



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

**INSTYTUT FARMAKOLOGII
IM. JERZEGO MAJA
Polskiej Akademii Nauk
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
tel.: 12 662 32 20, fax: 12 637 45 00
Regon: 000325943, NIP: 675-000-18-28**

Dr hab. Agnieszka Pałucha-Poniewiera
Zakład Neurobiologii
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Kraków, 7.12.2022 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej
mgr inż. Piotra Pankiewicza**

**„Rozwój innowacyjnych, małowzrostkowych agonistów TrkB w terapii chorób
układu nerwowego”**

wykonanej
w Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Marcelego
Nenckiego w Warszawie
oraz
Laboratoriach Celon Pharma. S.A.

pod kierunkiem:
Promotor: prof. dr hab. Katarzyny Kality-Bykowskiej
i Promotora pomocniczego: dr Jerzego Pieczykolana

Rozprawa doktorska mgr inż. Piotra Pankiewicza stanowi obszerne opracowanie dotyczące zaprojektowania, a następnie praktycznego zweryfikowania tzw. „platformy badawczej”, polegającej na wykorzystaniu szerokiego panelu technik badawczych, zarówno przesiewowych jak i szczegółowych testów funkcjonalnych, do identyfikacji cząsteczek o profilu agonisty receptora TrkB, dedykowanych do potencjalnego terapeutycznego zastosowania w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego. Biorąc pod uwagę merytoryczne przesłanki wskazujące na potencjał terapeutyczny agonistów receptora TrkB w szerokim spektrum zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego, ze szczególnym uwzględnieniem depresji, która stanowi narastający problem medyczny i społeczny, z niewystarczającą i często nieskuteczną terapią farmakologiczną, poszukiwanie nowych możliwości terapii, opartych o zastosowanie związków aktywujących receptor TrkB jest w mojej opinii w pełni zasadne. Uważam również, że zastosowanie nowoczesnych technik z zakresu szeroko pojętej biologii molekularnej i biotechnologii, w celu opracowania platformy do poszukiwania leku w oparciu o konkretny cel molekularny było w tym przypadku jedyną słuszną drogą. Droga ta była realizowana bardzo konsekwentnie i chociaż nie doprowadziła do identyfikacji cząsteczki o pożądanym właściwościach, dostarczyła szeregu informacji pozwalających na weryfikację dotychczasowej wiedzy na temat aktywności związków o

ul. Smętna 12
31-343 Kraków

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

tel.: +48 12 662 32 20
+48 12 662 32 05
+48 12 662 32 49
fax: +48 12 637 45 00



znany profil działania, związanym z aktywacją receptora TrkB oraz pozwoliła na opracowanie i weryfikację ścieżki przesiewowej cząsteczek o tym profilu receptorowym.

Rozprawa doktorska Pana mgr Piotra Pankiewicza jest napisana w języku polskim, liczy 141 stron i ma układ typowy dla tego typu opracowań. Obejmuje *Streszczenie* w języku polskim i angielskim, *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, *Dyskusję*, *Wnioski* i *Bibliografię*, a także spis treści, spis tabel i rycin, wykaz skrótów oraz kopię uchwały Lokalnej Komisji Etycznej dotyczącej doświadczeń na zwierzętach. Nie zabrakło również wskazania źródeł finansowania projektu, dorobku publikacyjnego oraz licznych podziękowań.

Liczący 24 strony *Wstęp* profesjonalnie i szczegółowo wprowadza w badane zagadnienie, poświęcając poszczególnym jego aspektom kolejne podrozdziały. Dowiadujemy się nie tylko o biologii BDNF, receptorze TrkB, jego budowie, mechanizmach aktywacji i transdukcji sygnału, ale również o zaburzeniach interakcji BDNF-TrkB w chorobach neuropsychiatrycznych, wskazując podstawę merytoryczną do podjętych badań. Poświęcono również sporo miejsca opisowi procesu rozwoju nowego leku, z uwzględnieniem filozofii tzw. *drug discovery* i ograniczeń związanych z tym procesem. Bardzo logiczny pod względem kompozycji wstęp został uzupełniony czytelnymi i dokładnie opisanymi rycinami. W mojej ocenie, ta część rozprawy mogłaby stanowić osobną, polskojęzyczną monografię dotyczącą biologii BDNF i jego receptora. Aczkolwiek, musiałaby być uzupełniona o nierzadkie przecież doniesienia naukowe, sceptycznie traktujące rolę BDNF w chorobach neuropsychiatrycznych i ich terapii.

Cel pracy został postawiony jasno. Obejmował on próbę identyfikacji innowacyjnych, małowcząsteczkowych agonistów TrkB, o potwierdzonej aktywności *in vitro* i *in vivo*, gotowych do dalszego rozwoju przedklinicznego i mających potencjalne zastosowanie w terapii chorób ośrodkowego układu nerwowego. Wyznaczono również zadania badawczo-rozwojowe podzielone na kolejne etapy.

Kolejny rozdział, zawierający opisy użytych materiałów i metod badawczych, został uzupełniony o tabele zawierające szczegółowe informacje na temat składów buforów, pożywek hodowlanych, czy przeciwciał, zastosowanych w poszczególnych fazach badań. Ta forma prezentacji bardzo ułatwia poruszanie się w wieloetapowej i skomplikowanej metodyce zastosowanej w badaniach. Metody są dobrane odpowiednio do założonych celów, a ich szczegółowy opis umożliwia ewentualną weryfikację.

Wyniki zostały zaprezentowane w formie 11 rycin i 6 tabel, uzupełnionych o pełne opisy uzyskanych rezultatów na kolejnych etapach badań, poczynwszy od określenia biblioteki 987



użytych związków chemicznych, poprzez kolejne etapy ich selekcji, a następnie oceny ich zdolności do wiązania i aktywacji receptora TrkB w układzie ortosterycznym, a także, dla związków referencyjnych, określenia ich aktywności w układzie ortosterycznej aktywacji, a następnie allosterycznej modulacji, zdolności do indukowania dimeryzacji oraz aktywowania kolejnych ścieżek sygnałowych w modelu *in vitro* z zastosowaniem odpowiednich linii komórkowych, aż po ocenę właściwości cytoprotekcyjnych oraz parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych. Uzyskane w pracy wyniki wskazują, iż spośród biblioteki 987 związków chemicznych, na drodze badań przesiewowych ostatecznie nie zidentyfikowano innowacyjnej cząsteczki, która wiązałaby się z receptorem TrkB i powodowała jego aktywację *in vitro*. Wykazano natomiast, że znacząca większość związków małowcząsteczkowych opisanych w literaturze jako agoniści receptora TrkB nie wykazuje właściwości ortosterycznych ligandów tego receptora oraz że żaden spośród tych związków nie spełnia kryteriów allosterycznego modulatora. Ponadto wykazano, że 7,8-dihydroksyflawon (7,8-DHF), traktowany powszechnie jako wiodący związek referencyjny w grupie małowcząsteczkowych agonistów receptora TrkB, nie aktywuje tego receptora, ani w trybie ortosterycznym, ani allosterycznym oraz nie wykazuje działania cytoprotekcyjnego, a ponadto jest związkiem o bardzo niskiej selektywności i, jak wykazano, oddziałuje z co najmniej dwunastoma celami molekularnymi.

Prezentacja wyników jest w mojej ocenie znakomita. Ryciny są przejrzyste, czytelne, dobrze i szczegółowo opisane (z wyjątkiem Ryc. 8, na której nie naniesiono jednostek na oś X w żadnym z wykresów) oraz pozwalają na precyzyjną, porównawczą ocenę wielu danych. Wyniki poddane analizom statystycznym są przedstawione bardzo syntetycznie, ale nie brakuje wyników zaprezentowanej w formie bezwzględnej, w postaci np. reprezentatywnych analiz uzyskanych za pomocą metody Western blot dla wszystkich białek. Dodatkowo, niektóre wykresy są poprzedzone schematem przedstawiającym badane w danym eksperymencie zjawisko (Ryc. 9, 10, 11), co dodatkowo ułatwia interpretację wyników. Na uznanie zasługuje zaprezentowanie pełnego panelu wyników, z których większość to tzw. „wyniki negatywne”, które są przecież wynikami równocennymi z tymi, które pokazują tzw. „zmianę” i których unikanie staje się często źródłem tworzenia niepełnego lub nawet fałszywego obrazu badanych mechanizmów. Cennym zabiegiem zastosowanym przez Doktoranta było zebranie w jednej tabeli (Tabela nr 8) podsumowania wyników badań dla analizowanych związków referencyjnych oraz BDNF. Niepotrzebne wydają się natomiast liczne powtórzenia opisów wyników umieszczone w treści podrozdziałów, a następnie w podpisach rycin. Nie znajduję również jednoznacznego wyjaśnienia kwestii analizy statystycznej w



przypadku wyników zaprezentowanych na Ryc. 11 i Ryc. 12, gdzie zgodnie z opisem zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji, właściwą do analiz np. działania jednego związku w kilku dawkach, podczas gdy z wykresu wynika, że analizie zostało poddanych kilka związków, każdy w trzech dawkach i dodatkowo jedna z tych dawek dla każdego agonisty była badana w obecności antagonisty TrkB. Czy te wszystkie przedstawione „średnie” (SEM) zostały poddane jednej analizie, a następnie porównane metodą „każdy z każdym”? Zastanawiam się dlaczego nie zastosowano tutaj wieloczynnikowej analizy wariancji, która, uwzględniając interakcje pomiędzy czynnikami, wskazałaby (bądź nie) istotne statystycznie znaczenie badanego antagonisty dla efektu agonisty?

Rozdział *Dyskusja* zawiera omówienie wyników w odniesieniu do aktualnych danych literaturowych, obejmujących aż 247 pozycji. Jest merytoryczna, aczkolwiek w dużej części stanowi opis wyników i wynikających z nich wniosków, które wcześniej zawarto w rozdziale *Wyniki*. Zawiera natomiast sporo elementów świadczących o dojrzałości naukowej, przede wszystkim wskazanie ograniczeń metodycznych własnych badań, potencjalnych przyczyn wyniku fałszywie pozytywnego i fałszywie negatywnego, czy krytyczna ocena przydatności konkretnych technik badawczych oraz jasna ocena szans na znalezienie funkcjonalnego agonisty ortosterycznego lub allosterycznego modulatora receptora TrkB w przyszłości. Ta część rozprawy dowodzi również, że Doktorant nie boi się wyzwań w postaci konfrontacji swoich wyników z przyjętą wiedzą i potrafi analizować przyczyny licznych rozbieżności w tym zakresie. Z zainteresowaniem wysłuchałabym jednak planów na dalsze eksperymenty, zapewne zawarte w projekcie, w przypadku, gdyby cząsteczkę o pożądanых własnościach udało się wyodrębnić. Jakie badania *in vivo* były planowane w celu określenia potencjalnych terapeutycznych efektów poszukiwanej cząsteczki w fazie badań przedklinicznych?

Po *Dyskusji* wyników Doktorant umieścił jednostronicowy rozdział *Wnioski*, zawierający zawarte w ośmiu punktach najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań.

Bardzo wysoko oceniam styl w jakim napisana jest rozprawa. Kompozycja pracy pozwala podążać za eksperymentatorem przez kolejne etapy badań i zrozumieć motywację do przeprowadzania kolejnych faz z użyciem konkretnych technik. Doktorant posiadał umiejętność przekazywania wiedzy o skomplikowanych mechanizmach stylem prostym, poprawnym językowo i pozbawionym zbędnych zapożyczeń, a jednocześnie merytorycznym i fachowym. Z obowiązku wskazuję kilka drobnych nieścisłości lub błędów, jak np. użycie pojęcia „frontalna” w odniesieniu do kory czołowej; wskazanie Ryc. 7B, zamiast 7C w odniesieniu do „pozostałych związków



referencyjnych” (str. 65) oraz nieliczne błędy stylistyczne i interpunkcyjne, które nie mają wpływu na ocenę rozprawy.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam doktorat Pana mgr inż. Piotra Pankiewicza. Stało się przed nim trudne zadanie, wymagające żmudnej pracy i szerokiej wiedzy merytorycznej i praktycznej z zakresu chemii, biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii. Realizacja doktoratu nie sprowadzała się do weryfikacji przewidywalnej hipotezy, przy użyciu standardowych metod. Cel, polegający na znalezieniu małowzrostkowego, funkcjonalnego agonisty receptora TrkB nie został wprawdzie osiągnięty, ale osiągnięto inne, niemniej ważne cele, takie jak stworzenie profesjonalnej platformy do badań tego typu związków oraz krytycznej weryfikacji aktywności substancji referencyjnych o tym profilu, które otwierają możliwości dalszych badań w tym zakresie. *Drug discovery* to dziedzina wymagająca zaawansowanych technologii, a jednocześnie cierpliwości, sumienności i pracowitości. Cel nie zawsze udaje się osiągnąć. Tak wygląda rzeczywistość tej dziedziny badań. Jeśli w ramach realizacji tego projektu udało się wdrożyć specjalistę, który w tej rzeczywistości się odnalazł i będzie potrafił profesjonalnie realizować kolejne tego typu projekty, to należy to potraktować jako sukces.

Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż opracowana w ramach projektu platforma badawcza stanowi istotną, aplikacyjną wartość projektu, która, jak zapewnia Autor, potencjalnie może zostać skomercjalizowana. Ponadto, wyniki badań zostały w dużym stopniu opublikowane.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Piotra Pankiewicza spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie Pana mgr inż. Piotra Pankiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań, ich szeroki zakres, interdyscyplinarność projektu, jego innowacyjność, metodyczną wszechstronność i oryginalność oraz niewątpliwy wpływ na rozwój badanej dziedziny, a także możliwe zastosowanie użytkowe, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Piotra Pankiewicza.

INSTYTUT FARMAKOLOGII
IM. JERZEGO MAJA
Polskiej Akademii Nauk
ul. Smetna 12, 31-343 Kraków
tel.: 12 662 32 20
fax: 12 637 45 00

ul. Smetna 12
31-343 Kraków

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

tel.: +48 12 662 32 20
+48 12 662 32 05
+48 12 662 32 49
fax: +48 12 637 45 00