



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

**Dr hab. Rafał Kurczab
Zakład Chemii Leków
Instytut Farmakologii im. J. Maja
Polska Akademia Nauk**

Kraków, 8.02.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej
pt. **„Molekularna ocena mechanizmu działania amfoterycyny B i jej pochodnych
w kontekście poszukiwania nowych leków przeciwgrzybiczych”**
wykonanej pod kierunkiem Promotora Pana prof. dr hab. Tomasza Bączka
w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Przedłożona do oceny rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych dotyczy kluczowych zagadnień związanych z poznaniem pierwszych etapów mechanizmu działania i selektywności amfoterycyny B (AmB) na poziomie molekularnym – jednego z kluczowych leków stosowanych w leczeniu grzybic układowych. Badania przeprowadzono głównie z użyciem metod symulacji dynamiką molekularną, wspierając się w wybranych aspektach wynikami eksperymentalnymi. AmB jest antybiotykiem polienowym obecnym na rynku farmaceutycznym od ponad sześciu dekad, ale nadal mechanizm jego działania jest słabo poznany. Lek ten posiada dużo pożądanych właściwości, jak zdolność przenikania bariery krew-mózg, brak indukowania oporności, bardzo szerokie spektrum działania (nie tylko grzyby, ale też niektóre gatunki bakterii i pierwotniaków), ale z drugiej strony indukuje wiele niepożądanych interakcji (uszkodzenie/upośledzenie czynności nerek i/lub wątroby, głęboka hipokaliemia i hipomagnezemia). Wiąże się to z faktem, że lek ten łączy się również ze sterolami innych komórek, a nie tylko należącymi do ściany komórkowej grzyba.

Problem grzybic układowych jest nadal aktualny, na co wskazuje rosnąca ilość zakażeń. Przyczyn jest wiele – jedne powiązane są przede wszystkim z rosnącą liczbą osób o obniżonej odporności lub dysfunkcjami w działaniu układu immunologicznego. Natomiast drugie, paradoksalnie, są wynikiem rozwoju medycyny – wprowadzenie do leczenia większej ilości antybiotyków o szerokim spektrum działania powoduje, że coraz częściej można spotkać się ze zjawiskiem powstawania oporności wielolekowej (MDR) u grzybów. Szacuje się, że różnego



rodzaju grzybice układowe są powodem śmierci ok. 50% pacjentów chorych na AIDS i ok. 70% zakażonych pacjentów z powikłaniami pooperacyjnymi.

Obecnie, coraz większym i poważniejszym wsparciem badań biologicznych, chemicznych, farmakologicznych, jak i medycznych są metody dynamiki molekularnej (MD), tj. symulacji zachowania dużych układów molekularnych w bardzo małej skali czasowej. Sprowadzenie badanego problemu (właściwości makroskopowej) do skali atomowej (ligandów, makromolekuł) oraz zbioru praw pozwala na badanie zachowania i ewolucji takiego układu, i wyciąganie wniosków na temat postawionej hipotezy badawczej. Niewątpliwie, ostatnia dekada przyniosła znaczny przełom w wykorzystaniu metod MD (zakresie wielkości badanych układów, skali czasowej, algorytmów analizy trajektorii) głównie za sprawą pojawienia się implementacji algorytmów MD dla kart graficznych z procesorami GPU (CUDA). Ta rewolucja, w zależności od implementacji (Desmond, NAMD) algorytmu MD pozwala na skrócenie czasu obliczeń nawet 10-krotnie i powoduje, że badacz nie jest uzależniony od dostępności zasobów superkomputerów, ponieważ obliczenia można wykonać na stacji roboczej zaopatrzonej w kartę graficzną.

W kontekście powyższych faktów, badania Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej dotyczą aktualnych problemów i dobrze wpisują się w obecne trendy działań na rzecz efektywnego leczenia grzybic układowych. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy są niewątpliwie nowatorskie i mają duże znaczenie praktyczne. Uważam podjęcie przez Kandydatkę niniejszego tematu badawczego, pod kierunkiem doświadczonych Promotora, za niezwykle ważne z punktu widzenia nauk farmaceutycznych i medycznych oraz w pełni uzasadnione.

Ocena strony formalnej rozprawy

Praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych znajdujących się na liście A wykazu czasopism Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Podkreślić należy, iż średni współczynnik oddziaływania tych prac jest bardzo wysoki (4,1623), a Kandydatka w jednej z nich jest pierwszym autorem. Do publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej dołączony jest przewodnik liczący 39 stron, zawierający logicznie ułożonych pięć rozdziałów (tj. 1. Działanie amfoterycyny B; 2. Dynamika molekularna; 3. Cel pracy; 4. Wyniki oraz 5. Wnioski) wyczerpująco wprowadzające



w tematykę rozprawy doktorskiej. Na szczególne wyróżnienie zasługuje wyjątkowa staranność w przygotowaniu dysertacji, poprawny język oraz ilustracja dobrze przygotowanymi graficznie 10 rycinami. Cele pracy zostały sformułowane prawidłowo i jasno. Zarówno cele pracy oraz wyniki zostały bardzo dobrze powiązane z wnioskami. Spis bibliografii obejmuje odpowiednio dobrane 46 pozycje polskie i anglojęzyczne, w tym 29 opublikowanych w latach 2000–2020 oraz 17, które ukazały się przed 2000 rokiem.

Mam drobne uwagi dotyczące: str. 28: „*a poliol na kontakt z warstwą...*” w zdaniu występuje literówka; str. 29: oznaczenie „ $\Delta G^{\circ}d$ ” – nie do końca wiadomo co oznacza „d”, nie ma wyjaśnienia w tekście ani w cytowanej publikacji (Sci. Rep); str. 29: „*...dwa minima energetyczne – 6,5 oraz 4,5 ...*” brakuje znaków minus przed wartościami energii. Dodatkowo, obrazki użyte w dysertacji do wizualizacji wyników i ich dyskusji powinny być wg mojej oceny znacznie większe, szczególnie te na których zobrazowane są istotne aspekty związane z omawianymi zależnościami molekularnymi (Rysunek 8–10). Wymienione uwagi dotyczą jedynie głównie strony edytorskiej pracy i w żaden sposób nie wpływają na jej aspekty merytoryczne pracy.

Ocena merytoryczna rozprawy

Celem badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej była analiza mechanizmu działania przeciwgrzybiczego i selektywności amfoterycyny B przy pomocy symulacji komputerowych metodami dynamiki molekularnej. Cele badawcze zostały przez Doktorantkę podzielone na trzy cele cząstkowe, które porządkują plan badań, a także ułatwiają dalszą dyskusję i spinanie wyników. Do każdego z tych celów odnosi się jedna publikacja Doktorantki. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż wyniki otrzymane metodami teoretycznymi zostały w większości przypadków odniesione do danych eksperymentalnych, co istotnie uwiarygadnia dyskusję i wnioski.

Pierwszym podjętym przez Doktorantkę celem było zbadanie mechanizmu wnikania amfoterycyny B do wnętrza błon lipidowych. W pierwszym etapie sprawdzono wpływ rodzaju błony komórkowej na proces wnikania cząsteczki AmB do trzech rodzajów błony komórkowej – generalnie, była to kombinacja DMPC z 30 mol % cholesterolu/ergosterolu oraz bez dodatku steroli. Wykonane symulacje MD pokazały, że wnikanie amfoterycyny B do wnętrza błony jest procesem korzystnym termodynamicznie (spontanicznym), niezależnie od



rodzaju błony (wyznaczona bariera wejścia jest niska – ok. 1 kcal/mol). Ciekawym spostrzeżeniem jest preferencja modu wiązania AmB w błonie z i bez dodatku steroli. W przypadku, gdy błona zawiera dodatek steroli cząsteczka amfoterycyny B wnika głębiej do wnętrza błony (nawet do głębokości drugiego listka), niż ma to miejsce w przypadku błony bez dodatku steroli. Kolejnym interesującym aspektem była analiza preferencji AmB do orientowania się wewnątrz błony. Analiza profilu energii swobodnej dla kąta nachylenia pomiędzy normalną do płaszczyzny błony a osią główną AmB pokazała, że bez względu na rodzaj błony najbardziej korzystna jest orientacja pionowa cząsteczki leku, przy czym w przypadku błon bez dodatku steroli dystrybucja kąta nachylenia jest dużo bardziej rozmyta (bardziej przypadkowa). Przedstawiona w pracy P1. analiza modu wiązania AmB wewnątrz błony wskazuje na oddziaływania hydrofobowe, jako główny czynnik napędowy stabilizacji kompleksu. Badania zaplanowane i wykonane w pracy P1. zostały bardzo dobrze, a analiza i dyskusja wyników przeprowadzona w wyczerpujący sposób. Pomimo to, nasuwają się pewne wątpliwości: i) niezbyt jasne są przesłanki na podstawie których wybrano do utworzenia modelu błony wyłącznie jeden lipid - DMPC. Właściwości błony komórkowej są między innymi determinowane przez budujące ją lipidy, stąd wydaje się, że ciekawym byłoby przeprowadzenie dyskusji mechanizmu oddziaływania cząsteczki AmB z innymi modelami błon. Za takim podejściem przemawia „różna budowa polarnej głowy” cząsteczek tłuszczu – np. cząsteczki POPE, POPS mają pierwszorzędowe grupy aminowe, które w środowisku pH fizjologicznego będą dodatkowo sprotonowane ($-NH_3^+$), w przeciwieństwie do DMPC, która posiada w tym miejscu czwartorzędową grupę aminową ($+NR_4-$). Doktorantka w pracy P1. zauważa, że na wstępnym etapie wnikania AmB do błony dochodzić może do słabych oddziaływań (mostki solne) między grupami funkcyjnymi „polarnej głowy lipidu” (fosforanową i czwartorzędową grupę aminową) a mykozaminą. Można sobie wyobrazić, że z tego rodzaju „zestawu” grup funkcyjnych może powstać różny zbiór komplementarnych oddziaływań, np.: $AmB-NH_3^+ \cdots OPO(O-R)_2-DMPC$ lub $AmB-COO^- \cdots +NR_3-DMPC$. O ile w pierwszym przypadku można mówić o mostku solnym (a właściwie o podwójnie wspomaganym ładunkowo wiązaniu wodorowym), to w drugim przypadku już nie (oddziaływanie elektrostatyczne, bez komponentu wiązania wodorowego). Mostki solne uznawane są za najsilniejsze oddziaływania międzycząsteczkowe znane w chemii, stąd w tym kontekście nie jasne jest odniesie w pracy P1. (str. 3455) „DMPC form salt bridges with the



ammonium and carboxyl groups of AmB, respectively. This relatively weak interaction" do którego rodzaju oddziaływania odnosi się Doktorantka. Wracając do uzasadnienia użycia innych lipidów w konstrukcji błony, POPE zamiast czwartorzędowej grupy aminowej posiada pierwszorzędową, co oznacza że będzie tworzył z AmB-COO⁻ mostki solne, znacznie mocniejsze oddziaływania, niż w przypadku ⁺NR₃-DMPC.

ii) Ostatnia wątpliwość dotyczy użycia 30 mol % zawartości steroli. Co prawda w dysertacji znajduje się stwierdzenie, że taki poziom stężenia modeluje właściwości błon ludzkich oraz grzybowych, ale powinno to być poparte odniesieniami do odpowiedniej literatury. W świetle otrzymanych wyników, ciekawym wydaje się zbadanie (jako kolejnego wymiaru) wpływu różnych poziomów stężenia steroli w błonach na mechanizm wnikania AmB do błony.

Drugim celem podjętym przez Doktorantkę w pracy było zbadanie procesu dimeryzacji cząsteczek amfoterycyny B w środowisku wodnym (praca P2.) – sam proces asocjacji cząsteczek AmB jest łączony z działaniem toksycznym tego leku. Obliczenia wykonane dynamiką molekularną dostarczyły bardzo ciekawych wyników nt. kolejnych aspektów działania AmB na błonę komórkową. Doktorantka wykazała, że cząsteczki leku bardzo szybko ulegają dimeryzacji (10% cząsteczek występuje w formie dimerów przy stężeniu 0,41 μM), proces dimeryzacji jest kontrolowany dyfuzją. Profil energii swobodnej wskazuje na możliwość powstawania dwóch typów dimerów (tj. ułożenie równoległe i antyrównoległe cząsteczek amfoterycyny B) w identycznych proporcjach, oraz co ciekawe, zmiana konformacji na przeciwną zachodzi szybko – 200 ns, stała szybkości 5·10⁶ s⁻¹. Wykazano również, że proces dimeryzacji napędzany jest hydrofobowo (oceniony za pomocą parametru SASA) i w tym świetle oba typy dimerów powstają z identycznym prawdopodobieństwem (brak jest wyraźnej tendencji). Na podkreślenie zasługuje również zestawienie wyników obliczeń MD dla procesu dimeryzacji z danymi eksperymentalnymi pochodzącymi z widm dichroizmu kołowego (zapożyczone z pracy Starzyk et al. z 2014 roku). Najważniejszą konkluzją wynikającą z tej części badawczej pracy jest powiązanie toksyczności amfoterycyny B z tworzeniem różnych form oligomerycznych, które powstają już przy stężeniach leku dużo niższy niż terapeutyczne. Te dane mają wymiar praktyczny i w mojej ocenie mogą się przyczynić do opracowania bezpieczniejszych i skutecznych leków przeciwgrzybiczych nowej generacji.



Kontynuacja badań nad rolą oligomerów amfoterycyny B były przedmiotem badań przedstawionych w pracy P3., w której metodami teoretycznymi (dynamika molekularna) i eksperymentalnymi (spektroskopia fluorescencyjna) zbadano właściwości oligomerów AmB w obecności wybranych modelowych błon lipidowych (DPPC, DMPC oraz POPC). Wyniki badań dostarczyły kilku niezwykle ważnych informacji nt. mechanizmu działania amfoterycyny B. Po pierwsze, obecność steroli, a nie rodzaju lipidów w składzie błony determinuje przenikanie małym oligomerom do wnętrza błony. Po drugie, oligomery wewnątrz błony orientują się prostopadle do jej płaszczyzny, co może mieć istotne znaczenie z punktu widzenia tworzenia porów transmembranowych pozwalających na wypływ jonów.

Należy również podkreślić, że badania przedstawione do dysertacji Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej były kontynuowane, czego wynikiem jest pojawienie się (niestety już po zgłoszeniu pracy doktorskiej do postępowania) kolejnej publikacji doktorantki w znakomitym czasopiśmie *Nanoscale* (IF = 6,895; MNiSW = 140 pkt). W pracy Doktorantka (autor główny) przedstawia model prawdopodobnej struktury kanału transbłonowego, łącząc wszystkie dotychczasowe wyniki i hipotezy. Wyniki cyklu prac P1–3 oraz opublikowanej poza cyklem, stanowią bardzo istotny wkład Doktorantki w wiedzę, oraz trendy rozwoju nauk farmaceutycznych. Otrzymane wyniki, pozwalają uczynić kolejne kroki w stronę optymalizacji amfoterycyny B lub poszukiwania strukturalnie nowych związków o porządnym profilu farmakologicznym. Warsztat badawczy wypracowany przez Doktorantkę przy realizacji niniejszej pracy stanowi doskonały punkt do dalszego rozwoju naukowego. Na podkreślenie zasługuje umiejętność współpracy Doktorantki z różnymi specjalistami, których wkład w wykonanie badań eksperymentalnych w przedstawionym dorobku jest bardzo ważny i uwiarygadnia otrzymane wyniki z obliczeń teoretycznych.

Oceniam pozytywnie zakres prac badawczych zaprezentowanych przez Kandydatkę w niniejszej dysertacji, ze względu na ich charakter nie tylko poznawczy, ale również praktyczny. Wyniki badań zakończone słusznymi wnioskami, świadczącymi o rozwojowym charakterze obserwacji, kompetencjach Kandydatki oraz umiejętności rozwiązywania trudnych problemów badawczych, dostarczają cennych informacji i wskazówek do prowadzenia dalszych badań, które mogą przyczynić się do optymalizacji struktury AmB i/lub całkowicie nowych struktur leków przeciwwgrzybiczych.

Podsumowanie

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



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

Stwierdzam, że wyniki pracy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej są bardzo wartościowe merytorycznie, zawierają niewątpliwie element nowatorstwa i stanowią rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego, a całość opracowania wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w reprezentowanej dziedzinie naukowej. Uważam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora i wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej pt. „Molekularna ocena mechanizmu działania amfoterycyny B i jej pochodnych w kontekście poszukiwania nowych leków przeciwgrzybiczych” wykonanej pod kierunkiem Promotora Pana prof. dr hab. Tomasza Bączka w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego ze względu na rangę podjętej tematyki, nowatorski charakter prowadzonych badań, kompetencje Kandydatki, umiejętność prowadzenia dyskusji i formułowania wniosków oraz znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju nauki i praktyki. Oczywiście, Kandydatka spełnia warunek formalny kwalifikujący ją do wyróżnienia pracy – sumaryczny IF > 12, podczas gdy minimalny wymagany jest co najmniej równy 3.



Rafał Kurczab

Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

Rafał Kurczab

Imię i nazwisko recenzenta

dr hab. / adiunkt

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko

doktoranta: mgr inż. Joanna Zielińska

Tytuł pracy doktorskiej:

Molekularna ocena mechanizmu działania
amfoterycyny B i jej pochodnych w kontekście poszukiwania
nowych leków przeciwgrzybiczych

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

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

Uzasadnienie:

W mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Zielińskiej spełnia wymogi formalne (sumaryczny IF prac wchodzących w skład rozprawy ≥ 3 , doktorantka legitymuje się donobkiem o sumarycznym IF > 12), oraz merytorycznie (tj. wysoko oceniam wyniki i wkład w rozwój dziedziny nauk farmaceutycznych prezentowanych przez Doktorantkę).

Proszę jeszcze nadmienić, iż Doktorantka posiada bardzo dobry (nowy) ponadprzeciętny donobek naukowy - jej publikacje to 10 artk. naukowych w czasop. zagranicznych oraz 3 streszczenia zjezdowe. Sumarycznie Pani mgr inż. Joanna Zielińska legitymuje się ≥ 400 pkt MNiSW, oraz wsq. H (wg. SCOPUS, dostęp dn. 8.07.2021) na poziomie 5.

Rafał Kurczab