and **Toll-like (TLR4)** families, which are expressed in the spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) especially on the microglia/macrophage surface, on the neuroimmunological malfunctions in neuropathy.

All experiments were performed on Wistar male rats according to the recommendations of the 2nd Local Ethics Committee on Animal Testing in the Institute of Pharmacology, PAS and the instructions given by the NIH and the IASP (Zimmermann, 1983). Animals underwent procedures of **intrathecal catheters implantations** and unilateral, loose **sciatic nerve ligature (CCI model)** according to the developed methods (Bennett and Xie, 1988; Yaksh and Rudy, 1976). Experiments were conducted with the intrathecal administration of the following antagonists: **CORM-2** for P2X4R and **LPS-RS Ultrapure** for TLR4. Two behavioral and two biochemical tests were performed in order to evaluate the impact of these injections. **Von Frey** and **cold plate** tests allowed for the assessment of the level of mechanical and thermal hypersensitivity, while **Western blot** and **real time qRT-PCR** enabled the detection of changes in protein levels and mRNA levels respectively in dorsal lumbar (L4-L6) **spinal cord** and **DRG**.

The results of the behavioral experiments showed that unilateral sciatic nerve ligation leads to the development of hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli on the 2nd, 7th and 14th day after the CCI. The results of subsequent biochemical tissue analysis revealed that together with neuropathic pain development, the levels of P2X4R and TLR4 become upregulated in the spinal cord after a nerve ligation, what is additionally parallel to IBA-1- and GFAP-positive cells activation. Observed change in receptors levels indicates that they are engaged in the mechanisms leading to pain development in a rat model of neuropathy. Results of pharmacological experiments showed that **both antagonists**, CORM-2 and LPS-RS Ultrapure **reveal similar analgesic properties** after repeated intrathecal administration on day 7 after the CCI. What is important, **CORM-2** has the ability to enhance the effectiveness of a single administration of opioids, **morphine as well as buprenorphine**, **LPS-RS Ultrapure**, on the other hand, **only buprenorphine**.

Further investigation suggests that these antagonists also have different molecular effects. Repeated intrathecal administrations of CORM-2 prevented the upregulation of IBA-1 in the spinal cord and GFAP in both analyzed structures. Moreover, the use of this antagonist prevented the elevation of pronociceptive factors: IL-1 β in the spinal cord, and IL-18, IL-6 and MMP-9 in both structures, with a parallel upregulation of antinociceptive IL-1Ra in the spinal cord. What is more, CORM-2 prevented the activation of intracellular signaling pathways: p-p38 MAPK, pNF κ B, PI3K, pAkt, and significantly enhanced the activation of pERK1/2. Most of the changes which occurred after the P2X4R antagonist administration were observed in the spinal cord. On the contrary, repeated intrathecal administrations of LPS-RS Ultrapure influenced neither IBA-1, nor GFAP levels in this structure. Surprisingly, IBA-1 level was significantly enhanced in DRG after the administration of this antagonist, which also restored previously disrupted balance between pro- and antinociceptive factors: IL-18/IL-18BP and MMP-9/TIMP-1 in DRG. LPS-RS Ultrapure had no modulating impact on the levels of the investigated representatives of intracellular signaling pathways which are relevant in neuropathy. However, taking into consideration its undoubted analgesic properties, further experiments ought to be conducted to explain molecular mechanisms of action of this substance. Interestingly, the majority of changes noticed after the intrathecal administration of TLR4 antagonist are restricted to DRG, what is another issue requiring further investigation.

Results presented in this dissertation broaden the knowledge on the contributions of the members of two receptors families to neuropathic pain development. Demonstrated changes allow for a statement that **the consequences of P2X4R activation in neuropathy can be observed mostly in the spinal cord, where microglia prevail over other immunological cells, and that the neuroimmunological effects of TLR4 blockade can be detected mainly in DRG with macrophages being the most abundant immune population expressing these receptors.** Both substances also modulate the levels of nociceptive factors, however, in a different manner. Nevertheless, this suggests that their further investigation in neuropathic pain might be beneficial. **One crucial advantage of P2X4R antagonist over TLR4's is the ability to enhance the effectiveness of both of the investigated opioids, which are commonly used in clinics for pain therapy.** In conclusion, currently used antinociceptive therapies have limited efficacy in neuropathy, probably due to the fact that they target neuronal activity. Hence, taking into consideration the results introduced in this dissertation as well as the cited preclinical studies performed in other laboratories, it can be assumed that a blockade of microglial activity *via* its receptors has a promising analgesic function.