

PRACOWNIA PATONEUROCHEMII
ZAKŁAD NEUROCHEMII
02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5

Warszawa, 27.08.2026r.

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

Ocena rozprawy doktorskiej
Pani mgr inż. Katarzyny Pawlik-Szczerby
p.t. „Nowe strategie farmakologiczne oparte na modulacji komórek
glejowych i immunologicznych w modelu bólu neuropatycznego, ze szczególnym
uwzględnieniem roli chemokin w tworzeniu potencjalnej terapii skojarzonej z lekami
opiodowymi”

wykonanej w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem Promotora, Pani Prof. dr hab. Joanny Miki

Ocena formalna

Przedstawiona mi do oceny dysertacja została przygotowana w formie zbioru 5 spójnych tematycznie publikacji, jednej przeglądowej i czterech oryginalnych. Wszystkie prace zostały opublikowane w uznanych czasopismach naukowych, co potwierdza wysoka punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW), wynosząca 620 pkt oraz wysoki sumaryczny wskaźnik oddziaływania (impact factor, IF) równy 32.983. Oznacza to, że średni IF pojedynczej publikacji wynosi prawie 6,6 (6,5966), co stanowi imponujący wynik.

Co szczególnie istotne, Pani mgr inż. Katarzyna Pawlik-Szczerba jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach wchodzących w skład cyklu. Potwierdza to Jej wiodącą rolę w badaniach i przygotowaniu prac do druku.

Załączone artykuły naukowe, stanowiące podstawę rozprawy, zebrano w rozdziale **Główne Zagadnienia Doktoratu** i opatrzone dodatkowymi rozdziałami: **Wstęp, Cel pracy, Metodyka Badań, Dyskusja, Podsumowanie Wyników i Wnioski**. Rozdział **Bibliografia** zawiera 459 pozycji aktualnej literatury światowej dotyczącej badanego problemu. Ponadto dołączono streszczenia w języku polskim i angielskim, spis wszystkich publikacji Kandydatki (31 pozycji o łącznym IF=149,32), oświadczenia współautorów publikacji określające ich indywidualny wkład w powstanie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej oraz zgody Lokalnej Komisji Etycznej na wykonywanie doświadczeń na zwierzętach.

Na stronie tytułowej zamieszczono informację o finansowaniu badań zawartych w rozprawie ze środków otrzymanych w konkursach grantowych Narodowego Centrum Nauki – projekty OPUS 11 2016/21/B/NZ4/00128 oraz OPUS 2021/43/B/NZ7/00230

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.

Tematyka rozprawy doktorskiej ściśle wpisuje się w wieloletnie dogłębne badania nad mechanizmami bólu neuropatycznego prowadzone w zespole Pani Prof. Joanny Miki.

Ocena merytoryczna

Wstęp rozprawy doktorskiej Pani Katarzyny Pawlik-Szczerby stanowi kompleksowe i logicznie uporządkowane wprowadzenie do problematyki neuroimmunologicznych mechanizmów bólu neuropatycznego. Rozdział ten opiera się na bogatej, aktualnej literaturze naukowej, co pozwala na solidne osadzenie badań własnych w kontekście światowej nauki. Charakteryzuje się on spójnością i logicznością, prowadząc czytelnika od ogólnej definicji bólu i nocycencji do bólu neuropatycznego jako trudnego problemu klinicznego, o ograniczonej skuteczności leczenia aktualnie dostępnymi lekami przeciwbólowymi. Autorka identyfikuje tu lukę badawczą, wskazując potrzebę poszukiwania nowych komórkowych punktów uchwytu i nowych terapii.

Poruszane dalej wątki tematyczne, dotyczące roli chemokin, gleju, komórek immunologicznych oraz dymorfizmu płciowego w odczuwaniu bólu, stanowią kompendium aktualnej wiedzy dotyczącej wątków rozwiniętych następnie w publikacjach składowych.

Podrozdział 1.3.3.3. Farmakologiczna modulacja mikrogleju/makrofagów i neutrofili jest punktem wyjścia do hipotezy neutrofilowej promowanej przez Autorkę rozprawy (neutrofile jako niezależny od płci cel terapeutyczny w leczeniu bólu neuropatycznego). Z kolei podrozdział 1.3.3.4 szczegółowo opisuje pro-nocycceptywny charakter receptorów chemokinowych CCR1 i CCR3 oraz ich ligandów (CCL2, CCL7, CCL8), wskazując jednocześnie na brak danych literaturowych dotyczących ich roli w bólu neuropatycznym.

Podsumowując, wstęp jest bardzo mocną stroną rozprawy, który systematyzuje ogromną wiedzę z zakresu farmakologii bólu neuropatycznego i stanowi solidny fundament teoretyczny uzasadniający kierunek podjętych badań i sformułowane cele badawcze.

Komentarz:

- Opisując znaczenie płci w badaniach nad bólem neuropatycznym (Rozdz. 1.3.2.), Autorka koncentruje się na różnicach klinicznych, genetycznych oraz neuroimmunologicznych, ale pomija analizę bezpośredniego wpływu hormonów płciowych. W mojej opinii, istotne byłoby wspomnieć, że molekularne ścieżki bólowe są zaprogramowane inaczej u obu płci, a hormony, a konkretnie „wczesne środowisko hormonalne”, to kluczowy czynnik determinujący różnice płciowe w morfologii, funkcjach i profilu transkryptomycznym mikrogleju, który rzutuje na jego rolę w patomechanizmach bólu w ciągu całego życia organizmu.

- kilka określeń wymagałoby poprawy na bardziej rygorystyczny język biochemiczny, n.p.: zastosowanie przezskórne (transdermalne) buprenorfiny zamiast „zastosowanie buprenorfiny przezskórnej” (str. 22); wychwyt i metabolizm neuroprzekaźników zamiast „recykling neuroprzekaźników” (str. 23); wzrost **liczby** a nie poziomu ich prekursorów (mowa tu o komórkach OPCs) (str. 24).

Doktorantka sformułowała dwa główne, oryginalne i w pełni uzasadnione w świetle dotychczasowej wiedzy, cele badawcze. Jednym z nich było zbadanie roli receptorów

chemokinowych CCR1 i CCR3 oraz ich dwunastu endogennych ligandów (od CCL2 do CCL9, CCL11, CCL24, CCL26 i CCL28) w patomechanizmach powstawania i utrzymywania się bólu neuropatycznego u szczurów i myszy. Badania miały na celu określenie wpływu farmakologicznej blokady tych receptorów oraz hamowania syntezy wybranych chemokin (CCL2, CCL7 i CCL8) na nadwrażliwość bólową oraz na skuteczność leków opioidowych, takich jak morfina i buprenorfina. Drugim celem było ustalenie wpływu farmakologicznej modulacji aktywności komórek mikrogleju/makrofagów oraz neutrofilii na rozwój neuropatii oraz przebieg rozwoju tolerancji na przeciwbólowe działanie morfiny, z bezpośrednim uwzględnieniem różnic zależnych od płci badanych zwierząt.

Wszystkie te działania zmierzały do wyznaczenia nowych punktów uchwytu dla skutecznego leczenia bólu neuropatycznego i opracowania molekularnych podstaw do stworzenia optymalnej terapii skojarzonej. Obszerne 2 cele główne zostały uszczegółowione i przedstawione w formie tabeli.

Choć w poszczególnych publikacjach opisano dokładnie zastosowane metody badawcze, to w rozdziale **Metodyka badań** Doktorantka syntetycznie opisuje model bólu neuropatycznego (CCI) polegający na luźnym, jednostronnym podwiązaniu nerwu kulszowego oraz umieszcza schematy eksperymentów przeprowadzonych zarówno na szczurach jak i na myszach. Opisuje także testy behawioralne i wymienia techniki biochemiczne i molekularne zastosowane w badaniach tkanek pobranych od zwierząt (t.j. odcinków rdzenia kręgowego L4-L6 i odpowiadających im zwojów korzeni grzbietowych), jak również metody statystyczne użyte do opracowania wyników badań. Umieszczone tu przejrzyste schematy, systematyzują i logicznie wyjaśniają przebieg kolejnych eksperymentów z zastosowaniem narzędzi farmakologicznych, co bardzo ułatwia śledzenie całego procesu badawczego opisanego w składowych publikacjach. Na podkreślenie zasługuje mnogość wykonanych badań, co doskonale ilustruje sumaryczna liczba użytych zwierząt (1107).

Komentarz:

- Strona metodologiczna budzi moją wątpliwość jedynie w zakresie wielokrotnych podań dootrzewnowych (publikacja V). Substancje podawano przez kilkanaście dni, 2 razy dziennie), co z dużym prawdopodobieństwem może powodować, jeśli nie uogólniony, to co najmniej miejscowy odczyn zapalny, w który zaangażowane są cytokiny/chemokiny. Wielokrotne nakłucia indukują również przewlekły stres, który przez oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) i glikokortykoidy może modyfikować działanie układu immunologicznego. Jaka jest opinia Doktorantki dotycząca możliwości interferencji z wynikami eksperymentu?

- W opisie techniki Western Blot (publikacja II i IV) pojawia się błąd terminologiczny. Masa białek w biologii molekularnej jest standardowo podawana jako masa cząsteczkowa w Daltonach (Da) lub kiloDaltonach (kDa) a nie jako masa molowa (g/mol).

Kolejny rozdział **Główne Zagadnienia Doktoratu** zawiera 5 składowych publikacji, z których każda poprzedzona jest krótkim uzasadnieniem przeprowadzonych badań, opisem najważniejszych wyników i wnioskami. Takie syntetyczne podsumowanie bardzo ułatwia śledzenie toku rozprawy.

Pierwsza praca z cyklu to obszerny artykuł przeglądowy, opublikowany w czasopiśmie *Molecules* w 2023 roku, który stanowi imponujące kompendium wiedzy na temat roli układu chemokinowego w transmisji nocyceptywnej. Dokonano tu szczegółowej analizy danych z 354 artykułów naukowych wykazując, że chemokiny z czterech rodzin (CC, CXC, XC oraz CX3C) i ich receptory są kluczowymi mediatorami w patomechanizmie bólu neuropatycznego pomiędzy neuronami, gładkim mięśniem a komórkami układu odpornościowego. Praca analizuje również znaczenie układu chemokinowego jako potencjalnego celu terapeutycznego, wskazując przeciwbólowy efekt neutralizacji chemokin oraz blokady ich receptorów z jednoczesnym wzmocnieniem efektów analgetycznych leków opioidowych. Wskazując luki w dotychczasowej wiedzy (np. niedostateczne poznanie receptorów CCR1 i CCR3), praca ta stanowi logiczny fundament dla kolejnych prac oryginalnych wchodzących w skład doktoratu. Drugą pracą wchodzącą w skład cyklu jest artykuł oryginalny pt. „The blockade of CC chemokine receptor type 1 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in a rat model of neuropathic pain”, opublikowany w czasopiśmie *Immunology* w 2020 r.

Główne wyniki zawarte w tej pracy wskazują, że uszkodzenie nerwu kulszowego (model CCI) u szczurów prowadzi do silnego wzrostu ekspresji mRNA większości ligandów receptora CCR1 (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7 oraz CCL9) w rdzeniu kręgowym i/lub zwojach korzeni grzbietowych (DRG) w okresie od 2 do 28 dnia po zabiegu. Zbadanie czasowego profilu zmian ekspresji siedmiu endogennych ligandów CCR1 w tak szerokim zakresie czasowym po raz pierwszy pozwoliło na identyfikację chemokin kluczowych dla rozwoju i podtrzymywania bólu. Zidentyfikowano również komórkowe punkty działania blokady CCR1, wskazując po raz pierwszy, że działanie przeciwbólowe antagonisty CCR1 wynika nie tylko z wyciszenia mikrogleju, ale przede wszystkim z zahamowania aktywacji i napływu neutrofilów (MPO) oraz limfocytów T (CD4) w obwodowym układzie nerwowym (DRG). Praca dostarczyła również nowych dowodów na to, że strategia celująca w CCR1 (związek J113863) skutecznie optymalizuje terapię morfiną i buprenorfiną w modelu CCI u szczura.

Komentarz:

- Wyniki zawarte w tej pracy wskazują na istotne różnice pomiędzy rdzeniem kręgowym a zwojami korzeni bocznymi (DRG) w poziomach wzrostu chemokin (gł. CCL2, CCL7, CCL9) oraz badanych markerów komórkowych po podaniu antagonisty CCR1. Czy na tej podstawie można stwierdzić, że receptor ten jest silniej włączony w odczuwanie bólu na poziomie obwodowego niż centralnego układu nerwowego? Jaka jest opinia Doktorantki na ten temat?
- Czym kierowano się wybierając 7 dzień po CCI do badań poziomów markerów komórkowych (IBA-1, GFAP, CD4, CD8 i MPO)?
- Brak wpływu antagonisty CCR1 na obniżenie poziomu GFAP Autorka uznaje za efekt pozytywny (str. 425 publikacji). Na podstawie samego poziomu tego białka nie da się określić, czy astrocyty przyjęły fenotyp protekcyjny (A2), czy neurotoksyczny (A1). W mojej opinii takie stwierdzenie, pomijające możliwość prozapalnej polaryzacji astrogleju, można uznać za nadmierny optymizm badawczy.

Trzecią pracą z cyklu jest artykuł oryginalny pt. „Blockade of CC chemokine receptor type 3 diminishes pain and enhances opioid analgesic potency in a model of neuropathic pain”, opublikowaną w czasopiśmie *Frontiers in Immunology* w 2021 r. Jest to pionierska praca identyfikująca receptor CCR3 jako obiecujący i skuteczny punkt uchwytu w terapii bólu neuropatycznego, który charakteryzuje się unikalnym mechanizmem komórkowym. Efekt przeciwbólowy antagonisty CCR3 opiera się na modulacji aktywności neutrofilów, limfocytów T oraz komórek satelitarnych a nie na wyciszaniu mikrogleju. Po raz pierwszy wykazano, że zastosowanie modulatora aktywności neutrofilów może być skutecznym narzędziem w uśmierzaniu bólu neuropatycznego. Co więcej, strategia celująca w CCR3 może optymalizować terapię opioidową.

Komentarz:

Wyniki badań przedstawione w rozprawie wskazują, że choć antagonist receptor CCR3 (SB328437) wykazuje silne działanie przeciwbólowe w testach behawioralnych, to na poziomie molekularnym efekty są słabo widoczne i w zasadzie ograniczają się do zwojów korzeni grzbietowych (DRG), co sugeruje istotny, a być może dominujący, obwodowy komponent jego działania, mimo że związek był podawany drogą podopajęczynówkową (czyli do OUN). Czy zdaniem Doktorantki, inny sposób podania antagonisty mógłby nasilić jego przeciwbólowe działanie?

Czwartą pracą wchodzącą w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę rozprawy jest artykuł oryginalny pt. „Pharmacological Evidence of the Important Roles of CCR1 and CCR3 and Their Endogenous Ligands CCL2/7/8 in Hypersensitivity Based on a Murine Model of Neuropathic Pain”, opublikowany w czasopiśmie *Cells* w 2023 r.

Badania podjęte w tej pracy na modelu mysim są rozszerzeniem i porównaniem wyników uzyskanych wcześniej u szczurów. To pierwsza praca w cyklu, która bezpośrednio potwierdza, że blokada receptorów CCR1 i CCR3 zarówno przez selektywnych antagonistów (J113863 i SB328437) jak i podwójnego antagonistę CCR1/CCR3 (UCB35625) może być skuteczną strategią terapeutyczną niezależnie od płci. Identyfikuje ona kluczowe chemokiny (CCL2, CCL7 i CCL8) odpowiedzialne za inicjację i podtrzymywanie bólu neuropatycznego. Zastosowano tu również nowatorskie podejście, hamując syntezę wielu chemokin jednocześnie przy użyciu bindaritu, co może być skuteczniejszą strategią niż blokowanie pojedynczych receptorów chemokinowych.

Komentarz:

- Mimo silnego akcentowania w pracy dymorfizmu płciowego, doświadczenia z bindaritem przeprowadzono wyłącznie na samcach, nie potwierdzając skuteczności tej obiecującej substancji u samic. Czy Doktorantka planuje takie badania?

Zagadnienie dymorfizmu płciowego w nocycepcji staje się osią rozważań w piątej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej (*Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2025). Jest ona kluczowa, ponieważ weryfikuje hipotezy dotyczące udziału mikrogleju w bólu neuropatycznym. Doktorantka po raz pierwszy udowodniła, że minocyklina (inhibitor mikrogleju/makrofagów) wykazuje działanie przeciwbólowe i opóźnia rozwój tolerancji morfinowej wyłącznie u samców, a u samic paradoksalnie nasila nadwrażliwość termiczną w

początkowej fazie neuropatii. Nowatorskim odkryciem było wykazanie, że w modelu neuropatii CCI u samic myszy dochodzi do znaczącego wzrostu poziomu białka mieloperoksydazy (MPO) w rdzeniu kręgowym, co świadczy o napływie i aktywacji neutrofili w tej strukturze również u płci żeńskiej, a zahamowanie aktywacji tych komórek (inhibitor MPO) jest skuteczną strategią uśmierzającą ból neuropatyczny u obu płci.

Rozdział **Dyskusja** w rozprawie doktorskiej Pani Katarzyny Pawlik-Szczerby jest wnikliwym zestawieniem wyników własnych z aktualnym stanem wiedzy światowej cytowanej w obszernej bibliografii, który doskonale spaja wątki badawcze dyskutowane w poszczególnych pracach. Sposób prowadzenia dyskusji i krytyczna ocena wyników własnych świadczy o wysokim poziomie naukowym Autorki.

Niezwykle intrygującym naukowo wątkiem podjętym przez Doktorantkę jest próba interpretacji tzw. „paradoksu blokady podwójnej”. Zjawisko to, opisane w czwartej publikacji cyklu (*Cells*, 2023), polega na uzyskaniu słabszego efektu przeciwbólowego po jednoczesnym zablokowaniu receptorów CCR1 i CCR3 (zarówno przy użyciu podwójnego antagonisty UCB35625, jak i mieszaniny substancji selektywnych J113863 oraz SB328437) niż po wysoce selektywnej blokadzie każdego z tych receptorów z osobna. Jest to sytuacja nietypowa w farmakologii, gdyż blokowanie wielu ścieżek sygnałowych o tym samym profilu zazwyczaj prowadzi do efektu synergicznego lub addytywnego. Autorka wykazuje się dużą dozą naukowej dociekliwości, poszukując wyjaśnień tego fenomenu w klasycznych mechanizmach farmakologicznych takich jak różnice w powinowactwie ligandów, budowa przestrzenna kieszeni receptorowych czy interakcje farmakodynamiczne między cząsteczkami.

Komentarz:

Jak podkreśla Doktorantka – receptory CCR1 i CCR3 wykazują blisko 60% homologii strukturalnej i współdzielą te same endogenne chemokiny. Czy zatem wyjaśnienia tego paradoksu można zdaniem Autorki szukać w zjawisku oligomeryzacji/heterodimeryzacji tych receptorów? Czy w dostępnej literaturze istnieją dowody na bezpośrednie tworzenie takich struktur?

Rozdziały **Podsumowanie wyników i Wnioski** przejrzyste pokazują szerokie spektrum badań wykonanych przez Doktorantkę oraz wysoką wartość naukową otrzymanych wyników. Zawartość tych rozdziałów jednoznacznie udowadnia, że wszystkie cele badawcze postawione na początku pracy eksperymentalnej zostały zrealizowane. Łączna analiza całego cyklu prac oraz podsumowania zawartego w rozprawie pozwala na wskazanie kilku kluczowych, nowatorskich wyników, które rzucają nowe światło na mechanizmy bólu neuropatycznego i optymalizację terapii opiodowej.

Według mojej oceny, wśród wielu wyników o dużej wartości naukowej, najwyższe znaczenie należy przyznać odkryciu, że płeć determinuje skuteczność terapii przeciwbólowych celowanych w mikroglej oraz wskazanie receptora CCR3 i neutrofili jako potencjalnych uniwersalnych punktów uchwytu dla nowych leków, skutecznych w leczeniu bólu neuropatycznego niezależnie od płci pacjenta.

Podsumowując, wyniki uzyskane w toku badań przez Panią Pawlik-Szczerbę znacząco przyczyniają się do wzbogacenia wiedzy dotyczącej udziału układu chemokinowego w

mechanizmach komórkowych i molekularnych leżących u podstaw bólu neuropatycznego. Z pełnym przekonaniem uważam, że stanowią one oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, spełniając tym samym wymóg stawiany kandydatom do stopnia doktora.

Stwierdzam zatem, że przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2024, poz. 1571 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Pawlik-Szczerby do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Jednocześnie, mając na uwadze wysoką wartość naukową prezentowanych w dysertacji wyników jak również dotychczasowy wybitny dorobek publikacyjny Doktorantki, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

W uzasadnieniu wniosku o wyróżnienie chcę podkreślić pionierski charakter i nowatorstwo wielu z uzyskanych wyników, jak choćby odkrycie unikalnej roli CCR3 w bólu neuropatycznym, mapowanie czasowe ligandów CCR1 i CCR3 oraz identyfikację kluczowych chemokin odpowiedzialnych za inicjację i podtrzymywanie bólu neuropatycznego. Ponadto, redefinicja dotychczasowego podejścia do terapii przeciwbólowych celowanych w komórki glejowe oraz udowodnienie modulacji neutrofili jako uniwersalnego celu terapeutycznego niezależnego od płci są istotne z punktu widzenia klinicznego i mają wysoki potencjał translacyjny. Wykazanie skuteczności bindaritu (inhibitora syntezy chemokin) oraz 4-hydrazydu aminobenzoowego (inhibitora mieloperoksydazy) otwiera potencjalne drogi do badań klinicznych nad nowymi terapiami skojarzonymi z opioidami, które mogłyby pozwolić na stosowanie niższych dawek tych leków w celu redukcji ich niepożądanych skutków.

Podsumowując, ze względu na liczne nowatorskie odkrycia oraz bardzo wysoki poziom publikacji, praca ta w pełni zasługuje na uznanie jej za wyróżniającą się rozprawę doktorską.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska