



Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Biofarmacji
ul. Chodźki 4a 20-093 Lublin

Lublin, dn. 05.02.2021

dr hab. n. farm. Anita Płazińska
Profesor uczelni
Zakład Biofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
e-mail: anita.plazinska@umlub.pl

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Zielińskiej

pt.: *Molekularna ocena mechanizmu działania amfoterycyny B i jej pochodnych w kontekście poszukiwania nowych leków przeciwgrzybiczych.*

wykonanej pod opieką naukową prof. dr hab. Tomasza Bączka

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Rady Nauk Farmaceutycznych z dnia 15.XII.2020 r, zgodnie z Uchwałą Rady Nauk Farmaceutycznych GUMed podjętą w dniu 08.XII.2020 r.

Metody obliczeniowe służące do badania struktury i konformacji biomolekuł, jak również zajmujące się analizą oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych mają ugruntowaną pozycję w dziedzinie nauk biologicznych, chemicznych oraz biochemicznych. Z uwagi na dużą złożoność badanych układów biologicznych oraz kompleksowość procesów w nich zachodzących, równoległe z badaniami skupionymi na konkretnych układach podejmowane są liczne starania mające na celu ulepszenie dokładności oraz wydajności dostępnych metodologii oraz towarzyszących im narzędzi obliczeniowych.

Recenzowana rozprawa doktorska, napisana przez Panią mgr inż. Joannę Zielińską, poświęcona jest ocenie mechanizmu działania amfoterycyny B z błoną biologiczną na poziomie molekularnym.

Przedstawiona do oceny rozprawa skonstruowana jest w formie kompilacji trzech artykułów opublikowanych w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się na liście filadelfijskiej. Do kolekcji artykułów dołączony jest wstęp, w którym



autorka przedstawiła wybrane zagadnienia bezpośrednio związane z tematyką przeprowadzonych badań a także skondensowany opis celów oraz rezultatów pracy.

Podstawą recenzowanej pracy są trzy oryginalne artykuły naukowe opublikowane renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej. Artykuły o łącznym IF wynoszącym 13,646 opublikowane zostały w: *Langmuir* (IF = 4.15, punkty MEiN = 100), *Scientific Reports* (IF = 4.576, punkty MEiN = 140) oraz *Molecular Pharmaceutics* (IF = 4.92, punkty MEiN = 140).

Autorka określiła udział w realizacji wszystkich prac w sposób opisowy. Z opisu tego wynika, że jej rola w realizacji wszystkich prac będących podstawą doktoratu dotyczyła badań teoretycznych, w szczególności przeprowadzenia symulacji metodą dynamiki molekularnej, analizowania otrzymanych wyników, a także pisania manuskryptów publikacji oraz przeprowadzania analizy literatury. Jednakże, oświadczenie doktorantki, dotyczące własnego wkładu w przygotowanie ww. prac, napisane jest zbyt ogólnie i nie wskazuje jasno zadań zrealizowanych przez doktorantkę. Z uwagi na to, że w każdej z wymienionych publikacji badania teoretyczne przeprowadzały co najmniej 2 osoby, wskazane byłoby zamieścić dokładny opis samodzielnie przeprowadzonych badań, uwzględniających np. rodzaj symulacji lub typ analiz otrzymanych wyników.

Tematem wiążącym wszystkie prace jest zastosowanie wybranych metod obliczeniowych w celu badania mechanizmu oddziaływania amfoterycyny B (AmB) z błoną biologiczną. Cel zdefiniowany we wstępie przez Autorkę rozprawy dotyczy trzech głównych aspektów. Pierwszy z nich jest związany z problematyką mechanizmu wnikania cząsteczki amfoterycyny B do błon lipidowych oraz oddziaływaniem leku z lipidami błony na poziomie molekularnym. Drugi cel dotyczy wyjaśnienia mechanizmu oraz zbadania kinetyki procesu dimeryzacji cząsteczek amfoterycyny B w środowisku wodnym oraz określenia wpływu dimeryzacji na dalszy proces oligomeryzacji leku. Trzeci cel dotyczy zbadania wpływu składu błony biologicznej na wnikanie w głąb błony oraz na oligomeryzację AmB w błonie.

Dołączony do zestawu publikacji wstęp jest dość zwięzły lecz pokazuje, że Autorka rozprawy doskonale porusza się w tematyce prowadzonych przez siebie badań. Treść wstępu podzielono kilka sekcji, dotyczących m.in. charakterystyki i sposobu działania AmB oraz jej pochodnych oraz problematyki symulowania dużych układów biologicznych. Całość każdej z tych sekcji stanowi dość spójny ciąg, w którym Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia istotne dla opisanych później badań. Następnie precyzowane są cele badawcze a na końcu prezentowane są (w sposób skondensowany w porównaniu do oryginalnych artykułów naukowych) wyniki uzyskane w toku badań. Prezentację wyników podzielono w analogii do artykułów w których się one oryginalnie ukazały. Zakończenie wstępu stanowią wnioski będące



podsumowaniem najważniejszych wyników uzyskanych w toku badań opisanych w niniejszej rozprawie.

Poniżej omawiam badania i ich wyniki, zawarte w pracach będących podstawą rozprawy. Omówienie to jest dość pobieżnie z uwagi m.in. na to, że prace wchodzące w skład rozprawy były już recenzowane. Dodatkowo, z racji faktu, iż niektóre prace dotyczą badań multidyscyplinarnych, skupiam się na elementach dotyczących bezpośrednio recenzowanej rozprawy.

- W pracy **P1** [Neumann, A., *et. al.*, *Langmuir*, 2016, 32, 3452-3461] przeprowadzone symulacje metodą dynamiki molekularnej oraz wyznaczone profile swobodnej energii dla wnikania amfoterycyny B (AmB) w głąb błony metodami *adaptive biasing force* (ABF) i *umbrella sampling* (US) pozwoliły na stwierdzenie, że proces wnikania AmB jest termodynamicznie korzystny dla każdego badanego rodzaju błony komórkowej. Występowanie steroli w błonie wpływa na sposób orientowania monomerów AmB w błonie: monomery AmB lokują się w jednej z dwóch warstw błony i ustawiają się prostopadle do powierzchni błony. Natomiast, w przypadku braku steroli w błonie, obserwowane było wnikanie monomerów AmB w głębsze warstwy błony oraz ich przypadkowy sposób ułożenia względem powierzchni błony.
- Praca **P2** [Zielinska, J. *et. al.*, *Scientific Reports*, 2016: 19109] dotyczy badania mechanizmu procesu dimeryzacji cząsteczek AmB w środowisku wodnym z uwzględnieniem orientacji równoległej i antyrównoległej. Częstość występowania obu typów dimerów jest niemalże identyczna. Równocześnie dimery o orientacji równoległej przechodzić mogą spontanicznie w orientację antyrównoległą, i odwrotnie. Możliwość zmiany orientacji zanika już u tetramerów.
- Praca **P3** (Grela, E. *et. al.*, *Molecular Pharmaceutics*, 2018) stanowi wynik interdyscyplinarnego podejścia do zagadnienia wnikania cząsteczek AmB w głąb błon biologicznych różniących się składem chemicznym, jak również organizacji AmB w dimery, tetramery i oligomery. Badania eksperymentalne (pomiar czasu życia fluorescencji) oraz teoretyczne (dynamika molekularna) wykazały, że di-, tri- oraz tetramery przyjmują szeroki możliwy zakres orientacji w błonie. Istotną rolę we wnikaniu cząsteczki AmB w głąb błony pełnią cząsteczki steroli (ułatwiają wnikanie oligomerów AmB). Ponadto, obecność steroli warunkuje zmiany organizacji oligomerów AmB w błonie. Obserwowano również tworzenie się na powierzchni błony POPC oligomerów złożonych z więcej niż 4 cząsteczek AmB, co tłumaczyć może hipotezę tworzenia się na



powierzchni błony tzw. „gąbek”, które poprzez oddziaływanie ze sterolami zaburzają strukturę błony komórkowej i w konsekwencji doprowadzają do śmierci komórki.

Wyniki zawarte w ww. pracach oceniam jako wartościowe i wnoszące istotny wkład w dziedzinę modelowania biomolekularnego. Warto podkreślić, iż cele badawcze deklarowane przez Doktorantkę zostały w pełni zrealizowane.

Niezależnie od faktu, iż prace stanowiące rozprawę doktorską oraz wyniki w nich zawarte były już uprzednio recenzowane, szczegółowa analiza rozprawy, wliczając w to dołączony wstęp ujawniła pewne niedociągnięcia, które z obowiązku recenzenta przedstawiam w formie następujących uwag:

1. Tytuł rozprawy nie odzwierciedla w pełni jej zawartości. W tytule rozprawy mowa jest nie tylko o amfoterycynie B lecz również o jej pochodnych. Ponadto, tytuł rozprawy sugeruje również przeprowadzenie analizy z uwzględnieniem modyfikacji struktury amfoterycyny B w kontekście poszukiwania nowych leków przeciwgrzybiczych. Powyższy aspekt nie był poruszany w żadnej z prac ujętych w cyklu.
2. W **sekcji 1.4**, dotyczącej mechanizmu działania AmB pobieżnie opisany został proces tworzenia kanałów przez cząsteczki AmB. W pracy opisano jedynie modele zaproponowane w latach 70. XX w., natomiast zabrakło wzmianki o nowszych modelach, odpowiadających różnym mechanizmom zaburzenia struktury błony np. model Cohena, czy model Hartsela. Ponadto, Autorka nie odniosła się we wstępie do wyników badań teoretycznych, przeprowadzonych przez inne zespoły naukowe, dotyczących organizacji AmB w błonie biologicznej np. Bagiński M., Resat H., Borowski E. 2002. *Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels*. Biochim. Biophys. Acta 1567:63-78 83. Bagiński M., Resat H., McCammon J.A. 1997. *Molecular properties of amphotericin B membrane channel: A molecular dynamics simulations*. Mol. Pharmacol. 52:560-570. Sternal K, Czub J, Baginski M. *Molecular aspects of the interaction between amphotericin B and a phospholipid bilayer: molecular dynamics studies*. J Mol Model. 2004 Jun;10(3):223-32.
3. We wstępie zabrakło również informacji na temat: (i) natury oddziaływania pomiędzy AmB a błoną lipidową, sterolem, cholesterolem czy ergosterolem na poziomie molekularnym oraz (ii) ich wpływu na stabilność oligomerów AmB w błonie. Z uwagi na tematykę badań warto byłoby omówić najważniejsze typy oddziaływań odpowiedzialnych za stabilizację m.in. półpora oraz odpowiedzialnych za przemieszczanie się (tzw. *trafficking*) cząsteczki antybiotyku w błonie, jak również za proces destrukcji kanału.



Podsumowując, obecny stan wiedzy na temat wnikania, umiejscowienia oraz tworzenia kanałów przez AmB i ich trwałości przedstawiony został pobieżnie.

4. **Sekcja 2.3** w sposób zwięzły i poprawny opisuje formę funkcyjną klasycznych pól siłowych, choć wybór literatury cytowanej w tym kontekście wygląda na dość przypadkowy.
5. **Sekcja 2.5**, poświęcona w zamierzeniu termodynamice symulowanych układów, ogranicza się jedynie do problematyki termostatów. Zabrakło opisu metod służących do obliczeń energii swobodnej, co wydaje się istotne z uwagi na naturę badań przeprowadzonych w pracach cyklu.

Zaznaczam, że ww. uwagi dotyczą głównie wstępu mającego wprowadzić czytelnika w tematykę pracy przedstawionej w cyklu trzech publikacji i w dużej mierze są niezależne od wyników oraz dyskusji zawartych w załączonych artykułach.

Abstrahując od wstępu, a odnosząc się do wyników zawartych w publikacjach stwierdzam poprawność zastosowanej metodologii, staranną i skrupulatną analizę wyników jak i ich interpretację pod kątem zjawisk zachodzących w skali molekularnej i kontrybucji poszczególnych sił międzyatomowych.

Oprócz dyskutowanej powyżej rozprawy doktorskiej oraz wyników w niej zawartych, należy także docenić dużą aktywność Doktorantki, na którą składa się 10 artykułów oryginalnych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej. Łączny *Impact Factor* wynosi 40,149. Zaznaczyć należy, iż w roku 2021 ukazała się kolejna publikacja Doktorantki dotycząca amfoterycyny B. Publikacja pt.: „Self-assembly, stability and conductance of amphotericin B channels: bridging the gap between structure and function” opublikowana została w czasopiśmie *Nanoscale* posiadającym wysoki IF = 6,895 [Nanoscale, 2021 Feb 5. doi: 10.1039/d0nr07707k.]. Publikacja powyższa nie jest przedmiotem oficjalnej wersji doktoratu opartego na trzech publikacjach, jednakże stanowi kontynuację badań dotyczących wyjaśnienia mechanizmu organizacji amfoterycyny B w błonie, stanowiących jeden z kluczowych czynników odpowiedzialnych za toksyczne efekty uboczne antybiotyku.

Podkreślić warto aktywność Doktorantki na innych polach związanych z nauką. W szczególności chodzi tu o aktywność konferencyjną oraz zaangażowanie w realizowanie projektów badawczych (projekt pt. „Mechanizm molekularny toksyczności antybiotyku przeciwgrzybiczego amfoterycyny B”, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu OPUS(2015/19/B/NZ7/02159 oraz Grant dla Młodych Naukowców 01-0314/08/506).



Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Biofarmacji
ul. Chodźki 4a 20-093 Lublin

Oceniając wysoko poziom badań naukowych będących podstawą recenzowanej rozprawy, w podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona przez Doktorantkę praca doktorska spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 r (wraz z późniejszymi zmianami). Dlatego też wnioskuję do Rady Wydziału Farmaceutycznego GUMed o dopuszczenie mgr inż. Joanny Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę szereg czynników pozytywnie wyróżniających pracę naukową oraz aktywność Doktorantki, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Uzasadniam to przede wszystkim ponadprzeciętnym poziomem naukowym prezentowanym w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej.

Z poważaniem,

dr hab. n. farm. Anita Płazińska, profesor UM w Lublinie

Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

AMITA PŁAZIŃSKA

Imię i nazwisko recenzenta

dr hab. n. farm., prof. uczelni UM w Lublinie

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko

doktoranta: JOANNA ZIELIŃSKA

Tytuł pracy doktorskiej:

Molekularne ocena mechanizmu działania
amfoterycyny B i jej pochodnych w kontekście
poszukiwania nowych leków przeciwpłytkowych.

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Decyzję o wyróżnieniu pracy doktorskiej uzasadniłem ponadprzeciętnym poziomem naukowym prezentowanym w publikacjach, stencjonowanych w pracy doktorskiej.

Rozprawa sformułowana jest w formie kompilacji 3 artykułów opublikowanych w: Langmuir (IF=4.15), Scientific Reports (IF=4.516) oraz Molecular Pharmaceutics (IF=4.92). Łączny współczynnik oddziaływania wynosi 13,646.

Ponadto, w publikacji pt.: "Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail" doktorantka jest pierwszym współautorem.

Biuro podjęło uwzględnienie wysoki poziom prezentowanych badań opublikowanych w renomowanych czasopiśmie naukowych oraz spełnienie przez Doktorantkę wymogów uchwalonych przez Radę NF z ONK w dniu 16.08.2014 r., dotyczących zasady wyróżnienia pracy doktorskiej wniosem o wyróżnienie w pracy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Zelińskiej.

Z poważaniem,

dr hab. Aneta Mazińska