

Prof. dr hab. Adam Patkowski  
Zakład Biofizyki Molekularnej  
Wydział Fizyki  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 2  
61-614 Poznań

Poznań, 31.05.2023.

**Recenzja pracy doktorskiej mgra Mateusza Pabiszczaka pt. "Napełnianie bioagregatów fosfolipidowych substancjami polarnymi i niepolarnymi – symulacje komputerowe".**

W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania eksperymentalne oraz przy pomocy symulacji komputerowych mające na celu znalezienie nanocząstek (nanostruktur) mogących służyć do efektywnego celowanego dostarczania leków do określonych miejsc występowania choroby w organizmie ludzkim. Nanocząstki takie muszą spełniać wiele warunków takich jak małe rozmiary (rzędu nanometrów), odpowiednie własności powierzchni zapewniające znalezienie celu i efektywne przenikanie do komórki, długi czas życia i możliwość ich wydalania z organizmu (biodegradowalność), a także biokompatybilność i niską stymulację immunologiczną.

Jedną z takich nanocząstek jest lipoproteina HDL. Kompleks lipoproteinowy składa się z hydrofobowego rdzenia (złożonego z estrów cholesterolu oraz triacylogliceroli) otoczonego cholesterolem oraz fosfolipidami i białkami (apolipoproteinami), które stanowią hydrofilową powłokę. Jedną z klas lipoprotein są lipoproteiny wysokiej gęstości (High Density Lipoprotein – HDL) oraz nHDL (nascent HDL). HDL są lipoproteinami przeciwmiażdżycowymi, w odróżnieniu od pozostałych lipoprotein o działaniu odwrotnym. Główną funkcją HDL jest wiązanie uwalnianego do osocza cholesterolu oraz wychwytywanie, przechowywanie i transport apolipoprotein. Kompleksy nHDL zawierające głównie apoproteiny i fosfolipidy oraz małą ilość cholesterolu, z cząstek w kształcie dysku, przekształcają się w cząstki kuliste (HDL) w miarę wypełniania ich wnętrza przez cholesterol.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej były badania procesów wypełniania kompleksów nHDL (złożonych z apolipoproteiny (apoA-I, złożonej z 243 aminokwasów o  $M_w=20$  kDa) oraz 200 cząsteczek fosfolipidów (1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicero-fosfocholiny, POPC) i 20 cząsteczek cholesterolu, przez cząsteczki hydrofilowe (wodę) w próżni i w środowisku wodnym oraz hydrofobowe atomy argonu w próżni. Kompleks HDL tworzyła apoA-I, 188 lipidów POPC, 20 cholesteroli i 86 cząsteczek oleinianu cholesterolu (CE), które wypełniają jego wnętrze.

W tej pracy doktorskiej wybraną metodą badawczą były symulacje komputerowe metodami dynamiki molekularnej (Molecular Dynamics - MD) i sterowanej dynamiki molekularnej (Steered Molecular Dynamics - SMD) uwzględniające oddziaływania na poziomie atomowym. Symulacje MD wykonano przy pomocy standardowych metod NAMD stosując w pełni atomistyczny model układu. Do przygotowania i wizualizacji badanych układów i przeglądania oraz analizy wyników stosowano oprogramowanie VDM, a oddziaływania międzycząsteczkowe obliczano przy pomocy potencjału CHARMM oraz zastosowano model wody TIP3P. Uwzględniano także oddziaływania elektrostatyczne dalekiego zasięgu. Analizę wyników przeprowadzono przy pomocy autorsko zaimplementowanego oprogramowania.

Bez wątpienia tematyka ta należy do głównego, najbardziej aktualnego nurtu projektowania leków przy pomocy symulacji MD.

Treść pracy ściśle odpowiada tytułowi.

Przedstawiona praca doktorska składa się z 4 rozdziałów, wprowadzenia i podsumowania, obszernej bibliografii oraz spisu rysunków.

We Wprowadzeniu Doktorant krótko przedstawił cel pracy i potencjalne zastosowania uzyskanych wyników.

W rozdziale 1-szym szczegółowo omówiono strukturę i funkcję fosfolipidów, cholesterolu i lipoprotein, a w szczególności budowę, funkcję, metabolizm i typy kompleksów HDL, które stanowią przedmiot badań prezentowanych w tej pracy.

W rozdziale 2-gim bardzo szczegółowo omówiono metodę symulacji komputerowych dynamiki molekularnej (MD) z uwzględnieniem stosowanych algorytmów. Omówiono też metodę sterowanej dynamiki molekularnej (SMD), a także stosowany w obliczeniach potencjał CHARMM. Zdefiniowano też stosowane w analizie danych symulacyjnych parametry: pierwiastek ze średniego kwadratowego odchylenia pozycji atomów (RMSD) oraz promień bezwładności  $R_g$  i liczbę wiązań wodorowych dla badanych obiektów.

Założony w tej pracy program badań wypełniania nHDL cząsteczkami wody i atomami argonu podzielony został na cztery etapy:

1. symulacje struktury HDL i nHDL
2. nanoindentacja bioagregatu nHDL nanorurką węglową
3. symulacja wypełnienia nHDL cząsteczkami wody lub atomami argonu w środowisku bezwodnym (w próżni)
4. symulacja wypełnienia nHDL cząsteczkami wody w środowisku wodnym.

W rozdziale 3-cim przedstawiono modele (atomowe) złożonych struktur użytych w symulacjach oraz parametry symulacji. W szczególności przedstawiono modele używanych w symulacjach kompleksów nHDL i HDL z uwzględnieniem wszystkich atomów. Symulacje przeprowadzono w temperaturach od 290 do 330 K z prędkością zmiany temperatury  $10^{-6}$  K/krok symulacyjny =  $2 \times 10^9$  K/s (krok symulacyjny wynosił 0,5 fs). O ile zmiana temperatury na krok symulacyjny jest bardzo mała, o tyle powstaje pytanie czy zmiana temperatury tak skomplikowanego układu z prędkością rzędu  $10^9$  K/s jest wystarczająco wolna aby umożliwić układowi osiągnięcie stanu równowagi.

W dalszej części rozdziału 3-ciego opisano proces nanoindentacji bioagregatu nHDL nanorurką węglową. Jednak ani na rysunku ani w tekście nie podano wymiarów nHDL (które można później znaleźć na rys. 4.8) ani średnicy nanorurki i jej ewentualnego wpływu na proces nanoindentacji i wypełniania nHDL. Następnie opisano metodę i parametry użyte w symulacji wypełniania nHDL cząsteczkami wody lub atomami argonu w środowisku bezwodnym (w próżni) oraz cząsteczkami wody w środowisku wodnym. Wymagało to skonstruowania użytych w symulacjach skomplikowanych nanoukładów składających się z nHDL wraz z otoczeniem, nanorurki i słupa wpływającej do niej substancji wypełniającej, które zapewniały unieruchomienie nHDL oraz kontrolę szybkości przepływu substancji wypełniającej przez nanorurkę. Na podkreślenie zasługuje fakt, że przeprowadzono symulacje z uwzględnieniem wszystkich atomów symulowanego układu, których liczba przekraczała pół miliona.

Wyniki własne Doktoranta uzyskane w trakcie realizacji wymienionych wyżej czterech etapów badań przedstawiono w rozdziale 4-tym.

Pierwszym etapem badań były symulacje struktury nHDL i HDL w zależności od temperatury w zakresie temperatur 290-330 K. Stabilność otrzymanych struktur w każdej temperaturze określano podając wartości RMSD obliczone oddzielnie dla apolipoproteiny apoA-I i fosfolipidów POPC oraz  $R_g$  i liczbę wiązań wodorowych uśrednione po czasie symulacji. Pokazano, analizując RMSD i liczbę wiązań wodorowych, że struktura nHDL jest dość stabilna do 320 K, a HDL – do 330 K. Wykazano też że w obu strukturach ruchliwość apoA-I jest mniejsza niż lipidów oraz że w ruchliwość obu składników jest większa w nHDL niż w HDL. Ta ostatnia różnica tłumaczona jest bardziej zwartą strukturą wypełnionego HDL i występowaniem pustej przestrzeni wewnątrz nHDL.

Określono także promienie bezwładności nHDL i HDL oddzielnie w oparciu o położenia atomów apoA-I i fosfolipidów w temperaturze 310 K. Odpowiednie wartości średnie dla HDL wynoszą 42,2 i 38,7 Å. Dla nHDL wartości  $R_g$  zmniejszają się w czasie

symulacji odpowiednio od 46,8 do 46,2 Å oraz od 37,5 do 37,1 Å. Te minimalne zmiany przypisano zmniejszeniu się pustej wnęki wewnątrz nHDL.

Drugim etapem badań były symulacje procesu nanoindentacji bioagregatu nHDL nanorurką węglową. Analizowano siłę konieczną do wbijania i przesuwania nanorurki w nHDL oraz profil gęstości nHDL w odpowiednich stadiach procesu. Stwierdzono, że siła potrzebna do wbicia nanorurki do nHDL jest większa niż poprzednio określona analogiczna siła dla dwuwarstwy fosfolipidowej. Efekt ten wyjaśniono tym, że nanorurka dodatkowo zgniata i przyciska nHDL do podłoża, a dodatkowo fosfolipidy POPC w nHDL są sztywniejsze od tworzących dwuwarstwę fosfolipidów DMPC. Badając profile gęstości nHDL w poszczególnych stadiach indentacji stwierdzono, że jego zmiany świadczą o dość dużej deformacji nHDL w tym procesie. Deformacje te można zmniejszyć zmniejszając prędkość przesuwu indentera.

Trzecim etapem badań były symulacje procesu wypełniania nHDL cząsteczkami wody lub atomami argonu w środowisku bezwodnym (w próżni).

Układ stosowany w tych symulacjach składał się z nHDL z wbitą nanorurką o strukturze określonej w etapie 1-szym i 2-gim. Nad wolnym otworem nanorurki umieszczano słup substancji wypełniającej opartej na warstwie grafenowej z odpowiednim otworem, przytwierdzonej do nanorurki.

Symulacje przeprowadzono w temperaturze 310 K dla szybkości przepływu  $10^{-5}$  Å/ $\Delta t = 2 \times 10^2$  cm/s. Na rys. 4.7 pokazano chwilowe konfiguracje układu w trakcie procesu wypełniania nHDL cząsteczkami wody, na których wyraźnie widać stopniowe wypełnianie wodą wnęki nHDL, niejednorodną zmianę kształtu nHDL oraz moment, w którym wtłaczane cząsteczki wody naruszają błonę nHDL wypływając na zewnątrz. Dynamikę wypełniania nHDL analizowano wykreślając zależność od czasu symulacji takich parametrów ładowania jak liczba i strumień cząsteczek wody załadowanych do nHDL, wypływających z nHDL i bez kontaktu z nHDL (które nie opuściły nanorurki) oraz długości półosi elipsoidy opisującej kształt i rozmiary nHDL dla dwóch przebiegów ładowania.

W przedstawionej pracy nie znalazłem opisu sposobu obliczania półosi a, b, c elipsoidy odpowiadającej nHDL. Dodatkowo, jak widać na rys. 4.8 e i f długość półosi spełnia zależność  $a \approx c < b$ , co jest charakterystyczne dla elipsoidy wydłużonej a nie dla dysku (elipsoidy spłaszczonej), jak wielokrotnie w pracy pisze Doktorant. Gdyby nHDL miało kształt dysku, to półosie spełniałyby warunek  $a \approx c > b$ . Szczęśliwie, przyjęcie poprawnej interpretacji kształtu elipsoidy nHDL nie zmienia kompleksowej interpretacji wyników i

nadal można stwierdzić, że w wyniku wypełnienia kompleks nHDL przyjmuje kształt mniej wydłużony (bardziej kulisty), czyli maleje stosunek  $b/a$  i  $b/c$ .

Pokazano, że proces ładowania cząsteczek wody do nHDL przebiega dwufazowo: W pierwszej fazie (od 0 do ok. 550 ps) cząsteczki wody wypełniają wnętrze kompleksu nHDL nie zmieniając jego kształtu i wymiarów. W drugiej fazie (od 55 ps do rozerwania nHDL) następuje zmiana jego kształtu z wydłużonej elipsoidy (nie dysku) na bardziej kulisty. Te fazy wypełniania nHDL wodą również wyraźnie widać na wykresach czasowych zależności parametrów RMSD i  $R_g$  obliczonych oddzielnie dla apoproteiny apoA-I i fosfolipidów POPC (rys. 4.9), przy czym wzrost  $R_g$  widoczny jest ok. 100 ps przed zakończeniem 1-szej fazy ładowania. Na str. 52 Doktorant stwierdza, że wartości  $R_g$  (w pierwszej fazie ładowania) zbliżone są do wartości otrzymanych dla samego nHDL na pierwszym etapie badań (rys. 4.4 a i c). Nie jest to do końca prawdą, gdyż wartości te różnią się o ok. 2 Å i zapewne są bardziej zbliżone do odpowiednich wartości  $R_g$  po nanoindentacji (2-gi etap badań), których w pracy nie podano. Stwierdzono również, że w trakcie obu faz ładowania wprowadzono do nHDL 1400 cząsteczek wody o efektywnej objętości 41,7 nm<sup>3</sup>. Ładowanie z największą szybkością ( $5 \times 10^{-5}$  Å/Δt) uniemożliwia agregatowi nHDL dopasowanie swojej struktury do zwiększającej się ilości wody i prowadzi do zniszczenia agregatu. Dla lepszej oceny czasu reakcji struktury agregatu na zwiększającą się ilość załadowanej do jego wnętrza wody przeprowadzono symulacje dla czterokrotnie mniejszej prędkości ładowania ( $2,5 \times 10^{-6}$  Å/Δt=50 cm/s). W tym przypadku proces ładowania zachodzi do 1500 ps a liczba załadowanych cząsteczek wody wynosi 1400, czyli tyle samo co dla stosowanej poprzednio czterokrotnie większej prędkości ładowania. Przebieg procesu ładowania jest podobny, przy czym zmiana kształtu nHDL rozpoczyna się wcześniej, już przy 270 załadowanych cząsteczkach wody (8 nm<sup>3</sup>). Analizując przebiegi czasowe RMSD i  $R_g$  stwierdzono, że parametry te systematycznie rosną w trakcie ładowania, co potwierdza zmiany elastyczności i kształtu nHDL wymuszone rosnącą ilością wody w jego wnętrzu. Zatem kompleks nHDL przy najmniejszej prędkości ładowania nadaża z przystosowaniem swoich rozmiarów i kształtu do rosnącej ilości wody w jego wnętrzu.

Dalszą częścią badań procesu ładowania nHDL w środowisku bezwodnym (w próżni) były symulacje ładowania hydrofobowych atomów argonu w temperaturze 310 i 10 K. Symulacje w temperaturze 310 K przeprowadzono dla kilku szybkości ładowania od największej ( $5 \times 10^{-5}$  Å/Δt) do najmniejszej ( $2,5 \times 10^{-6}$  Å/Δt). Przy największej prędkości ładowania atomy argonu zaczynają opuszczać nHDL praktycznie natychmiast, przy średniej prędkości ( $10^{-5}$  Å/Δt) – po 200 ps, a przy najmniejszej prędkości – po 450 ps. Do wnęki

nHDL można było załadować ok. 450 atomów, dla średniej, i ok. 500 atomów, dla najniższej prędkości ładowania, co odpowiada znacznie niższymi niż dla wody objętościami, odpowiednio 11,1 i 13,9 nm<sup>3</sup>. Te małe ilości (objętości) załadowanych atomów wynikają z faktu, że stosunkowo wcześnie dyfundują one na zewnątrz nHDL. Aby tego uniknąć dodatkowo przeprowadzono symulacje w temperaturze 10 K. W tej temperaturze, przy średniej prędkości, proces ładowania trwa ok. 1900 ps, a liczba atomów argonu wewnątrz nHDL osiąga 1100 (objętość – 30,6 nm<sup>3</sup>). Jest to znacznie mniejsza objętość niż w przypadku wody. Stwierdzono, że w tak niskiej temperaturze elastyczność nHDL jest znacznie mniejsza i mniejsze są też zmiany rozmiarów nHDL indukowane procesem ładowania. Symulacje przeprowadzone dla różnych prędkości ładowania wykazały, że w temperaturze 10 K liczba załadowanych atomów argonu oraz wartości RMSD i R<sub>g</sub> w poszczególnych fazach ładowania są praktycznie identyczne.

Rozumiem, że Celem użycia hydrolilowej wody i hydrofobowego argonu było zbadanie wpływu polarności ładowanych cząsteczek na przebieg procesu ich ładowania do nHDL. Cel ten chyba nie do końca został zrealizowany, ponieważ zaobserwowane różnice zdominowane zostały dużą przenikalnością błon nHDL dla atomów argonu i trudno jest wyodrębnić wpływ polarności cząsteczek na przebieg procesu ładowania. Może w dalszych badaniach należałoby zastosować cząsteczki hydrofobowe o rozmiarach porównywalnych do wody, najlepiej porównywalnych do rozmiarów i budowy oleinianu cholesterolu, który w warunkach natywnych wypełnia wnękę nHDL.

Czwartym etapem badań były symulacje napełniania nHDL cząsteczkami wody w środowisku wodnym. Jest to układ modelowy najbardziej zbliżony do rzeczywistości, który pozwala ocenić, na ile poprzednie symulacje wykonane dla analogicznych układów w próżni dają wyniki zbliżone do układów rzeczywistych. Symulacje przeprowadzono w temperaturze 310 K z prędkością ładowania 10<sup>-5</sup> Å/Δt. Z porównania procesów ładowania cząsteczek wody do nHDL w próżni i w środowisku wodnym, przy tej samej prędkości ładowania wynika, że w środowisku wodnym proces ten zachodzi znacznie wolniej, a zmiany kształtu nHDL są utrudnione. Pierwsze cząsteczki wody zaczynają wypełniać nHDL po 1700 ps, a cały proces trwa do ok. 3500 ps, kiedy woda zaczyna przedostawać się na zewnątrz. W środowisku wodnym maksymalna liczba cząsteczek wody załadowanych do nHDL jest dwukrotnie mniejsza niż w próżni.

Wolniejszy przebieg ładowania w środowisku wodnym i mniejsza liczba cząsteczek wody, jaką można załadować do nHDL zanim kompleks zostanie rozerwany wynika, zdaniem Doktoranta, z przenikania wody zewnętrznej do błony nHDL, co prowadzi do jej

uszkodzenia. Efekt ten potwierdza również wzrost długości dwóch krótszych półosi elipsoidy dopasowanej do nHDL, przy zachowaniu praktycznie stałej długości długiej półosi. Świadczy to o istotnym wzroście powierzchni nHDL, co przy stałej liczbie fosfolipidów prowadzi ostatecznie do uszkodzenia struktury. Potwierdza to dwukrotnie większa wartość RMSD dla obu składników nHDL w początkowej fazie ładowania. Natomiast przebiegi zależności czasowej i wartości  $R_g$  obu składników kompleksu w próżni i w środowisku wodnym są zbliżone. Prowadzi to do końcowego wniosku, że procesy ładowania nHDL cząsteczkami wody w próżni i w środowisku wodnym przebiegają podobnie, a na podstawie wyników symulacji w próżni można oszacować ilość cząsteczek wody jaką można wprowadzić do nHDL przed jego uszkodzeniem oraz optymalną prędkość ładowania substancji.

Interesujący jest fakt, że w przeprowadzonych symulacjach procesu wypełniania kompleksu nHDL jest stabilniejszy w próżni niż w wodzie, która jest jego naturalnym środowiskiem. Czy tak samo jest w przypadku HDL i czy da się to wyjaśnić?

Wypracowane metody i modelowe nanoukłady oraz cenne informacje uzyskane w tej pracy doktorskiej mogą istotnie pomóc w projektowaniu systemów transportu leków w oparciu o kompleksy nHDL.

W podsumowaniu Autor omówił wszystkie nowe wyniki badań i perspektywy potencjalnych zastosowań medycznych.

Największymi osiągnięciami tej pracy doktorskiej są:

- opracowanie stosowanego w symulacjach modelu nano-urządzenia do ładowania nHDL dowolnymi cząsteczkami
- zastosowanie symulacji MD i SMD i opracowanie procedur analizy wyników symulacji skomplikowanych nanoukładów,
- przeprowadzenie symulacji procesu wypełniania kompleksu nHDL polarnymi cząsteczkami wody i niepolarnymi atomami argonu i wykazanie, że istotne znaczenie dla przebiegu i wydajności tego procesu ma elastyczność strukturalna nHDL,
- wykazanie, że wyniki symulacji tego procesu w próżni są zbliżone do odpowiednich wyników w wodzie i mogą być używane do przewidywania zachowania nHDL w środowisku naturalnym.

Bardzo wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej. Autor z dużą inwencją logicznie zaplanował cały cykl badań, wybrał właściwe zaawansowane metody symulacji i układy modelowe, a przedstawione w pracy wizualizacje bardzo ułatwiają zrozumienie uzyskanych wyników. W sposób jednoznaczny pokazano, że przebieg i wydajność procesu ładowania nHDL zależy od prędkości ładowania, polarności substancji

ładowanej i elastyczności struktury kompleksu nHDL. Bez wątpienia wyniki uzyskane przez Doktoranta w istotny sposób rozszerzają naszą wiedzę w tej dziedzinie.

Doktorant jest współautorem 2 prac opublikowanych w międzynarodowych czasopiśmie naukowych o wysokiej randze w tej dziedzinie i jednej pracy opublikowanej w materiałach konferencyjnych.

Praca doktorska mgr Mateusza Pabiszczaka zawiera 85 stron, 4 rozdziały, wprowadzenie i podsumowanie, obszerną bibliografię zawierającą 57 starannie dobranych odnośników literaturowych oraz spis rysunków. Praca napisana jest bardzo starannie i wraz z zawartym w pracy szczegółowym przeglądem literatury dotyczącej przedmiotu pracy oraz opisem metod symulacji komputerowych świadczy o głębokiej wiedzy Autora i gruntownym zrozumieniu omawianych problemów. Praca napisana jest merytorycznie jasno, sposób prezentacji wyników (rysunki, tabele) jest jasny, a wnioski są wyraźnie sformułowane. Wyniki własne Autora zawarte są w oddzielnych rozdziałach i przedstawione na tle aktualnego stanu wiedzy w tej dziedzinie.

Mimo bardzo starannej redakcji Autor nie ustrzegł się kilku drobnych błędów:

- praca cytowana jako [9] cytowana jest jeszcze dwukrotnie jako [32] i [44]
- str. 29, linia 2 od dołu: jest „kął D-A-H”, powinno być „kął D-H-A”,
- str. 30, linie 1-2 od góry: jest „odchylenie średnio-kwadratowe (RMSD)”, powinno być: „pierwiastek z odchylenia średnio-kwadratowego (RMSD)”,
- str 64, linia 8 od góry: jest : „rys. 4.18”, powinno być „rys. 4.17”
- w Conclusions brakuje przedostatniego akapitu Podsumowania
- kilka błędów literowych

Te drobne błędy w żadnym stopniu nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny tej pracy doktorskiej.

Uważam, że przedstawiona praca doktorska mgra Mateusza Pabiszczaka pt. „Napełnianie bioagregatów fosfolipidowych substancjami polarnymi i niepolarnymi – symulacje komputerowe” spełnia warunki określone w ustawie o tytule i stopniach naukowych i wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Adam Patkowski