

5. Summary in Polish

Molekularne podłoże patomechanizmu bólu neuropatycznego nie jest do końca poznane. Stosowane w terapii leki opioidowe nie wykazują dobrego efektu analgetycznego, co prowadzi do zwiększenia dawek i wystąpienia wielu objawów niepożądanych. Celem pracy doktorskiej było określenie nowych punktów uchwytu dla terapii bólu neuropatycznego w oparciu o zbadanie roli wybranych szlaków wewnątrzkomórkowych w procesie aktywacji komórek mikrogleju oraz działaniu opioidowych leków przeciwbólowych.

W badaniach wykorzystany został zwierzęcy model bólu neuropatycznego polegający na luźnym podwiązaniu nerwu kulszowego (*chronic constriction injury*, CCI) u szczura. W tym modelu zwierzęta wykazują wzrost wrażliwości na bodźce bólowe (hiperalgezia) oraz reagują na bodźce niebólowe (alodynia). Rozwój symptomów neuropatii był mierzony za pomocą testu von Frey'a (mechaniczna alodynia) oraz testu zimnej płytki (termiczna hiperalgezia). Badane związki były podawane zwierzętom dootrzewnowo oraz za pomocą drenów nardzeniowych. W badaniach wykorzystane zostały również szczurze, pierwotne hodowle komórek mikrogleju. Pobrany w trakcie doświadczeń materiał biologiczny został wykorzystany do badań biochemicznych (qRT-PCR, western blot, immunocytochemia oraz wiązania [³⁵S]GTPγS) w celu określenia wpływu podanych związków na modulację aktywacji komórek glejowych, czynników pro- i antynocyceptywnych oraz wybranych szlaków wewnątrzkomórkowych.

W badaniach przeanalizowano wpływ inhibitora kinazy p38 MAPK, minocykliny, na efektywność analgetycznego działania morfiny oraz selektywnych ligandów receptorów opioidowych MOP, DOP, KOP i NOP. Uzyskane wyniki wykazały, że minocyklina w sposób istotny znosiła symptomy bólu neuropatycznego oraz zwiększała efektywność ligandów MOP, KOP i NOP, co było skorelowane z zahamowaniem aktywacji komórek mikrogleju na poziomie lędźwiowym rdzenia kręgowego (Mika i wsp., 2014; Popiolek-Barczyk i wsp., 2014a). Co ciekawe podania minocykliny nie wpływały na analgetyczne efekty ligandów receptora DOP (Mika i wsp., 2014). W badaniach, z wykorzystaniem pierwotnej hodowli komórek mikrogleju, wykazano, zarówno na poziomie mRNA jak i białka, obecność receptora MOP, KOP i NOP, ale nie DOP. Otrzymane wyniki sugerują, że efekt analgetyczny wywoływany ligandami receptora DOP nie jest zależny od aktywacji komórek mikrogleju przez co te nie tracą one swojej efektywności w trakcie rozwoju bólu neuropatycznego (Mika i wsp., 2014). W badaniach z wykorzystaniem techniki wiązania [³⁵S]GTPγS wykazaliśmy, że minocyklina zwiększała oddziaływanie nocyceptyny z receptorem NOP u zwierząt neuropatycznych (Popiolek-Barczyk i wsp., 2014a). Dodatkowo minocyklina obniżała mRNA dla receptora NOP na poziomie rdzenia kręgowego, co było związane z jednoczesnym spadkiem aktywacji komórek mikrogleju (Popiolek-Barczyk i wsp., 2014a). Wyniki naszych badań sugerują, że minocyklina nasila analgetyczne działanie nocyceptyny w wyniku jej oddziaływanie z neuronalną pulą receptora (Popiolek-Barczyk i wsp., 2014a).

W dalszych badaniach wykazaliśmy, że inhibitor szlaku kinaz ERK1/2, U0126, również obniża symptomy bólu neuropatycznego oraz nasila przeciwbólowe efekty morfiny. Badania biochemiczne wykazały, że U0126 nasilał obniżony w neuropatii poziom rdzeniowych receptorów opioidowych MOP, DOP i KOP (Popiolek-Barczyk i wsp., 2014b).

W kolejnej części badań przeanalizowaliśmy wpływ inhibicji szlaku czynnika jądrowego κB (NF-κB), z wykorzystaniem partenolidu, na rozwój bólu neuropatycznego. Partenolid jest związkiem pochodzenia roślinnego, wykazującym działanie przeciwzapalne i przeciwmigrenowe. Nasze badania wykazały, że partenolid w sposób istotny obniżał symptomy bólu neuropatycznego, a także zwiększał efektywność analgetyczną morfiny, co było skorelowane ze zwiększeniem poziomu ekspresji receptorów opioidowych MOP,

DOP i *KOP* w odcinku lędzwiowym rdzenia kręgowego (**Popiolek-Barczyk i wsp., 2014b**). W kolejnych badaniach zaobserwowaliśmy, że partenolid podawany wielokrotnie prowadzi do nasilenia aktywacji komórek mikrogleju. Równolegle przeprowadzone badania wykazały, że związek ten hamuje poziom aktywacji markerów fazy M1 (IL-1 β , IL-18 i iNOS), natomiast podnosi fazy M2 (IL-10, TIMP1) (**Popiolek-Barczyk i wsp., 2015**). Wyniki naszych badań sugerują, że analgetyczne efekty partenolidu są związane z polaryzacją mikrogleju w kierunku neuroprotektoryjnej fazy M2. Przeprowadzona w badaniach analiza szlaków wewnątrzkomórkowych wykazała, że partenolid nie tylko hamuje aktywację szlaku NF- κ B, ale także kinaz p38 i ERK1/2, co może być związane z obserwowanym zahamowaniem probólowych czynników takich jak IL-1 β , IL-18 i iNOS. Natomiast jego podanie podnosi poziom aktywacji białka STAT3, co może być związane z korzystnym wpływem na poziom przeciwbólowej IL-10 oraz TIMP1 (**Popiolek-Barczyk i wsp., 2015**). W naszych badaniach wykazaliśmy nieznaną dotąd fakt, że partenolid zwiększa aktywację komórek mikrogleju na poziomie rdzenia kręgowego oraz przywraca zaburzoną w neuropatii równowagę pomiędzy czynnikami pro- i przeciwbólowymi (**Popiolek-Barczyk i wsp., 2015**). W pierwotnej hodowli komórek mikrogleju dowiedliśmy, że komórki te są źródłem istotnych dla rozwoju neuropatii czynników nocyceptywnych (**Popiolek-Barczyk i wsp., 2015**).

Wyniki pracy doktorskiej pozwoliły na określenie szlaków wewnątrzkomórkowych, które mają znaczenie dla rozwoju neuropatii oraz analgetycznego działania opioidów, a tym samym zaproponowaliśmy nowe cele molekularne dla leczenia bólu neuropatycznego. W mojej pracy wykazałam, że partenolid, w przeciwieństwie do minocykliny (która silniej działa zastosowana przed uszkodzeniem) wywiera działanie przeciwbólowe zastosowany w trakcie rozwiniętej neuropatii, co wydaje się być bardzo ważne z klinicznego punktu widzenia. Z danych literaturowych wynika, że minocyklina zmniejsza aktywację mikrogleju i hamuje fazę M1 (IL-6, IL-18), ale nie wpływa na M2 (IL-10). Nasze badania wykazały, że korzystne efekty partenolidu w neuropatii wynikają z polaryzacji komórek mikrogleju w kierunku fazy M2. Wyniki otrzymane podczas realizacji badań udowadniają, że proponowana strategia skierowana na modulację szlaku kinaz p38 i NF- κ B prowadząca do zmian aktywacji komórek mikrogleju podczas bólu neuropatycznego, nie tylko znosi symptomy bólu, ale także zwiększa efektywność działania leków opioidowych.

Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej

1. Joanna Mika, Katarzyna Popiolek-Barczyk, Wioletta Makuch, Ewelina Rojewska, Katarzyna Starowicz, Barbara Przewlocka „Delta-opioid receptor analgesia is independent of microglial activation in a rat model of neuropathic pain” *PLOS-ONE*, 2014, IF₂₀₁₄=3.23, MNiSW=40
2. Katarzyna Popiolek-Barczyk, Ewelina Rojewska, Agnieszka Jurga, Wioletta Makuch, Ferenc Zador, Anna Borsodi, Anna Piotrowska, Barbara Przewlocka, Joanna Mika, "Minocycline enhances the effectiveness of nociceptin/orphanin FQ during neuropathic pain" *BioMed Research International*, 2014a, IF₂₀₁₄=2.71, MNiSW=30
3. Katarzyna Popiolek-Barczyk, Wioletta Makuch, Ewelina Rojewska, Dominika Pilat, Joanna Mika, "Inhibition of intracellular signaling pathways NF- κ B and MEK1/2 attenuates neuropathic pain development and enhances morphine analgesia" *Pharmacological Reports*, 2014b, 66: 845-851. IF₂₀₁₄=1.93, MNiSW=25
4. Katarzyna Popiolek-Barczyk, Natalia Kolosowska, Anna Piotrowska, Wioletta Makuch, Ewelina Rojewska, Agnieszka Jurga, Dominika Pilat, Joanna Mika, „Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy” *Neural Plasticity*, 2015 IF₂₀₁₄=3.58, MNiSW=25