6. Streszczenie w języku polskim

Neuropatia to trzecie najczęstsze powikłanie cukrzycy. Jej etiologia nie jest dokładnie poznana a łagodzenie charakterystycznych dla tego bólu symptomów stanowi wciąż duże wyzwanie dla klinicystów (**Zychowska i wsp., *Pharm. Rep.* 2013 - *praca przeglądowa***). Z tego też względu istotą badań prowadzonych w trakcie realizacji doktoratu było określenie udziału czynników immunologicznych w patomechanizmach rozwoju neuropatii cukrzycowej, a także próba określenia pośredniej (działanie na źródło komórkowe) oraz bezpośredniej (zastosowanie przeciwciał neutralizujących cytokiny) farmakologicznej modulacji bólu.

Doświadczenia przeprowadzono na samcach myszy rasy Albino Swiss (Charles River) zgodnie z zaleceniami II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Instytutu Farmakologii PAN oraz zasadami podanymi przez *National Institutes of Health* i *International Association for the Study of Pain*. Do badań wykorzystano mysi model neuropatii cukrzycowej, który uzyskuje się poprzez jednorazowe, dootrzewnowe podanie streptozotocyny (STZ; 200 mg/kg). Badania behawioralne określające stopień rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne oraz termiczne wykonywane były przy użyciu testu von Frey, zimnej płytki i/lub testu odsuwania ogona (**Zychowska i wsp., *J. Neuroimmunol.* 2013, *J. Diabetes Res.* 2015, *Anesthesiology* 2016, *Int. Immunopharmacol.* 2017**). Narzędzia farmakologiczne podawane były dootrzewnowo lub podpajęczynówkowo na poziomie L5-L6. W wyżej wymienionych pracach analizie poddano zmiany poziomu ekspresji mRNA oraz białka w lędźwiowej części rdzenia kręgowego przy użyciu techniki RT-qPCR, Western blot, macierzy cytokinowych i/lub immunohistochemii. Hodowle komórkowe prowadzone były na komórkach mikrogleju i astrocytów izolowanych z kory mózgowej jednodniowych osesków szczurów rasy Wistar (**Zychowska i wsp., *Anesthesiology* 2016, *Int. Immunopharmacol.* 2017**).

Badania z wykorzystaniem streptozotocynowego modelu neuropatii cukrzycowej dowiodły, że wraz ze wzrostem poziomu glukozy we krwi oraz spadkiem masy ciała dochodzi do rozwoju charakterystycznych dla bólu neuropatycznego symptomów, a co za tym idzie obniżenia progu percepcji bólowej. Jednocześnie w części lędźwiowej rdzenia kręgowego obserwowano wzrost poziomu markera aktywacji mikrogleju IBA1 (mierzonym w dniu siódmym od podania STZ). Zmianom tym towarzyszył również wzrost poziomu znaczącej liczby cytokin (tj. IFNgamma, IL-1beta, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-17). Zastosowanie wielokrotnych podań minocykliny, substancji hamującej aktywację mikrogleju, podniosło próg percepcji bólowej. Podania minocykliny doprowadziły również do wzrostu poziomu antynocyceptywnych czynników immunologicznych (tj. IL-1alpha, IL-2, IL-10, sTNFRII). Istotnym z punktu widzenia potencjalnej terapii jest fakt, iż minocyklina zarówno łagodziła symptomy neuropatii cukrzycowej, jak również nasilała analgetyczne efekty morfiny (**Zychowska et al., *J. Neuroimmunol.* 2013**).

Badania prowadzone w trakcie realizacji doktoratu pozwoliły również na określenie profilu zmian chemokin z grupy CXC-, XCL- i CCL- w przebiegu neuropatii cukrzycowej. W mysim modelu dowiedziono, że wraz z rozwojem neuropatii cukrzycowej ekspresja mRNA *cxcl1*, *cxcl9* i *cxcl11* wzrasta, a *cxcl12* maleje w lędźwiowej części rdzenia kręgowego. Ponadto wykazano, że poziom białka CXCL1, CXCL5, CXCL9 oraz CXCL12 jest podniesiony w dniu siódmym po podaniu STZ. Natomiast poprzez jednorazowe podpajęczynówkowe podania chemokin CXCL1, CXCL5, CXCL9 oraz CXCL12 zwierzętom zdrowym wykazano, że doprowadzają one do rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne

i termiczne. Wskazuje to na istotny udział chemokin grupy CXC- w procesie nocycepcji **(Zychowska et al., *J. Diabetes Res.* 2015).**

Dalsze badania w streptozotocynowym modelu neuropatii cukrzycowej pozwoliły na stwierdzenie, że wraz z rozwojem bólu neuropatycznego poziom chemokiny XCL1 oraz jej receptora XCR1 wzrasta, czemu towarzyszy wzrost ilości markera aktywacji mikrogleju IBA1. Nie obserwowano natomiast aktywacji astrocytów, czy też komórek CD4 i CD8 pozytywnych. Dzięki zastosowaniu pierwotnych hodowli komórek glejowych dowiedziono, że stymulacja mikrogleju lipopolisacharydem prowadzi do wzrostu poziomu XCL1 oraz XCR1. Jednakże na poziomie rdzenia kręgowego ekspresja XCR1 okazała się być największa na komórkach neuronalnych, dlatego też silny rozwój symptomów bólu neuropatycznego obserwowany był wkrótce po jednorazowym podpajęczynówkowym podaniu XCL1 zwierzętom zdrowym czemu towarzyszył wzrost poziomu markera aktywacji mikrogleju IBA1. Ponadto, istotnym okazał się fakt, że podanie przeciwciał neutralizujących XCL1 podnosi próg percepcji bólowej w modelu neuropatii cukrzycowej, a jednocześnie zapobiega aktywacji mikrogleju wywołanej podaniem XCL1 **(Zychowska et al., *Anesthesiology* 2016).**

Dalsze badania skupiły się na określeniu roli chemokiny CCL1 w zaburzonych w przebiegu neuropatii cukrzycowej procesach nocycepcji. Wykazano, że pojedyncze podpajęczynówkowe podanie CCL1 zwierzętom zdrowym powoduje pojawienie się nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne. Dowiedziono również, że poziom tej chemokiny w neuropatii cukrzycowej jest podniesiony. Niezmiernie istotnym okazał się fakt, iż podanie przeciwciał neutralizujących CCL1 nie tylko osłabia rozwinięte symptomy bólu neuropatycznego, ale również nasila efekty opioidów (morfiny i buprenorfiny). Barwienie immunofluorescencyjne wykonane na skrawkach pobranych z rdzenia kręgowego wykazały, że CCR8 (jedyny receptor CCL1) jest zlokalizowany głównie na komórkach neuronalnych. Również neurony (a nie mikroglej czy astroglej) okazały się być głównym źródłem komórkowym dla CCL1, co potwierdziły badania przeprowadzone w hodowlach pierwotnych mikrogleju i astrogleju (**Zychowska i wsp., *Int. Immunopharmacol.* 2017**).

Określenie roli cytokin w rozwoju i utrzymywaniu się bólu neuropatycznego towarzyszącego cukrzycy daje możliwość lepszego poznania oraz zrozumienia patomechanizmów jego powstawania. Wiedza ta umożliwia zaproponowanie całkowicie odmiennych niż dotychczas podejść terapeutycznych. Skupiając uwagę na możliwości zastosowania przeciwciał neutralizujących chemokiny nie tylko obserwowano łagodzenie symptomów bólowych, ale również pozyskano informacje stanowiące podstawę zaproponowania nowej formy terapii opartej na zmniejszaniu endogennej puli wybranych chemokin. Stosując natomiast zgoła odmienne podejście, w którym celem staje się nie ligand lecz komórka będąca jego źródłem, nie tylko potwierdzono istotną rolę cytokin w patomechanizmach neuropatii cukrzycowej, ale również wykazano jak ważne jest przywrócenie zaburzonej w bólu neuropatycznym równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antynocyceptywnymi. Propozycja łącznego stosowania nowych substancji o potencjale analgetycznym z klasycznymi opioidami będącymi często jedyną, jak również ostatnią szansą dla cierpiących z powodu bólu przewlekłego uzmysławia jak szalenie istotne jest poszerzanie pola terapeutycznych możliwości z którego obecnie w tak niewielkim stopniu korzystamy. Dlatego też najistotniejszym osiągnięciem przedstawionego doktoratu jest zaproponowanie nowego podejścia do łagodzenia symptomów bólu neuropatycznego poprzez skupienie uwagi głównie na zmniejszaniu poziomu endogennych czynników immunologicznych, a nie na komórkach uczestniczących w tworzeniu neuroimmunologicznych zależności w wyniku których dochodzi do ich uwalniania.

7. Streszczenie w języku angielskim

Neuropathy is the third most common complication of diabetes. Its etiology is poorly understood and the alleviation of its symptoms still presents itself as a big challenge for clinicians (**Zychowska et al., *Pharm. Rep* 2013 – *review work***). For this reason, the research conducted throughout my PhD studies focused on two main issues: determination of the role of immunological factors in the pathomechanisms of diabetic neuropathy, and an attempt to detect indirect (impact on a cell source) and direct (with the use of cytokine neutralizing antibodies) pharmacological modulation of pain.

The experiments were performed on male Albino Swiss mice (Charles River) in accordance with the recommendations of the 2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee at the Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences, and the principles of the National Institutes of Health and the International Association for the Study of Pain. A mouse model of diabetic neuropathy obtained by a single intraperitoneal administration of streptozotocin (STZ: 200 mg/kg) was used. Behavioural tests, which determine a degree of development of hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli, were performed with the von Frey test, cold plate test and/or tail flick test (**Zychowska et al., *J. Neuroimmunol.* 2013, *J. Diabetes Res.* 2015, *Anesthesiology* 2016, *Int. Immunopharmacol.* 2017**). Pharmacological tools were administered intraperitoneally or intrathecally at the L5-L6 level. In the abovementioned tasks, changes in the level of mRNA and protein expression in the lumbar part of the spinal cord were analyzed with the RT-qPCR technique, Western blot, cytokine microarrays and/or immunohistochemistry. Cell cultures were developed on microglia and astrocytes isolated from the cerebral cortex of one-day-old Wistar pups (**Zychowska et al., *Anesthesiology* 2016, *Int. Immunopharmacol.* 2017**).

Studies on a streptozotocin model of diabetic neuropathy showed that an increase in blood glucose and weight loss are accompanied by the development of the symptoms characteristic of neuropathic pain what results in the reduction of pain perception threshold. In the lumbar part of the spinal cord a concomitant increase in the level of a microglia activation marker IBA1 (measured on day 7 after the STZ administration) was observed. Those changes were also accompanied by an increase in the level of a significant number of cytokines (i.e., IFNgamma, IL-1beta, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-17). Multiple administrations of minocycline, a substance inhibiting microglia activation, raised the threshold of pain perception and led to an increase in the level of antinociceptive immunological factors (i.e., IL-1alpha, IL-2, IL-10, sTNFRII). The fact that minocycline alleviated the symptoms of diabetic neuropathy and enhanced analgesic effects of morphine turned out to be vital for potential therapy (**Zychowska et al., *J. Neuroimmunol* 2013**).

The research conducted during my PhD studies allowed for a determination of the profile of changes of chemokines from the CXC-, XCL-, and CCL- groups under diabetic neuropathy. Experiments on a mouse model showed that the development of diabetic neuropathy is accompanied by an increase of the expression of mRNA *cxcl1*, *cxcl9*, and *cxcl11*, and a decrease of *cxcl12* in the lumbar part of the spinal cord. In addition, the levels of CXCL1, CXCL5, CXCL9 and CXCL12 proteins became elevated on day 7 after the STZ administration. By contrast, it was shown that single intrathecal administrations of CXCL1, CXCL5, CXCL9 and CXCL12 chemokines to healthy animals lead to the development of hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli. This indicates a significant role of CXC-chemokines in the nociception process (**Zychowska et al., *J. Diabetes Res.* 2015**).

Further studies on a streptozotocin model of diabetic neuropathy brought a conclusion that the level of XCL1 chemokine and its XCR1 receptor raises alongside the development of

neuropathic pain, what is accompanied by an increase in the number of microglia activation markers IBA1. However, the activation of astrocytes or CD4 and CD8 positive cells was not observed. Primary glial cell cultures allowed us to prove that the stimulation of microglia with lipopolysaccharide leads to an increase of XCL1 and XCR1 levels. However, at the level of the spinal cord, the XCR1 expression turned out to be the greatest on neuronal cells. Therefore, a strong development of neuropathic pain symptoms could be observed soon after a single intrathecal administration of XCL1 to healthy animals, what was accompanied by an increase in the level of the microglia activation marker IBA1. Additionally, it is noteworthy that the administration of XCL1 neutralizing antibodies raises the threshold of pain perception in a diabetic neuropathy model and at the same time prevents microglia activation caused by the administration of XCL1 (**Zychowska et al., *Anesthesiology* 2016**).

Subsequent studies focused on the determination of the role of CCL1 chemokine in the processes of nociception disordered due to the development of diabetic neuropathy. It was demonstrated that a single intrathecal administration of CCL1 to healthy animals causes hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli. It was also proven that the level of this chemokine becomes elevated in diabetic neuropathy. The fact that the administration of CCL1 neutralizing antibodies not only weakens already developed symptoms of neuropathic pain, but also intensifies the effects of opioids (morphine and buprenorphine) turned out to be extremely important. Immunofluorescence staining performed on samples taken from the spinal cord showed that CCR8 (a sole CCL1 receptor) is located mainly on neuronal cells. Neurons (not microglia or astroglia) also proved to be the main cellular source for CCL1, as confirmed by the research conducted on primary cultures of microglia and astroglia (**Zychowska et al., , *Int. Immunopharmacol.* 2017**).

Determination of the role of cytokines in the development and maintenance of neuropathic pain associated with diabetes gives the opportunity for a better understanding of the pathomechanisms of its formation. This knowledge can allow us to propose completely different and new therapeutic approaches. Our attention was focused on the possibility of using chemokine neutralizing antibodies. This allowed us not only to observe pain symptom alleviation, but also to obtain information constituting the foundations for proposing a new form of therapy based on reducing the endogenous pool of selected chemokines. However, a completely different approach – where not a ligand but its cell-source becomes the target – resulted not only in the confirmation of an important role of cytokines in the pathomechanisms of diabetic neuropathy, but also in showing the importance of restoration of the balance between pro- and antinociceptive factors which becomes disrupted under neuropathic pain. The suggestion of using new substances with analgetic potential combined with classic opioids, being often the only and last chance for those suffering from chronic pain, makes one aware of how important it is to expand the field of therapeutic options, which is currently used to a small extent. Therefore, the most important achievement of the presented doctoral dissertation is the proposal of a new approach to relieving neuropathic pain symptoms by turning the main attention to the reduction of the level of endogenous immunological factors, and not to the cells involved in the formation of neuroimmunological relations resulting in their release.