

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Kędziory
pt.: „ Mechanism and pharmacotherapy of osteoarthritis – recent advances in
the endocannabinoid system targeting”

wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Starowicz-Bubak

Osteoartroza czyli choroba zwyrodnieniowa stawów (ChZS) jest nieuleczalną chorobą prowadzącą do przedwczesnej niepełnosprawności ruchowej związanej 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 (NLPZ), często wywołują szereg działań niepożądanych. Biorąc powyższe pod uwagę tematyka przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej mgr Marty Kędziory jest zarówno aktualna jak i celowa. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że praca jest kontynuacją bogatego dorobku wybitnej specjalistki z zakresu znaczenia endokannabinoidów w terapii ChZS i bólu Promotorki pracy, pani prof. dr hab. Katarzyny Starowicz-Bubak.

Zasadniczą część liczącą 86 stron, napisanej w języku angielskim, pracy doktorskiej stanowią 3 publikacje oryginalne z lat 2020-2023 o łącznym Impact Factor aż 17,469 punktów oraz 380 punktów MEiN. Chciałabym w tym miejscu zaznaczyć, że biorąc pod uwagę powyższe zdanie o opublikowaniu uzyskanych przez Doktorantkę wyników w czasopismach o wysokim IF, moja recenzja jest recenzją formalną. Współautorami powyższych publikacji są, oprócz Pani Promotor, współpracownicy z Zakładu Neurochemii Instytutu Farmakologii PAN im. Jerzego Maja w Krakowie, przy czym trzecia publikacja została wykonana i napisana we współpracy z 4 naukowcami z Włoch. Wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie publikacji do pracy doktorskiej mgr M. Kędziory, a także zadeklarowali, że zawarte w nich wyniki nie zostaną przez nich wykorzystane do uzyskania stopni naukowych. Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie powstały w trakcie realizacji dwóch projektów OPUS finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, których kierownikiem była Promotor rozprawy oraz programów statutowych Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Pragnę zaznaczyć, że mgr M. Kędziora jest pierwszym autorem wszystkich trzech publikacji (dwóch pod nazwiskiem Bryk i jednej pod nazwiskiem Kędziora), co niewątpliwie świadczy o Jej wiodącej roli, zaangażowaniu i kompetencji przy powstawaniu tych publikacji.

Publikacje wchodzące w skład niniejszej pracy doktorskiej, poprzedzone są spisem treści i skrótów, a także streszczeniem rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim oraz 11-stronicowym wstępem. We wstępie Doktorantka zaznacza czytelnika z najważniejszymi zagadnieniami swojej rozprawy doktorskiej: (1) etiologią

oraz objawami ChZS z podaniem najnowszej definicji tej choroby z 2023 r., a także aktualnym postępowaniem terapeutycznym w przypadku jej wystąpienia; (2) krytycznym opisem zwierzęcych modeli ChZS, ze szczególnym zwróceniem uwagi i dokładnym uzasadnieniem zastosowania w niniejszej rozprawie metody z wewnątrzstawową iniekcją jodooctanu monosodowego (MIA), (3) chorobom współistniejącym z ChZS takimi jak wynikającymi z długotrwałego bólu zaburzeniami nastroju czy depresją; (4) przedstawieniem układu endokannabinoidowego (ECS) oraz (5) zmianami w ECS podczas przewlekłego bólu i ChZS. Całość wzbogacona jest o 7 rycin przybliżających czytelnikowi m.in. (1) patogenezę ChZS (porównawcze zestawienie zdrowego i chorego stawu), miejsca chirurgicznej i chemicznej interwencji przy indukowaniu ChZS (w tym MIA), (2) związek między przewlekłym bólem związanym z ChZS, zaburzeniami mózgu, które przyczyniają się do zmian poznawczych takich jak upośledzenie nastroju i pamięci oraz potencjalną modulacją ECS jako strategią terapeutyczną; (3) syntezę i degradację dwóch najbardziej poznanych endokannabinoidów anandamidu (AEA) oraz 2-arachidonyloglicerolu (2-AG), a także wcześniej opublikowane czy jeszcze nieopublikowane wyniki dodatkowo uzasadniające celowość zaplanowanych badań czy zastosowanie danego modelu badawczego. Tak napisany wstęp znacznie ułatwia późniejsze zrozumienie tekstu publikacji oryginalnych oraz dyskusji rozprawy, a przede wszystkim jednoznacznie uzasadnia trzy wymienione przez Doktorantkę cele Jej rozprawy doktorskiej. Są to: (1) szczegółowe zbadanie zmian zwyrodnieniowych i zapalnych występujących podczas progresji ChZS w tkankach stawów w celu lepszego zrozumienia patomechanizmów odpowiedzialnych za rozwój tej choroby w modelu ChZS wywołanej przez MIA u szczurów; (2) kompleksowa ocena szeregu szlaków produkcji i degradacji AEA w trakcie rozwoju ChZS, co miało umożliwić wyjaśnienie roli ECS w patogenezie ChZS; (3) zbadanie wpływu efektu zahamowania rozkładu AEA za pomocą inhibitora hydrolazy amidowej kwasów tłuszczowych (FAAH, URB597) na ból i towarzyszące mu zmiany poziomów długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP, z ang. Long-term potentiation LTP), a także monoamin w hipokampie zwierząt z ChZS. Szczegółowe problemy badawcze, ich wzajemne powiązanie zmierzające do osiągnięcia zawartego w tytule głównego celu rozprawy doktorskiej zostały dodatkowo zilustrowane na jednym schemacie.

W tym miejscu mam do Doktorantki jedną uwagę – w pracy nie znalazłam wyjaśnienia, dlaczego akurat skoncentrowała się na AEA, jeżeli jednym z głównych celów było wyjaśnienie roli ECS w patogenezie ChZS. Tym bardziej, że np. stężenie 2-AG w szeregu tkankach, w tym mózgu szczura, jest wyższe niż AEA.

Pragnę pokreślić, że publikacje wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej nie są ułożone chronologicznie według dat ich publikowania, ale w kolejności ułatwiającej zrozumienie tekstu rozprawy – dokładna ocena doświadczalnego modelu ChZS wywołanego za pomocą wewnątrzstawowej iniekcji MIA, ocena składowych ECS w trakcie rozwoju ChZS oraz potencjalnego znaczenia terapeutycznego związku wpływającego na układu endokannabinoidowy w leczeniu tej choroby. Wszystkie doświadczenia wykonano na szczurach, u których jak wspominałam powyżej, ChZS indukowano poprzez wewnątrzstawową iniekcję MIA. Co ważne, jak wyraźnie stwierdzono we wszystkich 3 publikacjach i rozprawie

doktorskiej, na wszystkie doświadczenia uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Testy behawioralne oceniające wrażliwość na ból oraz pobieranie tkanek (próbki chrząstki, błony maziowej i płynu maziowego ze stawu oraz w pracach 2 i 3 także odpowiednio fragmenty rdzenia kręgowego z odcinka lędźwiowego i hipokampu) do analizy biochemicznej (poziom ekspresji mRNA oraz Western Blot) wykonywano zależnie od czasu (2, 7, 14 i 28 dni od momentu indukcji ChZS; publikacje 1 i 2) oraz jedynie w 28 dniu (publikacja 3). W publikacji 1 zbadano wpływ trzech dawek MIA 1, 2 lub 3 mg. Pozwoliło to na wybór i krytyczne uzasadnienie jednej dawki MIA 2 mg stosowanej w kolejnych publikacjach. Badania biochemiczne pozwoliły na ocenę zmian w poziomie szeregu czynników zapalnych, enzymów biorących udział w syntezie i rozkładzie AEA, a także poziomu dopaminy i serotoniny.

Oprócz zamieszczonych 3 publikacji rozprawa doktorska zawiera 6-stronicową dyskusję, której podrozdziały odnoszą się do poszczególnych publikacji. Pragnę w tym miejscu pokreślić, że Doktoranta w przypadku opisu każdej pracy oryginalnej starała się nawiązywać do człowieka, podkreślając m.in. podobieństwa zastosowanego modelu u szczurów do ChZS u człowieka czy opisując tragiczne skutki badań klinicznych inhibitora FAAH BIA10-2474.

Dyskusja zakończona jest podsumowaniem oraz wypunktowaniem głównych osiągnięć pracy. Na końcu rozprawy jest spis 116 pozycji dodatkowej literatury, z czego 55% pochodzi z lat 2022-2023, co świadczy o nowatorstwie pracy. Niestety Doktorantka przez przeoczenie nie podała w 2 publikacjach tytułu czasopisma i ich szczegółowych danych, a w około 20 numeru tomu i strony/stron.

Charakterystyka zmian na poziomie behawioralnym i molekularnym [w tym głównie czynników zapalnych (CCL2, CXCL1, IL-1 β) i metaloproteinaz (MMP-2, -3, -9, -13) zależnych od dawki MIA stymulującej ChZS u szczurów oraz postępujących wraz z rozwojem choroby pozwoliło na wybór i krytyczne uzasadnienie jednej dawki MIA 2 mg, jako najniższej możliwej dawki skutecznie wyzwalającej ChZS, ale nie wywołującej jeszcze nadmiernego stanu zapalnego. Jest ona rekomendowana przez Doktorantkę jako „złoty standard” do kolejnych badań i niewątpliwie jest to bardzo cenna osiągnięcie niniejszej rozprawy doktorskiej, które zapewne doczeka się w przyszłości szeregu cytowań. Na podkreślenie zasługuje dodatkowo fakt, że charakterystyka powyższego modelu została dodatkowo rozszerzona poprzez powiązanie roli przewlekłego bólu wynikającego z ChZS z zaburzeniami nastroju i pamięci, związanego m.in. z redukcją LTP w hipokampowym szlaku bocznej kory śródwęczowej-zakrętu zębatego i zaburzeniami poziomów monoamin (dopaminy i serotoniny). Niewątpliwie bardzo ciekawa jest ocena roli ECS w rdzeniu kręgowym i tkance stawowej podczas rozwoju ChZS poprzez scharakteryzowanie zmian w enzymach odpowiedzialnych za syntezę i degradację AEA (i to zarówno za pośrednictwem szlaków głównych jak i alternatywnych), które z jednej strony mogą być ważnymi wskaźnikami rozwoju ChZS, a z drugiej potencjalnymi punktami uchwytu przyszłych leków, gdyż, jak zaznacza Doktorantka, degradacja endokannabinoidów na szlakach alternatywnych może prowadzić do powstania czynników prozapalnych m.in. na szlaku zależnym od COX-2. A biorąc pod uwagę

podobieństwa pomiędzy zastosowanym przez Doktorantkę doświadczalnym modelem ChZs a tą chorobą u ludzi, o czym wspomina Doktorantka, a także fakt, że uzyskane wyniki pozwoliły na dokładną charakterystykę patomechanizmu ChZS w trakcie progresji choroby na poziomie chrząstki, błony maziowej błony i płynu maziowego, które reprezentują kluczowe punkty spustowe dla obecnego zrozumienia implikacji terapeutycznych (zależnych i niezależnych od ECB), przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska ma istotne znaczenie nie tylko ze względu na dokładną i kompleksową weryfikację metody doświadczalnej ale także może mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne. Potwierdzenie skuteczności modulacji ECS przez URB597 w zmniejszaniu przewlekłego bólu związanego z chorobą zwyrodnieniową stawów, przywróceniu zaburzeń pamięci i nastroju oraz normalizacji zmian monoamin w mózgu szczurów z ChZS potwierdza potencjalną efektywność takiej terapii.

Z czystej ciekawości recenzenta mam następujące pytania do Doktorantki:

1. URB597 stosowany był jednorazowo 28 dnia od momentu doświadczalnego wywołania ChZS. Biorąc pod uwagę różne zmiany w enzymach odpowiedzialnych za syntezę i degradację AEA w trakcie rozwoju choroby, czy efektywność tego związku również może być zależna od progresji choroby? Czy polecałaby Pani chroniczne stosowanie inhibitorów FAAH w ChZS?
2. W swojej pracy przeglądowej opublikowanej w 2021 r. razem z Panią Promotor w *Pharmacol. Rep.* zwraca Pani uwagę na rolę receptorów kannabinoidowych CB₂ (*Pharmacol Rep.* 2021;73:681-699), a w pracy doktorskiej bada Pani receptory CB₁. Czy wg. Pani receptory CB₂ mogą również być zaangażowane w korzystnym działaniu URB597?
3. Biorąc pod uwagę wyniki Pani pracy jak ocenia Pani potencjalne znaczenie terapeutyczne (a) podwójnych inhibitorów FAAH i COX opisanych m.in. w publikacji Dongdem i wsp. (*Assessment of NSAIDs as potential inhibitors of the fatty acid amide hydrolase I (FAAH-1) using three different primary fatty acid amide substrates in vitro. BMC Pharmacol Toxicol.* 2022;23:1) oraz (b) wysiłku fizycznego o odpowiednim obciążeniu w terapii pacjentów z ChZS, ponieważ poziom ECB jest modulowany podczas wysiłku fizycznego (np. Matei i wsp. *The endocannabinoid system and physical exercise. Int J Mol Sci.* 2023;24:1989).

Wysoka jakość uzyskanych wyników oraz ich nowatorstwo, a także ich potencjalne znaczenie w patofizjologii i terapii ChZS zostało docenione przez recenzentów prestiżowych czasopism. Chciałabym podkreślić, że złożona z publikacji rozprawa doktorska, w tym oryginalne komentarze Doktorantki została napisana w sposób bardzo przejrzysty i zrozumiały. Wysoka jakość merytoryczno-edytorska omówienia publikacji jednoznacznie potwierdza, że Doktorantka zasłużenie została pierwszym autorem wszystkich publikacji. Na uwagę zasługuje także fakt, że mgr M. Kędziora jest laureatką Stypendium doktoranckiego L'Oréal-UNESCO: Dla Kobiet i Nauki, stypendium Prezesa Polskiej Akademii Nauk za wybitne osiągnięcia oraz kierownikiem grantu PRELUDIUM, a także odbyła 5- i 2-miesięczne stypendia naukowe w USA i Francji.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marty Kędziory spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.). 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 trzech publikacji, których pierwszą autorką jest Doktorantka, a które stanowią podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej wynosi aż 17,5 punktów. Dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Marty Kędziory do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne, a jednocześnie wnoszę o **wyróżnienie** rozprawy doktorskiej.

Białystok, 11 kwietnia 2023 r.