

mgr Katarzyna Ciapała

Wpływ farmakologicznej modulacji szlaku kynureninowego oraz wybranych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych na objawy bólu neuropatycznego i efektywność leków opioidowych w modelach przedklinicznych

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika

STRESZCZENIE

Ból neuropatyczny, będący konsekwencją uszkodzenia lub choroby somatosensorycznego układu nerwowego, traci fizjologiczną funkcję ostrzegawczą i przekształca się w uporczywą dolegliwość, znacząco obniżając jakość życia pacjentów. Niezwykle złożone mechanizmy leżące u podstaw jego powstawania oraz różnorodność objawów sprawiają, że zarówno diagnostyka, jak i leczenie stanowią ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Pomimo dostępności szerokiego spektrum leków przeciwbólowych oraz metod terapii nefarmakologicznych, u wielu pacjentów nie udaje się uzyskać satysfakcjonującej ulgi w bólu ani perspektyw na poprawę. Wynika to z faktu, że pomimo intensywnego rozwoju badań podstawowych i klinicznych, wiedza dotycząca mechanizmów powstawania i utrzymywania się bólu neuropatycznego nadal pozostaje niepełna.

W literaturze z ostatnich lat coraz częściej podkreśla się, że w rozwoju neuropatii istotną rolę odgrywają nie tylko neurony, lecz również komórki glejowe. Zagadnienie to od kilku lat stanowi przedmiot badań prowadzonych w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk. Dotychczas wykazano między innymi, że minocyklina, substancja hamująca aktywację, infiltrację i proliferację mikrogleju oraz makrofagów, obniża nadwrażliwość w zwierzęcych modelach bólu neuropatycznego. Efekt ten wiąże się z jej wpływem na poziom kynureninazy 3-monooksygenowej (KMO), jednego z kluczowych enzymów szlaku kynureninowego, oraz kinazy p38 należącej do grupy kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK) w rdzeniu kręgowym. Zagadnienia te, obejmujące rolę szlaku kynureninowego w bólu neuropatycznym, a także analizę potencjału przeciwbólowego związków o wielokierunkowym mechanizmie działania, modulujących wybrane wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, zostały omówione w dwóch pracach przeglądowych wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej [Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci* 2021 oraz Ciapała i Mika, *Pharmaceuticals*, 2023.](#)

W obliczu rosnącej potrzeby opracowania skuteczniejszych metod leczenia bólu neuropatycznego, badania przeprowadzone w ramach tej dysertacji miały na celu określenie znaczenia farmakologicznej modulacji szlaku kynureninowego oraz wybranych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych w nadwrażliwości na bodźce, jak również w odpowiedzi behawioralnej po podaniu leków opioidowych (morfiny, buprenorfiny i oksykodonu) modelach bólu neuropatycznego. Eksperymenty prowadzone były przy wykorzystaniu środków statutowych Zakładu Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii PAN oraz w oparciu o finansowanie uzyskane z Narodowego Centrum Nauki, w ramach projektów SONATA 2015/17/D/NZ4/02284 i OPUS 2021/43/B/NZ7/00230. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w 4 pracach oryginalnych - [Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, *Pharmacological Reports*, 2024, *Neurotherapeutics*, 2025.](#)

Doświadczenia wykonywano zarówno na samcach jak i samicach myszy Albino Swiss, zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu (*International Association for the Study of Pain*), Narodowych Instytutów Zdrowia (*National Institutes of Health*) oraz II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach działającej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie (uchwały: 333/2017, 267/2020; 218/2020, 319/2021, 99/2022; 252/2023, 128/2023, 124/2024; 75/2023, 18/2023, 153/2023, 242/2024, 243/2024). Zastosowano dwa modele bólu neuropatycznego: model uszkodzenia mechanicznego, polegający na jednostronnym luźnym podwiązaniu nerwu kulszowego, a także model neuropatii cukrzycowej, wywołany jednorazowym podaniem streptozotocyny. Badane substancje podawano różnymi drogami: podpajęczynówkową, dootrzewnową oraz dożylną. Stopień nasilenia/złagodzenia objawów nadwrażliwości dotykowej i termicznej oceniano odpowiednio za pomocą testów behawioralnych von Freya i zimnej płytki, natomiast funkcje motoryczne w teście pręta obrotowego. Równolegle przeprowadzono badania *ex vivo*, analizując ekspresję mRNA i białka w odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego (L4–L6) przy zastosowaniu technik RT-qPCR oraz Western blot. Do obliczenia istotności statystycznej wykorzystano test t-Studenta oraz jedno- i/lub dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z odpowiednimi poprawkami *post-hoc*.

Na wczesnych etapach badań zaobserwowano, że po podwiązaniu nerwu kulszowego u myszy dochodzi do wzrostu ekspresji mRNA genów kodujących enzymy: *Kmo*, kynureninazę (*Kynu*) oraz oksydazę 3-hydroksyantranilinową (*Hao*), które ukierunkowują szlak kynureninowy na produkcję neurotoksycznego metabolitu, kwasu chinolinowego. Eksperymenty farmakologiczne dowiodły, że zarówno podanie podpajęczynówkowe UPF648 (inhibitora KMO), jak i L-kynureniny (centralnego metabolitu tego szlaku), prowadzi do zmniejszenia nadwrażliwości dotykowej i termicznej. Ponadto zastosowanie tych związków w skojarzeniu z lekami opioidowymi wzmacniało efekt przeciwbólowy u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego. Co istotne, L-kynurenina wykazuje również działanie analgetyczne po podaniu dożylnym, które ulega nasileniu w przypadku jednoczesnego zastosowania z minocykliną ([Toxicology and Applied Pharmacology, 2023](#)). *Modulacja szlaku kynureninowego może zatem stanowić obiecującą strategię w leczeniu bólu neuropatycznego, oferując jednocześnie potencjał do komplementarnego stosowania z istniejącą farmakoterapią, a także możliwość identyfikacji nowych punktów uchwytu.*

Kolejnym etapem badań niniejszej rozprawy doktorskiej stało się określenie i porównanie skuteczności przeciwbólowej różnych nieselektywnych inhibitorów MAPK: peiminy (inhibitora MAPK i NF- κ B), fisetyny (inhibitora ERK1/2 i NF- κ B, modulatora PI3K), artemizyniny (inhibitora MAPK, aktywatora NF- κ B) oraz astaksantyny (inhibitora MAPK, aktywatora Nrf2), a także związków selektywnych - bardoksolonu metylu (aktywatora Nrf2) i 740 Y-P (aktywatora PI3K) - w mysim modelu neuropatii wywołanej podwiązaniem nerwu kulszowego. Po raz pierwszy wykazano, że podpajęczynówkowe podanie peiminy, fisetyny i astaksantyny, ale nie artemizyniny, skutecznie zmniejsza nadwrażliwość dotykową i termiczną. Co istotne, podobne efekty uzyskano w przypadku selektywnej farmakologicznej aktywacji Nrf2 i PI3K. Warto podkreślić, że w podaniach łączonych ze wszystkimi testowanymi lekami opioidowymi to astaksantyna i bardoksolon metylu dają najlepszy efekt przeciwbólowy ([International Journal of Molecular Sciences, 2023](#)). *Analiza wyników badań behawioralnych wskazała astaksantynę jako najbardziej obiecującą spośród testowanych substancji w zastosowanym modelu neuropatii po*

podaniu podpajęczynówkowym. Uzyskane rezultaty, w połączeniu z udokumentowanymi w literaturze korzystnymi efektami biologicznymi astaksantyny, stanowiły podstawę do podjęcia dalszych badań w ramach niniejszej rozprawy, ukierunkowanych na ocenę jej potencjalnych zastosowań klinicznych w bólu neuropatycznym.

Kontynuując eksperymenty, dowiedziono, że również jednorazowe dootrzewnowe podanie astaksantyny obniża nadwrażliwość zarówno u samców jak i u samic po podwiązaniu nerwu kulszowego, a jej wielokrotne podania wywołują długotrwały efekt przeciwbólowy oraz opóźniają rozwój tolerancji morfinowej. Badania biochemiczne wykazały, że astaksantyna na poziomie rdzenia kręgowego nie wpływa na ekspresję markerów mikrogleju/makrofagów i astrocytów. W oparciu o dalszą analizę zaobserwowano, że na poziomie rdzenia kręgowego astaksantyna zmniejsza ekspresję podjednostki NR2B receptora NMDA. W kolejnych eksperymentach farmakologicznych po raz pierwszy potwierdzono, że blokada Nrf2 poprzez podpajęczynówkowe podanie trigonelliny ogranicza efekt przeciwbólowy astaksantyny, potwierdzając istotną rolę tego czynnika transkrypcyjnego w jej mechanizmie działania. Dalsze badania dowiodły również, że podpajęczynówkowe podanie astaksantyny zapobiega nadwrażliwości wywołanej podaniem kwasu chinolinowego, który jest nie tylko agonistą podjednostek NR2A/B receptora NMDA, lecz także końcowym produktem szlaku kynureninowego ([Neurotherapeutics, 2025](#)). *Uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji na temat molekularnego podłoża analgetycznego działania astaksantyny, a ponadto podkreślają jej potencjał jako obiecującego środka terapeutycznego w leczeniu bólu neuropatycznego.*

Na podstawie uzyskanych wcześniej rezultatów dokonano również oceny skuteczności astaksantyny w modelu neuropatii cukrzycowej, będącej jednym z najczęstszych powikłań cukrzycy, choroby określanej mianem epidemii XXI wieku. Dowiedziono, że pojedyncze podanie astaksantyny, zarówno podpajęczynówkowe, jak i dootrzewnowe, skutecznie redukuje nadwrażliwość dotykową i termiczną u samców i samic myszy. Co ważne, wielokrotne dootrzewnowe podania zmniejszają nadwrażliwość bólową, częściowo opóźniają rozwój tolerancji morfinowej oraz zapobiegają rozwojowi nadwrażliwości indukowanej tym lekiem opioidowym, przy czym nie obserwowano niekorzystnego wpływu na masę ciała i koordynację ruchową zwierząt ([Pharmacological Reports, 2024](#)). *Ból neuropatyczny pozostaje poważnym i trudnym do leczenia powikłaniem cukrzycy, a uzyskane wyniki sugerują, że astaksantyna, charakteryzująca się korzystnym profilem bezpieczeństwa, może w przyszłości stanowić efektywną strategię terapeutyczną również w tym rodzaju neuropatii.*

Podsumowując, wyniki badań przedstawionych w cyklu 6 prac (2 przeglądowych i 4 oryginalnych) wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują, że zarówno farmakologiczna modulacja szlaku kynureninowego jak i zastosowanie związków będących modulatorami kinaz MAP łagodzą objawy bólu neuropatycznego. Spośród analizowanych substancji astaksantyna została zidentyfikowana jako najbardziej obiecujący związek, wykazujący działanie osłabiające nadwrażliwość na bodźce dotykowe i termiczne w bólu neuropatycznym o zróżnicowanej etiologii, niezależnie od płci. Zasluguje ona na szczególną uwagę, gdyż oprócz modulowania wewnątrzkomórkowych mechanizmów sygnałowych, takich jak kinazy MAP lub czynnik transkrypcyjny Nrf2, może również wpływać na działanie kwasu chinolinowego. Co więcej, jej właściwości przeciwbólowe oraz zdolność do zapobiegania rozwojowi tolerancji morfinowej czynią ją atrakcyjnym kandydatem do zastosowania zarówno w monoterapii, jak i w politerapii bólu neuropatycznego. Warto podkreślić, że najnowsze badania kliniczne

potwierdzają skuteczność preparatów zawierających astaksantynę w redukcji bólu w chorobie zwyrodnieniowej i zapaleniu stawów, dodatkowo wzmacniając przesłanki dotyczące jej potencjału terapeutycznego. Przedstawione obserwacje mogą stanowić podstawę do opracowania w przyszłości nowych strategii terapeutycznych, zgodnych z nowoczesnymi koncepcjami uśmierzania bólu neuropatycznego i w dalszej perspektywie przyczyniać się do poprawy jakości życia pacjentów.

SPIS PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD DOKTORATU

Prace przeglądowe:

1. **Ciapała K**, Mika J, Rojewska E. *The Kynurenine Pathway as a Potential Target for Neuropathic Pain Therapy Design: From Basic Research to Clinical Perspectives*. Int J Mol Sci. 2021 Oct 13;22(20):11055. doi: 10.3390/ijms222011055.

IF₂₀₂₁= 6.208; MNiSW₂₀₂₁=140

2. **Ciapała K**, Mika J. *Advances in Neuropathic Pain Research: Selected Intracellular Factors as Potential Targets for Multidirectional Analgesics*. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Nov 17;16(11):1624. doi: 10.3390/ph16111624.

IF₂₀₂₃=4.3; MNiSW₂₀₂₃=140

Prace oryginalne:

1. **Ciapała K**, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J, Rojewska E. *Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain*. Toxicol Appl Pharmacol. 2023 Feb 15;461:116382. doi: 10.1016/j.taap.2023.116382.

IF₂₀₂₃=3.3; MNiSW₂₀₂₃=140

2. **Ciapała K**, Rojewska E, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J. *Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain*. Int J Mol Sci. 2023 May 19;24(10):9000. doi: 10.3390/ijms24109000.

IF₂₀₂₃= 4.9; MNiSW₂₀₂₃=140

3. **Ciapała K**, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. *Promising effects of astaxanthin on pain-related behaviors and morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain: Possible involvement of Nrf2 and the NMDA receptor subunit NR2B*. Neurotherapeutics. 2025 Oct;22(6):e00765. doi: 10.1016/j.neurot.2025.e00765.

IF₂₀₂₄= 6.9; MNiSW₂₀₂₄=140

4. **Ciapała K**, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. *Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies*. Pharmacol Rep. 2024 Dec;76(6):1346-1362. doi: 10.1007/s43440-024-00671-9.

IF₂₀₂₄=3.8; MNiSW₂₀₂₄=100

Sumaryczny wskaźnik cytowań (impact factor, IF) = 29.408

Sumaryczna liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) = 800