

Mgr Anna Piotrowska-Murzyn
Zakład Farmakologii Bólu

Promotor: **prof. dr hab. n. med. Joanna Mika**

Recenzenci:

Prof. dr hab. Magdalena Chadzińska, Zakład Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna, Zakład Biochemii, Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Tytuł pracy doktorskiej:

„Determination of the mechanisms and potential targets of the substances that modulate selected subpopulations of glial cells activity in the treatment of neuropathic pain”

Streszczenie w języku polskim

Ból neuropatyczny związany jest ze złożonością i wielością procesów zaangażowanych w jego powstawanie, tendencją do długotrwałego, wieloletniego utrzymywania się oraz trudną i w wielu przypadkach nieskuteczną terapią. Przewlekłe dolegliwości bólowe w istotnym stopniu obniżają jakość życia pacjentów i ograniczają codzienne funkcjonowanie. Zaangażowanie komórek glejowych w skomplikowany patomechanizm neuropatii jest prawdopodobną przyczyną wykazanego zarówno w badaniach na zwierzętach, jak też w praktyce klinicznej, znaczącego osłabienia efektu analgetycznego konwencjonalnie stosowanych leków przeciwbólowych. Prowadzi to do konieczności zwiększenia ich dawek, co przyczynia się do wystąpienia objawów niepożądanych. W celu wdrożenia skutecznego leczenia, niezbędne jest wskazanie nowych celów molekularnych w terapii bólu neuropatycznego i zidentyfikowanie przyczyn słabnącej skuteczności leków przeciwbólowych w oparciu o szeroko zakrojone badania. Niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na tym poważnym problemie klinicznym, jakim jest neuropatia, a jej celem było określenie mechanizmów i potencjalnych punktów uchwytu substancji modulujących aktywność wybranych subpopulacji komórek glejowych w transmisji nocyceptywnej.

Badania *in vivo* prowadzono na samcach szczurów rasy Wistar lub myszach Albino Swiss (Charles River) zgodnie z zaleceniami II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN oraz zasadami podanymi przez Narodowe Instytuty Zdrowia i Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu. Model bólu neuropatycznego polegał na jednostronnym uszkodzeniu nerwu kulszowego (*Chronic Constriction Injury*, model CCI), a narzędzia farmakologiczne podawane były dootrzewnowo lub podpajęczynówkowo (pomiędzy kręgi na poziomie lędźwiowym L5-L6 u myszy lub przez wcześniej podpajęczynówkowo implantowaną kaniulę u szczurów). W badaniach behawioralnych wykorzystano testy mierzące poziom nadwrażliwości na bodźce

dotykowe i termiczne takie jak, test von Frey, test zimnej płytki i test odsuwania ogona. Równolegle prowadzone były badania *in vitro*, z wykorzystaniem hodowli pierwotnych komórek mikrogleju i astrogleju wyizolowanych z kory mózgowej jednodniowych osesków samiec szczurów rasy Wistar. Eksperymenty biochemiczne prowadzono na pobranej tkance z odcinka lędźwiowego rdzenia kręgowego (L4-L6) oraz odpowiadających im zwojach korzeni grzbietowych, a także na pozyskanych komórkach mikrogleju i astrogleju. Do oceny zmian w poziomie mRNA i białka wykorzystywano metody takie jak RT-qPCR, Western blot, immunocytochemia, immunohistochemia.

Neuroimmunologiczna interakcja pełni kluczową rolę w patogenezie bólu neuropatycznego. Dlatego początkowo badania skupiały się na ocenie zmian w poziomie czynników immunologicznych (interleukin i chemokin) zaangażowanych w procesy związane z jego powstawaniem. Badania prowadzone przy wykorzystaniu modelu CCI wskazały, że w przebiegu neuropatii dochodzi do wzrostu ekspresji interleukiny (IL)-18 i jej receptora, IL-18R, co jest równoległe do wystąpienia symptomów bólu neuropatycznego oraz aktywacji komórek glejowych na poziomie rdzenia kręgowego. Jednocześnie stwierdzono spadek poziomu IL-18BP, endogennego białka wpływającego na zdolność wiązania się IL-18 z jej receptorem. W dalszych badaniach wykazano, że ten naturalny inhibitor IL-18 odgrywa niezmienne istotną rolę w nocycepcji. Już jednorazowe, podpajęczynówkowe podanie IL-18BP obniża nadwrażliwość dotykową i termiczną rozwijającą się po uszkodzeniu nerwu kulszowego. Ponadto, zaobserwowano, że pojedyncze podania IL-18BP zwiększają efekty analgetyczne opioidów, takich jak morfina i buprenorfina. Co więcej, w stymulowanych hodowlach mikrogleju pokazano największy wzrost pronocyceptywnej IL-18, a w hodowlach astrogleju antynocyceptywnej IL-18BP. Jest to zgodne z obecnie panującymi poglądami, że w warunkach patologicznych, w których rozwija się ból neuropatyczny, mikroglej przyjmuje fenotyp neurotoksyczny związany z uwalnianiem cytokin prozapalnych. Natomiast astrocyty pełnią fundamentalną rolę w utrzymaniu homeostazy i mogą wykazywać właściwości neuroprotektoryjne, immunomodulujące i przeciwutleniające. Wskazanie na istotny udział interakcji IL-18/IL-18BP/IL18R w patomechanizmie bólu neuropatycznego sugeruje, że przywrócenie zachwianej równowagi pomiędzy tymi czynnikami zmniejsza symptomy bólu neuropatycznego i podnosi efektywność leków przeciwbólowych, co może zostać wykorzystane przy projektowaniu nowych leków i opracowaniu skuteczniejszej farmakoterapii (**Pilat&Piotrowska i wsp. Mol Cell Neurosci., 2016**).

Ze względu na zaburzenia w plastyczności neuronalnej, jak również aktywację komponentu immunologicznego w procesie bólu neuropatycznego, kolejnym punktem badań prowadzonych w trakcie studiów doktoranckich była modulacja oddziaływań neuroimmunologicznych. Na podstawie wieloletnich analiz Zakładu Farmakologii Bólu wyselekcjonowano związki o odmiennym mechanizmie działania i dobrym potencjale przeciwbólowym - **minocyklinę** (uważaną za inhibitor aktywności mikroglejowej) i toksynę botulinową A (**BoNT/A**, uważaną za modulator aktywności neuronalnej). Wysunięto hipotezę, że substancje te wpływają na dotychczas niebrany pod uwagę patomechanizm bólu neuropatycznego. W pracy Zychowska i wsp. (*Eur J Pharmacol.*, 2016) zaobserwowano, że iniekcje dopodeszwowe BoNT/A u szczurów po podwiązaniu nerwu kulszowego hamują na poziomie rdzenia kręgowego aktywację komórek mikrogleju, a w pracy **Piotrowska i wsp.**

(*J Neuroimmunol.*, 2016a) stwierdzono, że dootrzewnowo podana minocyklina hamuje aktywność nie tylko mikrogleju, ale również astrogleju. Wyniki te stanowiły podstawę do rozpoczęcia badań nad oceną bezpośredniego wpływu minocykliny oraz BoNT/A na komórki mikrogleju i astrogleju, którą przeprowadzono w hodowlach pierwotnych w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Rezultaty badań *in vitro* wykazały, że **minocyklina** reguluje uwalnianie interleukin (IL-1 β , IL-18, IL-6) oraz syntazy tlenu azotu 2 (*nitric oxide synthase 2*, NOS2) w stymulowanych hodowlach pierwotnych mikrogleju i nieoczekiwanie również astrocytów. Odbywa się to poprzez zmniejszenie fosforylacji szlaków wewnątrzkomórkowych, takich jak kinazy p38, ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*), należących do rodziny kinaz białek aktywowanych mitogenem (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK) oraz czynnika transkrypcyjnego NF-kappa B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- κ B), a także aktywacji metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*). Z kolei **BoNT/A** wpływa na białko SNAP-23 (*synaptosomal-associated protein 23*) w komórkach mikrogleju i astrogleju oraz SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein 25*), którego ekspresja zachodzi wyłącznie w astrocytach. Co ciekawe, BoNT/A zwiększa poziom odgrywającego ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej receptora TLR2 (*Toll-like receptor 2*) w komórkach mikrogleju. Ta zmiana związana jest prawdopodobnie z wpływem tej toksyny na modulację kinaz MAP - p38, ERK1/2 oraz czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co powoduje spadek poziomu IL-1 β , IL-18, IL-6, NOS2, uwalnianych w wyniku stymulacji lipopolisacharydem. W prowadzonych badaniach udowodniono, że zarówno **minocyklina jak i BoNT/A wpływają bezpośrednio na komórki mikrogleju i astrogleju**, a na ich poziomie mechanizm działania obu substancji jest podobny i przyczynia się do zmian w uwalnianiu czynników immunologicznych. Wyjaśnia to dlaczego w badaniach *in vitro* nie zaobserwowano efektu synergistycznego w modulacji czynników pro- i antynocyceptywnych w następstwie łącznego podania minocykliny i BoNT/A. Wynik ten sugeruje, że z punktu widzenia przyszłych terapii, skojarzenie akurat tych dwóch substancji może nie przynieść oczekiwanej poprawy skuteczności ich działania, natomiast ich łączne podanie z opioidami mogą okazać się bardzo korzystne (*Piotrowska i wsp. Front Cell Infect Microbiol.*, 2017).

Badania prowadzone w ramach studiów doktorskich wykazały istotny udział również innej podgrupy cytokin – chemokin – w neuropatii. W pierwszej pracy z tego obszaru *Piotrowska i wsp. (J Neuroimmunol.*, 2016a) po uszkodzeniu nerwu kulszowego zaobserwowano wzrost poziomu CCL2 (*chemokine (C-C motif) ligand 2*) i jej receptora CCR2 (*C-C chemokine receptor type 2*) w rdzeniu kręgowym z równoległą aktywacją komórek glejowych, oraz ich obniżenie po wielokrotnych podaniach minocykliny. Co więcej, w badaniach *in vitro* stwierdzono, że minocyklina zmniejsza uwalnianie CCL2 w stymulowanych lipopolisacharydem komórkach mikro- i astrogleju. Ponadto, w modelu neuropatii u szczura wykazano, że podany wielokrotnie, podpajęczynówkowo **antagonista CCR2, RS504393** porównywalnie do minocykliny obniża nadwrażliwość na bodźce bólowe, równolegle prowadząc do osłabienia aktywacji mikrogleju, ale nie astrogleju. Tym samym udowodniono, że **blokowanie oddziaływania CCL2/CCR2** podwyższa próg odczuwania bólu u zwierząt neuropatycznych, a CCR2 jest istotnym celem dla modulacji transmisji nocyceptywnej.

Kontynuując badania nad rolą chemokin i ich receptorów w patomechanizmie bólu neuropatycznego wykazano, że **marawirok, antagonistą CCR5** (*C-C chemokine receptor type 5*) zmniejsza nadwrażliwość na bodźce dotykowe i termiczne u szczurów po podwiązaniu nerwu kulszowego. Jednocześnie, na poziomie rdzenia kręgowego i/lub zwojów korzeni grzbietowych wpływa na modulację kinaz MAP, p38 i ERK1/2, oraz czynników transkrypcyjnych NF- κ B i STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) zaangażowanych w nocycepcję, przywracając równowagę pomiędzy czynnikami pronocyceptywnymi (IL-1 β , IL-18, IL-6, NOS2) i antynocyceptywnymi (antagonistą receptora dla interleukiny 1, IL-18BP, IL-10). Ponadto, w badaniach *in vitro* po raz pierwszy udowodniono, że przeciwbólowy mechanizm działania marawiroku jest związany z modulacją aktywności komórek glejowych i zdolnością do wprowadzenia mikrogleju i astrogleju w **stan alternatywnej polaryzacji**, która promuje uwalnianie czynników o właściwościach antynocyceptywnych (**Piotrowska i wsp. *Neuropharmacology*, 2016b**).

Dalsze badania poświęcone były mało poznanej w kontekście bólu neuropatycznego podrodzinnie chemokin CXC. W pracy **Piotrowska i wsp. (*Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*, 2018)** wykazano ważną rolę CXCR3 (*C-X-C chemokine receptor type 3*) i jego ligandów w neuropatii. W badaniach behawioralnych udowodniono, że ligandy CXCR3 (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11) (CXCL-, *chemokine (C-X-C motif) ligand*) powodują rozwój nadwrażliwości dotykowej i termicznej u zdrowych myszy, a efekt ten pojawia się krótko po ich podaniu, co zasugerowało neuronalną obecność tego receptora. Potwierdziły taką lokalizację barwienia immunofluorescencyjne przeprowadzone na skrawkach rdzenia kręgowego. W badaniach biochemicznych wykazano wzrost poziomu mRNA i białka dla CXCR3, a także jego ligandów (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11) w rdzeniu kręgowym w modelu bólu neuropatycznego. Ponadto, nasilenie ekspresji CXCL9 i CXCL10 jest również obserwowane w późniejszych dniach po uszkodzeniu nerwu kulszowego, wskazując na ich zaangażowanie w utrzymywanie się zwiększonej reakcji na bodźce nocyceptywne. Co ważne, jednorazowe podanie przeciwciał neutralizujących te dwie silnie zmieniające się w przebiegu neuropatii chemokiny osłabia nadwrażliwość na bodźce dotykowe i termiczne w modelu bólu neuropatycznego. Korzystne efekty analgetyczne wykazano, również po wielokrotnych podaniach selektywnego **antagonisty CXCR3, ($\pm$)-NBI-74330**. W badaniach biochemicznych udowodniono, że mechanizm działania tego antagonisty jest związany z hamowaniem silnie zaktywowanego po uszkodzeniu nerwu kulszowego mikrogleju na poziomie rdzenia kręgowego, co pociąga za sobą obniżenie biosyntezy selektywnych ligandów receptora, CXCL9 i CXCL10. Jest to zgodne z wynikami badań prowadzonych *in vitro* w których potwierdzono, że CXCR3 jest obecny na powierzchni komórek mikrogleju, a aktywacja tych komórek przyczynia się do wzrostu uwalniania CXCL9 i CXCL10, których poziom bezpośrednio obniża blokada receptora przez ($\pm$)-NBI-74330. Na szczególną uwagę zasługuje również fakt, że **antagonista CXCR3 nasila analgetyczne efekty morfiny**, co stanowi propozycję terapii skojarzonej, która może znaleźć zastosowanie w badaniach klinicznych oraz ukazuje perspektywy wdrożeniowe dla nowych narzędzi farmakologicznych.

Na podstawie rezultatów przedstawionych w cyklu 5 prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, można wysunąć twierdzenie, że ważnym kierunkiem w poszukiwaniu patomechanizmów oraz przyczyn obniżonej skuteczności opioidów w bólu

neuropatycznym są badania wpływu komórek glejowych na to zjawisko. W wyniku uszkodzenia nerwu obwodowego oprócz efektów neuronalnych obserwuje się nasilenie uwalniania czynników immunologicznych, w tym pronocyceptywnych interleukin i chemokin. Wskazanie czynników zaangażowanych w procesy nocicepcji poszerza wiedzę w tym obszarze, ale również, co bardzo ważne, dostarcza informacji o nowych celach molekularnych dla skutecznej farmakoterapii bólu. Ponadto, zastosowanie substancji takich jak marawirok, które nie tylko obniżają aktywność komórek glejowych, ale także wprowadzają je w alternatywną polaryzację o prawdopodobnym charakterze neuroprotekcijnym może stanowić najlepsze podejście do łagodzenia objawów bólu neuropatycznego i poprawy jakości życia pacjentów. Ponadto, łączne stosowanie wybranych substancji o wysokim potencjale analgetycznym z konwencjonalnie stosowanymi lekami przeciwbólowymi może przynieść zadowalające efekty i ulgę w bólu. Niniejsza rozprawa doktorska podkreśla potrzebę wielokierunkowego podejścia w leczeniu bólu neuropatycznego łączącego modulację transmisji nociceptywnej przekazywanej przez neurony, ale również regulowanej przez komórki glejowe.

Streszczenie w języku angielskim

Neuropathic pain is related to complexity and multiplicity of processes involved in its development. With a tendency to long-lasting prevalence, its difficult therapy is in many cases ineffective. Such conditions significantly lower the quality of patients' lives and deprive their daily functioning. The involvement of glial cells in a complicated pathomechanism of neuropathy is a probable cause of a significant weakening of analgesic effects of conventionally used painkiller, as demonstrated in both animal and clinical studies. This leads to the need for increasing dosage of drugs, what can result in the occurrence of side effects. If effective therapy is to be implemented, it is necessary, basing on extensive research, to determine new molecular targets in the treatment of neuropathic pain and identify the reasons behind the decreasing effectiveness of analgesics. This doctoral dissertation focuses on that serious clinical issue, namely neuropathic pain, and its aim was to determine the mechanisms and potential targets of substances modulating the activity of selected glial cell subpopulations in nociceptive transmission.

In vivo studies were conducted on male Wistar rats or Albino Swiss mice (Charles River) according to the recommendations of the 2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee of the Maj Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences and the principles provided by the National Institutes of Health (NIH) and the International Association for the Study of Pain (IASP). The neuropathic pain model included unilateral sciatic nerve injury (Chronic Constriction Injury, the CCI model) and the pharmacological tools were administered intraperitoneally or intrathecally (between L5-L6 lumbar vertebrae in mice or via previously implanted subarachnoid cannulas in rats). Behavioural experiments incorporated tests such as the von Frey, cold plate and tail flick test, which measured the level of hypersensitivity to tactile and thermal stimuli. Concomitantly, *in vitro*

studies were conducted using primary cultures of microglia and astroglia isolated from the cortex of one-day-old female Wistar rat pups. The biochemical experiments were carried out on the tissue collected from the lumbar spinal cord (L4-L6) and corresponding dorsal root ganglia, as well as on the obtained cells. The RT-qPCR, Western blot, immunocytochemistry and immunohistochemistry methods were used in order to assess changes in mRNA and protein levels.

Neuroimmune interaction plays a key role in the pathogenesis of neuropathic pain. Therefore, the initial research focused on the assessment of changes in the level of immune factors (interleukins and chemokines) involved in the processes associated with its formation. Studies conducted on a CCI model showed that in the course of neuropathy the expression of interleukin (IL)-18 and its receptor, IL-18R, increases, what is parallel to the occurrence of neuropathic pain symptoms and the activation of glial cells in the spinal cord. At the same time, it was possible to observe the reduction in the level of IL-18BP, an endogenous protein affecting the ability of IL-18 to bind to its receptor. Further studies showed that this natural IL-18 inhibitor plays an extremely important role in nociception. A single intrathecal administration of IL-18BP is enough to lower tactile and thermal hypersensitivity which develops after sciatic nerve injury. In addition, single administrations of IL-18BP were observed to increase the analgesic effects of opioids such as morphine and buprenorphine. Moreover, stimulated microglia cultures showed the highest increase in a pronociceptive IL-18, while astroglia cultures showed the highest increase in an anti-nociceptive IL-18BP. This goes in line with current views that in pathological conditions, being the basis for the development of neuropathic pain, microglia adopt a neurotoxic phenotype associated with the release of proinflammatory cytokines, whereas astrocytes play a fundamental role in maintaining homeostasis and may have neuroprotective, immunomodulatory and antioxidant properties. The indication of a significant contribution of the IL-18/IL-18BP/IL18R interaction in the pathomechanism of neuropathic pain suggests that restoring the balance between these factors reduces the symptoms of neuropathic pain and increases the efficacy of analgesics. This knowledge can be used in designing new drugs and developing more effective pharmacotherapy (*Pilat&Piotrowska et al. Mol Cell Neurosci., 2016*).

Due to disorders in neuronal plasticity and the activation of an immune component in the process of neuropathic pain development, the next point of the research covered the modulation of neuroimmune interactions. Many years of analyses conducted at the Department of Pharmacology of Pain allowed for a selection of compounds with a different mechanism of action and good analgesic potential – **minocycline** (considered to be an inhibitor of microglia activity) and botulinum toxin A (**BoNT/A**, considered to be a modulator of neuronal activity). It was hypothesized that their analgesic mechanism extends beyond the accepted limits. In a paper by Zychowska et al. (*Eur J Pharmacol.*, 2016) it was observed that intraplantar injections of BoNT/A to rats after a sciatic nerve injury inhibit the activation of microglia at the spinal cord level. In another work by **Piotrowska et al.** (*J Neuroimmunol.*, 2016a) minocycline administered intraperitoneally was found to affect the activation of not only microglia, but also astroglia. These results provided the basis for

initiating studies on the assessment of possible direct influence of minocycline and BoNT/A on microglia and astroglia, which was in fact accomplished in the framework of this doctoral work. The results of the *in vitro* studies showed that **minocycline** regulates the release of interleukins (IL-1 β , IL-18, IL-6) and nitric oxide synthase 2 (NOS2) in stimulated primary cultures of microglia and, surprisingly, astrocytes. This occurs due to the reduction of the phosphorylation of intracellular pathways such as p38 kinase and ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) belonging to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, and NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), as well as the activation of MMP-9 extracellular matrix metalloproteinase. On the other hand, **BoNT/A** influences SNAP-23 protein (synaptosomal-associated protein 23) in microglial and astroglial cells and SNAP-25 (synaptosomal-associated protein 25) expressed exclusively in astrocytes. Interestingly, BoNT/A increases the microglial level of TLR2 receptor (Toll-like receptor 2), which plays an important role in immune response. This change is presumably related to the effect of this toxin on the modulation of MAP kinases – p38, ERK1/2 and NF- κ B transcription factor, what results in a decrease in the levels of IL-1 β , IL-18, IL-6, and NOS2 released due to a stimulation with lipopolysaccharide. The conducted studies proved that both **minocycline and BoNT/A have a direct impact on microglial and astroglial cells**, and the mechanism of action of both substances is alike and contributes to the changes in the release of immune factors. This explains why the *in vitro* studies showed no synergistic effects in the modulation of pro- and antinociceptive factors following the combined administration of minocycline and BoNT/A. This result suggests that in the light of future therapy, the combination of these two substances may not bring the expected improvement in their effectiveness, while their administration combined with opioids may prove very beneficial (*Piotrowska et al. Front Cell Infect Microbiol.*, 2017).

The research conducted within the presented doctoral work showed another subgroup of cytokines, namely chemokines, and their significant involvement in neuropathy. In the first paper in this area, **Piotrowska et al. (J Neuroimmunol., 2016a)** observed that after sciatic nerve injury the level of CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2) and its CCR2 receptor (C-C chemokine receptor type 2) increased in the spinal cord with a parallel activation of glial cells, and decreased after multiple administrations of minocycline. Furthermore, the *in vitro* studies showed that minocycline reduces the release of CCL2 in lipopolysaccharide-stimulated microglial and astroglial cells. In addition, in a rat model of neuropathy, multiple intrathecal administrations of the **CCR2 antagonist, RS504393**, as compared to minocycline, showed to reduce hypersensitivity to painful stimuli, simultaneously leading to a lowered activation of microglia, but not astroglia. Thus, it was proven that **blocking the effects of CCL2/CCR2** increases the threshold of pain experience in neuropathic animals, and CCR2 is an important target for the modulation of nociceptive transmission.

The subsequent research on the role of chemokines and their receptors in the pathomechanism of neuropathic pain showed that **maraviroc, a CCR5 antagonist** (C-C chemokine receptor type 5), reduces hypersensitivity to tactile and thermal stimuli in rats

after a sciatic nerve injury. At the same time, in spinal cord and/or dorsal root ganglia, it influences the modulation of MAP kinases p38 and ERK1/2, and transcription factors NF- κ B and STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) involved in nociception, restoring the balance between pronociceptive (IL-1 β , IL-18, IL-6, NOS2) and antinociceptive (interleukin 1 receptor antagonist, IL-18BP, IL-10) factors. What is more, the *in vitro* studies demonstrated for the first time that the analgesic mechanism of action of maraviroc is linked with the modulation of glial cell activity and the ability to bring microglia and astroglia into the **state of alternative polarity** by promoting the release of antinociceptive factors (*Piotrowska et al. Neuropharmacology, 2016b*).

Further research was devoted to the subfamily of CXC chemokines, little-known in the context of neuropathic pain. *Piotrowska et al. (Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis., 2018)* demonstrated a very important role of CXCR3 (C-X-C chemokine receptor type 3) and its ligands in neuropathy. The behavioural tests proved that CXCR3 ligands (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11) (CXCL-, chemokine (C-X-C motif) ligand) induce the development of tactile and thermal hypersensitivity in healthy mice occurring shortly after their administration, what suggested a neuronal presence of this receptor. Immunofluorescence staining performed on spinal cord sections confirmed this location. Biochemical tests showed an increase in mRNA and protein levels for CXCR3 and its ligands (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11) in the spinal cord in a CCI model. Moreover, the increased expression of CXCL9 and CXCL10 is also observed in later days after sciatic nerve injury, indicating their involvement in maintaining an increased response to nociceptive stimuli. Importantly, a single administration of antibodies neutralizing these two strongly changing in neuropathy chemokines weakens hypersensitivity to tactile and thermal stimuli in a model of neuropathic pain. Beneficial analgesic effects were also detected after multiple administrations of the selective **CXCR3 antagonist, ($\pm$)-NBI-74330**. The biochemical tests proved that at the spinal cord level the mechanism of action of this antagonist is linked to the inhibition of microglia which become highly-activated after sciatic nerve injury, and this entails the reduction of the biosynthesis of selective receptor ligands – CXCL9 and CXCL10. This is consistent with the results of the *in vitro* studies, which confirmed the presence of CXCR3 on the surface of microglial cells, and the activation of these cells contributes to the increased release of CXCL9 and CXCL10, which levels are directly reduced by blocking CXCR3 with ($\pm$)-NBI-74330. Particularly significant is the fact that the **CXCR3 antagonist intensifies the analgesic effects of morphine**, which is a proposal for combination therapy that can be used in clinical trials. Moreover, it presents implementation perspectives for new pharmacological tools.

Basing on the results exhibited in a series of 5 original papers included in this doctoral dissertation, one may argue that an important direction in the search for the pathomechanisms and causes of reduced efficacy of opioid drugs in neuropathic pain is studies on the influence of glial cells on this phenomenon. As a result of damage to the peripheral nerve, in addition to neuronal effects, we can observe an increased release of immunological factors, including pronociceptive interleukins and chemokines. Importantly, indication of factors involved in nociception processes can broaden the knowledge in this

area, but also, provide information about new molecular targets for effective pain pharmacotherapy. Additionally, the use of substances, such as maraviroc, which not only decrease the activity of glial cells, but also introduce them into an alternative polarization of likely neuroprotective character, may be the best approach to relieve the symptoms of neuropathic pain and improve the quality of patients' lives. Finally, selected substances with high analgesic potential combined with conventionally used analgesics may provide satisfactory therapeutics results and pain relief. This doctoral dissertation emphasizes the need for a multidirectional approach in the treatment of neuropathic pain, combining the modulation of nociceptive transmission executed by neurons, but also regulated by glial cells.