



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Joanna Zielińska

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

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Promotor: prof. dr hab. Tomasz Bączek

Gdańsk 2020

*Panu prof. dr. hab. Tomaszowi Bączkowi
dziękuję za ogromną pomoc oraz wsparcie
okazane mi podczas przygotowywania
niniejszej rozprawy.*

*Pragnę serdecznie podziękować
pracownikom Katedry i Zakładu Chemii
Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego za życzliwość, pomoc i wiele
cennych lekcji.*

*Szczególne podziękowania pragnę złożyć
dr. hab. inż. Jackowi Czubowi i dr. inż.
Miłoszowi Wieczorowi z Katedry Chemii
Fizycznej Politechniki Gdańskiej za ich
nieocenioną pomoc i owocną współpracę.*

Moim rodzicom oraz bratu dziękuję za pomoc, otuchę oraz wsparcie, których nigdy mi nie brakowało.

Badania będące przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej były finansowane z następujących źródeł:

- środki Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) przyznanego na podstawie MNiSW-DS-6002-4693-23/WA/12 z dnia 12 lipca 2012 r. na lata 2012-2017 Gdańskiemu Uniwersytetowi Medycznemu,
- grant dla Młodych Naukowców Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego realizowany w latach 2017-2018 (MN 01-0314/08/506),
- grant „Opus” (2015/19/B/NZ7/02159), pt. „Mechanizm molekularny toksyczności antybiotyku przeciwgrzybiczego amfoterycyny B” (kierownik: prof. dr hab. Wiesław Gruszecki, Wydział Matematyki, Fizyki I Informatyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie), realizowany w latach 2015-2018 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki,
- projekt POWER2 (POWR.03.02.00-00-I026/17-00) – Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Spis treści

| | |
|---|----|
| Streszczenie | 8 |
| Abstract | 9 |
| 1. Działanie amfoterycyny B | 10 |
| 1.1. Wprowadzenie | 10 |
| 1.2. Leki przeciwgrzybicze stosowane w leczeniu grzybic układowych | 10 |
| 1.3. Charakterystyka amfoterycyny B | 12 |
| 1.4. Mechanizm działania amfoterycyny B | 14 |
| 1.5. Pochodne amfoterycyny B i poszukiwanie nowych leków przeciwgrzybiczych | 16 |
| 2. Dynamika molekularna | 19 |
| 2.1. Wprowadzenie | 19 |
| 2.2. Przybliżenie Borna-Oppenheimera | 19 |
| 2.3. Pole siłowe | 20 |
| 2.4. Generowanie trajektorii układu | 24 |
| 2.5. Termodynamika układu | 25 |
| 3. Cel pracy | 26 |
| 4. Wyniki | 27 |
| 4.1. Badania procesu wnikania amfoterycyny B do błon lipidowych | 27 |
| 4.2. Badania przebiegu dimeryzacji cząsteczek amfoterycyny B w środowisku wodnym | 29 |
| 4.3. Badania mechanizmu oligomeryzacji oraz wiązania się cząsteczek amfoterycyny B z błoną lipidową – badania z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej i dynamiki molekularnej | 31 |
| 5. Wnioski | 33 |
| Bibliografia | 35 |

Wykaz stosowanych skrótów:

AIDS – zespół nabytego upośledzenia odporności (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*)

AmB – amfoterycyna B (ang. *amphotericin B*)

AmE – ester metylowy amfoterycyny (ang. *amphotericin B methyl ester*)

CD – dichroizm kołowy (ang. *circular dichroism*)

CUN, OUN – centralny (ośrodkowy) układ nerwowy

DLC – kanał podwójny (ang. *double-length channel*)

DMPC – 1,2-dimirystoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
(ang. *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*)

DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)

DPPC – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
(ang. *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*)

GUV – olbrzymie jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe (ang. *giant unilamellar vesicles*)

MFAmE – ester metylowy N-metylo-N-D-fruktopiranozylo-amfoterycyny B
(ang. *N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester*)

MD – dynamika molekularna (ang. *molecular dynamics*)

MDR – oporność wielolekowa (ang. *multidrug resistance*)

MIC – minimalne stężenie związku powodujące zahamowanie wzrostu drobnoustrojów
(ang. *minimal inhibitory concentration*)

PAmE – ester metylowy N-(1-piperidynopropionilo)-amfoterycyny B
(ang. *N-(1-piperidinepropionyl) amphotericin B methyl ester*)

PES – powierzchnia energii potencjalnej (ang. *potential energy surface*)

POPC – 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
(ang. *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*)

SLC – kanał pojedynczy (ang. *single-length channel*)

SASA – powierzchnia dostępna dla rozpuszczalnika (ang. *solvent accessible surface area*)

Publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej:

P1. Neumann, A., Wieczór, M., Zielińska, J., Bagiński, M., Czub, J. Membrane sterols modulate the binding mode of amphotericin B without affecting its affinity for a lipid bilayer. *Langmuir* **32**, 3452-3461 (2016). <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.langmuir.5b04433>

P2. Zielińska, J., Wieczór, M., Bączek, T., Gruszecki, M., Czub, J. Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail. *Scientific Reports* **6**, 19109 (2016). <https://www.nature.com/articles/srep19109>

P3. Grela, E., Wieczór, M., Luchowski, R., Zielińska, J., Barzycka, A., Grudziński, W., Nowak, K., Tarkowski, P., Czub, J., Gruszecki, W.I. Mechanism of binding of antifungal antibiotic amphotericin B to lipid membranes: an insight from combined single-membrane imaging, microspectroscopy and molecular dynamics. *Molecular Pharmaceutics* **15**, 4202-4213 (2018). <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00572>

Streszczenie

Pomimo intensywnego rozwoju medycyny, ciężkie zakażenia grzybicze są wciąż dużym problemem w terapii, zwłaszcza u osób z upośledzoną odpornością. Jednym z kluczowych leków stosowanych w leczeniu grzybic układu jest amfoterycyna B – antybiotyk z grupy makrolidów polienowych. Lek ten posiada dużo pożądanych właściwości, jak zdolność przenikania bariery krew-mózg czy brak indukowania oporności. Niestety wywołuje też wiele reakcji ubocznych. Pomimo istnienia amfoterycyny B na rynku farmaceutycznym od ponad sześćdziesięciu lat, dokładny mechanizm jej działania jest zbyt słabo znany, żeby zaproponować racjonalne modyfikacje struktury. Obszar tematyczny niniejszej pracy doktorskiej obejmuje analizę pierwszych etapów działania amfoterycyny B na poziomie molekularnym.

Przeprowadzone w ramach badań symulacje procesu wnikania cząsteczki amfoterycyny B do wnętrza błony komórkowej wykazały, że proces wnikania leku jest korzystny termodynamicznie i w minimalnym stopniu zależy od rodzaju błony komórkowej. Błony zawierające sterole (30% mol cholesterolu i 30% mol ergosterolu) stabilizują ułożenie leku na poziomie jednej z dwuwarstw błony pozwalając na korzystne oddziaływania pomiędzy makrolidem a niepolarnym wnętrzem błony. Dodatkowo błony zawierające sterole faworyzują ułożenie cząsteczek leku prostopadle do płaszczyzny błony komórkowej, co może wpływać na tworzenie się i stabilność kanałów transbłonowych.

Analiza kinetyki i termodynamiki dimeryzacji amfoterycyny B w środowisku wodnym wykazała, że dimery przyjmują zarówno orientację równoległą (52%), jak i antyrównoległą (47%) z niemal identycznym prawdopodobieństwem, co odzwierciedla brak preferencji dla którejkolwiek orientacji. Ustalono także, że stała szybkości dimeryzacji wynosi ok. $k_{ol} = 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dimeryzacja jest głównie napędzana przez oddziaływania hydrofobowe, natomiast na przebieg reakcji nie ma wpływu obecność grup zjonizowanych (karboksylowej i aminowej).

Dzięki zastosowaniu dynamiki molekularnej możliwa była ostatecznie interpretacja wyników uzyskanych techniką spektroskopii fluorescencyjnej dotyczących wnikania cząsteczek amfoterycyny B do wnętrza liposomów złożonych z różnych rodzajów fosfolipidów (DPPC, DMPC, POPC). Ustalono, że większe oligomery jak np. tetramery znajdujące się wewnątrz dwuwarstwy lipidowej są stabilizowane przez sterole, które są także odpowiedzialne za zmianę organizacji oligomerów we wnętrzu błony.

Abstract

Despite the intensive development of medicine, severe fungal infections still remain a pressing problem in the therapy of mycoses, especially for people with impaired immunity. One of the drugs used in systemic antifungal therapy is amphotericin B – a prominent polyene macrolide antibiotic. This drug has many unique properties, such as the ability to penetrate the blood-brain barrier or the very low resistance induction rates. Unfortunately, it also causes many adverse reactions. Despite its 60-years presence on the pharmaceutical market, the mechanism of action of amphotericin B is still insufficiently known to propose reasonable changes in its structure. The scope of the doctoral thesis covers the initial steps in the mechanism of action of amphotericin B on the molecular level.

Molecular dynamics simulations of the process of penetration of the amphotericin B molecule into the cell membrane have shown that drug penetration is thermodynamically favourable and minimally depends on cell membrane composition. Membranes containing sterols (30 mol % cholesterol and 30 mol % ergosterol) stabilize the drug alignment at one of the membrane bilayers, allowing for favorable interactions between the macrolide and the non-polar interior of the membrane. Nevertheless, sterol-rich membranes (30% cholesterol and ergosterol) induce a perpendicular alignment of the antibiotic molecules relative to the cell membrane plane, which can affect the formation and stability of transmembrane channels.

Analysis of kinetic and thermodynamic properties of amphotericin B dimerization in an aqueous environment showed that dimers exist in both parallel (52%) and antiparallel (47%) orientations with almost identical probabilities – reflecting the lack of preference for either orientation. The dimerization rate constant was also calculated as about $k_{ol} = 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dimerization is mainly hydrophobically driven, while the reaction is not affected by the presence of ionized (carboxyl and amino) groups.

By using molecular dynamics, it was finally possible to interpret the results obtained by fluorescence spectroscopy on the penetration of amphotericin B molecules into liposomes composed of various types of phospholipids (DPPC, DMPC, POPC). It was established that larger oligomers, such as tetramers inside the lipid bilayer, are stabilized by sterols, which are also responsible for reorganizing the oligomers inside the membrane.

1. Działanie amfoterycyny B

1.1. Wprowadzenie

Pomimo intensywnego rozwoju medycyny w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat, problem grzybic układowych wydaje się wciąż nieprzedawniony. Wiąże się to z rosnącą ilością zakażeń, a przede wszystkim z coraz większą liczbą osób o obniżonej odporności lub nieprawidłowościach w działaniu układu immunologicznego [1]. Paradoksalnie ma na to też wpływ sam rozwój medycyny, który wraz z wprowadzeniem do leczenia większej ilości antybiotyków o szerokim spektrum działania, wynikający zarówno z nowych rodzajów, jak i częstszej antybiotykoterapii, powoduje, że coraz częściej można spotykać się ze zjawiskiem powstawania oporności wielolekowej (MDR) u grzybów. Niestety, u pacjentów z obniżoną opornością większość ogólnoukładowych zakażeń grzybiczych kończy się śmiertelnie – szacuje się, że różnego rodzaju grzybice układowe są powodem śmierci ok. 50% pacjentów chorych na AIDS i ok. 70% zakażonych pacjentów z powikłaniami pooperacyjnymi [2].

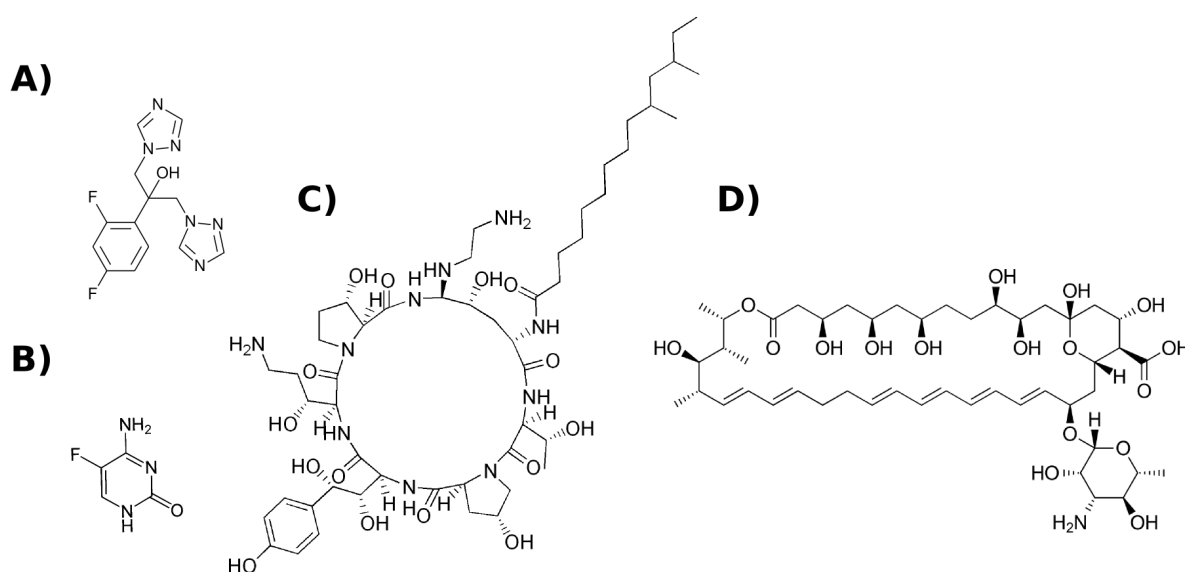
1.2. Leki przeciwgrzybicze stosowane w leczeniu grzybic układowych

Leczenie grzybic powierzchniowych (tj. skóry, paznokci i włosów) jest wysoce efektywne, natomiast medycyna wciąż boryka się z problemem nieskutecznego leczenia grzybic układowych [3]. Aktualnie dostępne leki można zakwalifikować do 4 różnych klas [2]:

1. Azole
2. Analogi nukleozydowe
3. Kandyny
4. Polieni

Leki należące do rodziny azoli, czyli N-podstawione pochodne imidazolu i triazolu, zostały wprowadzone do leczenia w latach 80. Ich działanie polega na blokowaniu syntezy ergosterolu w błonie komórkowej poprzez hamowanie demetylazy 1,4- α -lanosterolu zależnej od cytochromu P450. Powoduje to gromadzenie się w komórce prekursorów ergosterolu, takich jak lanosterol, 1,4-dwumetylolanosterol i 2,4-metylenodwuhydro lanosterol. Zazwyczaj azole są lekami pierwszego rzutu przy infekcjach grzybiczych, ponieważ są dość dobrze

tolerowane przez pacjentów. Do tej rodziny należą m.in.: ketokonazol z grupy dwuazoli oraz flukonazol (Rysunek 1A), itrakonazol, worykonazol, posakonazol i rawukonazol należące do grupy trójazoli – związków heterocyklicznych posiadających w pierścieniu azolowym 3 atomy azotu [4]. Azole, ze względu na powinowactwo do cytochromu P450 metabolizującego ksenobiotyki i biorącego udział w biotransformacji związków endogennych, nie są pozbawione negatywnego wpływu na komfort leczenia pacjenta; ponadto wchodzą w interakcje z innymi równocześnie stosowanymi lekami. Zdecydowanie największą wadą azoli jest częste pojawianie się wtórnej oporności podczas ich stosowania [5]. Najczęściej stosuje się je w leczeniu zakażeń drożdżakami z rodzaju *Candida* (kandydoz).



Rysunek 1. Wybrane leki stosowane w leczeniu grzybic układowych: A) flukonazol, B) 5-fluorocytozyna, C) kaspofungina oraz D) nystatyna.

Kolejną grupą leków przeciwgrzybiczych są analogi nukleozydowe, w skład których wchodzi 5-fluorocytozyna (Rysunek 1B). Lek ten zostaje przekształcony przez deaminazę cytozynową do fluorouracylu, co skutkuje zablokowaniem syntezy kwasów nukleinowych oraz inhibicją niektórych enzymów. 5-fluorocytozyna jest dobrze tolerowana przez pacjentów, niestety odznacza się bardzo dużą tendencją do indukowania oporności, dlatego na ogół nie jest stosowana jako jedyny lek podczas leczenia. Standardowo jest podawana równolegle z amfoterycyną B, co zwiększa skuteczność terapii przeciwgrzybiczej [6].

Najmłodszą grupą leków przeciwgrzybiczych są kandyny [7]. Należą do niej m.in. kaspofungina (Rysunek 1C), mikafungina oraz anidulafungina. Mechanizm działania kandyn opiera się na upośledzeniu funkcji syntazy β -1,3-glukanowej (której pozbawione są komórki ssaków). W efekcie w komórce grzyba nie jest produkowany glukan, bez którego ściana komórkowa traci swoją integralność. Unikalny mechanizm działania kandyn sprawia,

że są stosunkowo bezpieczne w stosowaniu. Są lekami z wyboru w leczeniu kandydoz oraz aspergilozy, zwłaszcza po uprzednich niepowodzeniach z wykorzystaniem azoli. Pomimo dość szerokiego spektrum działania, leki te nie są skuteczne w leczeniu zakażeń grzybami pleśniowymi z rodzaju *Fusarium*, *Zygomycetes* oraz drożdżaków z gatunku *Trichosporium beigelli*. Niekłą aktywność wykazują także wobec *Mucor* oraz *Cryptococcus* [8]. Ponadto kandydiny nie są w stanie penetrować bariery krew-mózg, przez co nie znajdują zastosowania w leczeniu grzybic ośrodkowego układu nerwowego. Pomimo wymienionych wad, duże bezpieczeństwo ich stosowania oraz wysoka selektywność sprawiają, że są to jedne z najbardziej obiecujących leków w terapii grzybic układowych.

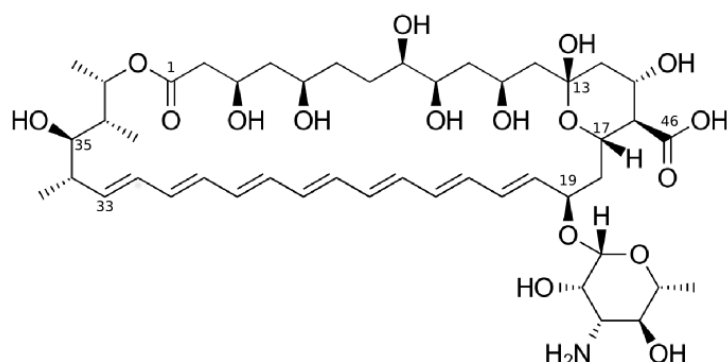
Ostatnią grupą leków, a zarazem najstarszą z nich, są polieny makrolidowe, do których należą m.in. amfoterycyna B, natamycyna oraz nystatyna (Rysunek 1D). Mechanizm działania tych antybiotyków polega na selektywnym oddziaływaniu z ergosterolem i zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej grzybów [9]. Efektem jest zaburzenie homeostazy wnętrza komórki (m.in. wpływ jonów potasu) powodujące następnie lizę i jej śmierć. Dowiedziono także, że makrolidy są w stanie aktywować wytwarzanie cytokin i innych czynników prozapalnych, jak np. $TNF\alpha$ czy $IL-1\beta$ [10, 11]. Makrolidy polienowe, a zwłaszcza amfoterycyna B, mają najszersze spektrum działania, obejmujące nie tylko grzyby i drożdżaki, ale także niektóre gatunki bakterii i pierwotniaków [9]. Mimo że jest to najdłużej istniejąca na rynku grupa leków, do tej pory nie udało się wprowadzić nowych pochodnych o satysfakcjonujących właściwościach. Dużą przeszkodą jest brak wyczerpującej wiedzy na temat mechanizmu ich selektywności.

1.3. Charakterystyka amfoterycyny B

Amfoterycyna B należy do grupy makrolidów polienowych o działaniu przeciwgrzybiczym. Została wyizolowana z bakterii *Streptomyces nodosus* znalezionych w dorzeczu rzeki Orinoco w Wenezueli [12]. Jej wzór chemiczny to $C_{47}H_{73}NO_{17}$, a masa molowa wynosi 924,1 g/mol. Struktura chemiczna tego związku została ustalona na przełomie lat 60. i 70. ubiegłego wieku [13], natomiast pełen model struktury uwzględniający konfigurację absolutną centrów stereogenicznych został zweryfikowany przy użyciu techniki rentgenografii strukturalnej pochodnej amfoterycyny B – N-jodoacetyloamfoterycyny B w 1971 roku [14]. W 1959 roku miało miejsce pierwsze użycie tego leku w terapii klinicznej.

Podstawowym elementem budowy amfoterycyny B jest duży, 38-członowy makrocykliczny pierścień laktonowy połączony wiązaniem β -glikozydowym z resztą aminocukru – mykozaminą D – poprzez węgiel C19. Makrolakton charakteryzuje budowa amfipatyczna: atomy węgla C20-C33 są połączone szeregiem wiązań podwójnych w konformacji all-trans tworząc część hydrofobową (polien), podczas gdy po przeciwnej stronie

makrolaktonu występuje odznaczający się większą elastycznością fragment polihydroksylowy – polioliol (atomy C3, C5, C8, C9, C11, C13). Dodatkowo, w strukturze występuje 6-członowy hemiketal łączący atomy węgla C13 i C17 (Rysunek 2).



Rysunek 2. Struktura chemiczna amfoterycyny B.

Oprócz właściwości amfipatycznych, amfoterycyna B wykazuje także właściwości amfoteryczne. Jest to wynik występowania w jej strukturze zarówno grupy karboksylowej, jak i aminowej. W warunkach fizjologicznego pH (ok. 7,0) związek występuje w postaci tzw. „zwitterjonu”, czyli jonu dwubiegunowego. Wspomniana wyżej budowa amfipatyczna związku, a dokładnie występowanie fragmentu hydrofobowego w strukturze leku powodują, że amfoterycyna B posiada silną tendencję do samoagregacji w środowisku wodnym. Agregacja następuje samoistnie już przy stężeniu leku powyżej 10^{-7} M [15]. Wiąże się to też ze słabą rozpuszczalnością amfoterycyny B, co przekłada się na trudności w procesie formułacji leku – lek podawany jest w postaci wlewów dożylnych pod ścisłą kontrolą lekarza [16].

Do tej pory amfoterycyna B jest jednym z leków o najszerszym spektrum działania, a do gatunków grzybów wrażliwych na nią zaliczyć można m.in.: *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans* oraz *Zygomycetes spp.*

Pomimo istnienia na rynku farmaceutycznym od ponad 60 lat, antybiotyk ten wciąż pozostaje aktywny wobec większości znanych gatunków grzybów [17]. Do nielicznych gatunków opornych na działanie amfoterycyny B zaliczają się grzyby takie jak *Candida dematiaceae*, *Scedosporium spp.* oraz *Pneumocystis jiroveci*. W przypadku ostatniego wymienionego patogenu powodem braku występowania wrażliwości na działanie leku jest zmieniony skład błony komórkowej (w skład błony wchodzi cholesterol). Amfoterycyna B, jako jeden z niewielu środków leczniczych, jest aktywna wobec *Aspergillus spp.* [18]. Bardzo podobne lub nawet szersze spektrum działania do amfoterycyny B wykazują echinokandyny, niestety charakteryzuje je pierwotna oporność w stosunku do gatunków z rodzaju *Fusarium* i *Zygomycetes*.

Oprócz wymienionego powyżej działania przeciwgrzybiczego, amfoterycyna B wykazuje potencjał immunostymulacyjny, retrowirusowy, a także przeciwprionowy [10]. Lek ten jest

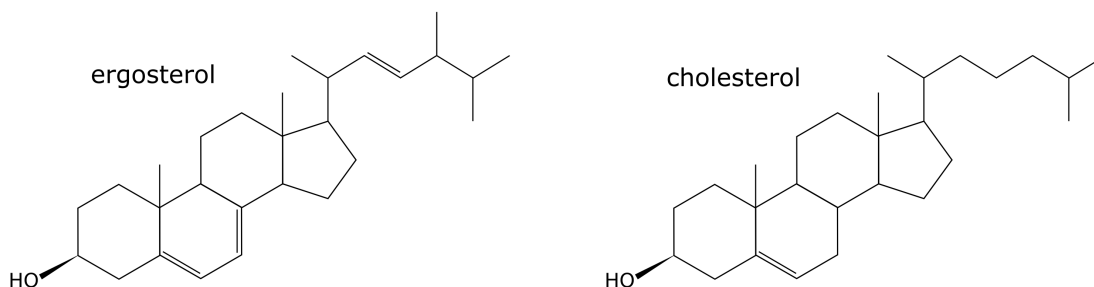
z powodzeniem stosowany również w zakażeniach pierwotniakami *Leishmania brasiliensis* i *Leishmania mexicana* [19]. Udowodniono także, że może spowalniać tempo rozwoju niektórych infekcji bakteryjnych oraz wzrost nowotworów [10]. Jako jeden z nielicznych leków przeciwgrzybiczych jest w stanie przenikać do większości tkanek, w tym do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [20].

Pomimo wielu pożądanych właściwości, amfoterycyna B nie jest pozbawiona wad. Niska rozpuszczalność [15] jest przyczyną słabego wchłaniania leku z przewodu pokarmowego (na poziomie kilku procent) [20], co wymusza stosowanie leku w formie wlewów dożylnych. Zdecydowanie największą wadą podczas stosowania amfoterycyny B jest jej niska selektywność działania w stosunku do komórek patogenu i gospodarza. Powoduje to, że lek ten jest zazwyczaj ostatnim na drodze wyboru skutecznej farmakoterapii. Konieczne jest stosowanie niskich dawek leku, które pomimo że zmniejszają efekty jego toksyczności, wiążą się dodatkowo z niższą efektywnością działania. Najczęściej spotykanymi efektami ubocznymi stosowania leku jest anemia, zaburzenia liczby leukocytów i stężenia elektrolitów, hepatotoksyczność, ototoksyczność, a przede wszystkim nefrotoksyczność. Problem ten udało się rozwiązać częściowo poprzez stosowanie formułacji leku w postaci liposomów (*AmBisome liposomal* [Gilead], 50 mg, proszek do sporządzania dyspersji do infuzji), kompleksu lipidowego (*Abelcet* [Teva Pharmaceuticals], 5 mg/ml, koncentrat do sporządzania zawiesiny do infuzji) lub formy koloidalnej (*Amphocil* [Torrex Chesi Pharm GmbH], 100 mg, proszek do sporządzania roztworu do infuzji).

1.4. Mechanizm działania amfoterycyny B

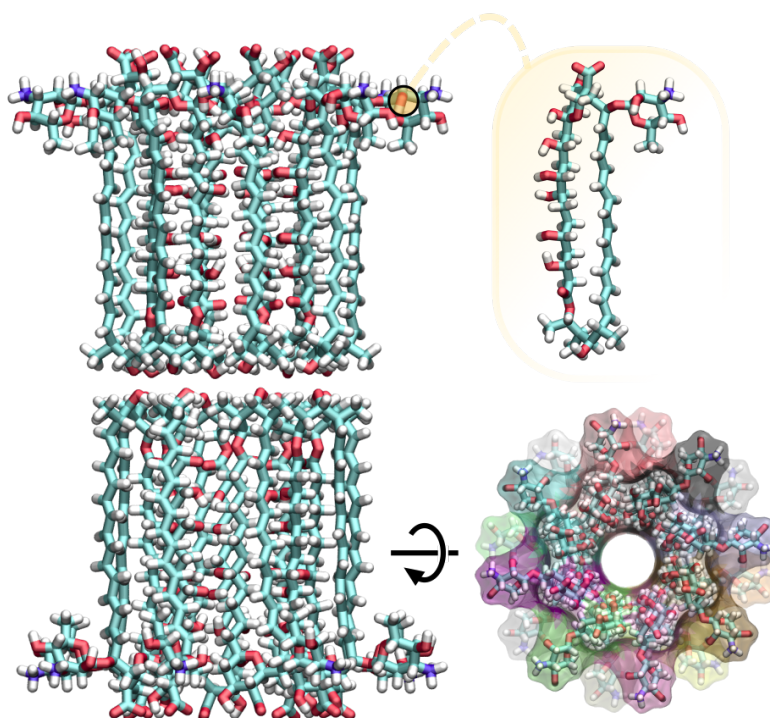
Dowiedziano, że mechanizm działania amfoterycyny B na poziomie komórkowym jest wynikiem zaburzenia integralności i funkcji błony komórkowej, co w efekcie spowalnia wzrost komórek oraz wywołuje ich lizę i śmierć. Co ciekawe, efekt działania leku jest ściśle zależny od stężenia leku w komórce: w niskich stężeniach (niewywołujących permabilizacji błony) amfoterycyna B może mieć także działanie immunostymulacyjne – najprawdopodobniej jest to wynik szybszej syntezy kwasów nukleinowych oraz zwiększonej wydajności fosforylacji oksydacyjnej wywołanej powstawaniem aktywnych form tlenu [21]. W wyższych stężeniach natomiast następuje wzrost przepuszczalności błony komórkowej [22]. W efekcie, podanie leku wywołuje niekontrolowany wypływ jonów (głównie potasu) z wnętrza błony komórkowej, które skutkuje zachwianiem homeostazy i potencjału błonowego. Oprócz jonów, spoza wnętrza komórki mogą wypływać także małe związki i metabolity, jak np. glukoza lub mocznik [23, 24]. Udowodniono eksperymentalnie, że wypływ jonów potasu jest skorelowany ze zmianą gradientu protonów w poprzek błony komórkowej [25].

Niestety, w przeciwieństwie do dobrze zbadanych skutków działania leku na poziomie komórkowym, mechanizm działania amfoterycyny B na poziomie molekularnym wciąż nie jest do końca poznany. Wiadomo natomiast, że występowanie steroli jest kluczowe dla działania amfoterycyny B, a różnice strukturalne pomiędzy występującym w komórkach ssaków cholesterolem a ergosterolem (Rysunek 3) zawartym w błonach komórkowych grzybów odpowiadają za selektywność leku. Istnieją dwie główne hipotezy na temat działania amfoterycyny B. Według pierwszej, lek pozycjonuje się na powierzchni błony i działa jak "gąbka", która potrafi ekstrahować sterole z wnętrza błony, zaburzając jej organizację i funkcje [26]. Natomiast według drugiej hipotezy, popartej bezpośrednimi obserwacjami przewodnictwa [27, 28], amfoterycyna B tworzy kanały transbłonowe odpowiedzialne za wypływ składników cytozolu i śmierć patogenu.



Rysunek 3. Struktura chemiczna ergosterolu i cholesterolu.

Pomimo bezpośredniej obserwacji prądu jonowego indukowanego przez amfoterycynę B, dotychczas nie udało się jednoznacznie określić, w jaki sposób miałyby formować się kanały odpowiedzialne za wypływ jonów z wnętrza błony komórkowej. Nie jest także znana przybliżona architektura tej struktury. Pierwszy model kanału utworzonego przez cząsteczki amfoterycyny B został zaproponowany w latach 70. [29]. Według tego modelu, kanał przypomina półpor o cylindrycznym kształcie, a cząsteczki amfoterycyny układają się tak, aby część hydrofilowa tworzyła wnętrze kanału, natomiast polieny mają kontakt z lipidami tworzącymi błonę komórkową (Rysunek 4). Reszta mykozaminy w tym samym czasie może korzystnie oddziaływać z resztami fosfolipidów na powierzchni błony. Jednocześnie cząsteczki steroli są odpowiedzialne za stabilizację struktury.



Rysunek 4. Struktura molekularna kanału transbłonowego typu DLC złożonego z cząsteczek amfoterycyny B.

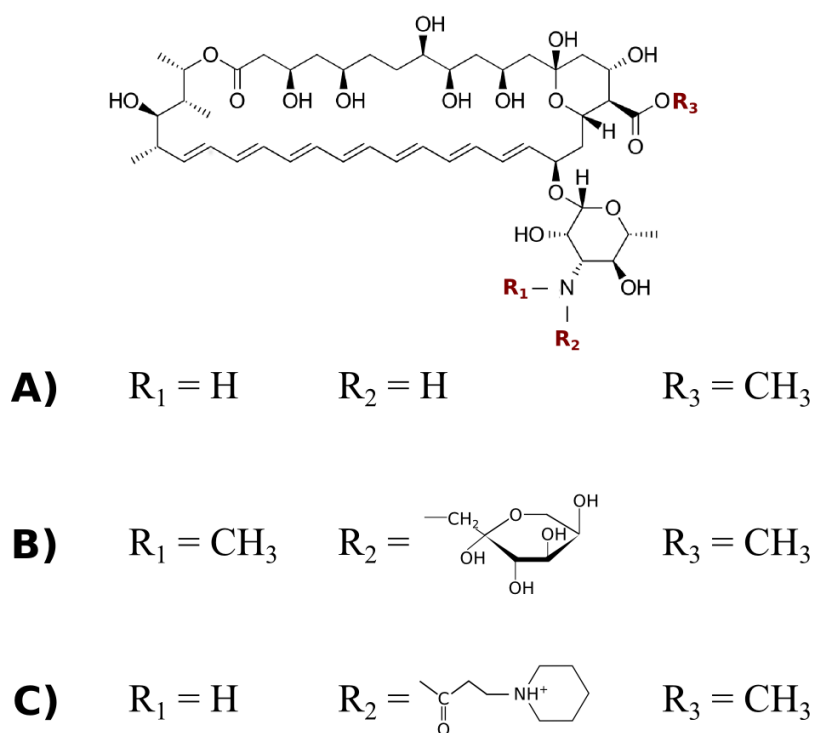
Wyżej opisany model kanału (typu SLC) wydaje się posiadać pewną nieścisłość. Długość pojedynczej cząsteczki amfoterycyny B to ok. 22 Å, a więc jest porównywalna z długością błony fosfolipidowej (ok. 20 Å). W związku z powyższym zaproponowano [30], że dwa przeciwnie ustawione pojedyncze kanały (SLC) mogą tworzyć tzw. kanał podwójny (DLC), który wypełniałby całą szerokość biwarstwy lipidowej (Rysunek 4). Warto wspomnieć, że istniejąca w dolnej części makrolidu grupa hydroksylowa przy węglu C35 (Rysunek 2) mogłaby stabilizować tak utworzony kanał poprzez wiązania wodorowe. Udowodniono też [26], że pochodna amfoterycyny B pozbawiona wspomnianej grupy hydroksylowej (35deOAmB) odznacza się dużo niższym potencjałem terapeutycznym (ponad 10-krotny wzrost wartości MIC [26]) – różnice w aktywności AmB oraz 35deOAmB nie zostały jednak jak dotąd wyjaśnione z wykorzystaniem modeli strukturalnych.

1.5. Pochodne amfoterycyny B i poszukiwanie nowych leków przeciwgrzybiczych

Pomimo że historia samej amfoterycyny B i jej zastosowania w leczeniu grzybic układowych sięga lat 60. ubiegłego wieku, lek nie doczekał się znaczących modyfikacji chemicznych, które znalazłyby zastosowanie w farmacji. Lek ten, z powodu wspomnianych już

unikalnych właściwości, jak chociażby niezmiennie, szerokie spektrum działania, wydaje się idealnym związkiem wiodącym do projektowania nowych leków przeciwgrzybiczych. Do tej pory modyfikacje właściwości terapeutycznych amfoterycyny B obejmowały proces formułacji leku oraz tworzenie nowych pochodnych leku. Największe sukcesy osiągnięto jednak wyłącznie w obszarze formułacji.

Przykładowo, preparat *AmBisome liposomal* [Gilead] oparty o formę liposomalną pozwolił na znaczną redukcję toksyczności poprzez wzrost dostępnej ilości formy monomerycznej amfoterycyny B [31]. *Abelcet* [Teva Pharmaceuticals] oraz *Amphocil* [Torrex Chesi Pharm GmbH] to dwa kolejne leki zwiększające dostępność monomerycznej formy amfoterycyny B.



Rysunek 5. Struktura chemiczna wybranych pochodnych amfoterycyny B: A) ester metylowy amfoterycyny B (AmE), B) ester metylowy N-metylo-N-D-fruktopiranozylo-amfoterycyny B (MFAmE) oraz C) ester metylowy N-(1-piperydynopropionylo)-amfoterycyny B (PAmE).

Modyfikacje samego leku skupiały się dotychczas na modyfikacjach grupy aminowej występującej w reszcie mykozaminy lub grupy karboksylowej jak ester metylowy amfoterycyny B – AmE (Rysunek 5A), ester metylowy N-metylo-N-D-fruktopiranozylo-amfoterycyny B – MFAmE (Rysunek 5B), lub ester metylowy N-(1-piperydynopropionylo)-amfoterycyny B – PAmE (Rysunek 5C). Żadna z pochodnych nie zachowywała jednak pierwotnej skuteczności leku przy jednoczesnym obniżeniu jej toksyczności.

Ostatnie modyfikacje struktury chemicznej skupiają się głównie na tworzeniu różnego rodzaju amidów amfoterycyny B [32–34]. Amidy mają mniejszą tendencję do oligomeryzacji, przez co uzyskuje się zmniejszoną toksyczność w stosunku do związku wiodącego.

Tylko nieliczne z zaprezentowanych pochodnych amfoterycyny B przeszły do etapów badań klinicznych, a żadna z nich nie trafiła dotąd na rynek, co jeszcze bardziej podkreśla konieczność dokładnego zbadania mechanizmu molekularnego leku, który zapewniłby podstawę do racjonalnego projektowania nowych, mniej toksycznych pochodnych.

2. Dynamika molekularna

2.1. Wprowadzenie

Dynamika molekularna (ang. *Molecular Dynamics*, MD) jest jedną z technik obliczeniowych pozwalających na badanie zachowania się układu molekuł i jego właściwości w czasie. Jest to metoda wysokorozdzielcza oraz dająca dużą kontrolę nad prowadzonym badaniem, jednocześnie niewymagająca ponoszenia przez użytkownika kosztów takich jak odczynniki czy eksploatacja sprzętu laboratoryjnego. Przybliżając rozwiązanie równania Schrödingera i następnie rozwiązując równania ruchu Newtona możemy w łatwy sposób generować trajektorię układu. Zastosowanie wspomnianych przybliżeń/uproszczeń m.in. przybliżenia adiabaticznego umożliwia symulowanie dużych układów biologicznych, z drugiej strony jednak wiąże się z pozbawieniem możliwości badania niektórych zjawisk, jak np. procesy fotochemiczne, przebieg reakcji chemicznych czy zjawisko jonizacji/rekombinacji ładunku [35]. Dynamika molekularna idealnie nadaje się natomiast do obserwowania zmian struktury i/lub oddziaływań jak np. mechanizm molekularny działania leków czy dynamika błon komórkowych.

2.2. Przybliżenie Borna-Oppenheimera

Podstawowym równaniem opisującym ewolucję funkcji falowej w mechanice kwantowej jest zależne od czasu równanie Schrödingera [36]:

$$\hat{H}\Psi = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi \quad (1)$$

W stanie stacjonarnym układu, czyli w sytuacji, gdy nie następuje żadna zmiana stanu kwantowego, oraz gdy potencjał nie zależy jawnie od czasu, układ jest dobrze opisywany niezależnym od czasu równaniem Schrödingera. Wówczas rozwiązanie równania Schrödingera sprowadza się do rozwiązania równania własnego energii:

$$\hat{H}\Psi_i = E_i\Psi_i \quad (2)$$

Rozwiązanie równania Schrödingera jest proste, jeżeli rozpatrywanym układem jest atom wodoropodobny, czyli jednoatomowy układ złożony z punktowego jądra i jednego elektronu, natomiast głównym obszarem zastosowań badań fizykochemicznych są badania

układów makromolekularnych. Dodawanie do układu coraz większej liczby elektronów i atomów powoduje lawinowy wzrost złożoności obliczeniowej, wynikający z konieczności opisu dodatkowo występujących oddziaływań pomiędzy nimi. W związku z tym, konieczne jest zastosowanie kilku przybliżeń w celu uproszczenia problemu. Pierwszym uproszczeniem jest zastosowanie tzw. przybliżenia adiabatyicznego [35]. Ponieważ masa elektronu jest zanedbywalnie mała w stosunku do masy jądra (masa elektronu wynosi 1/1836 masy protonu), trajektoria układu zależy w największym stopniu od ruchu samych jąder atomów, a elektrony dostosowują się do ich chwilowej konfiguracji. Stosując przybliżenie adiabatyiczne, rozwiązania funkcji falowej można zatem poszukiwać w postaci:

$$\Psi_i = \psi_i(r; R)\chi_i(R) \quad (3)$$

W powyższym równaniu funkcja falowa ψ zależy wyłącznie od położenia elektronów, natomiast χ_i jest zależna tylko od współrzędnych jąder.

Stosując następne niewielkie przybliżenie – przybliżenie Borna-Oppenheimera [36], które zanedbuje pierwszą poprawkę rachunku zaburzeń do Hamiltonianu energii elektronowej [36], otrzymujemy:

$$[T_n + E_i^{el}(R)]\chi_i(R) = E_i\chi_i(R) \quad (4)$$

gdzie: T_n jest operatorem energii kinetycznej jąder, E^{el} operatorem energii potencjalnej elektronów, a E_i operatorem energii potencjalnej (zawierającym energię kinetyczną jąder) i zależy wyłącznie od energii elektronów. W takim ujęciu samą cząsteczkę traktuje się jako układ złożony z jąder umieszczony w skalarnym polu pochodzącym od elektronów [35]. Bezpośrednim skutkiem zastosowania przybliżenia Borna-Oppenheimera jest otrzymanie pewnej funkcji energii zwanej powierzchnią energii potencjalnej (ang. *potential energy surface*, PES) czyli przypisania określonej konfiguracji układu (R) konkretnej wartości energii stanu podstawowego. Zgodnie z twierdzeniem Hellmanna-Feynmana [36], siły działające na jądra są dane jako ujemny gradient tej energii:

$$F = -\frac{\partial}{\partial R}E^{el} \quad (5)$$

Połączenie powyższych równań z klasycznymi równaniami ruchu Newtona pozwala na propagację ruchu układu w czasie.

2.3. Pole siłowe

Aby badania układów biologicznych *in silico* były możliwe, należy skonstruować taką funkcję energii potencjalnej V , która przy jednoczesnym zachowaniu umiarkowanej

złożoności obliczeniowej byłaby w stanie jak najwierniej odtworzyć powierzchnię energii potencjalnej będącej wynikiem zastosowania przybliżenia Borna-Oppenheimera. Taka właśnie postać funkcji energii potencjalnej nazywana jest polem siłowym [35]. Chęć symulowania układów o coraz większym rozmiarze połączona z niewielkimi początkowo możliwościami obliczeniowymi dawnych komputerów oraz rosnące zapotrzebowanie na coraz dłuższe symulacje sprawiły, że zdecydowano się poszukiwać funkcji opisującej PES nie metodami chemii kwantowej, lecz empirycznie w postaci równań, które są w stanie precyzyjnie opisać zmiany sił działających w układzie. Taka implementacja pola siłowego ogranicza możliwości badawcze – traci się część informacji dotyczącej gęstości elektronowej i związanych z nimi np. efektów polaryzacyjnych. Z drugiej strony jednak, zdecydowanie zwiększa to możliwości badania układów pod względem liczby atomów ich tworzących oraz czasu prowadzenia symulacji [37].

Zwyczajowo pole siłowe jest sumą wkładów związanych z oddziaływaniami niekowalencyjnymi (oddziaływania niewiążące) oraz zmianami geometrii i struktury cząsteczki (oddziaływania wiążące). Na ogół gwarantuje to bardzo dobry opis zmian konformacyjnych i powinowactwa makromolekuł, które pokrywają się z danymi eksperymentalnymi [38, 39]. Generalną postać addytywnych pól siłowych można zapisać w postaci:

$$V = V_b + V_a + V_d + V_i + V_{vdW} + V_{el} + V_{ext} \quad (6)$$

gdzie:

- V_b – wkład odpowiadający zmianom długości wiązań,
- V_a – wkład odpowiadający zmianom wielkości kątów,
- V_d – wkład odpowiadający zmianom wielkości kątów dwuściennych,
- V_i – wkład odpowiadający zmianom wielkości niewłaściwych kątów dwuściennych,
- V_{vdW} – energia oddziaływań van der Waalsa,
- V_{el} – energia oddziaływań elektrostatycznych,
- V_{ext} – potencjał zewnętrzny.

W powyższym równaniu można wyróżnić kilka charakterystycznych części. Wkłady odpowiadające zmianom długości wiązań, wartości kątów płaskich, kątów dwuściennych oraz niewłaściwych kątów dwuściennych noszą nazwę członów wiążących. Charakteryzują one wkłady energetyczne związane ze zmianą parametrów geometrycznych w odniesieniu do zdefiniowanych eksperymentalnie lub obliczonych wartości równowagowych. Wkłady energetyczne, w zależności od rodzaju zastosowanego pola siłowego, mają postać potencjałów dwu-, trój- i czterociałowych. Przy opisie tych oddziaływań konieczne jest zdefiniowanie tzw. typów atomów, które oprócz informacji o nazwie i masie pierwiastka niosą także

informację o jego hybrydyzacji i otoczeniu chemicznym. Energia oddziaływań van der Waalsa wraz z energią oddziaływań elektrostatycznych noszą nazwę członów niewiązanych, ponieważ w odróżnieniu od wyżej wymienionych zależą jedynie od odległości pomiędzy centrami oddziaływań. Ostatnim elementem jest tzw. potencjał zewnętrzny, który opisuje energetykę oddziaływań z innymi, zewnętrznymi polami [40].

Do opisu wkładów, które mają jedno, dobrze zdefiniowane minimum energii potencjalnej, a termiczne odchylenia od niego są niewielkie, stosuje się potencjał harmoniczny. Przykładem jest wkład energetyczny odpowiedzialny za zmianę długości wiązania, w którego przypadku odpowiedni wzór wygląda następująco:

$$V_b = \sum \frac{1}{2} k_b (l - l_0)^2 \quad (7)$$

gdzie: k_b jest odpowiednią stałą siłową, a l i l_0 odpowiednio odległością chwilową oraz odległością równowagową pomiędzy danymi typami atomów. Suma oznacza sumowanie po wszystkich parach atomów połączonych wiązaniem chemicznym. Jeżeli odchylenia od wartości równowagowej są znaczne, zależność energii od odległości odbiega od kształtu krzywej potencjału harmonicznego (krzywa drugiego rzędu), w związku z czym zaleca się korzystanie z bardziej rozwiniętych funkcji, np. pól siłowych, których rozwinięcie w szereg Taylora obejmuje co najmniej człony trzeciego stopnia (np. MM3), lub pól, które wykorzystują potencjał Morse'a [41] lepiej opisujący anharmoniczny charakter krzywej:

$$V_b = \sum D [1 - \exp(-\beta(l - l_0))]^2 \quad (8)$$

W powyższym równaniu D jest głębokością studni potencjału, natomiast β – miarą jego szerokości.

Do opisu wkładu opisującego energię pochodzącą od zmian kątów płaskich (walencyjnych) również korzysta się z potencjału harmonicznego:

$$V_a = \sum \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 \quad (9)$$

gdzie θ i θ_0 są wartościami chwilowymi i referencyjnymi kąta, a k_a odpowiednią stałą siłową. Jak poprzednio, do polepszenia charakterystyki stosowane jest dodawanie do powyższego wzoru dalszych wyrazów wynikających z rozwinięcia szeregu Taylora lub członu harmonicznego zależnego od odległości skrajnych odległości atomów [42].

Do opisu energetyki rotacji wokół wiązania (zmiana kąta torsyjnego) stosowany jest potencjał w postaci:

$$V_d = \sum \sum_{n=1}^6 \frac{1}{2} k_{d,n} (1 + \cos(n\phi - \phi_{0n})) \quad (10)$$

W powyższym równaniu oprócz stałych i wartości kątów pojawia się także współczynnik krotności n . Odpowiada on ilości minimów energetycznych w ciągu pełnego obrotu wokół danego wiązania, czyli 360 stopni. W powyższym równaniu możliwe jest także zastosowanie różnych stałych siłowych tak, aby uwzględnić efekty fizyczne pochodzące od oddziaływań o różnej periodyczności, jak wiązania podwójne, hiperkoniugacja lub wpływ podstawników o znacznej zawadzie sterycznej. Maksymalna, sensowna fizycznie liczba minimów n odpowiadająca periodyczności wynosi 6, dlatego pola siłowe zazwyczaj ograniczają się do tej wartości [41].

Ostatnim członem zaliczanym do członów wiążących jest potencjał odpowiadający za energetykę niewłaściwych kątów torsyjnych. Zadaniem tego potencjału jest wymuszenie odpowiedniej chiralności lub zapewnienie płaskości układu, np. wokół atomu węgla o hybrydyzacji sp^2 . Człon ten nie jest obligatoryjny, lecz większość stosowanych w praktyce pól siłowych go posiada [43].

Człony V_{el} i V_{vdW} odpowiadają za opis oddziaływań między niezwiązanymi atomami. Oddziaływania elektrostatyczne są opisywane prawem Coulomba [41]:

$$V_{el} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (11)$$

gdzie ϵ_r i ϵ_0 są odpowiednio względną przenikalnością elektryczną ośrodka i przenikalnością elektryczną próżni, q – ładunkiem oraz r – odległością pomiędzy dwoma atomami (i i j). Warto wspomnieć, że w dynamice molekularnej nie stosuje się rzeczywistych ładunków, którymi obdarzone są cząstki (zdefiniowane centra oddziaływań, np. atomy lub grupy funkcyjne), lecz ładunki cząstkowe, które mają za zadanie jak najwierniej odtworzyć potencjał elektrostatyczny wokół danej cząstki.

Drugim typem oddziaływań niewiązących są oddziaływania van der Waalsa opisywane potencjałem Lennarda-Jonesa:

$$V_{vdW} = \sum_i \sum_{j>i} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (12)$$

gdzie ϵ_{ij} jest głębokością studni potencjału a σ_{ij} jest skończoną odległością, przy której zanika oddziaływanie pomiędzy atomami. Oddziaływania van der Waalsa są kombinacją dwóch wkładów: silnego odpychania się cząstek na małych odległościach (r_{ij}^{12}) oraz oddziaływań dyspersyjnych (r_{ij}^6). Człony niewiązące mają stosunkowo największą złożoność obliczeniową, rzędu N^2 (wprost proporcjonalna do kwadratu ilości atomów znajdujących się w układzie). W celu zmniejszenia czasu obliczeń korzysta się zatem z tzw. promienia obcięcia (ang. *cut-off distance*), czyli zaniechania powyższych członów dla atomów oddalonych od siebie o więcej niż ustalony promień.

2.4. Generowanie trajektorii układu

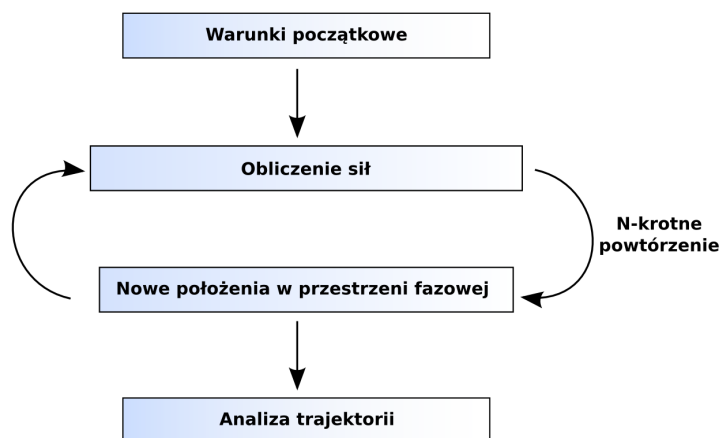
Dynamika molekularna jest deterministyczną metodą symulacji zmian układu modelowanego w czasie. W tej metodzie do opisu ruchu oddziałujących punktów materialnych w przestrzeni fazowej wykorzystuje się klasyczne równania ruchu dynamiki Newtona [35]:

$$\vec{F} = m \cdot \vec{a} \quad (13)$$

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m} \quad (14)$$

$$\frac{d^2 x}{dt^2} = \frac{d}{dt} \frac{dx}{dt} = \frac{d}{dt} v \quad (15)$$

Punktami materialnymi mogą być zarówno atomy, centra klastrów, jak i inne zdefiniowane centra oddziaływań. Chwilowy stan układu może być jednoznacznie opisany poprzez przypisanie każdemu z N-punktów materialnych położenia (x_i) i pędów (p_i) w 6N-wymiarowej przestrzeni fazowej. Element różniczkowy czasu dt zastępowany jest skończonym krokiem czasowym Δt , podczas którego zakłada się niezmiennosc działających w układzie sił. Z powodów praktycznych (niestabilność energii), krok czasowy nie powinien być dłuższy niż 1/10 okresu najszybszych oscylacji w układzie, co w symulacjach pełnoatomowych przekłada się zazwyczaj na wartość 1-2 fs. Schemat prowadzenia symulacji dynamiki molekularnej jest przedstawiony na rysunku poniżej (Rysunek 6).



Rysunek 6. Schemat wykonywanych obliczeń w dynamice molekularnej. Po zadaniu warunków początkowych następuje obliczenie sił i przypisanie nowych położenia atomów w przestrzeni fazowej. W każdym kroku zostają także skalowane prędkości atomów oraz objętość układu tak, aby utrzymać odpowiednio zadane temperaturę i ciśnienie. Schemat powtarza się aż do osiągnięcia ustalonej początkowo liczby kroków.

2.5. Termodynamika układu

Temperatura układu związana jest z energią kinetyczną elementów układu. Relacja ta wynika z zasady ekwipartycji energii [35] i ma postać:

$$E_k = \frac{3}{2} N k_B T = \sum_i \frac{m_i v_i^2}{2} \quad (16)$$

N jest w tym równaniu liczbą cząstek (punktów materialnych) tworzących układ, k_B jest stałą Boltzmanna równą ok. $1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K, a m_i i v_i są odpowiednio masami i prędkościami poszczególnych cząstek układu. Energia całkowita takiego układu w zadanej temperaturze wynosi:

$$E_{tot}(R, T) = E_p(R) + \frac{3}{2} N k_B T \quad (17)$$

Ustalenie odpowiedniej temperatury układu jest niezmiernie istotne, ponieważ pierwszym krokiem każdej symulacji jest przypisanie każdemu elementowi układu położenia w przestrzeni oraz jego prędkości początkowej odpowiadającej zadanej temperaturze. Rozkład ten powinien być zgodny z rozkładem Maxwella-Boltzmanna [35]. W dalszym toku symulacji na skutek oddziaływania ze sobą molekuł, prędkości, a więc i energia kinetyczna ulegają zmianom. Skutkuje to fluktuacjami temperatury układu. Względna intensywność wahań jest tym większa, im symulowany układ jest mniejszy. Aby zapobiec znacznym zmianom temperatury układu stosuje się tzw. termostaty. Zadaniem termostatu jest utrzymanie średniej temperatury układu na względnie stałym poziomie z odchyleniami zgodnymi z pojemnością cieplną układu. Do najbardziej znanych algorytmów pozwalających na skalowanie temperatury podczas symulacji dynamiki molekularnej należą [44]:

- termostat Berendsena – temperatura jest sprzężona z kontrolą prędkości cząstek w układzie dynamicznym,
- termostat CSVR – jak powyżej, temperatura jest sprzężona z kontrolą prędkości cząstek w układzie dynamicznym; stosowany do małych układów,
- termostat Nose-Hoovera – do układu dodany jest dodatkowy stopień swobody,
- termostat Langevina – w układzie występują dodatkowe siły stochastyczne utrzymujące zadaną temperaturę.

Wszystkie powyższe koncepcje działania termostatów można także wykorzystać do tworzenia podobnie działających barostatów utrzymujących zadane ciśnienie w układzie. Warto wspomnieć, że barostat odpowiadający działaniu termostatowi Nose-Hoovera nosi nazwę barostatu Parrinello-Rahmana, i jest często stosowany we właściwej symulacji dynamiki molekularnej układów błonowych po etapie równowagowania [35].

3. Cel pracy

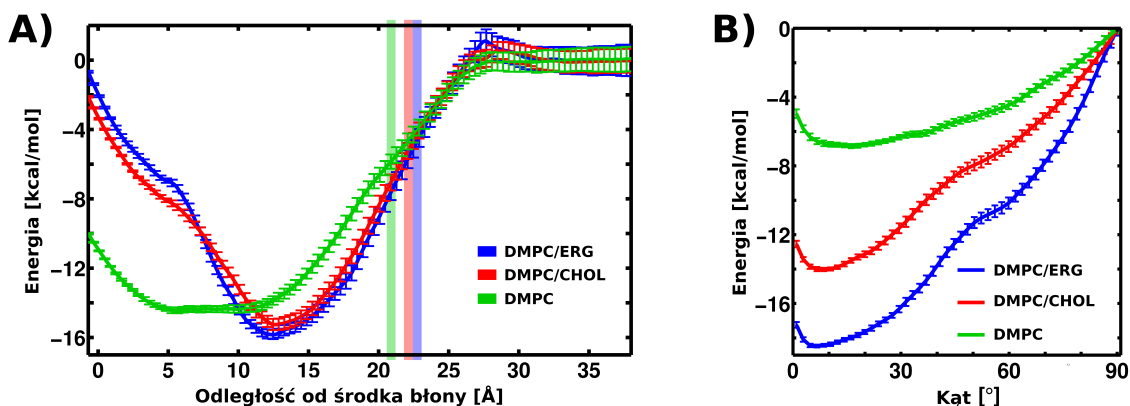
Celem badań będących przedmiotem prezentowanej rozprawy doktorskiej jest analiza mechanizmu działania i selektywności leku przeciwgrzybiczego – amfoterycyny B – z użyciem symulacji komputerowych, ze szczególnym uwzględnieniem dynamiki molekularnej. Cel ten został osiągnięty poprzez realizację następujących celów cząstkowych:

1. Badania procesu wnikania amfoterycyny B do błon lipidowych:
 - a) ocena wpływu rodzaju błony komórkowej na zdolność wnikania monomeru amfoterycyny B w głąb dwuwarstwy lipidowej,
 - b) ustalenie mechanizmu wnikania leku wraz z opisem oddziaływań pomiędzy poszczególnymi elementami leku a lipidami,
 - c) badania zachowania się cząsteczki leku wewnątrz błony oraz jego preferowane położenie.
2. Badania przebiegu dimeryzacji cząsteczek amfoterycyny B w środowisku wodnym:
 - a) ustalenie struktury i orientacji struktury dimerów na podstawie symulacji dynamiki molekularnej oraz widm dichroizmu kołowego (CD),
 - b) badania kinetyki procesu dimeryzacji,
 - c) analiza wpływu dimeryzacji na dalszy proces oligomeryzacji w środowisku wodnym ze szczególnym uwzględnieniem powstawania tetramerów.
3. Badania mechanizmu oligomeryzacji oraz wiązania się cząsteczek amfoterycyny B z błoną lipidową – badania z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej i dynamiki molekularnej:
 - a) ocena wpływu obecności steroli (ergosterolu i cholesterolu) i rodzaju lipidów na zdolność wnikania oligomerów amfoterycyny B w głąb błony komórkowej,
 - b) ocena wpływu środowiska (wodnego oraz badanych błon lipidowych) na strukturę oligomerów,
 - c) analiza zachowania się oligomerów amfoterycyny B wewnątrz błony oraz ich wpływ na dalszy postęp oligomeryzacji.

4. Wyniki

4.1. Badania procesu wnikania amfoterycyny B do błon lipidowych

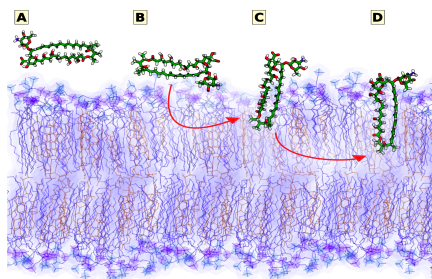
Mechanizm działania makrolidów polienowych oparty jest na selektywnym oddziaływaniu ze sterolami występującymi w błonie komórkowej grzybów. W celu ustalenia wpływu rodzaju błony komórkowej na proces wnikania amfoterycyny B obliczono profil energii swobodnej monomeru AmB do 3 rodzajów błony komórkowej: DMPC + 30 mol % ergosterolu, DMPC + 30 mol % cholesterolu oraz DMPC bez dodatku steroli. Uzyskane wyniki wskazują, że proces wnikania leku do błony jest termodynamicznie korzystny ($\Delta G = -14$ kcal/mol) dla wszystkich trzech badanych rodzajów błon. W przypadku błon sterolowych widoczne jest jedno, głębokie minimum (czerwona i niebieska linia na Rysunku 7A) – najbardziej korzystnym ułożeniem leku jest takie, podczas którego makrolid ma kontakt z hydrofobowym wnętrzem błony, natomiast reszta mykozaminy wciąż może korzystnie oddziaływać z polarnymi resztami na powierzchni błony.



Rysunek 7. A) Profil energii swobodnej dla wnikania cząsteczki amfoterycyny B do błony oraz B) profil energii swobodnej dla zmiany kąta pomiędzy osią główną cząsteczki AmB a normalną/prostopadłą do płaszczyzny błony dla trzech rodzajów błon komórkowych: DMPC + 30 mol % ergosterolu, DMPC + 30 mol % cholesterolu oraz DMPC bez dodatku steroli [na podstawie publikacji P1: Neumann, A. *et al.*, Langmuir, 2016].

Warto nadmienić, że widoczna jest minimalna bariera wejścia (ok. 1 kcal/mol) hamująca cząsteczkę leku przed przekroczeniem granicy faz. Pomimo korzystnego oddziaływania pomiędzy poliolem a resztami fosforanowymi lipidów i kosztem energetycznym dehydratacji,

polarna reszta mykozaminy utrzymuje się na powierzchni błony odgrywając rolę kotwicy (Rysunek 8). W przypadku błon bez dodatku steroli, które są bardziej elastyczne, cząsteczka leku nie jest jak poprzednio ułożona w jednej warstwie błony, lecz może zanurzyć się w niej głębiej (szersze minimum na Rysunku 7A – linia zielona), nawet do całkowitego wypełnienia swoją długością (ok. 25 Å) obu listków (warstw) błony komórkowej. Warto zaznaczyć, że podczas wykonywania symulacji nie zaobserwowano żadnego minimum energetycznego w okolicy granicy faz, co wskazuje na brak preferencji do lokowania się monomerów leku na powierzchni błony. Jest to ciekawe spostrzeżenie, ponieważ spodziewano się raczej korzystnego oddziaływania pomiędzy grupą aminową AmB a resztami fosforanowymi lipidów i sytuacji, w której polien amfoterycyny B znajduje się w hydrofobowej warstwie błony, a polioliol na kontakt z warstwą rozpuszczalnika (wody).



Rysunek 8. Mechanizm wnikania cząsteczki amfoterycyny B do wnętrza błony komórkowej. A) AmB znajduje się w fazie wodnej. B) Stan przejściowy, w którym dochodzi do oddziaływania pomiędzy polarną „głową” AmB a resztami fosfatydylocholino lipidów. C) Obrót AmB skutkuje wejściem makrolidu leku w głąb błony. D) AmB w pełni zanurzone w błonie lipidowej [na podstawie publikacji P1: Neumann, A. *et al*, *Langmuir*, 2016].

Kolejnym etapem badań była analiza ułożenia leku w błonie poprzez obliczenie profilu energii swobodnej dla kąta nachylenia pomiędzy normalną (prostopadłą) do płaszczyzny błony a osią główną cząsteczki amfoterycyny B. W przypadku wszystkich trzech rodzajów błon ustalono, że najbardziej korzystną orientacją leku w błonie komórkowej jest jego pionowe ułożenie (minimum energetyczne dla ok. 10°, Rysunek 7B). W błonie bez dodatku steroli (Rysunek 7B – zielona linia), która charakteryzuje się bardziej elastyczną strukturą, zauważalna jest większa dowolność w ułożeniu (odchylenia do 60°), podczas gdy w błonach DMPC + 30 mol % ergosterolu i DMPC + 30 mol % cholesterolu ponad 99% populacji monomerów nie odchyła się od normalnej do błony o więcej niż 30°.

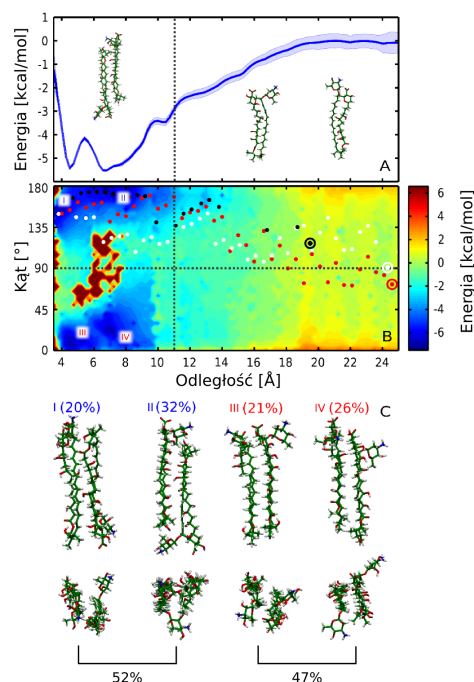
Wyniki tych badań zostały opisane szczegółowo w publikacji: Neumann, A., Wieczór, M., Zielińska, J., Bagiński, M., Czub, J. Membrane sterols modulate the binding mode of amphotericin B without affecting its affinity for a lipid bilayer. *Langmuir* **32**, 3452-3461 (2016).

4.2. Badania przebiegu dimeryzacji cząsteczek amfoterycyny B w środowisku wodnym

Amfipatyczna budowa makrolidów polienowych sprawia, że mają one silną tendencję do agregacji w środowisku wodnym. Oligomeryzacja zachodzi bowiem już przy stężeniu leku rzędu 10^{-6} M, co znacząco ogranicza możliwe drogi podania leku. Co więcej, wielu badaczy łączy proces dimeryzacji z działaniem toksycznym leku, sugerując, że jedynie monomery leku są w stanie wnikać w głąb błony patogenu, zaś dimery i wyższe oligomery są odpowiedzialne za jego toksyczność.

Dzięki zastosowaniu dynamiki molekularnej ustalono, że już przy stężeniu AmB powyżej $0,41 \mu\text{M}$, 10% populacji cząsteczek występuje w postaci dimerów. Proces dimeryzacji jest w tym przypadku procesem kontrolowanym dyfuzją, na co wskazuje obliczona stała szybkości dimeryzacji $k_{ol} = 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ oraz brak zauważalnych barier na ścieżce do formowania dimeru (obliczona energia swobodna dimeryzacji ΔG° wyniosła $-7,1 \text{ kcal/mol}$ – Rysunek 9A). Otrzymana wartość stałej szybkości jest kilkaset razy większa niż szybkość wnikania AmB do wnętrza błony ($k_b = 1,52 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [45]). Oznaczać to może, że przy zastosowaniu stężenia terapeutycznego, amfoterycyna B oddziałuje z błoną w formie oligomerycznej. Wykonany profil energii swobodnej wskazywał na istnienie dwóch głównych typów dimerów (dwa minima energetyczne – 6,5 oraz 4,5 w przebiegu profilu na Rysunku 9A). Ustalono, że dimery równoległe (reszty mykozaminy leżące obok siebie) oraz antyrównoległe (mykozaminy leżące naprzeciwko siebie – Rysunek 9C) powstają w porównywalnych proporcjach (odpowiednio 47% i 52%) z niewielką przewagą na korzyść orientacji antyrównoległej. Ponadto możliwa jest zmiana konformacji na przeciwną (oszacowany czas przejścia wynosi 200 ns, a odpowiednia stała szybkości – $5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$). Podczas wykonywania niezależnych symulacji spontanicznego zejścia się dwóch cząsteczek amfoterycyny B zaobserwowano kinetyczną tendencję do powstawania dimerów antyrównoległych (punkty białe, czerwone i czarne na Rysunku 9B).

Dodatkowo zbadano także typ oddziaływań w głównej mierze odpowiedzialny za dimeryzację. Proces ten jest napędzany hydrofobowo, za co w znacznej części odpowiada zmniejszenie się hydrofobowej powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika (SASA). W przypadku obu typów dimerów zmiana tego parametry jest porównywalna, co tłumaczy równocenne prawdopodobieństwo powstania danego typu dimeru.



Rysunek 9. A) Profil energii swobodnej w funkcji odległości pomiędzy środkami mas obu monomerów. Przerywaną linią zaznaczono granicę pomiędzy stanem związanym a rozseparowanym. B) Dwuwymiarowa mapa energii w funkcji odległości pomiędzy monomerami oraz kąta pomiędzy nimi. Punktami zaznaczono przebieg symulacji w warunkach równowagowych, a dodatkowym kółkiem oznaczono położenie stanów początkowych w tych symulacjach. C) Cztery typy dimerów wraz z prawdopodobieństwem ich powstawania. Struktury odpowiadają minimum energetycznym na mapie dwuwymiarowej [na podstawie publikacji P2: Zielińska, J. *et al*, *Sci Rep*, 2016].

Struktury uzyskanych dimerów zostały wykorzystane do wykonania kwantowochemicznej predykcji widm dichroizmu kołowego, które porównano następnie z wynikami eksperymentalnymi w kontekście badania procesu oligomeryzacji [46]. W tym przypadku potwierdzono, że istnieje kilka typów oligomerów oraz nie ma tendencji to przyjmowania przez nie określonej konfiguracji.

Ostatnim etapem tej części badań było przeprowadzenie symulacji spontanicznej asocjacji dwóch dimerów. Przeprowadzone symulacje potwierdziły, że szybkość oligomeryzacji wzrasta wraz z dostępną ilością cząsteczek leku. Równocześnie zaobserwowano brak możliwości zmiany konformacji tetrameru, która była możliwa w przypadku dimerów.

Wyniki tych badań zostały opisane szczegółowo w publikacji: Zielińska, J., Wieczór, M., Bączek, T., Gruszecki, M., Czub, J. Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail. *Scientific Reports* **6**, 19109 (2016).

4.3. Badania mechanizmu oligomeryzacji oraz wiązania się cząsteczek amfoterycyny B z błoną lipidową – badania z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej i dynamiki molekularnej

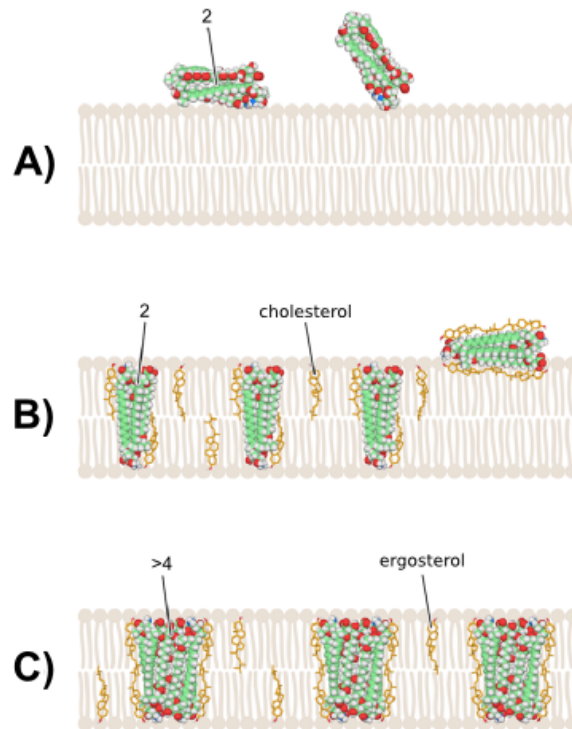
Jednym z najbardziej interesujących aspektów działania amfoterycyny B jest kwestia jej działania w postaci oligomerów w obrębie błony komórkowej. Aby uzyskać pełniejszy obraz tego procesu, postanowiono zbadać właściwości oligomerów AmB w obecności wybranych modelowych błon lipidowych w warunkach *in vitro*.

Poprzednie badania [46] wskazywały, że czas życia fluorescencji jest skorelowany ze stanem oligomeryzacji cząsteczek amfoterycyny B. Pierwszym etapem badań była zatem analiza czasu życia fluorescencji oligomerów AmB powstałych po spontanicznej inkorporacji cząsteczek leku do olbrzymich jednowarstwowych liposomów (GUV). Liposomy złożone były z DPPC, DMPC lub POPC odpowiednio bez dodatku steroli lub z 30 mol % cholesterolu lub 30 mol % ergosterolu (Rysunek 10), co modelowało właściwości błon odpowiednio bakteryjnych, ludzkich oraz grzybowych. Oligomeryzacja zachodziła w fazie wodnej po dodaniu roztworu AmB w DMSO do buforu zawierającego obrazowane liposomy. Występowanie zjawiska anizotropii fluorescencji (fotoselekcji) pozwoliło na wyodrębnienie czasów życia fluorescencji pochodzących od cząsteczek AmB znajdujących się w błonie (zorientowanych wertykalnie) oraz cząsteczek leku znajdujących się na jej powierzchni (zorientowanych horyzontalnie). Wartości czasów życia fluorescencji dla wybranych w ten sposób cząsteczek we wnętrzu błony wskazywały, że w tym środowisku AmB tworzą inne, małe oligomery (2-4 cząsteczki leku). Ponadto, małe oligomery charakteryzujące się krótkim czasem życia – dimery, trimery oraz tetramery – przyjmowały dowolną orientację we wnętrzu błony. Obserwacja ta została potwierdzona w przeprowadzonych symulacjach dynamiki molekularnej, w których stwierdzono, że uzyskany szereg różnych sygnałów (czasów fluorescencji) wynika z różnorodności w zakresie powstałych stechiometrii, a nie różnic w ich przestrzennym ułożeniu w błonie. Dodatkowo, wykonane symulacje dotyczące struktur tetramerów wykazały ich zdolność do rotacji wokół własnej osi pod wpływem przejścia z wody do błony.

Eksperyment wykazał, że to głównie obecność steroli, a nie rodzaj lipidów w składzie błony komórkowej ułatwia małym oligomerom przeniknięcie do wnętrza błony komórkowej, a także wpływa na zmianę organizacji oligomerów we wnętrzu błony – po wejściu do hydrofobowej części błony, tetramery układają się prostopadle względem płaszczyzny błony, a sama ich struktura jest bardziej stabilna. W tym przypadku dane eksperymentalne były również zbieżne z wykonanymi symulacjami komputerowymi, które potwierdziły inne ułożenie cząsteczek AmB względem siebie w środowisku wodnym i w błonie lipidowej.

Zaobserwowany efekt może mieć istotne znaczenie z punktu widzenia tworzenia przez agregaty amfoterycyny B porów transbłonowych pozwalających na wypływ jonów.

Podczas przeprowadzonych badań zauważono także duże agregaty ($\gg 4$ cząsteczek AmB, czas życia ok. 0,6 ns) tworzące się na zewnątrz liposomów złożonych z POPC. Ten wynik może wyjaśniać jedną z hipotez dotyczących działania amfoterycyny B, czyli dodatkowego tworzenia się tzw. „gąbek” na powierzchni błony lipidowej, które poprzez oddziaływanie ze sterolami zaburzają strukturę błony komórkowej, w efekcie przyspieszając śmierć komórki.



Rysunek 10. Ułożenie, lokalizacja i struktura oligomerów amfoterycyny B z uwzględnieniem rodzaju błony: A) błona bez steroli, B) błona z 30 mol % cholesterolu, C) błona z 30 mol % ergosterolu. Numer odpowiada liczbie cząsteczek amfoterycyny B tworzących dany oligomer [na podstawie publikacji P3: Grela, E. *et al*, *Molecular Pharmaceutics*, 2018].

Wyniki tych badań zostały opisane szczegółowo w publikacji: Grela, E., Wieczór, M., Luchowski, R., Zielińska, J., Barzycka, A., Grudziński, W., Nowak, K., Tarkowski, P., Czub, J., Gruszecki, W.I. Mechanism of binding of antifungal antibiotic amphotericin B to lipid membranes: an insight from combined single-membrane imaging, microspectroscopy and molecular dynamics. *Molecular Pharmaceutics* **15**, 4202-4213 (2018).

5. Wnioski

Podczas realizacji celów badawczych wchodzących w skład przedstawionej rozprawy doktorskiej wykorzystano dynamikę molekularną do oceny mechanizmu działania amfoterycyny B w początkowych etapach jej działania. Wyniki zostały w większości przypadków skonfrontowane z danymi eksperymentalnymi potwierdzając lub uzupełniając uzyskane dane.

Opis poszczególnych etapów działania amfoterycyny B rozpoczęto od analizy wpływu steroli na proces wnikania amfoterycyny B. Wykonane symulacje dynamiki molekularnej wykazały nieznaczne różnice w procesie wnikania monomerów leku w głąb błon komórkowych zawierających sterole (cholesterol lub ergosterol) oraz takich, które nie posiadały ich w swoim składzie. Proces wnikania leku do błony komórkowej jest termodynamicznie korzystny dla każdego rodzaju błony komórkowej. W przypadku błon zawierających sterole położenie leku we wnętrzu błony nie ulega zmianie – monomery lokują się w jednej z dwóch warstw błony i są prostopadłe do powierzchni błony komórkowej. W przypadku błon bez dodatku steroli, monomery lokują się głębiej, a ich ułożenie jest o wiele bardziej przypadkowe [P1].

Następnym zrealizowanym zagadnieniem było zbadanie procesu dimeryzacji cząsteczek amfoterycyny w środowisku wodnym. Przeprowadzone symulacje pozwoliły na wyznaczenie profilu energii swobodnej dimeryzacji dla dwóch typów dimerów (orientacji równoległej i antyrównoległej) różniących się ułożeniem części cukrowych względem siebie. Prawdopodobieństwo powstawania obu dimerów jest praktycznie identyczne (0,93 : 1,0), co świadczy o wysokiej heterogeniczności strukturalnej tych oligomerów. Niemniej jednak są one zdolne do zmiany konfiguracji na przeciwną. Nie jest to możliwe w przypadku formowania się wyższych oligomerów, co potwierdzono wykonując symulację spontanicznej oligomeryzacji dwóch dimerów. Dodatkowo wykonano też symulację widm dichroizmu kołowego, które skonfrontowano z danymi doświadczalnymi. Umożliwiło to ich dokładną analizę i potwierdzenie wniosków opartych na podstawie eksperymentów z użyciem dichroizmu kołowego [P2].

Dynamika molekularna okazała się także dobrą metodą wspierającą metody eksperymentalne podczas badania przebiegu i stanu oligomeryzacji amfoterycyny B. Symulacje dynamiki molekularnej prowadzone równoległe z badaniami spektroskopowymi (spektroskopia fluorescencyjną) miały na celu zbadanie procesu wnikania i orientacji względem błony oligomerów amfoterycyny B w różnych rodzajach błon biologicznych złożonych z

DPPC, DMPC oraz POPC: błon z cholesterolem, ergosterolem, bądź błon bez dodatku steroli. Uzyskane wyniki dotyczące struktur oligomerów pozwoliły wyjaśnić różnice w obserwowanych czasach zaniku fluorescencji oraz stwierdzić, że wniknięcie cząsteczki monomeru jest dużo bardziej prawdopodobne niż wniknięcie dimeru lub tetrameru; dodatkowo spontaniczne wejście oligomerów zachodzić może łatwiej do błon zawierających sterole [P3].

Ostatecznie, oprócz wymienionych powyżej badań, podczas realizacji pracy doktorskiej dokonano analizy struktury, stabilności i selektywności kanałów transbłonowych. Oszacowanie konduktancji kanałów o różnej wielkości (od 8 do 24 cząsteczek tworzących kanał), a następnie konfrontacja danych z wynikami literaturowymi pozwoliła na wytypowanie najbardziej prawdopodobnej struktury kanału transbłonowego. Ustalono, że obecność steroli w strukturze zwiększa stabilność kanału. Zbadano także wpływ reszty hydroksylowej (O35) na stabilność i proces formowania się kanału podwójnego oraz jonoselektywność kanału transbłonowego złożonego z cząsteczek amfoterycyny B. Wyniki tych badań znajdują się w recenzowanej aktualnie publikacji: Zielińska, J., Wieczór, M., Chodnicki, P., Grela, E., Luchowski, R., Nierzwicki, Ł., Bączek, T., Gruszecki, W.I, Czub, J. Self-assembly, stability and conductance of amphotericin B channels: bridging the gap between structure and function.

Bibliografia

- [1] Pound, M.W., Townsend, M.L., Dimondi, V., Wilson, D., Drew, R.H. Overview of treatment options for invasive fungal infections. *Medical Mycology* **49**, 561-580 (2011).
- [2] Fisher, M.C., Hawkins, N.J., Sanglard, D., and Gurr, S.J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **360**, 739-742 (2018).
- [3] Gupta, A.K., Tomas, E. New antifungal agents. *Dermatologic Clinics* **21**, 565-576 (2003).
- [4] Brüggemann, R.J.M., Alffenaar, J.C., Blijlevens, N.M.A., Billaud, E.M., Kosterink, J.G.W., Verweij, P.E., Burger, D.M., Saravolatz, L.D. Clinical relevance of the pharmacokinetic interactions of azole antifungal drugs with other coadministered agents. *Clinical Infectious Diseases* **48**, 1441-1458 (2009).
- [5] Pfaller, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine* **125**, S3-S13 (2012).
- [6] Chandra, J., Ghannoum, M.A. Flucytosine Treatment and Resistance Mechanisms. In *Antimicrobial Drug Resistance*, 407-413 (Springer, 2017).
- [7] Letscher-Bru, V., Herbrecht, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**, 513-521 (2003).
- [8] Kofla, G., Ruhnke, M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis-review of the literature. *European Journal of Medical Research* **16**, 159 (2011).
- [9] Zotchev, S.B. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Current Medicinal Chemistry* **10**, 211-223 (2003).
- [10] Hartsel, S., Bolard, J. Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends in Pharmacological Sciences* **17**, 445-449 (1996).
- [11] Bolard, J., Joly, V., Yeni, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. Its modulation by delivery systems. *Journal of Liposome Research* **3**, 409-427 (1993).
- [12] Donovan, R., Gold, W., Pagano, J.F., Stout, H.A. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiotics Annual* **3**, 579 (1955).
- [13] Borowski, E., Zieliński, J., Ziminski, T., Falkowski, L., Kołodziejczyk, P., Golik, J., Jereczek, E., Adlercreutz, H. Chemical studies with amphotericin B III. The complete structure of the antibiotic. *Tetrahedron Letters* **11**, 3909-3914 (1970).

- [14] Ganis, P., Avitabile, G., Mechlinski, W., Schaffner, C.P. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. *Journal of the American Chemical Society* **93**, 4560-4564 (1971).
- [15] Shervani, Z., Etori, H., Taga, K., Yoshida, T., Okabayashi, H. Aggregation of polyene antibiotics as studied by electronic absorption and circular dichroism spectroscopies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **7**, 31-38 (1996).
- [16] Hamilton-Miller, J.M.T. The effect of pH and of temperature on the stability and bioactivity of nystatin and amphotericin B. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **25**, 401-407 (1973).
- [17] Ellis, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 7-10 (2002).
- [18] Arikan, S., Lozano-Chiu, M., Paetznick, V., Rex, J.H. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 245-247 (2002).
- [19] Saravolatz, L. *et al.* Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* **43**, 917-924 (2006).
- [20] Gallis, H.A., Drew, R.H., Pickard, W.W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Reviews of Infectious Diseases* **12**, 308-329 (1990).
- [21] Brajtburg, J., Powderly, W.G., Kobayashi, G.S., Medoff, G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**, 183 (1990).
- [22] Cass, A., Finkelstein, A., Krespi, V. The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *The Journal of General Physiology* **56**, 100-124 (1970).
- [23] Hartsel, S.C., Benz, S.K., Ayenew, W., Bolard, J. Na⁺, K⁺ and Cl⁻ selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics. *European Biophysics Journal* **23**, 125-132 (1994).
- [24] Borisova, M.P., Brutyan, R.A., Ermishkin, L.N. Mechanism of anion-cation selectivity of amphotericin B channels. *Journal of Membrane Biology* **90**, 13-20 (1986).
- [25] Oliver Lampen, J. Amphotericin B and other polyenic antifungal antibiotics. *American Journal of Clinical Pathology* **52**, 138-146 (1969).
- [26] Gray, K.C., Palacios, D.S., Dailey, I., Endo, M.M., Uno, B.E., Wilcock, B.C., Burke, M.D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 2234-2239 (2012).
- [27] Ostroumova, O.S., Efimova, S.S., Schagina, L.V. Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers. *PLoS One* **7**, e30261 (2012).

- [28] Venegas, B., González-Damián, J., Celis, H., Ortega-Blake, I. Amphotericin B channels in the bacterial membrane: role of sterol and temperature. *Biophysical Journal* **85**, 2323-2332 (2003).
- [29] Andreoli, T.E. On the anatomy of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Kidney International* **4**, 337-345 (1973).
- [30] De Kruijff, B., Demel, R.A. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **339**, 57-70 (1974).
- [31] Clemons, K.V., Espiritu, M., Parmar, R., Stevens, D.A. Comparative efficacies of conventional amphotericin B, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 4867-4875 (2005).
- [32] Zhang, J., Ma, J., Dong, Y., Zhao, W., Feng, J. Synthesis and characterization of NH₂-(AEEA) n-amphotericin B derivatives. *The Journal of Antibiotics* **72**, 210-217 (2019).
- [33] Antillón, A. *et al.* An amphotericin B derivative equally potent to amphotericin B and with increased safety. *PloS One* **11** (2016).
- [34] Tevyashova, A. N. *et al.* Discovery of amphamide, a drug-candidate for the second generation of polyene antibiotics. *ACS Infectious Diseases* (2020).
- [35] Marx, D., Hutter, J. *Ab Initio Molecular Dynamics: The Virtual Laboratory Approach* (Cambridge University Press, 2010).
- [36] Piela, L. *Idee Chemii Kwantowej* (Wydawnictwo Naukowe PWN, 2005).
- [37] Elber, R. Perspective: Computer simulations of long time dynamics. *The Journal of Chemical Physics* **144**, 060901 (2016).
- [38] Klauda, J.B., Monje, V., Kim, T., Im, W. Improving the CHARMM force field for polyunsaturated fatty acid chains. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 9424-9431 (2012).
- [39] Riniker, S., van Gunsteren, W.F. A simple, efficient polarizable coarse-grained water model for molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics* **134**, 084110 (2011).
- [40] Vanommeslaeghe, K. *et al.* CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry* **31**, 671-690 (2010).
- [41] Cramer, C.J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models* (John Wiley & Sons, 2013).

- [42] Maple, J.R., Hwang, M-J., Stockfisch, T.P., Dinur, U., Waldman, M., Ewig, C.S., Hagler, A.T. Derivation of class II force fields. I. Methodology and quantum force field for the alkyl functional group and alkane molecules. *Journal of Computational Chemistry* **15**, 162-182 (1994).
- [43] Harrison, J.A., Schall, J.D., Maskey, S., Mikulski, P.T., Knippenberg, M.T., Morrow, B.H. Review of force fields and intermolecular potentials used in atomistic computational materials research. *Applied Physics Reviews* **5**, 031104 (2018).
- [44] Hünenberger, P. Thermostat Algorithms for Molecular Dynamics Simulations. In *Advanced Computer Simulation*, 105-149 (Springer, 2005).
- [45] Clejan, B. R., S. Rates of amphotericin B and filipin association with sterols. A study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 2884-2889 (1985).
- [46] Starzyk, J., Gruszecki, M., Tutaj, K., Luchowski, R., Szlajak, R., Wasko, P., Grudzinski, W., Czub, J., Gruszecki, W.I. Self-association of amphotericin B: spontaneous formation of molecular structures responsible for the toxic side effects of the antibiotic. *Journal of Physical Chemistry B* **118**, 13821-13832 (2014).