



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

ul. Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

tel.: 61 8546651  
fax: 61 8546652  
e-mail: [ajelinsk@ump.edu.pl](mailto:ajelinsk@ump.edu.pl)

Poznań, dnia 08 marca 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra farm. Adama Stasiulewicza  
pt. *Poszukiwanie ligandów receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 wśród substancji  
lecniczych, związków pochodzenia naturalnego i związków syntetycznych*,  
wykonanej pod kierunkiem Pana dra hab. Tomasza Pawińskiego i Pani dr hab. Joanny  
Sułkowskiej, prof. UW  
na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Modelowanie komputerowe jest obecnie jedną z podstawowych metod wspomagających poszukiwanie znanych i projektowanie nowych związków – substancji, które mogą być potencjalnie wykorzystane w terapii. Przy użyciu metod *in silico*, analizy danych i uczenia maszynowego możliwe jest określenie potencjału związku już na etapie jego projektowania, co prowadzi do obniżenia kosztów, jak również zwiększenia wydajności badań. Zastosowanie metod *in silico* umożliwia także zbadanie bardzo dużej liczby związków już znanych, obecnych na rynku, ich repozycjonowanie i potwierdza możliwość ich wykorzystania w leczeniu innych schorzeń.

Duże zainteresowanie terapeutyczne preparatami *Cannabis sativa*, możliwość ich wykorzystania w leczeniu wielu schorzeń, a jednocześnie ograniczenia ich stosowania wpłynęły na decyzję skierowania zainteresowania Doktoranta na poszukiwanie substancji oddziałujących na receptory kannabinoidowe CB1 i CB2. Poznanie struktur III-rzędowych białek tych receptorów umożliwiło skuteczne wykorzystanie metod obliczeniowych opartych na strukturze celu molekularnego, co z kolei przełożyło się na możliwość przesiewania dużych zbiorów związków – substancji leczniczych, ich metabolitów oraz związków pochodzenia naturalnego i związków podobnych. Ligandy receptorów kannabinoidowych są przedmiotem licznych badań, których celem jest potwierdzenie możliwości ich wykorzystania w leczeniu różnych schorzeń. Podjęcie przez Doktoranta próby wykorzystania różnych metod *in silico*, utworzenie na podstawie walidacji wieloetapowych procedur wirtualnego przesiewu,

aby uzyskać związki o jak najwyższym powinowactwie do receptorów CB1 i CB2, uważam za w pełni uzasadnione.

Podstawą rozprawy doktorskiej jest cykl spójnych tematycznie trzech prac naukowych, opublikowanych w latach 2020 – 2023, w recenzowanych czasopismach anglojęzycznych. Sumaryczny Impact Factor przedstawionego do oceny cyklu publikacji wynosi 17,866, co odpowiada 340 punktom MEiN. Wśród trzech publikacji jedna jest pracą przeglądową, dwie to prace oryginalne. Wymienione prace to:

1. Stasiulewicz A., Znajdek K., Grudzień M., Pawiński T., Sulkowska J.I. *A Guide to Targeting the Endocannabinoid System in Drug Design*. International of Molecular Sciences. 2020; 21(8):2778.
2. Stasiulewicz A., Lesniak A., Setny P., Bujalska-Zadrożny M., Sulkowska J.I. *Identification of CB1 Ligands among Drugs, Phytochemicals and Natural-Like Compounds: Virtual Screening and In Vitro Verification*. ACS Chemical Neuroscience. 2022; 13(20):2991-3007.
3. Stasiulewicz A., Lesniak A., Bujalska-Zadrożny M., Pawiński T., Sulkowska J.I. *Identification of Novel CB2 Ligands through Virtual Screening and In Vitro Evaluation*. Journal of Chemical Information and Modeling. 2023; DOI:10.1021/acs.jcim.2c01503.

We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, co stanowi warunek konieczny przy procedowaniu prac doktorskich. Załączone oświadczenia współautorów o udziale Doktoranta w powstawaniu publikacji potwierdzają Jego znaczący wkład w zaplanowanie, wykonanie badań, opis i analizę uzyskanych wyników oraz przygotowanie manuskryptów publikacji.

Układ pracy jest typowy dla publikacji będącej zbiorem prac własnych Autora. Praca składa się z sześciu podstawowych rozdziałów, w tym wstępu, celu pracy, komentarza do publikacji, podsumowania i wniosków, bibliografii, kopii prac i oświadczeń współautorów. Na początku opracowania Doktorant zamieścił spis publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, informacje o źródłach finansowania badań, dodatkowej aktywności naukowej, wykaz skrótów oraz streszczenia – w języku polskim i angielskim. Praca liczy 140 stron. W rozdziale *Wstęp* Autor opisał układ endokannabinoidowy (ECS), jego rolę w organizmie oraz znane ligandy receptorów kannabinoidowych (CBR). Interesującą częścią jest także opis struktury ECS i przemian biochemicznych zachodzących w tym układzie. Całość rozważań w tym rozdziale poparta została 132 pozycjami piśmiennictwa. Jest to dogłębna analiza,

zasługująca na podkreślenie i świadczy o bardzo dobrym zaznajomieniu się Kandydata z omawianą tematyką badawczą.

W kolejnym rozdziale – *Cel pracy*, Autor doprecyzował cel swoich badań oraz przedstawił jakie badania eksperymentalne zostaną przeprowadzone. Głównym celem badań była (i) identyfikacja substancji leczniczych lub ich metabolitów oddziałujących z receptorem CB1, (ii) identyfikacja ligandów receptora CB1 wśród związków pochodzenia naturalnego i pokrewnych związków syntetycznych, (iii) identyfikacja nowych ligandów receptora CB2. Do realizacji celów głównych zostały założone cele drugorzędowe - przegląd literatury związanej z tematem dysertacji oraz walidacja metod *in silico* i stworzenie procedury wirtualnego przesiewu do poszukiwania ligandów receptorów CB1 i CB2 w bibliotekach związków o różnej wielkości. Aby zrealizować założony cel pracy, Autor opracował efektywne procedury wirtualnego przesiewu z wykorzystaniem poznanych struktur III-rzędowych receptorów CB1 i CB2. W tym celu wykorzystał (i) dokowanie molekularne, (ii) szacowanie entalpii swobodnej wiązania białko-ligand metodą MM-GBSA (iii) predykcję pKi przy użyciu modeli QSAR. W zależności od wielkości bibliotek związków, dodatkowo Doktorant wykonał wstępny etap przesiewu farmakoforowego dla dużych bibliotek związków, natomiast przy małej liczbie dostępnych struktur użył dynamikę molekularną w celu wygenerowania większej liczby konformacji miejsca wiążącego.

W rozdziale *Komentarz do publikacji* Autor przedstawił co było celem każdej z prac włączonych do dysertacji oraz opisał jakie badania wykonał, a także wnioski wynikające z przeprowadzonych eksperymentów. W pracy przeglądowej, aby dobrze poznać możliwości modulacji receptorów kannabinoidowych, Doktorant dokonał rzetelnego, popartego 356 pozycjami cytowanego piśmiennictwa, przeglądu literatury na temat terapeutycznego potencjału białek układu endokannabinoidowego oraz możliwości wykorzystania ich celów molekularnych w projektowaniu leków i w farmakoterapii. Podkreślił także znaczenie receptorów kannabinoidowych typu 1 i 2 (CB1 i CB2) oraz zasadność projektowania i/lub poszukiwania nowych związków oddziałujących z tymi receptorami. Celem pierwszej pracy eksperymentalnej było poszukiwanie nowych ligandów receptora CB1 wśród substancji leczniczych, ich metabolitów, związków pochodzenia naturalnego i pokrewnych związków syntetycznych. Aby osiągnąć założony cel, Autor opracował i zwalidował wieloetapową procedurę przesiewu obliczeniowego, korzystając z różnych metod *in silico*. Godnym podkreślenia jest zakres wykonanych prac: 10 000 substancji leczniczych, ich metabolitów i związków pochodzenia naturalnego oraz 230 000 związków, w tym metabolitów i związków pochodzenia naturalnego oraz związków podobnych. W każdym przypadku Autor korzystał

z odpowiednich do wyznaczonego celu programów, wykorzystując właściwości fizykochemiczne badanych związków. Przeprowadzone badania umożliwiły wyłonienie potencjalnych agonistów i antagonistów/odwrotnych agonistów receptora CB1. Z grupy 240 000 związków, 45 związków zostało przebadanych *in vitro* i na tej podstawie Doktorant opisał 7 nowych ligandów receptora CB1, w tym trawoprostu, ginkgetyny i pięciu nowych ligandów z grupy związków zbliżonych do związków pochodzenia naturalnego. Celem drugiej pracy eksperymentalnej była identyfikacja nowych ligandów receptora CB2. W tym celu Autor wykorzystał także wieloetapową procedurę przesiewu obliczeniowego prawie siedmiu milionów dostępnych komercyjnie związków. W pierwszym etapie procedury *in silico* został zastosowany przesiew farmakoforowy, następnie dokowanie molekularne oraz szacowanie entalpii swobodnej wiązania przy użyciu odpowiednich do tego celu metod, a następnie wykorzystano właściwości fizyko-chemiczne i predykcję pKi potencjalnych ligandów przy pomocy modeli QSAR. Do badań *in vitro* wytypowano 16 związków, dla których wykonano test wypierania radioliganda. Efektem w/w badań jest zidentyfikowanie czterech nowych ligandów receptora CB2 - antagonistów tego receptora.

Kolejny rozdział, najistotniejszy dla oceniającego to *Podsumowanie i wnioski*, w którym Doktorant w sposób zwięzły i zrozumiały przedstawił wyniki swoich badań oraz odniósł się do danych z piśmiennictwa.

Po tym rozdziale Autor zamieścił trzy publikacje, jedną przeglądową i dwie eksperymentalne, w których opisano wszystkie przeprowadzone badania.

Założenia pracy zostały przygotowane prawidłowo, a odpowiedzi na pytania, przedstawione jako cele pracy, zostały zaprezentowane w postaci 10 wniosków. Wnioski sformułowane są poprawnie i wynikają z przeprowadzonej w pracy analizy oraz dyskusji. Dobór literatury w liczbie 141 pozycji, uwzględnia najnowsze piśmiennictwo i spełnia wymagania w tym zakresie. Przedstawiona dyskusja potwierdza znajomość i zrozumienie poruszanych zagadnień z zakresu nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Wykonane przez Doktoranta badania, ich omówienie i wnioski potwierdzają, umiejętność zaplanowania, samodzielnego prowadzenia badań naukowych i dobrej współpracy z innymi zespołami badawczymi, zawierają elementy nowości naukowej i wnoszą znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki farmaceutyczne. Są cenne dla farmaceutów, lekarzy, chemików, biologów oraz naukowców z dziedzin pokrewnych. W całości praca doktorska stanowi obraz bardzo dobrej pracy, która spełnia wymogi stawiane dla rozprawy doktorskiej, a drobne niedociągnięcia opracowania, w żaden sposób nie wpływają na jego wysoką ocenę.

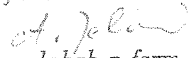
Podczas obrony pracy doktorskiej chciałabym przedyskutować, jakie inne parametry lub właściwości fizyko-chemiczne mogą być przydatne w badaniach *in silico*, na podstawie których można wnioskować o aktywności lub jej braku dla danego związku lub grupy związków. Czy potwierdzenie aktywności trawoprostu i ginkgetyny jako ligandów receptora CB1 stanowi podstawę do ich repozycjonowania w leczeniu innych schorzeń?

W podsumowaniu pragnę zwrócić uwagę na zasługującą na uznanie wysoką jakość przeprowadzonych badań. Doktorant miał wprawdzie możliwość realizacji badań w bardzo dobrym zespole badawczym, pod kierunkiem Pana dra hab. Tomasz Pawińskiego oraz Pani dr hab. Joanny Sułkowskiej, prof. UW, jednakże bez Jego zaangażowania, realizacja tak zaplanowanego zakresu badań byłaby niemożliwa. Na podkreślenie zasługuje także umiejętność współpracy Doktoranta z różnymi zespołami badawczymi oraz dodatkowa aktywność naukowa. Dorobek publikacyjny oprócz pracy doktorskiej to 4 publikacje, o współczynniku oddziaływania IF = 19,645 (450 pkt MEiN), co sumarycznie z pracami przedstawionymi jako osiągnięcie naukowe do uzyskania stopnia doktora daje IF = 37,511 (790 pkt MEiN). Pan mgr Adam Stasiulewicz był także kierownikiem dwóch grantów: (i) *Poszukiwanie ligandów receptorów CB1 i CB2 wśród substancji leczniczych, ich metabolitów i związków pochodzenia naturalnego*, Preludium 18 NCN, (ii) *Poszukiwanie i analiza oddziaływań substancji leczniczych z receptorem kannabinoidowym CB1*, Grant obliczeniowy, Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego UW oraz wykonawcą w trzech grantach: (i) *Papaino-podobna proteaza SARS-CoV-2: inhibicja wirusowego enzymu przetwarzającego i deubikwitynizującego – kompleksowe badanie in silico*, NCN; (ii) *Comprehensive analysis of knotted proteins*, EMBO Instalation Grant, European Molecular Biology Organisation; (iii) *Classification and free Energy landscape of entanglement proteins: knots, slipknots and lassos*, Ideas Plus II, MNiSW. Doktorant wyniki swoich badań prezentował na sześciu konferencjach międzynarodowych. Wszystkie wymienione powyżej osiągnięcia Doktoranta wskazują na Jego prawidłowy rozwój naukowy i stanowią bardzo dobry prognostyk do dalszej kariery naukowej.

### **Wniosek końcowy**

Rozprawa doktorska Pana mgra farm. Adama Stasiulewicza pt. *Poszukiwanie ligandów receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 wśród substancji leczniczych, związków pochodzenia naturalnego i związków syntetycznych* zawiera elementy nowości naukowej i przyczynia się do rozwoju dyscypliny nauki farmaceutycznej. Stanowi oryginalne rozwiązanie problemu poszukiwania nowych substancji o powinowactwie do receptorów kannabinoidowych. Oceniając pozytywnie, zarówno pod względem formalnym, jak

i merytorycznym pracę doktorską mgr farm. Adama Stasiulewicza mam zaszczyt zwrócić się do Pana Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych oraz do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pana mgr farm. Adama Stasiulewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, uwzględniając wysoki poziom przeprowadzonych badań, ich kompleksowe przedstawienie oraz opublikowanie wyników badań w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, w oddzielnym piśmie występuję z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej  
  
Prof. zw. dr hab. n. farm. Anna Jelińska