



## Akademia WSB

dr hab. Aleksander Dawid prof. AWSB

Katedra Transportu i Informatyki

Ul. Cieplaka 1c, 41-300 Dąbrowa Górnicza

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Pabiszczaka  
pod tytułem “Napełnianie bioagregatów fosfolipidowych substancjami polarnymi i  
niepolarnymi – symulacje komputerowe.”**

Rozprawa doktorska mgr Mateusza Pabiszczaka dotyczy istotnego problemu medycznego związanego z transportem leków wewnątrz organizmu na poziomie molekularnym. Transport tego typu wymaga nośników o rozmiarach nanometrów zdolnych do transportowania cząsteczek leku precyzyjnie w miejsce występowania choroby. Autor wskazuje jako nośnik tego typu na lipoproteinę o dużej gęstości (HDL) a właściwie jej odmianę nascent HDL (nHDL), która nie zawiera estrów cholesterolu w swoim wnętrzu. Motywując swój wybór małymi rozmiarami, odpowiednimi właściwościami powierzchniowymi, długim czasem krążenia, biokompatybilnością, biodegradowalnością, niską stymulacją immunologiczną oraz uczestnictwem tego bioagregatu w procesie odwróconego transportu cholesterolu. Badania przeprowadzone w tej pracy koncentrują się na ładowaniu obcych kompleksów molekularnych lub atomów do wnętrza nHDL.

Autor, jako metodę badań wybrał symulacje komputerowe. Swój wybór motywując wglądem do dynamiki atomów i molekuł, która z kolei umożliwia ocenę zjawisk fizycznych zachodzących w procesie napełniania lipoprotein nHDL substancjami polarnymi i niepolarnymi. Ta metoda badawcza pozwala na wielokrotne powtarzanie eksperymentu w zmienionych symulowanych warunkach fizyko-chemicznych. Kolejnym ważnym argumentem przy wyborze symulacji komputerowej było ograniczenie kosztów badań eksperymentalnych.

Głównym celem tej pracy jest badanie napełniania bioagregatu nHDL molekułami polarnymi wody i atomami niepolarnymi argonu przy użyciu nanorurki węglowej (CNT).

Realizacja tego głównego celu wymagała od autora także zbadania stabilności struktur HDL i nHDL oraz stabilności układu w procesie nanoidentacji nanorurką węglową.

Cele badawcze, których podjął się w tej pracy autor wpisują się jak najbardziej w najnowsze trendy obserwowane w naukach fizycznych, chemicznych i medycznych. Pan magister Mateusz Pabiszczak jest współautorem siedmiu prac opublikowanych w czasopismach indeksowanych w bazie Web of Science. Zagadnienia opisane w pięciu z tych prac dotyczą bezpośrednio tematu tej rozprawy doktorskiej. Tekst rozprawy doktorskiej podzielony jest na cztery zasadnicze części.

W pierwszej części opisane są kompleksy lipoproteinowe. Autor po kolei przedstawia w tym rozdziale budulec z którego składają się lipoproteiny. Znajdziemy tutaj wiele informacji o budowie lipidów oraz ich roli w organizmie. Dalej opisane są fosfolipidy i cholesterol jako lipidy wchodzące w skład błon komórkowych. Autor w tej części wyjaśnia sprawę rozpuszczalności lipoprotein składających się z silnie hydrofobowych estrów cholesterolu oraz triacylogliceroli w rdzeniu, otoczonych hydrofilową powłoką składającą się z wolnych cholesteroli i apoprotein. W dalszej części tego podrozdziału znajdziemy informacje na temat podziału lipoprotein osocza. Autor w następnym podrozdziale opisuje lipoproteinę o największej gęstości – biomolekułę HDL, która zyskała szczególne znaczenie w medycynie jako wskaźnik ryzyka wystąpienia miażdżycy w naczyniach krwionośnych. Z tego opisu dowiadujemy się o składzie, typach i metabolizmie biomelekuł HDL.

Kolejny rozdział dysertacji doktorskiej opisuje technikę symulacji układów molekularnych, zwaną Dynamiką Molekularną. We wstępie autor przedstawia podział symulacji komputerowych układów molekularnych na stochastyczne i deterministyczne, krótko je charakteryzując. Metodę dynamiki molekularnej prawidłowo przyporządkowuje do metod deterministycznych. Pod koniec wstępu możemy zapoznać się z najprostszym-bezpośrednim algorytmem na rozwiązywanie równań ruchu Newtona. Z zaprezentowanego matematycznego zapisu algorytmu nie jest jednak jasne dla czytelnika jak wyznaczyć położenia i prędkości w chwili  $t+\Delta t$ . Zapis byłby bardziej zrozumiały, gdyby jawnie występował czas w równaniach. W podrozdziale 2.1 autor opisuje algorytm Velocity Verlet. Sam opis jest poprawny pod względem matematycznym, ale nie ma żadnego uzasadnienia taka komplikacja prostego algorytmu, zwłaszcza że w dalszej części pracy nie ma wsparcia dla takiego podejścia. Sam zapis algorytmu jest niezrozumiały dla jego implementacji. Autor na str. 23 mówi o aktualizacji pędu do chwili czasu  $\Delta t$ , a w równaniu nie widać aktualizacji, wszystkie zmienne zależą od tego samego przedziału czasowego  $\Delta t$ . W podrozdziale 2.2

autor opisuje technikę symulacji sterowanej dynamiki molekularnej. W opisie tym brakuje równań ruchu z narzuconymi ograniczeniami, częściowo tą informację możemy uzyskać z odnośników. W symulacjach użyty jest potencjał CHARMM, który opisany jest w podrozdziale 2.3. Potencjał ten dzieli się na część opisującą wiązania chemiczne i część związaną z oddziaływaniami van der Waalsa i Coulomba. W tym podrozdziale pojawia się pojęcie okresowych warunków brzegowych (PBC). W opisie brakuje uzasadnienia wprowadzania PBC w układach molekularnych. Nie ma też uzasadnienia odnośnie promienia obciążenia dla oddziaływań elektrostatycznych. Zdanie „Aby rozwiązać ten problem, niezwiązane terminy interakcji są zawile ze specjalnymi funkcjami przełączania lub przesuwania” jest mało komunikatywne. W następnym podrozdziale zatytułowanym „Wybrane metody analizy danych symulacji MD” autor na pierwszej stronie opisuje wiązanie wodorowe i jego najważniejsze cechy w kontekście oddziaływań biomolekuł. Pod koniec tego opisu dowiadujemy się jakie parametry symulacji komputerowejbrane są pod uwagę w zliczaniu wiązań wodorowych. Dalej autor opisuje metodę obliczania funkcji odchylenia średnio-kwadratowego zależnego od czasu (RMSD) jako parametr charakteryzujący dynamikę molekuł. W badaniach jako parametr strukturalny opisujący rozkład atomów w biomolekule wybrany został promień bezwładności (RG). Z opisu dowiadujemy się, że w przypadku małego RG atomy znajdują się blisko środka masy, a duży RG oznacza, że atomy są daleko od środka masy.

Rozdział 3 pracy doktorskiej poświęcony jest modelowaniu molekuł i ustalaniu parametrów symulacji. Do realizacji symulacji komputerowej MD wybrano program symulacyjny NAMD stosując w pełni atomistyczny model. Do modelowania oraz analizy wyników wykorzystano oprogramowanie VMD w wersji 1.9.3. oraz własne oprogramowanie napisane w języku Python i TCL. Do budowy nanorurki węglowej autor wykorzystał generator z programu VMD, ale już bioagregaty HDL i nHDL sam zbudował i zoptymalizował używając symulacji równowagowej NPT, dla temperatury fizjologicznej  $T=310$  K. Wynikiem tej optymalizacji były kształty, dyskoidalny i sferyczny odpowiednio dla nHDL i HDL. Dalej opisane są parametry symulacji MD ustawione w programie NAMD. Z opisu dowiadujemy się, że równania ruchu całkowano za pomocą algorytmu Brungera-Brooksa-Karplusa, o którym nie ma wzmianki w poprzednim rozdziale. Temperatura w symulacjach, jak pisze autor, kontrolowana była przez termostat Langevina, i tutaj też nie ma odnośnika do literatury na temat tego algorytmu. W kolejnych podrozdziałach autor opisuje symulacje komputerowe MD wykonane w ramach tej pracy. Pierwszy podrozdział

poświęcony jest symulacją struktury HDL i nHDL. Drugi podrozdział opisuje symulacje nanoidentacji bioagregatu nHDL nanorurką węglową. Autor pisze, że dla zatrzymania bioagregatu użyto warstwy azotku boru, ale nie pisze dlaczego akurat taka molekula została użyta w warstwie. Trzeci podrozdział poświęcony jest symulacji wypełniania nHDL molekułami wody bądź atomami argonu w środowisku bezwodnym. W symulacji wykorzystano konfigurację końcową z poprzedniej symulacji. Molekuły wody lub atomy argonu wtłaczane były do nanorurki przez otwór w warstwie grafenowej przy użyciu wirtualnego tłoka. Parametrem, który był tutaj ustalany była prędkość ładowania substancji do agregatu nHDL. Następny podrozdział wprowadza środowisko wodne do systemu symulacji ładowania molekuł wody przez CNT. Autor uzasadnia taką symulację tym, że organizm ludzki składa się z około 70% wody. Autor w tym rozdziale pisze, że ze względu na umożliwienie rozprzestrzeniania się bioagregatu nHDL, molekuły wody rozlosowane zostały stosunkowo rzadko. Nie ma jednak wzmianki jakiej to odpowiadało gęstości wody, co ma raczej dość istotne znaczenie, gdy chcemy porównać tę symulację do rzeczywistego układu.

Najobszerniejszym rozdziałem pracy doktorskiej jest rozdział poświęcony prezentacji i omówieniu wyników. Rozdział ten składa się z czterech podrozdziałów poświęconych każdej z opisanych w rozdziale 3 symulacji. Stabilność struktur nHDL i HDL badana była przy pomocy uśrednionej wartości RMSD po całym czasie symulacji w zakresie temperatur 290-330 K. Wyniki tych badań wskazują na większą stabilność bioagregatów HDL niż nHDL. Dodatkowe badania, przeprowadzone przez autora pracy, związane ze zliczaniem średniej ilości wiązań wodorowych wskazują na przyczynę takiego faktu. W nHDL autor zaobserwował mniejszą liczbę wiązań wodorowych. Przebiegi czasowe funkcji RMSD(t) były użyte jako wskaźnik mobilności dla protein apoA-I oraz fosfolipidów POPC w bioagregatach nHDL i HDL. Wyniki wskazują na większą ruchliwość fosfolipidów, co potwierdza sam autor, podając możliwe przyczyny takiego zachowania molekuł. Wyniki te wskazują także na większą ruchliwość w bioagregacie nHDL niż w HDL. Analiza tego faktu pogłębiona jest w pracy przez obliczenie promienia bezwładności dla badanych molekuł. Zmniejszanie się wartości RG w czasie dla nHDL autor uzasadnia zmniejszeniem jamy wewnętrznej nHDL, jako bardziej korzystne energetycznie, przypominając o kształcie dyskoidalnym nHDL i sferycznym HDL. Autor na podstawie tych badań stwierdza możliwość zmiany kształtu nHDL z dyskoidalnego na sferyczny po napełnieniu jej wnętrza dodatkowymi substancjami. Następny podrozdział 4.2 prezentuje wyniki badań nad nanoidentacją bioagregatu nHDL nanorurką węglową. Autor bada ten proces przez analizę takich wielkości fizycznych jak siła i

profil gęstości. Wnioski z obserwacji siły potrzebnej do wbicia nanorurki do agregatu nHDL wskazują na to, że siła potrzebna do przebicia agregatu jest większa niż potrzebna do przebicia dwuwarstwy fosfolipidowej we wcześniejszych badaniach. Autor uzasadnia ten fakt zgniataniem makromolekuły oraz użyciem w poprzednich badaniach mniej sztywnych fosfolipidów DMPC. Wnioskiem z obserwacji profilu gęstości jest potwierdzenie obserwacji o przesuwaniu POPC w kierunku warstwy azotku boru. Podrozdział 4.3 opisuje proces ładowania nHDL cząsteczkami wody (4.3.1) i argonu (4.3.2) w środowisku bezwodnym. Prezentację wyników w tym podrozdziale autor rozpoczyna od przedstawienia chwilowych konfiguracji układu nHDL załadowanego molekułami wody. Dalsza analiza obejmuje zależność czasową liczby cząstek, przepływu cząstek i długości półosi elipsoidy nHDL. Po tej analizie autor stwierdza, że ładowanie molekułami wody nie jest w stanie zmienić kształtu nHDL z dyskooidalnego na we w pełni sferyczny. Wcześniej dochodzi do rozerwania struktury nHDL. Na podstawie tej analizy autor stwierdza istnienie dwóch faz modyfikacji struktury nHDL podczas ładowania wody. Pierwszy etap od 0-550 ps, nHDL pozostaje stabilny – nie zmienia swojego kształtu. Drugi etap od 550 ps prowadzi do zmiany kształtu agregatu. Wyniki te potwierdziły też wykresy RMSD(t). W celu pogłębienia badań autor postanowił powtórzyć symulacje dla obniżonej prędkości ładowania. Wnioskiem z tych badań jest to, że makromolekuła nHDL w przypadku najwolniejszej szybkości wtłaczania jest w stanie w sposób ciągły dopasować się do zmian spowodowanych ładowaniem wody. W przypadku ładowania nHDL argonem autor stwierdza natychmiastowe opuszczenie nHDL przez atomy argonu w temperaturze fizjologicznej. W celu obserwacji zmiany kształtu nHDL podczas ładowania argonem autor zmienia temperaturę symulacji na  $T=10$  K nie podając dlaczego akurat ta temperatura będzie odpowiednia. Wniosek autora jest taki, że przy tak niskiej temperaturze struktura nHDL jest znacznie sztywniejsza i mniej się odkształca. W następnym podrozdziale 4.4 autor prezentuje te same funkcje, ale dla symulacji wypełniania nHDL cząsteczkami polarnym w środowisku wodnym. Napęlnianie molekułami wody nHDL w środowisku wodnym jest prawie czterokrotnie dłuższe niż w środowisku bezwodnym przy tych samych parametrach. Autor wspomina w tym miejscu o trudnościach w oszacowaniu ilości molekuł wody we wnętrzu nHDL pochodzących z wtłaczania. W przypadku środowiska wodnego rozszerzanie agregatu nHDL prowadzi do wnikania dodatkowej wody ze środowiska, co przyspiesza degradację makromolekuł nHDL. Pod koniec rozdziału 4 Autor stwierdza, że badania bez obecności środowiska wodnego pozwalają lepiej oszacować ilość molekuł/atomów, którą można wprowadzić do bioagregatu przed jego uszkodzeniem. Taki

wniosek może wynikać głównie z braku narzędzi analizy układu w środowisku wodnym. W tekście pracy znajduje się kilka błędów typograficznych, jak na str. 15 dwa razy słowo „wolnego wolnego”, na str. 29 „Więzań wodorowych umożliwiają”, str. 59 powinno być słowo „spośród” a jest „sposód”.

Podsumowując, niewielkie błędy typograficzne zauważone w pracy oraz braki w opisie dla szerszego grona czytelników, nie umniejszają jej jakościowego wkładu do badań nad nano transportem leków w organizmach żywych, dlatego wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie mgr Mateusza Pabiszczaka do dalszego etapu przewodu doktorskiego.

Aleksander Dawid

Aleksander Dawid  
Dąbrowa Górnicza, 30 maj 2023