

Rozprawa doktorska

Działanie przeciwdrobnoustrojowe - rozkład zjawisk biologicznych w podejściu fizycznym - model teoretyczny

Mateusz Rzycki

Streszczenie

Szerzący się problem antybiotykooporności bakterii wymusza zastosowanie wielu podejść interdyscyplinarnych. Przykładem takiego podejścia może być sprowadzenie go do postaci odpowiednich oddziaływań. Głównym celem tej rozprawy stało się opracowanie fizycznych i numerycznych modeli błon biologicznych, aby umożliwić ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej cząsteczek o strukturze Gemini. W niniejszej pracy połączono podejścia w głównej mierze z fizyki oraz chemii i biologii celem stworzenia probabilistycznych oraz numerycznych modeli błon bakteryjnych pozwalających na ocenę wpływu związków powierzchniowo czynnych na fizykochemiczne i termodynamiczne parametry błon. Jedną z proponowanych koncepcji zakłada opis interakcji związku z błoną komórkową poprzez oddziaływania dipol-dipol w polu nie będącym polem zachowawczym ze względu na lepkość ośrodka. Zastosowana strategia sprowadzająca problem do oddziaływań fizycznych ma na celu dostarczenie szerszej perspektywy oraz wiedzy w nierównej walce z bakteriami opornymi na antybiotyki.

Szeroki wzrost oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe został uznany w 2015r. przez Światową Organizację Zdrowia za jeden z 10 największych globalnych zagrożeń dla zdrowia ludzkości. Jeżeli do 2050 roku nie zostaną odkryte nowe leki, miliony osób będą ofiarami bakterii lekoopornych każdego roku. Szczególnie przytłaczająca jest ciągła ekspansja tak zwanych superbakterii, takich jak *Klebsiella pneumoniae*, powodująca szerokie spektrum infekcji i wykazująca ciągle nabywanie oporności na leki nawet na te nazywane antybiotykami ostatniej szansy. Przyczyn uodparniania się mikroorganizmów jest wiele, m.in. ciągłe mutacje, czyli modyfikacje materiału genetycznego, nabywanie genów odporności od innych organizmów (transfer lateralny) czy nawet nieprawidłowo prowadzone antybiotykoterapie. Czynnikiem ludzki również silnie wpływa na uodparnianie się bakterii poprzez częste nadużywanie antybiotyków, przyjmowanie zbyt małych dawek lub zbyt krótki czas trwania antybiotykoterapii. Z biegiem czasu bakterie uciekają przed zabójczym działaniem antybiotyków, wykształcając swój własny mechanizm adaptacyjny. Obiecującym podejściem do rozwiązania tego problemu jest skupienie się na substancjach antyseptycznych, które nie mają dobrze zdefiniowanego celu molekularnego w komórkach bakteryjnych. Doniesiono, że niektóre z nich są środkami selektywnie atakującymi błony komórkowe poprzez oddziaływanie wywołujące jej destrukcję na drodze emulsyfikacji. Na rynku dostępnych jest kilka powszechnie stosowanych środków przeciwdrobnoustrojowych z rodziny kationowych środków powierzchniowo czynnych (surfaktantów Gemini). Jednymi z najbardziej znanych są oktenidyna (OCT) oraz chlorheksydyna (CHX), które skutecznie zwalczają bakterie Gram-dodatnie oraz Gram-ujemne. Dodatkowo każdego roku syntezowane są nowe związki o podwójnej (lustrzanej) strukturze Gemini, które wykazują potencjalne działanie antibakteryjne. Ze względu na różne protokoły stosowane przez grupy badawcze przy ocenie skuteczności antibakteryjnej danych związków, problematyczne staje się porównanie wprost ich efektywności, czy wybranie potencjalnych prekursorów mogących w przyszłości zastąpić obecnie używane antybiotyki.

W ramach pracy dostarczono wgląd w molekularne oddziaływania OCT oraz CHX na błony ujemnie naładowane (np. bakteryjne) oraz neutralne (np. eukariontów). Wykorzystanie modeli biofizycznych wspartych metodami numerycznymi oraz eksperymentami pozwoliło na określenie preferencyjnego miejsca lokowania się związków, tworzonych przez nich agregatów, destrukcyjnego działania na błony, czy ocenę zmian parametrów mechanicznych błon pod wpływem działania analizowanych cząsteczek. Przeprowadzona analiza pozwoliła zaproponować nowatorski mechanizm selektywnego oddziaływania związków antybakteryjnych - zwłaszcza OCT, oparty o różnice emergentnych własności mechanicznych błon bakteryjnych i zwierzęcych.

W dalszym etapie badań poszukiwano innych związków o budowie Gemini, które wykazują silne działanie antybakteryjne. Poprzez stosowanie różnych protokołów oraz szczepów bakteryjnych przy określaniu aktywności biobójczej surfaktantów, niemożliwym stało się porównanie ich efektywności. W związku z tym utworzono bazę ponad 250 cząsteczek Gemini o potencjalnym działaniu bakteriobójczym, w której cząsteczki zaklasyfikowano do odpowiednich grup uwzględniając ich strukturę. Wykonane obliczenia kwantowe pozwoliły na zoptymalizowanie pól siłowych (ang. force fields) wszystkich zebranych molekuł. Stosując ujednolicony protokół oraz symulacje dynamiki molekularnej przetestowano wpływ 25 związków o potencjalnym działaniu bakteriobójczym na trójkomponentowych modelach błon bakteryjnych. Analiza parametrów biofizycznych i mechanicznych błon pozwoliła na wybranie 8 najlepiej rokujących prekursorów o możliwym najsilniejszym działaniu przeciwbakteryjnym.

W podejściach teoretycznych i badaniach obliczeniowych często pojawiają się pytania dotyczące dokładności i rzetelności prezentowanych modeli struktur biologicznych. Modele mogą znacznie odbiegać od rzeczywistych lub od eksperymentalnych analogów, co może skutkować nieprecyzyjnymi wnioskami. W związku z tym ramach kolejnych prac badawczych zaproponowano kompleksowy model numeryczny odzwierciedlający szczegółową (wielokomponentową) strukturę lipidową bakterii *Escherichia coli* oraz oceniono czy jego złożoność może istotnie wpływać na wnioski płynące z analiz numerycznych takiego modelu. Dogłębna analiza parametrów strukturalnych, dynamicznych oraz własności mechanicznych wykazała, że złożoność i skład modelu błony bakteryjnej ma kluczowe znaczenie i nie może być przybliżane przez dowolne, ujemnie naładowane lipidy. Potencjalny brak złożoności obecnych modeli numerycznych błon bakteryjnych bez wątpienia wpływa na zasadnicze źródła interakcji, przez co niektóre zjawiska biologiczne mogą pozostać nieuchwytnie lub stłumione.

Świadomość ograniczeń metod eksperymentalnych oraz ugruntowanych metod numerycznych stała się inspiracją do stworzenia dedykowanej metodologii oraz autorskiego narzędzia symulacyjnego do szybkiej oceny potencjału antybakteryjnego surfaktantów Gemini. Symulacje dynamiki molekularnej pozwalają na ocenę zachowania związku względem błony oraz potencjalnego oddziaływania struktur. Metody szacowania energii swobodnej układu w precyzyjny sposób pozwalają na określenie zachowania cząsteczek antybakteryjnych w kontakcie z błoną, w tym zlokalizowanie barier energetycznych czy ocenę preferowanej lokacji molekuly w błonie. Stworzenie dokładnego profilu energetycznego cząsteczki typu Gemini w kontakcie z membraną jest procesem dość wymagającym obliczeniowo oraz czasochłonnym. Uproszczenie schematu oddziaływań i ograniczenie redundantnych parametrów pozwoliło na stworzenie autorskiego narzędzia *Diptool* do szybkiej analizy cząsteczek o potencjalnym działaniu antybakteryjnym. *Diptool* został oparty w głównej mierze na oddziaływaniach dipolowych lipidów oraz związków antybakteryjnych, a za całkowanie równań ruchu odpowiada zmodyfikowany algorytm Verleta. Korzystając z zależności struktura-funkcja (ang. quantitative structure-activity relationship) stworzono wzorzec istotnych statystycznie parametrów cząsteczek Gemini wpływających na ich aktywność czyli skuteczne działanie przeciwbakteryjne. Stworzenie probabilistycznego modelu błon biologicznych oraz implementacja wybranych parametrów w narzędziu *Diptool* pozwoliła w szybki sposób uzyskać odpowiedź na wystarczająco dokładnym poziomie czy cząsteczka penetruje błonę oraz jak wygląda rozkład energii swobodnej w procesie translokacji cząsteczki w poprzek błony. W efekcie końcowym pozwala to wprost oszacować jej potencjał antybakteryjny. Narzędzie zostało zwalidowane z użyciem metody Adaptive Biasing Force

znanej z dynamiki molekularnej. Największą zaletą narzędzia jest jego szybkość działania, która pozwala w ciągu kilku minut otrzymać wyniki porównywalne z pełno-atomowymi symulacjami dynamiki molekularnej.

Podsumowując, w ramach pracy doktorskiej zaproponowano mechanizm selektywnego działania związków antybakteryjnych - OCT oraz CHX stosowanych na szeroką skalę. Następnie stworzono bazę cząsteczek Gemini i zaproponowano ujednolicony numeryczny protokół badania związków o charakterze bakteriobójczym. Dalej, zaproponowano ulepszony i kompleksowy model bakterii *E. coli* do zastosowań numerycznych. Na koniec stworzono autorskie narzędzie bazujące na zjawiskach fizycznych w układach biologicznych do analizy potencjału antybakteryjnego cząsteczek o strukturze Gemini. Rdzeniem pracy doktorskiej są cztery publikacje naukowe, w których powyższe osiągnięcia zostały opisane, uwzględniając metodykę, etap wdrażania oraz weryfikację założeń.