



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski

Prof. dr hab. Andrzej Koliński
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
Pracownia Teorii Biopolimerów
<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/>

Warszawa, dnia 07.07.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Mateusza Rzyckiego
zatytułowanej: "Antimicrobial effect - decomposition of biological
phenomena into physical approach - a theoretical model"**

Praca doktorska Pana magistra inż. Mateusza Rzyckiego została zrealizowana w Katedrze Fizyki Doświadczalnej, Wydziału Podstawowych Problemów Techniki, Politechniki Wrocławskiej. Przedłożona Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Fizyczne rozprawa podsumowuje wyniki badań procesów cząsteczkowych ilustrujących mechanizmy działania środków przeciwdrobnoustrojowych. Badania te miały głównie teoretyczny charakter, z wykorzystaniem zaawansowanych metod modelowania cząsteczkowego. Promotorami rozprawy są profesorowie Marta Gładysiewicz-Kudrawiec i Sebastian Kraszewski. Podstawę rozprawy stanowią cztery artykuły naukowe prezentujące wyniki badań doktoranta. Najważniejsze wyniki badań zawarte w tych publikacjach podsumowane są w kilkunastostronicowym tekście w języku angielskim. Rozprawa zawiera też dwustronicowe streszczenie prezentowanych tez w języku polskim.

Tytuł rozprawy „***Antimicrobial effect - decomposition of biological phenomena into physical approach - a theoretical model***” (który w luźnym tłumaczeniu na język polski można sformułować jako: „*Działanie przeciwdrobnoustrojowe - Systematyzacja zjawisk biologicznych metodami fizyki - model teoretyczny*”) jest zgodny z tematyką rozprawy, aczkolwiek wydaje się być nieco niezręcznie sformułowanym. Można to było napisać prościej. Notabene, cały tekst podsumowujący uzyskane wyniki, aczkolwiek czytelny, zawiera sporo niezręczności językowych.

Podstawę pracy doktorskiej mgr. inż. Mateusza Rzyckiego stanowi seria czterech spójnych tematycznie publikacji, wymienionych poniżej. Mgr Rzycki jest pierwszym autorem tych artykułów.

(1) Rzycki M., Drabik D., Szostak-Paluch K., Hanus-Lorenz B., Kraszewski S., **“Unraveling the mechanism of octenidine and chlorhexidine on membranes: does electrostatics matter?”**, Biophysical Journal 2021, 120(16), 3392-3408.

(2) Rzycki M., Kaczorowska A., Kraszewski S., Drabik D., **“A Systematic Approach: Molecular Dynamics Study and Parametrisation of Gemini Type Cationic Surfactants”**, International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 10939.

(3) Rzycki M., Kraszewski S., Drabik D., **“Towards Mimetic Membrane Systems in Molecular Dynamics: Characteristics of E. Coli Membrane System”**, International Conference on Computational Science 2021, Lecture Notes in Computer Science, Springer, Cham. Vol. 12743, pp.551-563, 2021.

(4) Rzycki, M., Kraszewski S., Gładysiewicz-Kudrawiec M., **“Diptool – a novel numerical tool for membrane interactions analysis, applying to antimicrobial detergents and drug delivery aids”**, Materials 2021, 14, 6455

Biophysical Journal (IF=4.033), w którym doktorant opublikował pracę nr (1), to renomowane czasopismo, czytane przez badaczy z wielu dziedzin nauk ścisłych, nie tylko przez biofizyków. International Journal of Molecular Sciences (IF=5.824), w którym opublikowana jest praca nr (2) oraz Materials (F=3.623), w którym opublikowano artykuł nr (4), to również poczytne czasopisma. Te dwa czasopisma należą do MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) - wydawcy publikacji naukowych o otwartym dostępie. Niektórzy podchodzą krytycznie do czasopism należących do MDPI, uważając je za tzw. „predatory journals”. To jednak do pewnego stopnia problem oceny strategii ekonomicznej wydawcy a nie jakości naukowej publikowanych prac. Artykuł nr (3) opublikowano w seryjnym wydaniu Lecture Notes in Computer Science, któremu nie przyporządkowano jeszcze tzw. Współczynnika Oddziaływania (IF - Impact Factor). Oczywiście wszystkie publikacje były recenzowane przez kilku niezależnych ekspertów, co pozwala zakładać odpowiednio wysoki poziom merytoryczny prezentowanych badań. Ponieważ wszystkie wymienione artykuły, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej Pana mgr. Rzyckiego, zostały opublikowane w ubiegłym roku (2021) to trudno dokładnie oceniać ich odbiór w środowiskach naukowych. Nie mniej, prace te były już cytowane kilka razy, co sugeruje możliwość szybko rosnącego zainteresowania prezentowanymi rezultatami w niedalekiej przyszłości.

Biorąc pod uwagę wspomniany wcześniej fakt, że opublikowane w ubiegłym roku artykuły prezentujące wyniki pracy doktorskiej były już recenzowane przez szereg ekspertów, ograniczę swoją szczegółową ocenę do meritum zawartego w trzech pierwszych rozdziałach przedstawionego tekstu rozprawy. Ta zasadnicza część rozprawy zawiera omówienie przyjętych celów naukowych, opis zastosowanych metod badawczych oraz podsumowanie uzyskanych wyników.

Rozdział 1 rozprawy zatytułowany jest: **“Introduction and description of dissertation”**. Zawiera on omówienie biomedycznego kontekstu celów badawczych i teoretycznych podstaw używanych metod badawczych. Rozdział ten jest dobrze napisany (z wyjątkiem wspomnianych wcześniej niezręczności językowych) i pokazuje duże znaczenie podjętych badań oraz ich szeroki kontekst interdyscyplinarny. W pierwszym paragrafie tego rozdziału, bazując na wybranych źródłach naukowych i raportach organizacji międzynarodowych, pokazano jak ważnym wyzwaniem współczesnej nauki jest narastający problem szybkiego wzrostu odporności bakterii na istniejące i nowo projektowane antybiotyki i inne leki przeciwdrobnoustrojowe. Leki takie mogą działać na

różnorodne sposoby, zarówno uszkadzając strukturę molekularną i zakłócając (blokując) procesy zachodzące w komórkach drobnoustrojów, jak też wzmacniając mechanizmy obronne zaatakowanego przez mikroby organizmu. Niestety, wobec rosnącej rozpiętości kontaktów społecznych oraz częstego, a czasem niewłaściwego, stosowania leków (przede wszystkim antybiotyków) patogenne drobnoustroje ulegają szybkim i czasem bardzo groźnym mutacjom, powodując ich rosnącą lekoodporność. Potrzebne są zatem nowe leki, wykorzystujące mechanizmy działania bardziej odporne na mutacje patogenów.

W drugim paragrafie tego rozdziału autor dysertacji zwraca uwagę na rosnące zainteresowanie związkami amfifilowymi. Mogą one w sposób niespecyficzny oddziaływać na błony komórkowe osłaniające powierzchnie bakterii. W szczególności badane są dodatnio naładowane peptydy (CAMPs-cationic antimicrobial peptides) i powierzchniowo czynne bliźniacze dimery hydrofobowych peptydów (GS-gemini surfactants). Zakłada się, że tego typu związki mogą w sposób niespecyficzny wnikać w membrany osłaniające komórki drobnoustrojów, przez co uniezależnić swoje działanie od drobnych zmian spowodowanych mutacjami. Nie istnieje jeszcze dokładny opis mechanizmu działania tego typu związków antybakteryjnych, wydaje się jednak, że powodują one przerwanie osłonowej membrany komórkowej, tworząc pory o bliżej nieokreślonej strukturze przestrzennej. Szczególną uwagę autor rozprawy poświęca powierzchniowo czynnym związkom typu Gemini, zbudowanym z dwóch bliźniaczych (lub analogicznych) hydrofobowych peptydów, których polarne zakończenia połączone są giętkimi mostkami cząsteczkowymi o różnych rozmiarach i różnych składzie chemicznym.

W kolejnym paragrafie opisana jest budowa cząsteczkowa membran bakteryjnych, z uwzględnieniem zasadniczej różnicy w strukturze i znanych sposobach działania ścian komórkowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Opis ten jest przejrzysty oraz wyraźnie skoncentrowany na aspektach związanych z założonymi celami pracy doktorskiej. Ten paragraf i dwa poprzednie, prezentujące istotne dla rozprawy zagadnienia bio-medyczne i ich obraz na poziomie biologii molekularnej, napisane są w bardzo przejrzysty sposób i świadczą o tym, że doktorant bardzo dobrze rozumie wyzwania stojące przed opartym na wiedzy projektowaniem nowych leków.

Ostatni paragraf tego rozdziału zawiera omówienie metod numerycznych, które mogą być zastosowane do badania wybranych układów biologicznych. To ważna część teoretyczna, ponieważ ściśle dotyczy tematu pracy doktorskiej. Autor krótko opisuje różne metody modelowania molekularnego, od mechaniki kwantowej (QM), poprzez dynamikę molekularną (MD) z niektórymi jej specyficznymi rozszerzeniami, aż po modelowanie gruboziarniste (CG) i wieloskalowe. Ta część wstępu jest dość chaotyczna i moim zadaniem nie najlepiej napisana. Pierwszy akapit można było bez strat merytorycznych pominąć. Gdy kolejno wspomniane są metody QM, MD i CG warto było w bardziej klarowny sposób omówić dokładność i zakres praktycznej użyteczności różnych poziomów modelowania, z wyraźnym odniesieniem do symulacji wykorzystanych w pracy doktorskiej. W szczególności warto było dokładniej zaznaczyć praktyczne ograniczenia zakresów skal czasowych i rozmiarów modelowanych układów cząsteczkowych, dostępnych klasycznym metodom MD. Zabrakło też paru zdań o zasadniczych uproszczeniach metody MD. Wspominając wykorzystanie potencjału Lennard-Jones'a warto było zaznaczyć, że wersja 12-6 nie zawsze jest najbardziej dokładną, a wybierana jest głównie z powodu tego, że jest łatwa do całkowania numerycznego i umożliwia wykorzystanie relatywnie dużego kroku czasowego. Warto było również wspomnieć, że przybliżenia metody MD (przyjęty model oddziaływań, sposób całkowania równań ruchu, nałożone warunki

brzegowe, itp.) powodują tym większe błędy im większy i bardziej złożony jest modelowany obiekt. Dla przykładu, jeżeli do symulacji dużych przejść konformacyjnych molekuly białka użyjemy różnych wersji oprogramowanie dla pozornie tej samej metody MD to zwykle dostaniemy różniące się trajektorie dla takich samych przedziałów czasowych i identycznych warunków początkowych. Autor rozprawy zauważa, że opisywane w literaturze przykłady klasycznych symulacji MD nie pokazały rzadkich zjawisk przzerwania membran komórkowych. Warto zastanowić się, co mogło być tego powodem: zbyt krótki czas symulacji, niedokładność modelu oddziaływań cząsteczkowych, a może zastosowane warunki brzegowe? Pragnę jednak zaznaczyć, że im większy jest badany układ, im bardziej złożony jest jego skład chemiczny oraz im dłuższy jest czas rzeczywisty modelowanych zjawisk, tym mniej produktywna staje się klasyczna metoda MD. W takich przypadkach kombinacja metod CG i różnych „kierowanych” wersji metody MD wydaje się być warta rozważenie. W modelowaniu membran gruboziarnisty model Martini może być pomocnym narzędziem. Omawiając metody gruboziarniste autor wydaje się przypisywać im odpowiednik MD, jako jedyną opcję modelowania dynamiki. Istnieje przecież dynamika Monte Carlo i może być lepszym wyborem dla dużych układów makromolekularnych, dla których da się sensownie zdefiniować lokalne zmiany konformacyjne, możliwe w jednym kroku czasowym dynamiki MC. Nie wspomniano też możliwości wykorzystania opartych na wiedzy potencjałów statystycznych. Dzięki metodom dynamiki MC i statystycznym polom siłowym możliwe jest przewidywanie skomplikowanych struktur i ich przybliżonych trajektorii. Metody CG, w szczególności wykorzystujące statystyczne modele oddziaływań, mogą być doskonałym narzędziem dostarczającym dane dla „kierowanych” symulacji pełno-atomową metodą MD.

Rozdział 2 rozprawy, zatytułowany **“Hypotheses”** zawiera nieco zawiłe sformułowanie założeń i celów pracy doktorskiej. W skrócie, zakłada się, że stosując znane metody modelowania cząsteczkowego można pokazać, że są one skutecznym narzędziem do przewidywania antybakteryjnej aktywności powierzchniowo czynnych związków typu Gemini.

W Rozdziale 3, **“Summary of results”**, podsumowano uzyskane (i opublikowane wcześniej) wyniki prac badawczych stanowiących podstawę prezentowanej rozprawy doktorskiej. Początek tego rozdziału zawiera zwięzły harmonogram realizowanych prac wsparty uzasadnieniem przyjętej strategii badawczej. Dalej opisano kolejne etapy realizacji podjętych celów.

Na wstępnym etapie badań przeprowadzono staranne symulacje działania na modelowe błony komórkowe dwóch wybranych, i dobrze znanych, związków o działaniu antybakteryjnym (oktenidyna-OCT i chloroheksydyna- CHX). Oba działają na bakterie Gram-dodanie jak i Gram-ujemne. Modele uwzględniały zasadnicze różnice składu błon komórkowych eukariotów i bakterii. Błony komórek bakterii są ujemnie naładowane, a błony komórkowe zwierzęce są w przybliżeniu elektrycznie obojętne. Symulacje MD, po uprzedniej optymalizacji stałych siłowych, wykonane były z użyciem narzędzia CHARMM. Uzyskane wyniki zweryfikowano doświadczalnie, w stopniu dostępnym względnie prostym i powszechnie stosowanym metodom. Wymagało to od doktoranta zarówno umiejętności korzystania z takich metod, jak też ich właściwego wyboru. Symulacje pokazały przekonujący obraz wnikania badanych molekuł czynnych antybakteryjnie w błony komórkowe. Obserwowano to zarówno dla modelowych błon bakteryjnych, charakteryzujących się silnie naładowanymi ujemnie powierzchniami, jak też dla modelowych błon obojętnych elektrostatycznie. Molekuły OCT wykazały tendencje do agregacji, także przed penetracją powierzchni modelowej błony. Cały przedstawiony obraz cząsteczkowy modelowanych procesów wydaje się być jakościowo

poprawnym. Symulacje pokazały, iż badane związki antybakteryjne znacznie osłabiają charakterystyczną sztywność ujemnie naładowanych błon bakteryjnych. Ułatwia to proces ich destrukcji umożliwiając konkurencyjne dla samo-odbudowy błony powstawanie pęcherzyków lipidowych. Te obserwacje są oczywiście cenne i interesujące, ale zabrakło mi szerszej dyskusji dotyczącej możliwych zniekształceń rzeczywistego obrazu badanych zjawisk wynikających z przyjętych uproszczeń. Obliczenia MD zostały przeprowadzone dla modeli błon z określonymi warunkami brzegowymi dla modelowych fragmentów. Prawdziwa membrana jest zwykle dużo większym obiektem i wymuszane w symulacjach ograniczenia zawsze zniekształcają jej obraz, bez względu na dokładność modelu atomowego i modelu dynamiki. Gdy ogląda się filmy ilustrujące zarejestrowane trajektorie MD, to widać wyraźnie, że albo nałożone warunki brzegowe, albo też ograniczony czas symulacji, mogą uniemożliwiać zaobserwowanie niektórych bardziej rozległych (w czasie i przestrzeni) fluktuacji strukturalnych.

W dalszej części pracy doktorskiej skupiono się na badaniu metodami teoretycznymi aktywności antybakteryjnej powierzchniowo czynnych związków typu Gemini. Struktura molekularna tych surfaktantów zawiera dwie bliźniacze fragmenty hydrofobowe, których polarne (elektroujemne) końce połączone są giętkim łańcuchem peptydowym. Stworzono bazę danych zawierającą 250 molekuł tego typu, a po starannej analizie statystycznej wybrano 25 molekuł, reprezentujących grupy podobnych związków. Dla wybranych molekuł i nowego modelu błony lipidowej, o składzie cząsteczkowym dokładniej reprezentującym skład błon bakteryjnych (niż wykorzystano poprzednio) zbadano aktywność antybakteryjną tych surfaktantów, metodą symulacji MD. Bardzo starannie opisano szybkość i sposób wnikania surfaktantów w strukturę błony, zmiany jej giętkości i inne parametry, mogące mieć wpływ na skuteczność możliwych środków antybakteryjnych. Wydaje się, że uzyskane wyniki mogą być użyteczne w projektowaniu nowych leków antybakteryjnych, ułatwiając wybór optymalnych związków powierzchniowo czynnych typu Gemini.

W swoich badaniach doktorant słusznie zauważył, że dotychczas badane modele komórkowe były bardzo wyidealizowane pod względem założonego składu cząsteczkowego. W pracy ***“Towards Mimetic Membrane Systems in Molecular Dynamics: Characteristics of E. Coli Membrane System”*** opisano próbę stworzenia znacznie dokładniejszego modelu symulacyjnego. To bardzo ciekawa praca pokazująca jak ważne są wszystkie elementy takiego modelu. Uzyskane wyniki mogą stanowić źródło dodatkowych informacji dla podejmowanych ostatnio wysiłkach realistycznego modelowania molekularnego całych komórek. Badania takie prowadzone są od pewnego czasu w kilku miejscach, na przykład w grupie fizyko-chemików z Michigan State University, którą kieruje profesor Michael Feig. Warto zapoznać się z jego kilkoma publikacjami na ten temat.

Korzystając z wcześniejszych doświadczeń uzyskanych podczas modelowania membran i ich oddziaływania ze związkami powierzchniowo czynnymi doktorant stworzył pakiet oprogramowania, umożliwiający innym badaczom przeprowadzenie własnych symulacji pozwalających szacować antybakteryjne właściwości surfaktantów zawierających molekuły typu Gemini. Oprogramowanie to może być użytecznym narzędziem informatycznym do wykorzystania na wstępnych etapach racjonalnego projektowania nowych leków. Nie testowałem tego oprogramowania, ale jego opis i przedstawiane wyniki przykładowych symulacji są przekonujące. Ciekaw jestem, czy łatwo by było stworzyć serwer internetowy oparty na tym oprogramowaniu. Oczywiście zadaje sobie sprawę z kosztów (w sensie czasu komputerowego) bezpłatnego udostępnienia takiego serwera. Czy jest to możliwe?

Podsumowując moją ocenę prezentowanej rozprawy pragnę zwrócić uwagę na kilka mocnych stron tego doktoratu. Po pierwsze, prezentowane badania mają szeroki kontekst interdyscyplinarny, co wymagało przyswojenia znacznej wiedzy z zakresu biologii cząsteczkowej, wybranych zagadnień farmakologii, ze szczególnym uwzględnieniem komputerowego wspomagania projektowania nowych leków i umiejętności posługiwania się zaawansowanymi technikami modelowania cząsteczkowego. Po drugie, tematyka prezentowanych badań jest stosownie nakierowana na najszybciej rozwijającą się i ważną społecznie dziedzinę badań bio-fizycznych. Po trzecie, prezentowane badania są dobrze udokumentowane, uzyskane wyniki są bardzo ciekawe, o potencjalnie dużym znaczeniu dla rozwoju nowatorskich strategii stosowanych w projektowaniu skutecznych leków. Wyniki pracy doktorskiej zostały w całości opublikowane. Co też ważne, wszystkie publikacje były recenzowane przez niezależnych ekspertów i zostały przez nich odpowiednio ocenione, jako istotne i warte udostępnienia społeczności naukowej. Wnioskuje zatem o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

Uważam też, że rozprawa doktorska Pana magistra inż. Mateusza Rzyckiego spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i ustawowe (Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*) stawiane pracom doktorskim. Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne, Politechniki Wrocławskiej, z wnioskiem o dopuszczenie Pana Magistra inżyniera Mateusza Rzyckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Andrzej Koliński