

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Krajnik,
Kierownik Katedry Opieki Paliatywnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Katarzyny Pawlik-Szczerby
pt. „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 opioidowymi”
wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk pod
kierunkiem prof. dr hab. Joanny Miki.

Zgodnie z definicją Międzynarodowego Towarzystwa Badań nad Bólem (IASP, *International Association for the Study of Pain*), ból to przykre doznanie czuciowe i emocjonalne związane lub przypominające doznanie związane z aktualnie występującym lub potencjalnym uszkodzeniem tkanek. IASP definiuje ból przewlekły jako ten trwający dłużej niż 3 miesiące, co oznacza, że utrzymuje się on po normalnym czasie zdrowienia, nie pełni żadnej roli ostrzegawczej, natomiast prowadzi do szeregu niekorzystnych zjawisk, poczynając od ograniczeń w funkcjonowaniu codziennym, do lęku, depresji i wielowymiarowego cierpienia. Według najnowszego podejścia do klasyfikacji chorób, ból przewlekły został przedstawiony jako rozpoznanie kliniczne, będące albo chorobą samą w sobie (ból przewlekły pierwotny) albo zespołem towarzyszącym innemu schorzeniu (ból przewlekły wtórny). Można mieć nadzieję, że wskazanie na ból przewlekły jako rozpoznanie kliniczne pomoże zarówno w większej wrażliwości diagnostycznej personelu medycznego, jak i w intensyfikacji działań badawczych ukierunkowanych na poznanie mechanizmów bólu i wypracowanie skuteczniejszych metod jego leczenia.

Ból przewlekły jest poważnym problemem społecznym - ocenia się, że dotyka on około 20% ludzi na świecie i jest powodem 15-20% wizyt u lekarza. Jest też jednym z najczęstszych objawów towarzyszących chorobom przewlekłym. Dla przykładu można przytoczyć dane dotyczące populacji chorych na nowotwory. Pomimo znacznego postępu w zakresie wiedzy i

dostępności metod farmakologicznych i nefarmakologicznych leczenia bólu oraz szerokiego propagowania zasad postępowania w bólu u chorych na nowotwór, ocenia się, że nadal ból występuje u ok. 45% chorych onkologicznie, z czego najrzadziej u pacjentów po leczeniu radykalnym – ok. 35%, a najczęściej u osób z zaawansowanym nowotworem w okresie terminalnym – ok. 55%. Co ważne, niedawna metaanaliza badań wskazała, że ból umiarkowany lub ciężki występował u ponad 30% wszystkich chorych na nowotwory, najrzadziej u tych po leczeniu radykalnym – ok. 23%, a najczęściej u tych, u których nie było możliwe zastosowanie skutecznego leczenia przeciwnowotworowego – ponad 43%.

Wśród przyczyn odpowiedzialnych za nadal znaczącą częstotliwość występowania bólu, w tym tego o istotnym natężeniu, przede wszystkim zwraca się uwagę na konieczność poprawy procesu diagnostycznego i to począwszy od komunikacji z samym chorym. W świetle nowej definicji IASP, zaczyna się bardziej dostrzegać znaczenie osobistego przeżywania bólu przez pacjenta, tego jak on go doświadcza, co ból dla niego oznacza, a wreszcie jakie czynniki nie tylko fizyczne, ale i psychospołeczne oraz duchowe wpływają na ból oraz radzenie sobie z nim. Widać to szczególnie w przypadku chorych z zaawansowanymi chorobami nowotworowymi i nienowotworowymi, u których może występować tzw. ból totalny, czyli suma cierpienia zawierająca składowe fizyczne, psychiczne, społeczne i duchowe, będąca skutkiem wielu sensorycznych i afektywnych urazów, zbieranych przez chorego przez całe życie. W efekcie typowy obraz kliniczny bólu może tak naprawdę być przejawem na przykład cierpienia duchowego i wymagać wdrożenia ukierunkowanych na to cierpienie interwencji. Stąd medycyna paliatywna stara się uczulić klinicystów na uważną komunikację i holistyczne podejście do chorego zgłaszającego ból. Z drugiej strony, kolejną ważną przyczyną prowadzącą do ograniczeń w zakresie skuteczności postępowania przeciwbólowego są ciągle niewyjaśnione w pełni mechanizmy odpowiedzialne za sensytyzację bólu i za rozwój bólu neuropatycznego. Ból neuropatyczny, czyli ból spowodowany uszkodzeniem lub chorobą somatosensorycznej części układu nerwowego, może dotyczyć obwodowego układu nerwowego (np. bolesna neuropatia cukrzycowa, neuralgia trójdzielną i popółpaścowa, przetrwały ból pooperacyjny i pourazowy, zespół wielobjawowego bólu miejscowego, ból neuropatyczny w chorobie nowotworowej i w przebiegu infekcji wirusem HIV, bóle po amputacji.) lub mieć charakter bólu ośrodkowego (np. ośrodkowy ból poudarowy, pourazowy ból rdzeniowy, ośrodkowy ból w chorobie Parkinsona, w innych chorobach neurodegeneracyjnych, w jamistości rdzenia i w stwardnieniu rozsianym). Często jest składową bólu o charakterze mieszanym, obserwowanym u chorych na nowotwór jako konsekwencja naciekania przez guz różnych struktur tkankowych. Ponadto w patogenezie

bólu spowodowanego przerzutami do kości, czyli jednego z najczęstszych rodzajów bólu u chorych na zaawansowane nowotwory, może odgrywać rolę nieprawidłowy rozrost i uszkodzenie włókien unerwiających kość. Stąd w medycynie paliatywnej wskazuje się na konieczność diagnozowania bólu pod kątem obecności komponenty bólu neuropatycznego jako potencjalnego czynnika utrudniającego osiągnięcie zadowalającej analgezji m. in. przez zmniejszoną skuteczność leków opioidowych i na potrzebę odpowiedniej modyfikacji stosowanej terapii.

Podsumowując, ponieważ ból przewlekły to coś więcej niż nocycepcja, wymaga on uważnego całościowego diagnozowania potrzeb chorego i jeśli trzeba, wdrażania postępowania ukierunkowanego na jego cierpienie psychiczne czy duchowe. Ponadto, ponieważ ból przewlekły, a zwłaszcza ból neuropatyczny, stanowi w praktyce klinicznej bardzo duże wyzwanie w odniesieniu zarówno do jego diagnozowania, jak i leczenia, konieczne są dalsze badania wyjaśniające mechanizmy jego powstawania i oceniające skuteczność i bezpieczeństwo nowych strategii farmakologicznych.

Podjęcie przez Doktorantkę badań w zakresie roli receptorów chemokinowych CC typu 1 (CCR1) oraz 3 (CCR3), a także ich endogennych ligandów (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL11, CCL24, CCL26, CCL28) w patomechanizmach powstawania i utrzymywania się bólu neuropatycznego oraz określenie wpływu ich farmakologicznej modulacji na procesy nocycepcji i efektywność leków opioidowych jest niewątpliwie cennym działaniem w tym deficytowym obszarze naukowym. Ponadto celem pracy było ustalenie, czy oraz w jaki sposób zahamowanie aktywności wybranych populacji komórkowych (mikrogleju/makrofagów oraz neutrofili) wpływa na skuteczność przeciwbólowego działania morfiny w modelu neuropatii u obu płci.

Na rozprawę doktorską składa się pięć artykułów, w tym jedna praca przeglądowa i cztery prace oryginalne, opublikowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, o łącznej wartości Impact Factor = 32.983 oraz 620 punktów MEN. Prace prowadzone były w ramach projektów grantowych: Opus 11 2016/21/B/NZ4/00128, Opus 22 2021/43/B/NZ7/00230, PRELUDIUM 2018/29/N/NZ7/00287.

Pierwszą pracą wchodzącą w skład rozprawy doktorskiej jest artykuł przeglądowy opublikowany w *Molecules*, w którym przedstawiono szczegółowe dane dotyczące dotychczas poznanej roli wszystkich chemokin oraz ich receptorów w neuropatii. W podsumowaniu podkreślono, iż farmakologiczna modulacja oparta na blokowaniu receptorów dla różnych chemokin może zarówno sama w sobie stanowić innowacyjną metodę leczenia

bólu neuropatycznego, ale także być łączona z terapią opioidami w celu poprawy efektywności tych leków. We wstępnym opisie prac Doktorantka przyznała, że przegląd dotychczasowych badań zwrócił jej uwagę na ograniczoną wiedzę na temat roli CCR1 i CCR3 w bolesnej neuropatii, a także na nieliczne dane dotyczące zmian poziomu endogennych ligandów w trakcie rozwoju neuropatii po uszkodzeniu nerwu kulszowego. Stąd oba te zagadnienia stały się przedmiotem badań, podjętych przez Doktorantkę.

W drugiej pracy opublikowanej w *Immunology*, wykazano po raz pierwszy podniesioną ekspresję większości endogennych ligandów CCR1 w rdzeniu kręgowym i/lub zwojach korzeni grzbietowych między 2. a 28. dniem po podwiązaniu nerwu kulszowego u szczurów. Co ciekawe, poziom niektórych z nich (CCL2, CCL3, CCL4, CCL6 i CCL7) pozostawał podwyższony długotrwale (także w ostatnim, 28 dniu badania), co sugeruje ich rolę w utrwalaniu się bólu neuropatycznego. Ponadto Doktorantka wykazała, że pojedyncze i wielokrotne podpajęczynówkowe podanie antagonisty CCR1 (J113863) osłabia nadwrażliwość wywołaną uszkodzeniem nerwu, a dołączenie do niego morfiny lub buprenorfiny prowadzi do uzyskania silniejszego działania przeciwbólowego niż zastosowanie każdego z tych związków oddzielnie. Co więcej, wielokrotne podanie antagonisty CCR1 powodowało zahamowanie wzrostu poziomu białka markerów

komórkowych tj. IBA-1, MPO oraz CD4+ w rdzeniu kręgowym i/lub zwojach korzeni grzbietowych, co przemawiało za tym, że efekt przeciwbólowy antagonisty CCR1 wynikał z zahamowania aktywacji, proliferacji i/lub napływu mikrogleju, makrofagów, neutrofilów i limfocytów. Wszystkie te obserwacje mogą stanowić dowód na to, że farmakologiczna blokada CCR1 wywołuje efekt analgetyczny i że stanowi potencjalną strategię terapii skojarzonej z lekami opioidowymi u pacjentów cierpiących z powodu bólu neuropatycznego.

Trzecia praca opublikowana we *Frontiers in Immunology* przedstawia wyniki badań nad rolą blokady CCR3 w szczurzym modelu bólu neuropatycznego po podwiązaniu nerwu kulszowego. Wykazano podniesioną ekspresję niektórych endogennych ligandów CCR3 w rdzeniu kręgowym i/lub zwojach korzeni grzbietowych. Po raz pierwszy wykazano silne działanie przeciwbólowe antagonisty CCR3 (SB328437) zarówno po pojedynczych, jak i wielokrotnych podaniach podpajęczynówkowych. Co ważne, łączne podanie antagonisty CCR3 z morfiną lub buprenorfiną prowadziło do nasilenia efektu analgetycznego. Zasugerowano, że analgezja powodowana przez antagonistę CCR3 może być związana z jego korzystnym wpływem na neutrofile, limfocyty T oraz komórki satelitarne, za czym przemawiało hamowanie przez antagonistę CCR3 wzrostu ekspresji markerów tych komórek (MPO, CD4+ oraz GFAP) w zwojach korzeni grzbietowych. Chcąc wyjaśnić znaczenie

wpływu antagonisty CCR3 na neutrofile, uwidocznionego przez hamowanie ekspresji MPO, markera tych komórek, przeprowadzono dodatkowo badania behawioralne u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego. Wykazano w nich, że dootrzewnowo podany inhibitor aktywacji MPO (4- hydrazyd aminobenzoesowy) wykazuje dobre działanie przeciwbólowe, a jego jednoczesne podanie z morfiną dodatkowo nasila jej efekt analgetyczny.

Wszystkie te obserwacje mogą stanowić dowód na to, że farmakologiczna blokada CCR3 wywołuje efekt analgetyczny, także w połączeniu z morfiną. Ponadto wstępne dane na temat znaczenia neutrofili powinny zachęcać do dalszych badań pod kątem potencjalnego wykorzystania tego mechanizmu w poszukiwaniu skutecznych terapii bólu neuropatycznego.

Czwarta praca opublikowana w *Cells* przedstawia wyniki badań porównujących rolę CCR1 i CCR3 oraz ich endogennych ligandów w mysim modelu bólu neuropatycznego, po podwiązaniu nerwu kulszowego. Wykazano rolę chemokin działających zarówno przez CCR1, jak i CCR3 w rozwoju bólu neuropatycznego. Zaobserwowano utrzymywanie się wysokich poziomów trzech chemokin: CCL2, CCL7 i CCL8 także w późnej fazie neuropatii, co może sugerować ich rolę w utrwalaniu się bólu neuropatycznego. Co ciekawe, podawanie podpajeczynówkowo bindaritu (inhibitora syntezy tych cytokin) zmniejszało ból zarówno we wczesnej, jak i późnej fazie neuropatii. Po raz pierwszy wykazano u myszy, że blokada CCR1, CCR3, a także jednoczesna blokada CCR1/CCR3 zmniejsza nadwrażliwość mechaniczną i/lub termiczną wywołaną podwiązaniem nerwu zarówno u samców, jak i samic. Wszystkie te obserwacje przemawiają za znaczeniem blokady sygnalizacji CCR1 oraz CCR3 w potencjalnej strategii leczenia bólu neuropatycznego. Wskazują też na znaczącą rolę trzech chemokin – CCL2, CCL7 i CCL8 w rozwoju i utrwalaniu się bólu neuropatycznego.

W piątej pracy opublikowanej w *Biomedicine and Pharmacotherapy*, oceniano wpływ modulacji mikrogleju/makrofagów oraz neutrofili na rozwój nadwrażliwości bólowej i tolerancji na morfinę w mysim modelu bólu neuropatycznego po podwiązaniu nerwu kulszowego. W tej nowatorskiej pracy między innymi udowodniono wiele różnic w badanych parametrach w zależności od płci. Wykazano, że minocyklina poprzez modulację mikrogleju/makrofagów jedynie u samców zmniejsza nadwrażliwość na bodźce mechaniczne i termiczne oraz opóźnia rozwój tolerancji morfinowej. Natomiast 4-hydrazyd aminobenzoesowy (inhibitor MPO) wpływający na aktywację i napływ neutrofili, u obu płci wykazuje działanie przeciwbólowe oraz opóźnia rozwój tolerancji morfinowej. Wyniki tego badania sugerują, że hamowanie aktywacji i napływu neutrofili może być skuteczniejszą strategią leczniczą niezależnie od płci chorego.

W mojej ocenie wszystkie publikacje zawarte w cyklu są bardzo wartościowe i spójne. Rozprawa doktorska prezentuje dogłębną ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Warty podkreślenia jest sposób przedstawienia problematyki i dotychczasowych osiągnięć nauki w bardzo przejrzysty i interesujący sposób. Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przemawia za tym pozycja pierwszego autora we wszystkich wysoko cenionych publikacjach cyklu, prowadzenie badań w ramach grantów badawczych, znajomość i zastosowanie szerokiego wachlarza metod badawczych. W mojej ocenie rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Uzyskane dane poprzez wykazanie znaczenia modulacji CCR1 i CCR3 przybliżają nas do lepszego poznania roli komórek glejowych i immunologicznych w wypracowaniu skuteczniejszych metod leczenia bólu neuropatycznego, w tym do poprawy efektywności leków opioidowych. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania pokazały, jak ważne jest uwzględnianie płci przed wypracowywaniem nowych strategii postępowania w bólu neuropatycznym. Bardzo ciekawa jest sugestia wynikająca z tych badań, iż niezależnie od płci modulacja aktywacji neutrofili może być szczególnie obiecującą i preferowaną metodą wzmacniającą analgezję i poprawiającą skuteczność opioidoterapii w bólu neuropatycznym.

Zarówno wartość poznawcza, jak i potencjalny wpływ tych publikacji na kolejne badania oraz w dalszej perspektywie na samą praktykę kliniczną mogą przyczynić się do poprawy opieki nad pacjentami. Końcowe wyniki i wnioski, które Doktorantka prezentuje w podsumowaniu wersji drukowanej dysertacji są spójne z założeniami pracy i osiągniętymi rezultatami.

Podsumowując, naukowe osiągnięcie „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 opioidowymi” autorstwa mgr inż. Katarzyny Pawlik-Szczerby oceniam bardzo wysoko, jako dzieło, które wnosi bardzo istotne elementy zarówno poznawcze, jak i ważne z punktu widzenia praktyki klinicznej. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2024, poz. 1571 z późn. zm.). Na podstawie powyższej oceny wnioskuję zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie 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. Ponadto mam zaszczyt wnioskować do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy. Wniosek o wyróżnienie motywuję bardzo wysokim poziomem naukowym

dysertacji oraz potencjalnym znaczeniem praktycznym rozprawy, która wpisuje się w starania o poszukiwanie optymalnego leczenia osób cierpiących z powodu bólu neuropatycznego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Małgorzata Krajnik', written in a cursive style.

Bydgoszcz, 10.09.2026

Prof. dr hab. med. Małgorzata Krajnik