Ocena pracy doktoryzkiej 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 osteoartozy: obwodowe i ośrodkowe mechanizmy działania nowych substancji o potencjale terapeutycznym”


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


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. Przed wszystkim opisuje na czym polega osteoartoza, 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 jodooczanu monosodowego (MIA), metody dokładnie opracowanej i opisanej przez zespół prof. K. Starowicz-Bubak w innych publikacjach i szczegółowo przedstawionej przez mgr J. Młosta 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 osteoartozy (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 obecujący cel w terapii tej choroby. Celem pracy było sprawdzenie potencjalnego znaczenia w leczeniu osteoartozy trzech różnych strategii terapeutycznych związanych z układem endokannabinoidowym: (1) wzrostu poziomu endokannabinoidów poprzez zastosowanie inhibitory rozkładu endokannabinoidu anandamidu URB597 i zbadanie jego wpływu na mezolimbiczny szlak dopaminergiczny w powiązaniu do chronicznego bólu; (2) zastosowanie agonistów receptorów kannabinoidowych CB2 (CB2R), których pobudzenie działa
przeciwbólowo i przeciwpalnie [dwóch syntetycznych związków o wysokim powinowactwie do CB2R (JHW133 i GW833972A), charakteryzujących się różnym profilem farmakodynamicznym (odpowiednio cAMP i β-arrestyna) oraz jednym występującym naturalnie o niskim powinowactwie do CB2R (β-kariofilen)] oraz (3) fitokannabinoidów z ich głównym przedstawicielem cannabidiolem (CBD), związiem o szerokim potencjale farmakologicznym, który pozbawiony jest ośrodkowego działania niepożądanej. 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 jodoocutanu 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 ocenające wrażliwość na ból, analizę biochemiczną ex vivo określającą poziom dopaminy i jej metabolitów w określonych strukturach mózgu (prążkowiu, jądrze połóżącym, hipokampie i korze przedczołowej), a także poziom ekspresji mRNA, barwienia histologiczne oraz mikrotomografię stawu kolanowego. Niezwykle ciekawym podejściem, wymagającym niewątpliwej od Doktoranta dodatkowych zdolności było wykorzystuje 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 osteoartrozę 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, agonisci receptorów CB₂ (podawani jednorazowo i chronicznie) nie tylko działyli przeciwbólowo, ale także hamowali rozwój choroby. Przy tym trwałość efektu leczniczego zależał 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-karsofilenu, który pomimo słabszego powinowactwa do CB₂R 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 PPARγ 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 endokannabinoidalowy. 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 endokannabinoidalowy 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 zasłużenie został pierwszym autorem wszystkich publikacji.

Mgr Jakuba Młosta miał am okazję poznajęć osobiście podczas Zjazdów Światowego Towarzystwa Badań Cannabinoidów (ICRS) w Bethesda (USA, 2019) bądź European Workshop on Cannabinoid Research (Londyn, 2017), gdzie z zaangażowaniem bardzo ciekawie i przekonywująco prezentował ustnie przed
światowymi ekspertami z zakresuannabinoidów 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 Mlosta do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.

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

Białystok, 27 kwietnia 2022 r.