



PRACOWNIA PATONEUROCHEMII
ZAKŁAD NEUROCHEMII
INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
im. M. Mossakowskiego PAN

02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5
tel./fax: (0-22)-608-66-23
neurochemia@imdik.pan.pl

Warszawa, 01.12.2021r.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska
Tel: 22-608 65 76
e-mail: lidkas@imdik.pan.pl

Ocena rozprawy doktorskiej
Pani mgr Klaralii Kwiatkowski
p.t. „Nowe strategie w farmakoterapii bólu neuropatycznego oparte na modulacji
funkcji receptorów chemokinowych”
wykonanej pod kierunkiem Promotora, Pani Prof. dr hab. n. med. Joanny Mika

Ocena formalna

Przedstawiona mi do oceny dysertacja stanowi zbiór 5 spójnych tematycznie publikacji, czterech oryginalnych i jednej pogładowej, opublikowanych w uznanych międzynarodowych czasopismach. Sumaryczny wskaźnik oddziaływania (IF) opublikowanych prac wynosi 21,87, co przekłada się na wysoki IF pojedynczej publikacji (średni IF=4,37). Spis tych publikacji otwiera rozprawę doktorską.

We wszystkich publikacjach Pani mgr Kwiatkowski jest pierwszym autorem, a w pracy pogładowej jest jednocześnie współautorem korespondencyjnym. Wiodąca rola Kandydatki do stopnia doktora jest udokumentowana oświadczeniami współautorów, które dołączono do dysertacji.

Zbiór artykułów naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej opatrzone WPROWADZENIEM, następnie, jasno sformułowano główny cel badań oraz 4 cele szczegółowe. W rozdziale METODOLOGIA BADAŃ opisano modele zwierzęce zastosowane w badaniach i przedstawiono schematycznie rozbudowaną konstrukcję eksperymentów. Kolejny rozdział GŁÓWNE ZAŁOŻENIA PRACY to 5 publikacji stanowiących podstawę doktoratu. Wyniki tych prac zostały przedyskutowane w rozdziale DYSKUSJA. Następne rozdziały dysertacji to PODSUMOWANIE WYNIKÓW, WNIOSKI KOŃCOWE i BIBLIOGRAFIA. Ponadto, dołączono streszczenia w języku polskim i angielskim, spis wszystkich publikacji Kandydatki (16 prac) oraz zgody Lokalnej Komisji Etycznej na wykonywanie doświadczeń na zwierzętach. Informacja na stronie tytułowej wskazuje źródła finansowania badań wykonanych w ramach doktoratu, t.j. granty NCN otrzymane w konkursach Harmonia 5, Opus 11 i Preludium 15.

Praca jest bardzo starannie przygotowana pod względem językowym, graficznym i redakcyjnym. Jej konstrukcja jest zgodna z obowiązującymi wymogami ustawowymi dla oryginalnej rozprawy doktorskiej, jak również z zaleceniami Komisji Rady ds. Prowadzenia Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora przyjętymi w IF PAN.

Ocena merytoryczna

Ból, choć jest nieodłącznym elementem ludzkiego życia warunkującym przeżycie jednostki, w formie chronicznej może stanowić poważny problem zdrowotny. W

szczegółności zaś ból neuropatyczny prowadzi do skrajnego pogorszenia jakości życia, stanowiąc ogromne wyzwanie terapeutyczne. Dostępne obecnie terapie są mało skuteczne, bądź obciążone istotnymi efektami ubocznymi przy długim czasie stosowania, czego przyczyną są m.in. złożone mechanizmy patofizjologiczne i różnorodna etiologia neuropatii. Sugeruje to konieczność wielowymiarowego podejścia terapeutycznego, opartego na jednoczesnym działaniu na kilka punktów komórkowych. Zatem, rozprawa Pani mgr Kwiatkowski przedstawiająca koncepcję takiego nowego podejścia w leczeniu bólu neuropatycznego, jest odpowiedzią na aktualne potrzeby kliniczne.

We WPROWADZENIU omówiono patofizjologię, farmakoterapię i neuroimmunologiczne podłoże bólu neuropatycznego. Doktorantka wymienia dostępne obecnie metody farmakoterapii bólu, (t.j. substancje z grupy leków przeciwpadaczkowych, przeciwdepresyjnych, leki stosowane powierzchniowo oraz opioidy), opisując mechanizmy ich działania i ograniczenia w stosowaniu wynikające z niepożądanych działań ubocznych. Omawiając neuroimmunologiczne podłoże bólu neuropatycznego, wskazuje na kluczową rolę komórek immunologicznych oraz glejowych, jak również wydzielanych przez nie cytokin i chemokin, w mechanizmach leżących u podłoża rozwoju i utrzymywania się objawów bólowych.

Do tej części pracy mam jedynie niewiele drobnych uwag, przeważnie natury lingwistycznej:

Str. 20 – zdanie „podanie przezskórne w systemie transdermalnym” jest tautologią

Str. 31 – mówimy o **niealkoholowym** (a nie bezalkoholowym) stłuszczeniowym zapaleniu wątroby (też str. 97, 124)

Na str. 24 użyto zbyt ogólnego sformułowania w opisie funkcji komórek glejowych. Stwierdzenie „tworzą barierę krew-mózg” sugeruje, że bariera na poziomie komórkowym tworzona jest przez komórki astrocytów, podczas gdy to komórki endotelium połączone połączeniami ścisłymi są odpowiedzialne za szczelność mikronaczyń mózgowych. Astrocyty raczej **współtworzą barierę**, będąc elementem jej jednostki funkcjonalnej tzw. złącza nerwowo-naczyniowego.

Chcę podkreślić, że ta część pracy jest bardzo dobrze i wyczerpująco napisana. Sposób jej opracowania świadczy o dobrej znajomości literatury związanej z wybranym tematem badań. Co szczególnie cenne, wskazuje na umiejętność dogłębnej analizy informacji, która skutkuje starannie przemyślanym ciągiem logicznym podjętych badań eksperymentalnych, świadcząc o dojrzałości naukowej Autorki doktoratu. Rozdział ten bardzo dobrze uzasadnia podjętą tematykę badań, w tym wybór receptorów chemokinowych CCR2 i CCR5, ich ligandów zaangażowanych w mechanizmy bólu neuropatycznego oraz substancji farmakologicznych będących antagonistami tych receptorów, stanowiąc doskonale przejście do sformułowania celów pracy.

Głównym celem, jaki postawiła sobie Doktorantka, było zbadanie roli i efektów farmakologicznej modulacji receptorów dla chemokin CCR2 i CCR5 w patomechanizmach bólu neuropatycznego. Cztery cele szczegółowe, logicznie ze sobą powiązane, doprecyzowują szeroki zakres planowanych badań z udziałem trzech narzędzi farmakologicznych – selektywnego antagonisty receptora chemokinowego CCR2 – (RS504393), selektywnego antagonisty receptora CCR5 (marawirok) oraz podwójnego antagonisty CCR2/CCR5 (cenicriwirok). Zaplanowane badania obejmują testy behawioralne, analizy biochemiczne i molekularne w dwóch modelach zwierzęcych.

W rozdziale METODOLOGIA BADAŃ Doktorantka opisuje pokrótce zastosowane zwierzęce modele bólu neuropatycznego polegające na luźnym, jednostronnym podwiązaniu nerwu kulszowego oraz umieszcza schematy przeprowadzonych eksperymentów. Choć dokładna metodologia badań została opisana w każdej z kolejnych publikacji, zabrakło tu informacji o ogólnej liczbie zwierząt użytych w doświadczeniach. Na Schemacie B (procedury eksperymentalne u szczurów) nie uwzględniono podania morfiny/buprenorfiny,

których działanie przeciwbólowe badano po podaniu antagonistów receptorów CCR2 i CCR5 (co opisano w publikacjach 2 i 4). Rozumiem jednak, że mnogość wykonanych eksperymentów utrudniała umieszczenie wszystkich szczegółów na rycinie zbiorczej. Ciekawi mnie, dlaczego w badaniach zastosowano 2 modele bólu neuropatycznego, szczurzy i mysi, dlatego proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tej kwestii. (Drobna uwaga – mówimy o szczepie a nie rasie szczurów Wistar/myszy Albino Swiss).

W rozdziale GŁÓWNE ZAGADNIENIA DOKTORATU przedstawiono kolejne publikacje, z których każda poprzedzona jest krótkim (1-stronicowym) uzasadnieniem przeprowadzonych badań, opisem najważniejszych wyników i wnioskami. Taka synteza treści publikacji bardzo ułatwia śledzenie toku rozprawy.

Pierwsza z cyklu publikacji jest pracą poglądową, będącą analizą obecnego stanu wiedzy na temat roli chemokin i ich receptorów w powstawaniu bólu neuropatycznego a także ich wpływu na przeciwbólowe działanie leków opioidowych. Omówiono tu m.in. klasyfikację chemokin i ich receptorów a także mechanizmy leżące u podstaw interakcji pomiędzy neuronami a glejem, w których chemokiny biorą udział. Publikacja ta jest doskonałym uzupełnieniem informacji zawartych we WPROWADZENIU i myślę, że jej przygotowanie znacząco przyczyniło się do wybrania kierunku badań i sformułowania celów pracy.

Kolejne publikacje prezentują interesujące dane na temat korzystnych efektów analgetycznych wielokrotnego podania badanych antagonistów receptorów CCR2 i CCR5. Wykazano również kluczową rolę chemokin CCL2 i CCL7 w rozwoju bólu neuropatycznego, stosując ciekawą eksperymentalnie strategię ich neutralizacji *in vivo* za pomocą przeciwciał.

Ponieważ interesujące wyniki zawsze pobudzają do dyskusji, prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących pytań, które nasunęły mi się podczas czytania publikacji:

- 1) W czasie eksperymentów *in vitro* mających na celu poszukiwanie komórkowych źródeł chemokin (Kwiatkowski i wsp, *Cytokine*, 2019) zaobserwowano, że dodatek minocykliny do **niestymulowanych** LPS hodowli komórkowych obniża poziom mRNA badanych cytokin w mikrogleju ale nie w astrocytach. Jak Doktorantka skomentuje ten efekt? Czy występowały różnice ilościowe w mRNA cytokin pomiędzy tymi dwoma typami komórek po ich stymulacji LPS?
- 2) Czym mogą być spowodowane wyraźne różnice w efektach molekularnych cenicriwiroku w zależności od badanej struktury (rdzeń vs. zwoje) (Kwiatkowski i wsp. *Front Immunol.*, 2020)? Czy na tym etapie badań można coś powiedzieć o stopniu powinowactwa tego związku do obydwu typów blokowanych receptorów (podobne/inne)?

Znakomitą publikacją jest ostatnia z cyklu, w której w czasie **jednego** eksperymentu porównano molekularne i analgetyczne efekty wszystkich trzech badanych substancji w dwóch modelach bólu neuropatycznego (mysi/szczurzy). Porównanie to przyniosło bardzo interesujące wyniki wskazujące, że jednoczesne zablokowanie receptorów CCR2/CCR5 przez cenicriwirok indukuje największe spadki ekspresji endogennych probólowych ligandów tych receptorów, zarówno na poziomie rdzenia kręgowego jak i zwojów korzeni grzbietowych, czemu towarzyszy skuteczne hamowanie symptomów bólowych i nasilenie efektywności działania opioidów. Praca ta jednoznacznie wskazuje, że cenicriwirok ma cechy bardzo dobrego analgetyku, który potencjalnie mógłby być wykorzystany w politerapii bólu neuropatycznego w skojarzeniu z opioidami, pozwalając na zmniejszenie ich dawki i niepożądanych skutków ubocznych. Jest to oryginalny i nowy wynik dotyczący tej substancji, znanej dotychczas z innych mechanizmów działania.

W Dyskusji Autorka umiejętnie analizuje otrzymane wyniki w kontekście dotychczasowej wiedzy, jak również wyników prac macierzystego Zespołu i udowadnia ich

oryginalność i nowatorstwo. Rozdział ten świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki. Jedyną moją sugestią jest doprecyzowanie określenia „inhibitor mikrogleju” w odniesieniu do minocykliny (str. 111, 116). Należałoby tu raczej użyć stwierdzenia „inhibitor aktywacji mikrogleju”, albo dokładniej, „selektywny inhibitor polaryzacji mikrogleju do fenotypu prozapalnego”.

Szerokie spektrum prac eksperymentalnych oraz wysoką wartość otrzymanych wyników doskonale podkreśla PODSUMOWANIE WYNIKÓW. Skonstruowany w formie zbiorczej tabeli, rozdział ten przejrzysto przedstawia efekty kolejnych etapów badań, wykazując i porównując zalety zastosowanych antagonistów receptorów chemokinowych. Zawartość tego rozdziału jest już odpowiedzią na postawione przez Doktorantkę cele, jasno wykazując, że wszystkie one zostały zrealizowane. Niemniej, Doktorantka odnosi się do wyników swojej pracy we WNIOSKACH KOŃCOWYCH, podkreślając potencjał farmakologiczny cenicriwiroku w leczeniu bólu neuropatycznego (osobiście preferuję opracowanie wniosków w postaci punktów a nie opisu).

Podsumowując, dogłębnie przemyślana koncepcja pracy i szeroki zakres zaprojektowanych przez Doktorantkę badań eksperymentalnych pozwoliły na uzyskanie wielu oryginalnych wyników. Wzbogacają one dotychczasowy stan wiedzy o patomechanizmach bólu neuropatycznego, wskazując na istotny udział interakcji neuroimmunologicznych, a w szczególności receptorów dla chemokin. Jednak co najbardziej istotne i warte szczególnego podkreślenia, praca ma bardzo wysoki potencjał wdrożeniowy. Przedstawione tu dowody na korzystny wpływ farmakologicznej modulacji opartej na jednoczesnym blokowaniu dwóch receptorów dla chemokin CCR2/CCR5 przez cenicriwirok, stanowią bardzo mocną podstawę do zastosowania tego związku w politerapii bólu neuropatycznego. Translacyjność wyników zwiększa fakt, że nawet jednorazowe podanie tego związku wykazuje silne efekty analgetyczne, zwiększając jednocześnie przeciwbólowe działanie opioidów. Te nowe właściwości cenicriwiroku czynią go bardzo atrakcyjnym narzędziem do walki z bólem, szczególnie w zestawieniu z faktem, że związek ten jest obecnie w fazie testów klinicznych w kierunku leczenia zakażenia wirusem HIV i niealkoholowego zapalenia wątroby.

Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób przedstawienia wyników, świadczą o dojrzałości naukowej jej Autorki i w pełni uzasadniają bardzo wysoką ocenę tej dysertacji.

W mojej opinii przedłożona do oceny rozprawa całkowicie spełnia określone ustawowo warunki dla tego typu prac. Wniosuję zatem do Komisji ds. Prowadzenia Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora przy Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Klaudii Kwiatkowski do dalszych etapów przewodu doktorskiego, wnosząc jednocześnie o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej
mgr Klaudii Kwiatkowski
p.t. „Nowe strategie w farmakoterapii bólu neuropatycznego oparte na modulacji
funkcji receptorów chemokinowych”

W uzasadnieniu wniosku o wyróżnienie chcę podkreślić nie tylko wysoką wartość poznawczą badań nad udziałem chemokin i ich receptorów w mechanizmach bólu neuropatycznego, ale przede wszystkim wspomnianą wyżej wysoką wartość translacyjną wyników dotyczących potencjalnego zastosowania cenicriwiroku w politerapii bólu neuropatycznego.

Wysoki poziom przeprowadzonych w dysertacji badań, potwierdza fakt ich opublikowania w wiodących czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Dodatkowym dowodem na wysoki poziom naukowy Doktorantki jest liczba wszystkich jej publikacji (16) o łącznym IF=55,128, co zdarza się nieczęsto na tym etapie kariery naukowej.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska

