

mgr Jakub Mlost

**Role of the endocannabinoid system in osteoarthritis pathophysiology: peripheral and central mechanisms of action of novel drugs with therapeutic potential**

**Rola układu endokannabinoidowego w patofizjologii osteoartrozy: obwodowe i ośrodkowe mechanizmy działania nowych substancji o potencjale terapeutycznym**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Neurochemii  
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Starowicz-Bubak

**STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM**

Osteoartroza (OA) jest zwyrodnieniową chorobą stawów, w której zaburzona jest równowaga między procesami degradacji a regeneracji chrząstki stawowej, co prowadzi do jej postępującej utraty. Rozwój OA prowadzi do stopniowego ograniczenia ruchomości stawu oraz bólu. Dotychczasowy stan wiedzy nie przyniósł zadowalającego rozwiązania pozwalającego zahamować rozwój choroby, a dostępne strategie radzenia sobie z głównym objawem czyli z bólem są często niewystarczające. Brak zadowalającej skuteczności terapii OA pobudza nowe kierunki badań, do których należy przekaźnictwo kanabinoidowe. Układ endokannabinoidowy (ang. endocannabinoid system, ECS) jest zaangażowany w modulację układu odpornościowego i przekaźnictwo bólowe, a niedawne badania wykazały jego funkcjonalną rolę w układzie kostno-szkieletowym. Z ww. powodów, wydaje się, że ECS może być obiecującym punktem uchwytu dla nowych leków skutecznych w łagodzeniu skutków OA, które mogłyby jednocześnie hamować ból i zapobiegać jego dalszemu rozwojowi, a także bezpośrednio hamować rozwój choroby.

Celem badań w przedstawionej pracy doktorskiej było opracowanie różnych strategii terapeutycznych opierających się na aktywacji ECS. W tym celu, skupiono się na związkach zwiększających poziom endogennych kanabinoidów, selektywnych agonistach receptora CB2 oraz obiecujących fitokannabinoidach. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano testy behawioralne określające wrażliwość na ból, analizę biochemiczną *ex vivo* określającą poziom ekspresji mRNA lub poziom neuroprzekaźników monoaminowych w mózgu, barwienia histologiczne oraz mikrotomografię komputerową stawu kolanowego, a także metody bioinformatyczne.

Zrozumienie procesów modulacji układu mezo limbicznego przez endokanabinoidy może mieć decydujące znaczenie dla poznania ich roli w patofizjologii bólu przewlekłego. Badania w ramach mojej pracy doktorskiej przeprowadzone w zwierzęcym modelu OA wykazały istotne zaburzenia transmisji dopaminergicznej. Dodatkowo, wykazano, że zahamowanie rozkładu endokanabinoidów prowadzi do przywrócenia prawidłowej transmisji dopaminergicznej w zwierzęcym modelu OA, jednak nie ma ono wpływu u zwierząt zdrowych. Powiązanie mechanizmów bólowych z mezo limbicznym układem nagrody, a szczególnie z przewodnictwem dopaminergicznym, jak i istotne podobieństwa mechanizmów bólowych i depresji wskazują na ECS dla skutecznych poszukiwań idealnego leku analgetycznego.

Kolejną częścią mojej pracy doktorskiej było zbadanie potencjału terapeutycznego związków selektywnie aktywujących receptory kanabinoidowe typu 2 (CB2), których głównie obwodowa ekspresja ograniczyłaby pojawianie się działań niepożądanych (związanych z aktywacją ośrodkowych CB1). W badaniach wykazałem, że wielokrotne podania agonistów CB2 hamują rozwój choroby oraz działają przeciwbólowo. Wyniki badań behawioralnych zyskały potwierdzenie w obrazach kości podchrzęstnej stawu kolanowego wykonanych za pomocą mikrotomografii komputerowej. Co więcej, przy pomocy sekwencjonowania RNA oraz RT-qPCR udało nam się wykazać, że długotrwała terapia ukierunkowana na aktywację CB2 obniża ekspresje genów kodujących czynniki prozapalne i enzymy proteolityczne, które przyczyniają się do rozwoju OA. Jednakże, przewlekłe podawanie leków często prowadzi do rozwoju tolerancji na efekty terapeutyczne. W swoich badaniach wykazałem również właściwości farmakodynamiczne promujące rozwój tolerancji, tj. preferencyjną aktywację ścieżki  $\beta$ -arestyny oraz wysoką skuteczność w hamowaniu ścieżki cAMP.

Niestety, pomimo szeregu obiecujących badań przedklinicznych, próby z zastosowaniem leków kanabinoidowych w leczeniu OA nie przyniosły do tej pory oczekiwanych rezultatów. Wydaje się, że może to mieć związek ze skomplikowaną etiologią OA oraz farmakologią kanabinoidów. W związku z tym, postanowiłem w swoich badaniach zastosować bardziej holistyczne podejście i wykorzystać zdolności obliczeniowe komputera do analizy setek celów molekularnych, aby zbadać potencjał terapeutyczny kanabidiolu (CBD). CBD, to występujący w marihuanie w największej ilości niepsychoaktywny kanabinoid, zdolny do interakcji z ponad 60 różnymi celami molekularnymi. Analiza bioinformatyczna pozwoliła nam zidentyfikować heterogenne mechanizmy działania CBD, odpowiadające zarówno za pro- jak i przeciwbólowe działanie tego związku.

Podsumowując, w swoich badaniach opisałem istotne zaangażowanie ECS na wielu płaszczyznach patofizjologii OA. Wyniki przedstawione w poniżej pracy mogą przyczynić się do powstania nowej skutecznej terapii OA opartej o aktywację ECS.

## **STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (SUMMARY)**

Osteoarthritis (OA) is a chronic joint disease in which cartilage degenerates as a result of both mechanical and biochemical disturbances. Chronic joint pain, including both nociceptive and neuropathic components, is the most debilitating symptom of OA. Current treatment is mostly based on symptom alleviation since disease-modifying treatments are currently unavailable. Effective treatment is hampered by the association of chronic pain with depression and anxiety. In the management of difficult-to-treat pain, emerging promise is attributed to cannabinoids.

The aim of our research was to evaluate different cannabinoid-based treatment strategies in an animal model of OA. We concentrated on different drugs with effects on multiple pathways of the cannabinoid system involving increased endocannabinoid tone, targeting peripheral cannabinoid type 2 (CB2) receptors with specific agonists and taking advantage of promising phytocannabinoids. We performed a battery of behavioral assessments of pain and ex vivo biochemical studies to measure mRNA expression and neurotransmitter levels in the brain; we visualized the changes in knee joint morphology using microtomography and histological staining to define endocannabinoid system involvement in pain transmission and skeletal system physiology. We also employed a computational analysis to elucidate the mechanism of action of the multitarget, nonpsychoactive phytocannabinoid cannabidiol (CBD).

First, we focused on neurotransmission in key structures related to reward processing in the course of OA development. We hypothesized that increasing ECS tone may reverse impaired neurotransmission. Second, we targeted peripheral CB2 to elicit antinociceptive, anti-inflammatory and chondroprotective effects devoid of psychoactive properties. Moreover, leveraging pharmacodynamic properties and functional selectivity toward distinct intracellular pathways may increase the beneficial properties of CB2 agonists while reducing side effects. Our hypothesis assumes that CB2 activation will exert antinociceptive and disease-modifying effects on an animal model of OA, but high efficacy and functional bias of CB2 agonists toward the  $\beta$ -arrestin pathway will facilitate tolerance development after prolonged treatment. Third, we employed a systems pharmacology approach focused on

computational and mathematical methods to study the network of protein interactions to reveal relevant molecular targets of CBD within the context of OA.

Indeed, we revealed a hypodopaminergic state in the striatum resulting from OA-related chronic pain that was reversed by an inhibitor of endocannabinoid degradation, suggesting that enhancing ECS tone counteracts central and affective components of chronic pain. At the peripheral level, we documented analgesic and disease modifying properties of CB2 agonists, as well as their molecular mechanism of action. Moreover, we have indicated the pharmacodynamic properties of CB2 agonists that are related to tolerance development and natural compounds that might assist in OA treatment. Finally, we successfully employed a computational analysis to reveal both pro- and antinociceptive mechanisms of action of CBD in OA.

In summary, our data revealed the functional role and mechanism of action of the ECS at both the central and peripheral levels of OA pathophysiology. The results of the presented dissertation should provide a better understanding of cannabinoid pharmacology and may facilitate the development of novel disease-modifying treatment strategies for OA.