

## Ocena pracy doktorskiej mgr Jakuba Młosta

**pt.: „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 osteartrozy: obwodowe i ośrodkowe mechanizmy działania nowych substancji o potencjale terapeutycznym”**

Osteoartroza czyli nieuleczalna choroba stawów prowadząca do przedwczesnej niepełnosprawności ruchowej związana jest między innymi z silnym bólem, a także postępującym stanem zapalnym. Niestety, wciąż nie ma skutecznej terapii jej leczenia, a stosowane obecnie środki farmakologiczne, w tym najczęściej używane niesterydowe leki przeciwzapalne, często wywołują szereg działań niepożądanych. Biorąc powyższe pod uwagę tematyka przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej mgr Jakuba Młosta jest zarówno aktualna jak i celowa. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że praca jest kontynuacją bogatego dorobku wybitnej specjalistki z zakresu endokannabinoidów i bólu Promotorki pracy, pani prof. dr hab. Katarzyny Starowicz-Bubak.

Zasadniczą część liczącej 79 stron, napisanej w języku angielskim, pracy doktorskiej stanowią 4 publikacje oryginalne z lat 2018-2022 o łącznym Impact Factor aż 21,10 punktów. Współautorami powyższych publikacji są, oprócz Pani Promotor, współpracownicy z Zakładu Neurochemii (a dwóch autorów w jednej z publikacji pracuje w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej) Instytutu Farmakologii PAN im. Jerzego Maja w Krakowie. Wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie publikacji do pracy doktorskiej mgr J. Młosta, a także zadeklarowali, że zawarte w nich wyniki nie zostaną przez nich wykorzystane do uzyskania stopni naukowych. Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy powstały w trakcie realizacji dwóch projektów OPUS finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, których kierownikiem była Promotor rozprawy. Pragnę zaznaczyć, że mgr J. Młost jest pierwszym autorem wszystkich czterech publikacji, co niewątpliwie świadczy o wiodącej roli Doktoranta, Jego zaangażowaniu i kompetencji przy powstawaniu tych publikacji. Ponadto chcę podkreślić, że, jak zauważyłam w PubMed, Doktorant jest także pierwszym autorem jednej pracy oryginalnej i 2 prac przeglądowych,

dotyczących tematyki niniejszej rozprawy doktorskiej o łącznym IF 16 punktów, które nie zostały uwzględnione w niniejszej pracy doktorskiej. Są to:

1. Mlost J, Kostrzewa M, Malek N, Starowicz K. Molecular Understanding of the Activation of CB1 and Blockade of TRPV1 Receptors: Implications for Novel Treatment Strategies in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):342; praca oryginalna;
2. Mlost J, Bryk M, Starowicz K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8870. doi: 10.3390/ijms21228870. PMID: 33238607; praca przeglądowa;
3. Mlost J, Wąsik A, Starowicz K. Role of endocannabinoid system in dopamine signalling within the reward circuits affected by chronic pain. *Pharmacol Res.* 2019;143:40-47. doi: 10.1016/j.phrs.2019.02.02; praca przeglądowa.

Publikacje wchodzące w skład niniejszej pracy doktorskiej, poprzedzone są spisem treści i skrótów, a także streszczeniem rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim. W 17-stronicowym wstępie, który zawiera dodatkowo 6 kolorowych ilustracji przybliżających omawiane w tekście zagadnienia, Doktorant zaznajamia czytelnika z najważniejszymi zagadnieniami, których dotyczą 4 prace oryginalne stanowiące zasadniczą część rozprawy. Przede wszystkim opisuje na czym polega osteoartroza, jakie są jej konsekwencje, zwracając przy tym uwagę na objawy bólowe, wpływ choroby na zdrowie psychiczne, a także brak skutecznej terapii. Kolejny podrozdział wstępu to omówienie zwierzęcych modeli choroby, co umożliwiło uzasadnienie przez Doktoranta wyboru zastosowanej przez siebie metody z wewnątrzstawową iniekcją jodooctanu monosodowego (MIA), metody dokładnie opracowanej i opisanej przez zespół prof. K. Starowicz-Bubak w innych publikacjach i szczegółowo przedstawionej przez mgr J. Mlostę w pracy doktorskiej. Z kolei Doktorant opisuje układ endokannabinoidowy - receptory, endokannabinoidy, ich metabolizm i transport. Pozwala to na łatwe zrozumienie kolejnej części pracy omawiającej udział układu endokannabinoidowego w patofizjologii osteoartrozy (w tym głównie reakcji bólowej, jej związku z depresją i reakcją lękową, odpowiedzi immunologicznej czy wpływem na układ kostny). Całość znacznie ułatwia późniejsze zrozumienie tekstu publikacji oryginalnych, a przede wszystkim jednoznacznie uzasadnia dlaczego stanowi on obiecujący cel w terapii tej choroby. Celem pracy było sprawdzenie potencjalnego znaczenia w leczeniu osteoartrozy trzech różnych strategii terapeutycznych związanych z układem endokannabinoidowym: (1) wzrostu poziomu endokannabinoidów poprzez zastosowanie inhibitora rozkładu endokannabinoidu anandamidu URB597 i zbadanie jego wpływu na mezolimbiczny szlak dopaminergiczny w powiązaniu do chronicznego bólu; (2) zastosowanie agonistów receptorów kannabinoidowych CB<sub>2</sub> (CB<sub>2</sub>R), których pobudzenie działa

przeciwbólowo i przeciwzapalnie [dwóch syntetycznych związków o wysokim powinowactwie do CB<sub>2</sub>R (JHW133 i GW833972A), charakteryzujących się różnym profilem farmakodynamicznym (odpowiednio cAMP i β-arrestyna) oraz jednym występującym naturalnie o niskim powinowactwie do CB<sub>2</sub>R (β-kariofilen)] oraz (3) fitokannabinoidów z ich głównym przedstawicielem kannabidiolem (CBD), związkiem o szerokim potencjale farmakologicznym, który pozbawiony jest ośrodkowego działania niepożądanego. Przy czym dodatkowym celem w przypadku CBD było porównanie wskazań działania CBD uzyskanego za pomocą metod bioinformatycznych z jego rzeczywistym działaniem.

Wszystkie doświadczenia wykonano na szczurach, u których osteoartrozę indukowano poprzez wewnątrzstawową iniekcję z jodooctanu monosodowego, a podawanie związków najczęściej rozpoczynano 4 tygodnie po iniekcji MIA. Co ważne, jak wyraźnie stwierdzono we wszystkich 4 publikacjach, na wszystkie doświadczenia uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Oceniając wpływ badanych związków zastosowano szereg odpowiednich metod pozwalających na uzyskanie jak najdokładniejszych odpowiedzi na postawione hipotezy badawcze w tym testy behawioralne oceniające wrażliwość na ból, analizę biochemiczną *ex vivo* określającą poziom dopaminy i jej metabolitów w określonych strukturach mózgu (prążkowi, jądrze półleżącym, hipokampie i korze przedczołowej), a także poziom ekspresji mRNA, barwienia histologiczne oraz mikrotomografię stawu kolanowego. Niezwykle ciekawym podejściem, wymagającym niewątpliwie od Doktoranta dodatkowych zdolności było wykorzystanie metod obliczeniowych i matematycznych do badania sieci interakcji CBD i wytypowanie w ten sposób potencjalnych punktów uchwytu odpowiedzialnych za jego działanie korzystne i niepożądane, a następnie sprawdzenie tego za pomocą odpowiednich testów farmakologiczno-biochemicznych.

Oprócz zamieszczonych 4 publikacji praca doktorska zawiera 5-stronicową dyskusję oraz podsumowanie z prawidłowym wypunktowaniem pięciu głównych osiągnięć pracy. Po pierwsze, Doktorant stwierdza, że związana z chronicznym bólem osteoartroza prowadzi do spadku poziomu dopaminy w mezolimbicznym szlaku dopaminergicznym, któremu zapobiega podwyższenie poziomu endokannabinoidów przez URB597. Co ważne, URB597 nie modyfikuje poziomu dopaminy w mózgu w zdrowej grupie kontrolnej. URB597 stosowano przy tym

jednorazowo. W związku powyższym powstaje pytanie o jego działanie chroniczne. Po drugie, agoniści receptorów CB<sub>2</sub> (podawani jednorazowo i chronicznie) nie tylko działali przeciwbólowo, ale także hamowali rozwój choroby. Przy tym trwałość efektu leczniczego zależała od zastosowanego agonisty, gdyż preferencyjna aktywacja w kierunku β-arestyny prowadziła do rozwoju tolerancji na efekty terapeutyczne, natomiast wysoka skuteczność terapeutyczna została stwierdzona przy hamowaniu cAMP. Korzystne działanie wykazano także w przypadku naturalnie występującego βeta-kariofilenu, który pomimo słabszego powinowactwa do CB<sub>2</sub>R wykazywał działanie przeciwbólowe i lecznicze, a nie prowadził do rozwoju tolerancji. Ostatni punkt podsumowania poświęcony jest wytypowaniu za pomocą narzędzi bioinformatycznych oraz ich weryfikacji farmakologiczno-biochemicznej dwóch potencjalnych punktów działania CBD – korzystnego receptory PPAR<sub>γ</sub> i kanały TRP, które mogą być odpowiedzialne za indukowanie bólu.

Z czystej ciekawości mam 2 pytania do Doktoranta:


1. W przedstawionej pracy są przedstawione trzy strategie terapeutyczne w oparciu o układ endokannabinoidowy. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, proszę podać, która z nich wydaje się najbardziej obiecująca w terapii osteoartrozy.
2. Które z innych grup związków wpływających na układ endokannabinoidowy warte byłyby zbadania w badaniach przedklinicznych terapii osteoartrozy.

Wysoka jakość uzyskanych wyników oraz ich nowatorstwo, a także ich potencjalne znaczenie w patofizjologii i terapii osteoartrozy zostało docenione przez recenzentów prestiżowych czasopism. Chciałabym podkreślić, że złożona z publikacji rozprawa doktorska, w tym oryginalne komentarze Doktoranta, została napisana w sposób bardzo przejrzysty i zrozumiały. Wysoka jakość merytoryczno-edytorska omówienia publikacji jednoznacznie potwierdza, że Doktorant zasłużył na pierwsze miejsce jako autor wszystkich publikacji.

Mgr Jakuba Młosta miałam okazję poznać osobiście podczas Zjazdów Światowego Towarzystwa Badań Kannabinoidów (ICRS) w Bethesdzie (USA, 2019) bądź European Workshop on Cannabinoid Research (Londyn, 2017), gdzie z zaangażowaniem bardzo ciekawie i przekonująco prezentował ustnie przed

światowymi ekspertami z zakresu kannabinoidów wyniki, stanowiące między innymi podstawę niniejsze pracy doktorskiej i merytorycznie odpowiadał na zadawane pytania.

Podsumowując, otrzymane wyniki są nowatorskie, ciekawe, spójne, bardzo dobrze przedstawione oraz przedyskutowane i uzyskane w oparciu o zastosowanie precyzyjnych metod, a przede wszystkim opublikowane w prestiżowych czasopismach. Łączny Impact Factor czterech publikacji, których pierwszym autorem jest Doktorant, a które stanowią podstawę niniejszej pracy doktorskiej wynosi aż 21,1 punktów. Dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Jakuba Młosta do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a jednocześnie wnoszę o **wyróżnienie** pracy doktorskiej.

KIEROWNIK  
Zakładu Fizjologii i Patofizjologii  
Doświadczalnej  
  
prof. dr hab. Barbara Malinowska

Białystok, 27 kwietnia 2022 r.