

Ewelina Rojewska

Instytut Farmakologii PAN, Zakład Farmakologii Bólu

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Farmakologii Bólu pod kierunkiem dr hab. Joanny Mika

**ZMIANY CZYNNIKÓW NEUROIMMUNOLOGICZNYCH
W BÓLU NEUROPATYCZNYM
- ANALGETYCZNY MECHANIZM DZIAŁANIA MINOCYKLINY**

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Badania eksperymentalne i kliniczne ostatnich lat podkreślają mnogość endogennych czynników inicjujących i regulujących stany bólu neuropatycznego oraz podkreślają rolę neuroimmunologicznych interakcji w tych procesach. Wiadomo już, że w wyniku uszkodzenia tkanki dochodzi do zmian aktywności komórek glejowych, a zwłaszcza mikrogleju oraz do zaburzenia równowagi pomiędzy czynnikami przeciwzapalnymi i prozapalnymi, na korzyść tych ostatnich.

Celem pracy było określenie wpływu minocykliny, inhibitora aktywacji komórek mikrogleju na wywołane uszkodzeniem nerwu kulszowego zmiany czynników neuroimmunologicznych zachodzące w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych w modelu bólu neuropatycznego u szczura. Badania przewidywały również poszukiwanie nowych mechanizmów działania przeciwbólowego minocykliny w bólu neuropatycznym, a szczególnie udziału ligandów receptora KOP. W ramach tych badań pracy chcieliśmy również wykazać zmiany transkryptów na poziomie rdzenia kręgowego w modelu bólu neuropatycznego oraz ich modulację po podaniach minocykliny, przy wykorzystaniu metody mikromacierzy DNA.

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach samcach rasy Wistar (Charles River, Niemcy) zgodnie z zaleceniami Komisji do Spraw Etyki Badań nad Zwierzętami IF PAN w Krakowie oraz zasadami podanymi przez NIH „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals i przez Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu (IASP, Zimmermann, 1983). Operacje implantacji drenów przeprowadzono na szczurach po podaniu pentobarbitalu zgodnie z metodą opracowaną przez Yaksh i Rudy (1987). W badaniach zastosowano model bólu neuropatycznego polegający na luźnym jednostronnym podwiązaniu nerwu kulszowego (*chronic constriction injury*, CCI; Bennett i Xie, 1988). Badania prowadzone były przy pomocy metod

behawioralnych (metoda von Frey i zimnej płytki) i biochemicznych (metoda qPCR, wiązanie^[35S]GTPgammaS i mikromacierze DNA).

W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano, że podwiązanie nerwu kulszowego powoduje wzrost poziomu mRNA *C1q*, *MMP-9*, *TIMP-1*, *IL-10*, *IL-1beta*, *IL-6*, *IL-18*, *GFAP*, *PDYN* w lędźwiowej grzbietowej części rdzenia kręgowego oraz zwojów korzeni grzbietowych. Ponadto w rdzeniu kręgowym zanotowano wzrost poziomu mRNA *TIMP-2*, *NOS2* oraz *SNAP-25*, natomiast w zwojach korzeni grzbietowych uszkodzenie spowodowało wzrost poziomu mRNA *MMP-2*, *IL-1alfa* oraz *NOS1*. Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA *IL-4* w badanych strukturach. Wykazano, że w bólu neuropatycznym dootrzewnowe (*i.p.*) podania minocykliny hamują ekspresję mRNA markerów mikrogleju (*C1q*) i astrogleju (*GFAP*) a także wielu pronocyceptywnych czynników takich jak: *MMP-9*, *SNAP-25*, *prodynorfiny (PDYN)*, *IL-18* w obydwu strukturach, a także obniżają poziom mRNA *IL-1beta* i *NOS2* w rdzeniu kręgowym oraz *MMP-2* w zwojach korzeni grzbietowych. Natomiast zaobserwowano, że minocyklina w niewielkim stopniu wpływa na czynniki przeciwzapalne i tak na przykład tylko w zwojach korzeni grzbietowych zaobserwowano, że po jej podaniach następuje obniżenie poziomu mRNA *IL-10* i *TIMP-1*. Wyniki tych badań pozwalają wysnuć wniosek, że minocyklina przywraca równowagę zachwianą w rozwoju bólu neuropatycznego po uszkodzeniu nerwów obwodowych, co wskazuje na możliwość jej zastosowania w terapii bólu neuropatycznego.

Podpajęczynówkowe (*i.t.*) podania minocykliny obniżają poziom mRNA *PDYN* podniesiony po uszkodzeniu nerwu kulszowego, a także obniżają nasiloną podaniem dynorfiny $A_{(1-17)}$ ekspresję mRNA *IL-1beta* oraz *IL-6* na poziomie rdzenia kręgowego. W badaniach behawioralnych wykazano, że minocyklina (*i.t.*) nasila przeciwbólowe efekty agonisty receptora kappa U50,488H i niskiej dawki dynorfiny $A_{(1-17)}$ (0,15 nmol) oraz znosi wiotki paraliż wywołany nieopiodowym działaniem wysokiej dawki dynorfiny $A_{(1-17)}$ (15 nmol), co sugeruje jej właściwości neuroprotecyjne. Podobne działanie zapobiegające wystąpieniu wiotkiego paraliżu po podaniu dynorfiny $A_{(1-17)}$ wykazano po jednorazowym oraz wielokrotnych podpajęczynówkowych podaniach inhibitora metaloproteiny-9 – *MMP-9* INH. I. Wyniki badań behawioralnych i biochemicznych wykazują, że mechanizm działania minocykliny w bólu neuropatycznym oprócz hamowania aktywacji mikrogleju może być związany z *MMP-9*, ponieważ zarówno jej efekty, jak i nasilenie ekspresji mRNA *IL-1beta* i *IL-6* po podaniu dynorfiny może być, w podobny sposób do minocykliny, obniżane przez podanie selektywnego inhibitora tej metaloproteiny.

Badania wykonane przy użyciu metody mikromacierzy DNA pozwoliły na wyodrębnienie dwóch wzorców transkrypcyjnych oraz posłużyły do budowania nowych hipotez dotyczących modulującego wpływu minocykliny na poziom abundancji transkryptów ulegających zmianie po uszkodzeniu obwodowego układu nerwowego. Wykazano, że z 92 transkryptów ulegających zmianom po podwiązaniu nerwu kulszowego, 42% jest modulowanych przez podania minocykliny. Przy użyciu metody qPCR potwierdzono zmiany i modulację minocykliną poziomu mRNA 3-monooksygenazy kynureniny (*Kmo*), apolipoproteiny3b (*Apobec3b*) oraz receptora *Clec7a* (dektyny 1) w rdzeniu kręgowym oraz wykazano podobne zmiany na poziomie zwojów korzeni grzbietowych. Badania wykazały, że w rozwoju bólu neuropatycznego ważną rolę odgrywa szlak kynureninowy, ponieważ obniżenie poziomu mRNA *Kmo* przez minocyklinę, jak

również podanie podpajęczynówkowe Ro618048 (inhibitor KMO) wywołuje efekty przeciwbólowe w bólu neuropatycznym. Wydaje się, że zahamowanie aktywności KMO może być jednym ze sposobów ochrony neuronów przed uszkodzeniami i jak się wydaje może mieć znaczenie terapeutyczne.

Podsumowując, nasze badania znacznie poszerzyły naszą wiedzę na temat działania minocykliny w bólu neuropatycznym wskazując na system prodynorfinowy, prozapalne cytokiny, SNAP-25 oraz metaloproteinazę-9 jako ważne elementy mechanizmu działania tego związku. Badania prowadzone przy pomocy mikromacierzy DNA, pozwoliły na wskazanie wielu transkryptów ważnych dla rozwoju neuropatii i będących potencjalnymi punktami uchwytu dla leków oraz umożliwiły wykazanie, że szlak kynureinowy odgrywa ważną rolę w neuropatii, a jego farmakologiczna modulacja może mieć ważne implikacje kliniczne.