

# Υπολογιστική μοντελοποίηση νανοσωματιδίων σε επαφή με μοντέλα κυτταρικών μεμβρανών

---

Μιχαήλ Λαζαράτος & Ελευθέριος Μάινας

Επιβλέπων καθηγητής : Αθανάσιος Τσεκούρας

4 Μαρτίου 2017

[Πληκτρολογήστε το απόσπασμα του εγγράφου εδώ. Το απόσπασμα είναι συνήθως μια σύντομη σύνοψη των περιεχομένων του εγγράφου. Πληκτρολογήστε το απόσπασμα του εγγράφου εδώ. Το απόσπασμα είναι συνήθως μια σύντομη σύνοψη των περιεχομένων του εγγράφου.]

## **Κεφάλαιο 1**

### Εισαγωγή

- 1.1 Η νανοτεχνολογία και η στόχευση φαρμάκων σε όγκους
- 1.2 Βέλτιστα χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων
- 1.3 Εφαρμογές μαγνητικών νανοσωματιδίων ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων
- 1.4 Η κυτταρική μεμβράνη και η σημασία της
- 1.5 Λειτουργικό Νανοσωματίδιο (Μαγνητίτης, Πολύ-αραβικό οξύ, Πολυ-(βινυλο)-αλκοόλη
- 1.6 Στόχος μελέτης

## **Κεφάλαιο 2 Μεθοδολογία**

- 2.1 Αρχές Κλασσικής Μηχανικής
- 2.2 Αρχές Στατιστικής Μηχανικής
- 2.3 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής
  - 2.3.1 Πεδίο δυνάμεων
  - 2.3.2 Αριθμητική ολοκλήρωση
  - 2.3.3 Υπολογισμός θερμοκρασίας και πίεσης
  - 2.3.4 Ισοβαρές – Ισοθερμικό σύνολο
  - 2.3.5 Η διαδικασία της προσομοίωσης
- 2.4 Ανάλυση
- 2.5 Επαναληψιμότητα – Επιλογή λογισμικού (Επαναληψιμότητα μεταξύ ίδιου λογισμικού, Επαναληψιμότητα μεταξύ διαφορετικών λογισμικών)

## **Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα**

- 3.1 Μοριακή Δυναμική Προσομοίωση διαλανίνης στο νερό
- 3.2 Παραμετροποίηση πολύ-βινυλικής αλκοόλης PVA

3.3 Παραμετροποίηση πολύ-αραβικού οξέος ARA

3.4 Κατασκευή τοπολογίας λειτουργικού νανοσωματιδίου μαγνητίτη επικαλυπτόμενο από πολύ-βυνλική αλκοόλη (MAG-PVA) και από πολύ-αραβικό οξύ (MAG-ARA)

3.5 Προσομοίωση MAG-PVA και MAG-ARA σε κενό και νερό

3.6 Κατασκευή και προσομοίωση μοντέλου κυτταρικής μεμβράνης

3.7 Υπολογισμός βέλτιστου αριθμού επεξεργαστών για την προσομοίωση

3.8 Εισαγωγή νανοσωματιδίου στη μεμβράνη

3.9 Προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής νανοσωματιδίου στη μεμβράνη

3.10 Ανάλυση προσομοιώσεων

3.11 Σύγκριση με πειραματικά αποτελέσματα

**Κεφάλαιο 4 Συμπεράσματα**

**Κεφάλαιο 5 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα**

## Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή

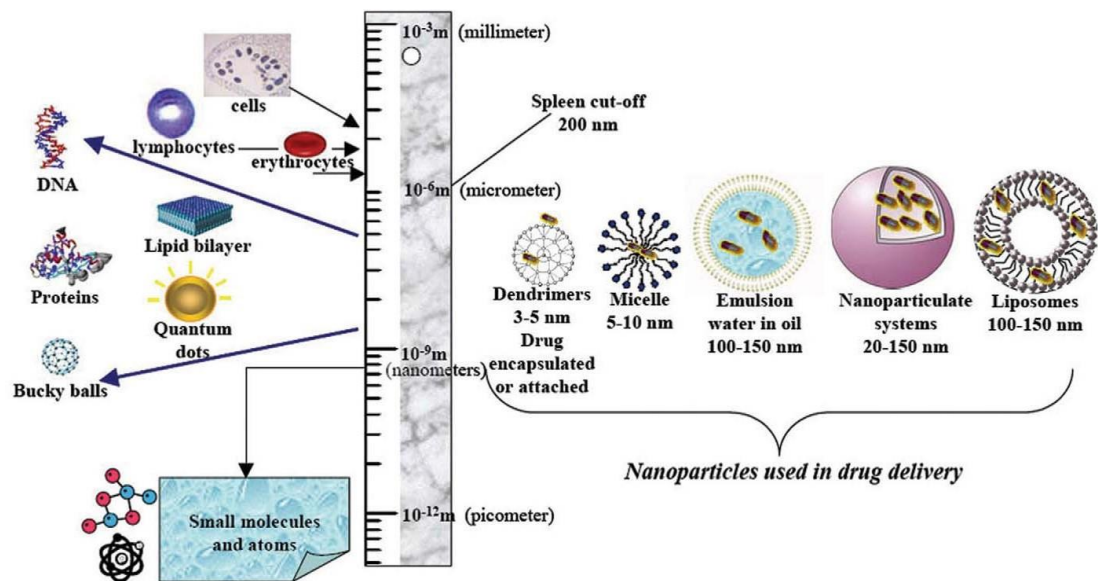
Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει γίνει τεράστια πρόοδος στην κατανόηση της παθογένειας του καρκίνου. Ο καρκίνος είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως, φθάνοντας τα 7,6 εκατομμύρια θανάτους (13% όλων των θανάτων) το 2008. Επιπλέον, οι θάνατοι από καρκίνο παγκοσμίως προβλέπεται ότι θα συνεχίσουν να αυξάνονται σε πάνω από 11 εκατομμύρια το 2030 [1]. Ο καρκίνος είναι μια θανατηφόρα διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη ανωμαλιών στα κύτταρα που προκαλούν ανεξέλεγκτη και γρήγορη ανάπτυξη και διαίρεση των κυτταρων λόγω ενός συνδυασμού μεταλλαξιόγόνων σταδίων. Ως συνέπεια αυτών των μεταλλάξεων, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν μια συστοιχία συγκεκριμένων ιδιοτήτων όπως απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμό,, αυτάρκεια σε σήματα ανάπτυξης και αντοχή σε ανασταλτικά σήματα ανάπτυξης, καθώς και αποφυγή από αποπτωτικές ενδείξεις, οι οποίες, σε κανονική κατάσταση, θα περιόριζαν την ανάπτυξή τους [2]. Εκτός αυτού, οι όγκοι έχουν αναπτύξει ποικίλες μεθόδους να επιτύχουν περαιτέρω υποστήριξη μέσω αλληλεπιδράσεων με το περιβάλλον στρωματικά κύτταρα, προωθώντας την αγγειογένεσή τους, την εισβολή των ιστών και μετάσταση σε μακρινά όργανα, μαζί με το αποφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα [3]. Μέχρι σήμερα οι πιο κοινές θεραπείες στον αγώνα κατά του καρκίνου είναι η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Τα συμβατικά αντικαρκινικά φάρμακα εμφανίζουν σημαντικές ελλείψεις οι οποίες περιορίζουν τη χρήση τους στη θεραπεία του καρκίνου. Ωστόσο, έχει επιτευχθεί μεγάλη πρόοδος στις συμβατικές θεραπείες, όμως, αυτές οι μέθοδοι υποβάλλονται σε μη συγκεκριμένο μηχανισμό δράσης, με την έλλειψη εκλεκτικότητας να φθάσουν στα κύτταρα του όγκου, όχι απλώς σκοτώνοντας καρκινικά κύτταρα, αλλά βλάπτοντας και τα υγιή [4]. Επιπλέον, καθώς η βιοδιαθεσιμότητα αυτών των φαρμάκων στους καρκινικούς ιστούς είναι περιορισμένη, απαιτούνται μεγαλύτερες δόσεις, οδηγώντας σε υψηλότερη τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα, μαζί με ένα αυξημένο φαινόμενο αντοχής σε πολλαπλά φάρμακα. Ως εκ τούτου, υπάρχει ένα τεράστιο ενδιαφέρον στην έρευνα νανοφαρμάκων που στοχεύουν όγκους, με την ανάπτυξη νέων θεραπειών κατά του καρκίνου τα τελευταία χρόνια. Για το λόγο

αυτό, επιτεύχθηκε σημαντική πρόοδος στον τομέα της νανοτεχνολογίας για την επίλυση αυτών των προβλημάτων και προσφέρει μια ελπιδοφόρα και αποτελεσματική εναλλακτική λύση για τη θεραπεία του καρκίνου. Τα νανοσωματίδια ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων εκμεταλλεύονται τα ανώμαλα χαρακτηριστικά των καρκινικών ιστών για να στοχεύουν επιλεκτικά το φορτίο τους στα καρκινικά κύτταρα, είτε με παθητική, ενεργή ή την πυροδοτημένη στόχευση. Επιπλέον, τα νανοσωματίδια μπορούν να τροποποιηθούν εύκολα για να βελτιώσουν τις ιδιότητές τους, αυξάνοντας έτσι τον θεραπευτικό δείκτη του φαρμάκου. Έχουν αναπτυχθεί λιποσώματα, πολυμερικά νανοσωματίδια, πολυμερικά μικύλλια και νανοσωματίδια συζεύξεως πολυμερούς ή λιπιδίου-φαρμάκου που ενσωματώνουν κυτταροτοξικά θεραπευτικά μέσα. Ορισμένα από αυτά είναι ήδη στην αγορά και άλλα βρίσκονται υπό κλινική και προκλινική έρευνα.

### **1.1 Η νανοτεχνολογία και η στόχευση φαρμάκων σε όγκους**

Η νανοτεχνολογία είναι ένα πρόσφατο πολυεπιστημονικό πεδίο το οποίο αποτελείται από μηχανικά υλικά και συστήματα στη νανομετρική κλίμακα [5, 6]. Ένας κλάδος της νανοτεχνολογίας, που ονομάζεται νανοιατρική «nanomedicine», περιγράφεται ως η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην ιατρική, επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη συστημάτων νανοσωματιδίων ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων [7, 8]. Αυτά τα συστήματα είναι μεταξύ 10 και 100 nm σε μέγεθος, ιδανικό λόγω της ενδοκυτταρικής τους πρόσληψης, την υψηλή ικανότητα φόρτωσης και τη ειδική στόχευση σε κύτταρα όγκου όταν σχεδιάζονται για αυτό το σκοπό [9]. Επιπλέον, αυτοί οι νανομεταφορείς προσφέρουν αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα έναντι των τυπικών θεραπειών, παρουσιάζοντας τεράστιες δυνατότητες να ξεπεραστούν οι περιορισμοί των χημειοθεραπευτικών παραγόντων, καθιστώντας τους μια εξαιρετική επιλογή για χορήγηση τους ως μεταφορείς φαρμάκων με στόχο τον όγκο. Για παράδειγμα, παρέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου στον όγκο, λόγω της αυξημένης συσσώρευσής τους στη θέση του όγκου και, συνεπώς, χαμηλότερων συγκεντρώσεων σε υγιείς ιστούς. Επομένως, οι αντικαρκινικές τους επιδράσεις

αυξάνονται ενώ η προκύπτουσα τοξικότητα και οι παρενέργειες μειώνονται. Επιπλέον, καθώς τα συμβατικά φάρμακα είναι αρκετά μικρά σε μέγεθος, απομακρύνονται ταχέως από την κυκλοφορία του αίματος, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματική τους συγκέντρωση μέσα στον όγκο [10]. Με την ενσωμάτωση αυτών των μικροσκοπικών φαρμάκων σε ένα κατάλληλο νανο-όχημα, ο χρόνος κυκλοφορίας τους στην κυκλοφορία του αίματος θα παραταθεί, επιτρέποντας σε μια επαρκή ποσότητα του φαρμάκου να φτάσει στο στόχο του, δηλαδή τον όγκο [11]. Συνεπώς, τα νανოსωματίδια θεωρούνται ένα ελπιδοφόρο εργαλείο για την μεταφορά αδιάλυτων και ευαίσθητων φαρμάκων, όχι μόνο ως αποτελεσματικός φορέας, αλλά και για την προστασία τους από την αποδόμηση, αλλά και επιτρέποντας την επιλεκτική και ελεγχόμενη απελευθέρωση των φαρμάκων στις στοχευμένες τοποθεσίες [12].



Εικόνα 1. Παραδείγματα τύπων νανοςωματιδίων που χρησιμοποιούνται ως μεταφορείς φαρμάκων. [13]

## 1.2 Βέλτιστα χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Για να ξεπεραστούν αποτελεσματικά όλες οι προκλήσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω και να στοχευθούν οι αντικαρκινικοί παράγοντες στους ιστούς των όγκων, τα συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων θα πρέπει να μπορούν να παραμείνουν στην κυκλοφορία του αίματος για αρκετό χρονικό διάστημα με ελάχιστη απώλεια του φορτίου ή της δραστηριότητάς τους. Έτσι, οι νανοφορείς πρέπει να κρύβονται από τους μακροφάγους του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (RES), υπεύθυνων για την κατάποση και την καταστροφή του παράξενων υλικών [14]. Οι δύο κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την πρόσληψη τους από κύτταρα του όγκου και την αναγνώριση από το RES είναι το μέγεθος των σωματιδίων και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειάς τους. Όσον αφορά το μέγεθος των νανοσωματιδίων, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά αιμοφόρα αγγεία, οι διασταυρώσεις διακένων μεταξύ γειτονικών ενδοθηλιακών κυττάρων σε ιστούς όγκων έχουν εκτιμηθεί ότι είναι 100-600 nm [15]. Ως εκ τούτου, υποτίθεται ότι, για την επαρκή εξαγγείωση των όγκων, το ευνοϊκότερο μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι μικρότερο από 100 nm. Όσον αφορά τα επιφανειακά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, οι νανομεταφορείς με υδρόφιλες επιφάνειες έχουν παρατεταμένους χρόνους κυκλοφορίας στην κυκλοφορία του αίματος λόγω της μειωμένης κάθαρσης από το RES. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με την προσθήκη ενός υδρόφιλου πολυμερούς. Το πολυμερές που χρησιμοποιείται ευρύτερα για το σκοπό αυτό είναι πολυ-αιθυλενογλυκόλη (PEG), ικανή να προσδίδει ιδιότητες στα νανοσωματίδια που τους επιτρέπει να κινούνται απαρατήρητα στην κυκλοφορία του αίματος, προφανώς επειδή η προσθήκη πολυ-αιθυλενογλυκόλης στην επιφάνεια νανοσωματιδίων εμποδίζει τη σύνδεση οψωνίνης μειώνοντας τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Επομένως, η PEG θα βελτιώσει τη κολλοειδή σταθερότητα και θα αποτρέψει τη σύλληψη νανοσωματιδίων από το RES, αυξάνοντας τον χρόνο κυκλοφορίας τους και συνεπώς τη συσσώρευση τους στη θέση του όγκου [16]. Επιπλέον, το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων είναι ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την πρόσληψη

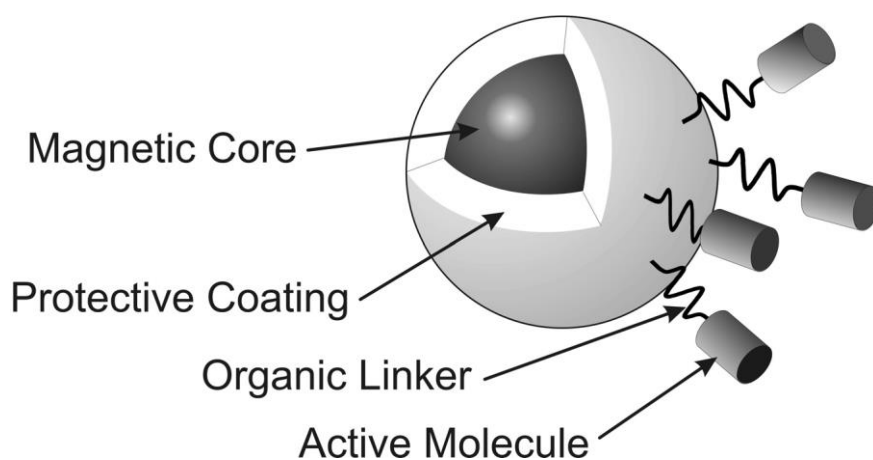
κυττάρων του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι τα θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια απορροφώνται εύκολα από τα κύτταρα, ωστόσο παράγουν σημαντικές ανοσολογικές αντιδράσεις. Επομένως, για κλινικές εφαρμογές, προτιμώνται ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα νανοσωματίδια [17].

### **1.3 Εφαρμογές μαγνητικών νανοσωματίδιων ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων**

Τα νανοσωματίδια που αποτελούνται από στοιχεία όπως ο σίδηρος, νικέλιο και κοβάλτιο και εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες ονομάζονται «μαγνητικά νανοσωματίδια». Λόγω των μαγνητικών τους ιδιοτήτων, τα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να χειρίζονται από ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια τα οποία είναι αρκετά μικρά, και αποτελούνται από οξείδια σιδήρου και παρουσιάζουν μαγνητική συμπεριφορά μόνο παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου ονομάζονται «υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου» (superparamagnetic iron oxide nanoparticles-SPIONs). Τα μαγνητικά νανοσωματίδια και τα SPIONs χρησιμοποιούνται σε διάφορες βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα ως παράγοντες αντίθεσης σε απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MR) επισκευή ιστών, ανοσοδοκιμασία, αποτοξίνωση βιολογικών υγρών, αντικαρκινική μαγνητική υπερθερμία, διαχωρισμός κυττάρων όπως επίσης και συστήματα μεταφοράς [18,19]. Τα SPIONs ως συστήματα μεταφοράς θεραπευτικών προσεγγίσεων μπορούν να δράσουν ως φορείς για πολλά διαφορετικά μόρια, όπως αλκαλοειδή φυτών, παράγοντες αλκυλίωσης, αντιμεταβολίτες, ραδιονουκλίδια, αντικαρκινικά αντιβιοτικά, μονοκλωνικά αντισώματα, κυτοκίνες, εμβόλια και νουκλεϊνικά οξέα [20]. Η αρχή των μαγνητικών νανοσωματιδίων ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου χρονολογείται στα τέλη του 1970. Η χρήση των SPIONs είτε ως ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων ή γονιδίων συμβάλλει στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας με πολλούς τρόπους. Πρώτα, αξιοποιώντας το μαγνητικό πεδίο ως κινητήρια δύναμη για τα SPIONs οδηγεί σε μια μη επεμβατική



θεραπευτική προσέγγιση. Ένα στατικό μαγνητικό πεδίο με μέτρια πυκνότητα μαγνητικής ροής προκαλεί οποιεσδήποτε γνωστές ανεπιθύμητες παρενέργειες και συνεπώς η και συνεπώς η συμμόρφωση του ασθενούς είναι υψηλή [21]. Δεύτερον, στη θεραπεία του καρκίνου, η στόχευση όγκων με SPIONs χρησιμοποιώντας εξωτερικό μαγνητικό πεδίο αυξάνει την εξειδίκευση στη θέση του στόχου και, συνεπώς, την εκλεκτικότητα της θεραπείας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα μειωμένες παρενέργειες και χαμηλότερο κόστος θεραπείας [20]. Υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα SPION με επικάλυψη πολυμερούς με διάμετρο 100-200 nm, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές *in vitro* και μερικές *in vivo* μελέτες μαγνητικής καθοδήγησης. [22-29]. Όπως περιγράφηκε από τους Gupta και Gupta (2005), οι φυσικές ιδιότητες των SPIONs στην πρόσληψη μαγνητικών νανοσωματιδίων σε κακοήθη κύτταρα όπως το μέγεθος, το σχήμα, η υδρόφιλη φύση, το επιφανειακό φορτίο και η μαγνητική συμπεριφορά, είναι υπεύθυνες για την βιοκατανομή και τη βιοσυμβατότητα. Χημικές ιδιότητες όπως η σύνθεση και η επίστρωση του πυρήνα είναι υπεύθυνες για τη βιοσυμβατότητα καθώς και για τη δέσμευση διαφορετικών μορίων για θεραπευτικές προσεγγίσεις και συνεπώς θεραπευτική αποτελεσματικότητα [18]. Διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει αποτελεσματικότερη διέλευση μεμβράνης και κυτταρική πρόσληψη μικρότερων σωματιδίων σε σύγκριση με μεγαλύτερα, π.χ. 10-20 nm έναντι 1.000 nm και 70 nm έναντι 200 nm, ανεξάρτητα από τη μαγνητική συμπεριφορά τους [30-31].

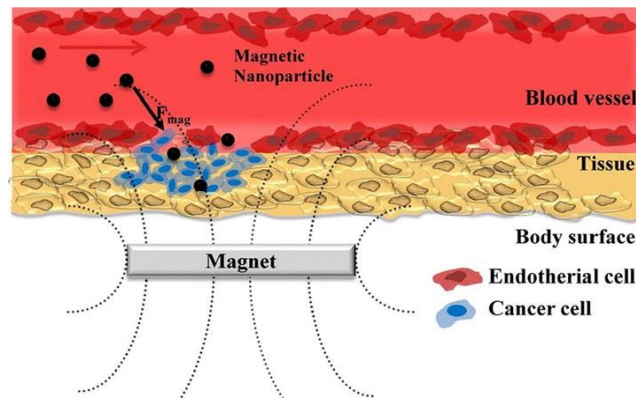


Εικόνα 2. Παράδειγμα μαγνητικού νανοσωματιδίου ως μεταφορέας φαρμάκων. [32]

### **Μαγνητικά νανοσωματίδια (MNPs) στη μεταφορά φαρμάκων**

Στην μεταφορά φαρμάκων , υπάρχουν τρεις κύριοι στόχοι: στόχευση του φαρμάκου στην επιθυμητή περιοχή, μείωση των παρενεργειών του φαρμάκου στα γύρω όργανα ή ιστούς και έλεγχου της απελευθέρωσης του φαρμάκου για να αποφευχθεί ο κλασικός κύκλος υπερδοσολογίας / υποδόσης. Τα μαγνητικά NPs παρέχουν ένα μοντέλο για την επίτευξη αυτών των στόχων. Έτσι, η επικάλυψη της επιφάνειας των MNPs έχει βελτιστοποιηθεί για τον έλεγχο της φόρτωσης του φαρμάκου, την μεταφορά του φαρμάκου και την απελευθέρωση του φαρμάκου στη επιθυμητή περιοχή. Η επιφανειακή επικάλυψη στοχεύει, εκτός από τη μείωση της τοξικότητας και να βελτιώσει τη βιοσυμβατότητα, να παρέχει στα MNPs λειτουργικές ομάδες που θα είναι πιο κατάλληλες για συνδυασμό φαρμάκων. Οι ευρείες εφαρμογές των MNPs στην στοχοθετημένη μεταφορά φαρμάκων βασίζονται στις μοναδικές ιδιότητες τους, το μαγνητισμό και την ευκολία χειρισμού τους με τη χρήση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (ΕΜΠ), που κατευθύνει τα MNP που μεταφέρουν φάρμακα απευθείας στη συγκεκριμένη περιοχή [33]. Τα MNP διερευνούνται εκτενώς για χρήση ως φορείς φαρμάκων [34,35]. Για παράδειγμα, οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες συζεύγνυνται με MNP μέσω διαφόρων αλληλεπιδράσεων και οι ενώσεις μπορούν να στοχεύουν ειδικά σε εντοπισμένες νοσούντες περιοχές υπό την επίδραση ενός ΕΜΠ [36,37]. Το σύστημα καθοδήγησης με το ΕΜΠ βοηθά τα φάρμακα να ενισχύσουν την τοπική θεραπευτική αποτελεσματικότητα και να μειώσουν την τοξικότητα [38]. Ως θεραπευτικά εργαλεία, τα MNP καλύπτονται με ένα στρώμα βιοδιασπώμενου πολυμερικού κελυφούς ή κατανέμονται ομοιόμορφα στη μήτρα πολυμερών νανοσωματιδίων. Τα προηγούμενα έχει δειχθεί ότι είναι αποτελεσματικοί μαγνητικοί φορείς φαρμάκων. Αυτό οφείλεται στο ότι τα MNPs που έχουν επικαλυφθεί με πολυμερή έχει βρεθεί

ότι μειώνουν το πρόβλημα συσσωμάτωσης και χαμηλώνουν την τοξικότητα σε σύγκριση με τα μη επικαλυμμένα. Τα MNPs προσφέρουν ένα πρωτόκολλο καθοδήγησης θεραπευτικών παραγόντων ειδικά σε μια θέση νόσου, ενώ συγχρόνως μειώνουν τη δοσολογία και μειώνουν ή εξαλείφουν τις επιβλαβείς παρενέργειες που σχετίζονται με μη ειδική πρόσληψη κυτταροτοξικών φαρμάκων από τους υγιείς ιστούς. Η έννοια του συστήματος μαγνητικής υποβοηθούμενης χορήγησης φαρμάκων χρονολογείται από το έργο των Widder et al [39] το 1978. Τα MNPs ως φορείς σε συστήματα χορήγησης φαρμάκων επικαλύπτονται συχνά με «έξυπνες επιφάνειες». Είναι τυπικά σχεδιασμένα να αναγνωρίζουν και να στοχεύουν την ασθενή περιοχή μετά από [40-44] και να απελευθερώνουν το φάρμακο στον όγκο σε απόκριση από ένα συγκεκριμένο ερέθισμα, όπως η θερμοκρασία [45] ή το pH [46]. Τα υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (SPIONs) είναι καλοί υποψήφιοι για την παράδοση θεραπευτικών φαρμάκων για τον καρκίνο, καθώς έχουν μαγνητικές ιδιότητες, επιτρέποντας την ειδική συσσώρευση σε συγκεκριμένη περιοχή και επιπλέον την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας τις καθιερωμένες τεχνικές απεικόνισης [47-49]. Τα MNPs που είναι επικαλυμμένα με πολυμερή ευαίσθητα στη θερμοκρασία έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή λόγω των διάφορων εφαρμογών τους στους τομείς της βιοτεχνολογίας και της ιατρικής. Είναι δημοφιλή λόγω των βλαβερών παρενεργειών που προκαλούνται από την παραδοσιακή θεραπεία του καρκίνου, κυρίως μέσω χημειοθεραπείας και / ή ακτινοθεραπείας και μη καρκινικής εκλεκτικότητας. Το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο δεν χρησιμοποιείται μόνο για να κατευθύνει τα νανοδομές σε μια θέση νόσου ,αλλά και παράγει επίσης θερμότητα ως ερέθισμα για το κέλυφος του πολυμερούς [50-53]. Αυτοί οι μαγνητικοί στοχευόμενοι φορείς συνήθως σχεδιάζονται με διπλή λειτουργικότητα, ως παράγοντες απεικόνισης και ως φορείς φαρμάκων. Γενικά, αυτά τα συστήματα είναι ικανά για στοχοθετημένη στόχευση και ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου με υψηλή βιοσυμβατότητα λόγω της μείωσης της συστημικής τοξικότητας [54].



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση μαγνητικών νανοσωματιδίων ως μεταφορείς φαρμάκων υπό την επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. [55]

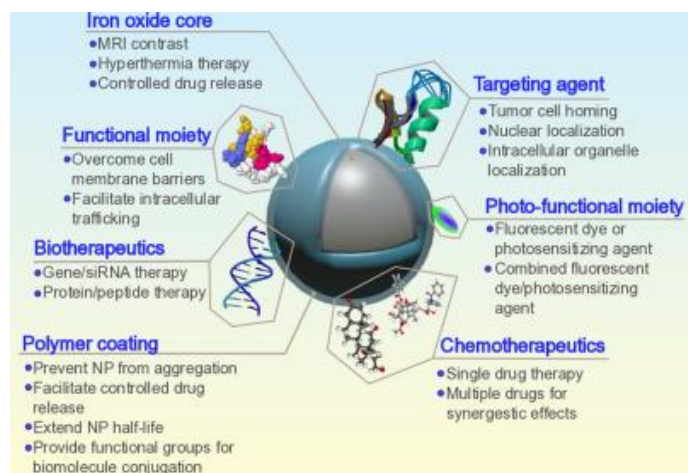
### **Ρόλος των SPIONs στη διάγνωση του καρκίνου και την παρακολούθηση της θεραπείας**

Η απεικόνιση του ιστού του όγκου έχει πρωταρχική σημασία για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της θεραπείας του καρκίνου [56,57]. Οι σαφείς απεικονίσεις των ορίων του όγκου επιτρέπουν την ακριβή εκτίμηση της κατανομής του όγκου και την ανταπόκρισή του στις χειρουργικές επεμβάσεις αφαίρεσης και τις θεραπείες. Πολλές μέθοδοι απεικόνισης χρησιμοποιούνται για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των ακτίνων Χ, υπερήχων, μαγνητικής τομογραφίας, υπολογιστικής τομογραφίας (CT) και τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET) [56]. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου έχουν διερευνηθεί εκτενώς για τη χρήση τους στην αύξηση της αντίθεσης για τη μαγνητική τομογραφία [58]. Πρόσφατα, οι υβριδικές συνθέσεις NP με υπεραπαγωγικούς πυρήνες οξειδίου σιδήρου τροποποιημένες με εξωτερικές επικαλύψεις και λειτουργικούς ανιχνευτές έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να αυξάνουν την αντίθεση σε εναλλακτικές τεχνικές απεικόνισης εκτός από τη μαγνητική

τομογραφία. Τα νανοσωματίδια που αυξάνουν την αντίθεση μπορούν να συσσωρευτούν επιλεκτικά στις θέσεις των όγκων βοηθώντας στην παροχή ακριβών πληροφοριών σχετικά με την έκταση του όγκου. Η μέθοδος συσσώρευσης νανοσωματιδίων σε θέσεις όγκων τυπικά κατηγοριοποιείται σε δύο ξεχωριστές κατηγορίες: παθητική και ενεργή στόχευση. Η παθητική στόχευση βασίζεται στο φαινόμενο EPR (Enhanced permeability and retention) [59]. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκινικού ιστού είναι ο σχηματισμός διάτρητης αγγειακής οδού και η ενδοαυλική λεμφική αποστράγγιση. Νανοσωματίδια μικρότερα από περίπου 100 nm μπορούν να περάσουν από τέτοια διαρρέοντα αγγεία στο μικροπεριβάλλον του όγκου και να παραμείνουν για ένα χρονικό διάστημα που είναι σημαντικά μεγαλύτερο από την κάθαρση αίματος των νανοσωματιδίων. Αυτό είναι το φαινόμενο EPR [60]. Η παθητική στόχευση είναι περιορισμένη εντούτοις επειδή δεν εμφανίζουν όλοι οι όγκοι το φαινόμενο EPR και ο βαθμός διαπερατότητας του αγγειακού όγκου είναι απίθανο να είναι ομοιογενής σε ολόκληρη την περιοχή [61]. Προσπάθειες υπέρβασης αυτών των περιορισμών πραγματοποιούνται με ενεργή στόχευση. Η ενεργή στόχευση επιτυγχάνεται με τροποποίηση ενός NP μέσω της προσάρτησης υποκαταστατών στόχευσης στην επιφάνεια του NP. Οι υποκαταστάτες που αναγνωρίζουν βιολογικές δομές μοναδικές ή υπερεκφρασμένες σε καρκινικά κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να συσσωρευτούν κατά προτίμηση στις θέσεις των όγκων. Ένας τρίτος τρόπος στόχευσης μοναδικός σε μαγνητικά NPs όπως SPIONs είναι η χρήση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου για την στόχευση των NPs στον τόπο δράσης [62]. Και οι τρεις αυτοί μηχανισμοί στόχευσης χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στην ανάπτυξη των SPION ως παράγοντες απεικόνισης. Η συντριπτική πλειοψηφία των σκευασμάτων SPION βρίσκονται σε προκλινική ανάπτυξη, παρόλο που υπάρχουν αρκετές μελέτες που χρησιμοποιούν το νανοσωματίδιο ferumoxytol από οξείδιο του σιδήρου ως παράγοντα αντίθεσης της μαγνητικής τομογραφίας που υπόκειται σε κλινικές δοκιμές [63-66].

## **Άλλες εφαρμογές**

- α) Magnetic Resonance Imaging (MRI)
- β) Multimodal Imaging
- γ) Induced Magnetic Hyperthermia
- δ) Photothermal ablation
- ε) Φωτοδυναμική θεραπεία [67]

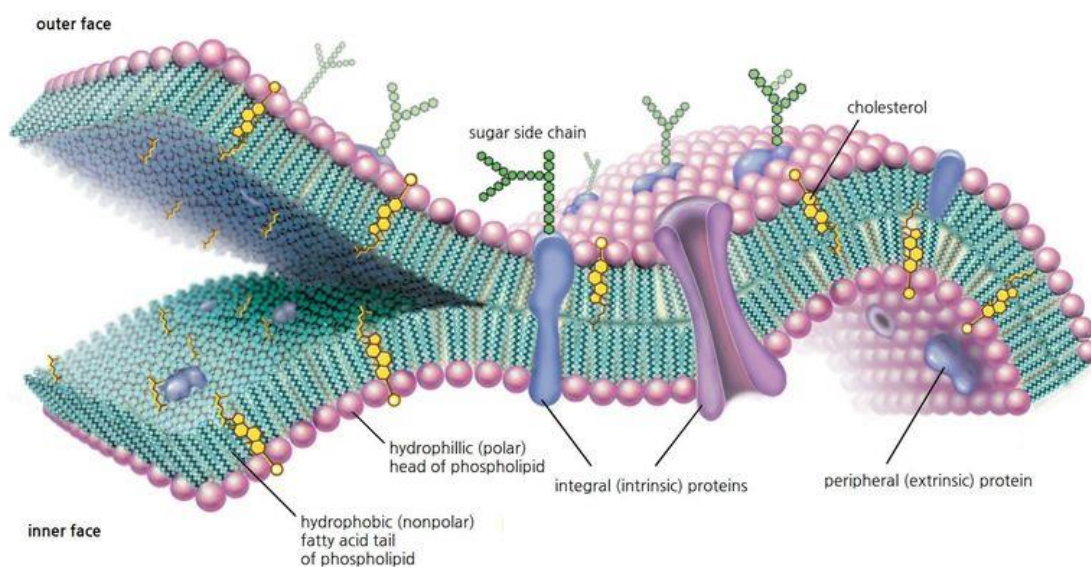


Εικόνα 4. Μαγνητικό νανοσωματίδιο με πληθώρα επικαλύψεων για όλες τις πιθανές εφαρμογές του στη νανοϊατρική. [67]

#### 1.4 Η κυτταρική μεμβράνη και η σημασία της

Η δομή και η λειτουργία των κυττάρων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις μεμβράνες, οι οποίες όχι μόνο διαχωρίζουν το εσωτερικό του κυττάρου από το περιβάλλον του αλλά και καθορίζουν τα εσωτερικά διαμερίσματα των ευκαρυωτικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του πυρήνα και των κυτταροπλασματικών οργανιδίων. Ο σχηματισμός βιολογικών μεμβρανών βασίζεται στις ιδιότητες των λιπιδίων και όλες οι κυτταρικές μεμβράνες έχουν κοινή δομική οργάνωση: διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων με πρωτεΐνες. Αυτές οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για πολλές εξειδικευμένες λειτουργίες. Μερικές δρουν

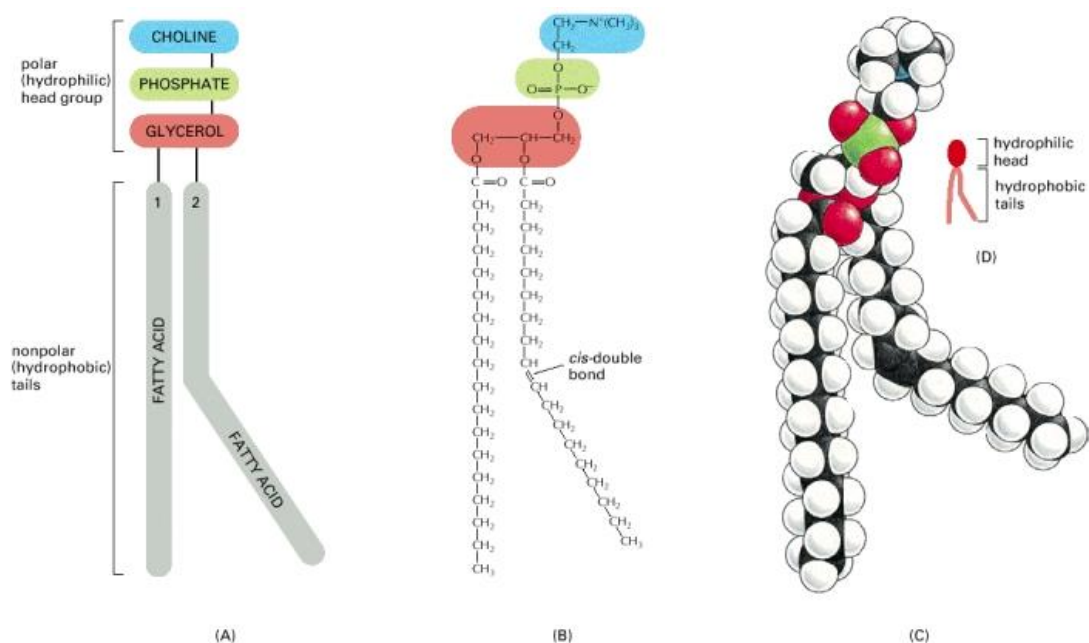
ως υποδοχείς που επιτρέπουν στο κύτταρο να ανταποκρίνεται σε εξωτερικά σήματα, μερικές είναι υπεύθυνες για την επιλεκτική μεταφορά μορίων διαμέσου της μεμβράνης και άλλες συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επιπλέον, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ελέγχουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων πολυκυτταρικών οργανισμών. Η κοινή δομική οργάνωση των μεμβρανών υποκρύπτει έτσι μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών και εξειδικευμένων λειτουργιών της μεμβράνης.



Εικόνα 5. Μοριακή όψη της κυτταρικής μεμβράνης. Επισημαίνεται τα φωσφολιπίδια, η χοληστερόλη και οι ενδογενείς και εξωγενείς πρωτεΐνες.

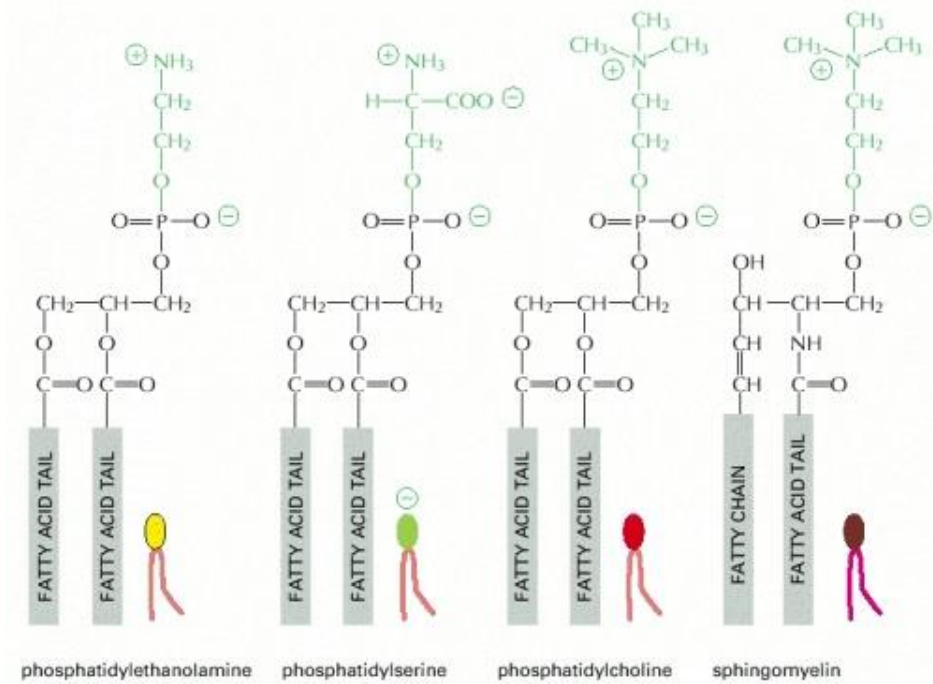
Τα λιπίδια αποτελούν περίπου το 50% της μάζας των περισσότερων κυτταρικών μεμβρανών, αν και η αναλογία αυτή ποικίλει ανάλογα με τον τύπο της μεμβράνης. Οι μεμβράνες πλάσματος, για παράδειγμα, είναι περίπου 50% λιπίδια και 50% πρωτεΐνη. Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, από την άλλη πλευρά, περιέχει ένα ασυνήθιστα υψηλό κλάσμα (περίπου 75%) πρωτεΐνης, αντανακλώντας την αφθονία των συμπλεγμάτων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταφορά

ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η λιπιδική σύνθεση διαφόρων κυτταρικών μεμβρανών ποικίλει επίσης. Η κυτταρική μεμβράνη της *E. Coli* αποτελείται κυρίως από φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, η οποία αποτελεί το 80% του συνολικού λιπιδίου. Οι κυτταρικές μεμβράνες των θηλαστικών είναι πιο πολύπλοκες, που περιέχουν τέσσερα κύρια φωσφολιπίδια, φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλσερίνη, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και σφιγγομυελίνη, τα οποία μαζί συνιστούν το 50 έως 60% των συνολικών λιπιδίων της μεμβράνης. Εκτός από τα φωσφολιπίδια, οι μεμβράνες πλάσματος των ζωικών κυττάρων περιέχουν γλυκολιπίδια και χοληστερόλη, τα οποία γενικά αντιστοιχούν σε περίπου 40% των συνολικών μορίων λιπιδίων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα θεμελιώδη δομικά στοιχεία όλων των κυτταρικών μεμβρανών είναι τα φωσφολιπίδια. Αυτά έχουν πολική κεφαλή και δύο υδρόφοβες υδρογονανθρακικές ουρές. Οι ουρές είναι συνήθως λιπαρά οξέα και μπορούν να διαφέρουν σε μήκος (κανονικά περιέχουν μεταξύ 14 και 24 ατόμων άνθρακα). Μια ουρά συνήθως έχει έναν ή περισσότερους *cis*-διπλούς δεσμούς (δηλ., ακόρεστη), ενώ η άλλη ουρά δεν είναι (δηλ. κορεσμένη).



Εικόνα 6. Παράδειγμα φωσφολιπιδίου. Η φωσφατιδυλοχολίνη αντιπροσωπεύεται (Α) σχηματικά, (Β) με τύπο, (Γ) ως μοντέλο πλήρωσης χώρου και (Δ) ως σύμβολο. [68]

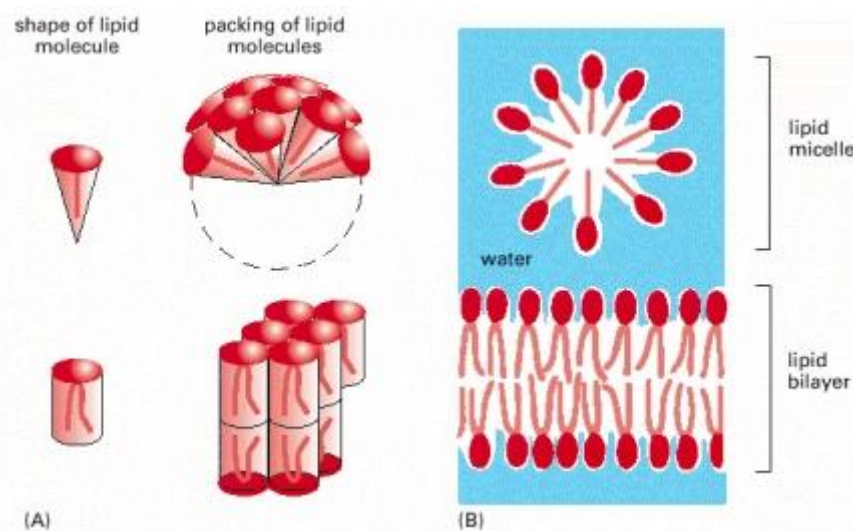




Εικόνα 7. Τέσσερα κύρια φωσφολιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες θηλαστικών. [68]

Το κυλινδρικό σχήμα και η αμφιπαθής φύση των λιπιδικών μορίων είναι οι παράγοντες που τα οδηγούν να σχηματίσουν διπλοστιβάδες αυθόρμητα σε υδατικά περιβάλλοντα. Τα υδρόφιλα μόρια διαλύονται εύκολα στο νερό επειδή περιέχουν φορτισμένες ομάδες ή μη φορτισμένες πολικές ομάδες που μπορούν να σχηματίσουν είτε ευνοϊκές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είτε δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού. Τα υδρόφοβα μόρια, αντιθέτως, είναι αδιάλυτα στο νερό επειδή όλα, ή σχεδόν όλα τα άτομα τους είναι μη φορτισμένα και μη πολικά και συνεπώς δεν μπορούν να σχηματίσουν ενεργειακά ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις με τα μόρια του νερού. Εάν διασκορπιστούν στο νερό, αναγκάζουν τα παρακείμενα μόρια νερού να αναδιοργανωθούν σε κελύφη που θυμίζουν τον πάγο που περιβάλλουν το υδρόφοβο μόριο. Επειδή αυτές οι δομές κλουβιών είναι πιο διατεταγμένες από το περιβάλλον νερό, ο σχηματισμός τους αυξάνει την ελεύθερη ενέργεια. Αυτό το ελεύθερο ενεργειακό κόστος ελαχιστοποιείται, ωστόσο, εάν τα υδρόφοβα μόρια (ή τα υδρόφοβα τμήματα των αμφιπαθών μορίων) συγκεντρωθούν έτσι ώστε να επηρεαστεί ο μικρότερος αριθμός μορίων νερού. Για τον παραπάνω λόγο, τα μόρια των λιπιδίων συσσωματώνονται αυθόρμητα για να

θάψουν τις υδρόφοβες ουρές τους στο εσωτερικό και να εκθέσουν τις υδρόφιλες κεφαλές τους στο νερό. Ανάλογα με το σχήμα τους, μπορούν να το κάνουν με δύο τρόπους: μπορούν να σχηματίσουν σφαιρικά μικύλλια, με τις ουρές προς τα μέσα ή μπορούν να σχηματίσουν διμοριακά φύλλα ή διπλοστιβάδες, με τις υδρόφοβες ουρές να επικαλύπτονται μεταξύ των υδρόφιλων κεφαλών (Εικόνα 8). Όντας κυλινδρικά, τα μόρια φωσfolιπιδίων σχηματίζουν αυθόρμητα διπλοστιβάδες σε υδατικά περιβάλλοντα. Σε αυτήν την ενεργειακά πιο ευνοϊκή διάταξη, οι υδρόφιλες κεφαλές αλληλεπιδρούν με το νερό σε κάθε επιφάνεια της διπλοστιβάδας και οι υδρόφοβες ουρές είναι θωρακισμένες από το νερό αφού εντοπίζονται στο εσωτερικό.

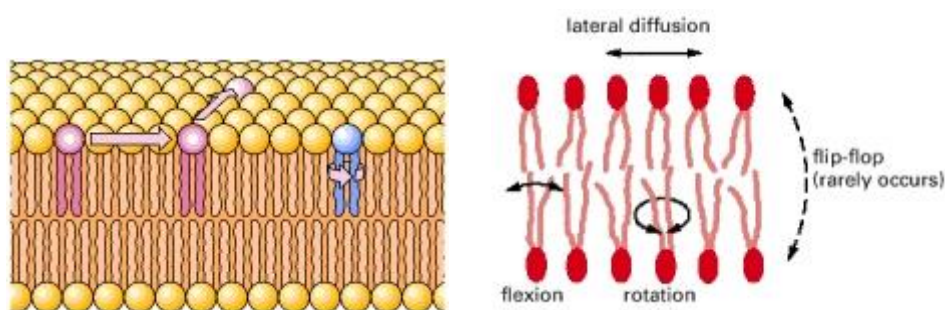


Εικόνα 8.(A) Τα μόρια λιπιδίου σχήματος σφήνας (επάνω) σχηματίζουν μικύλλια, ενώ τα μόρια φωσfolιπιδίων σχήματος κυλίνδρου (κάτω) σχηματίζουν διπλοστιβάδες. (B) Ένα μικκύλιο και μία διπλοστιβάδα που φαίνονται σε διατομή. Τα λιπιδικά μόρια σχηματίζουν αυθόρμητα μία ή την άλλη από αυτές τις δομές στο νερό, ανάλογα με το σχήμα τους. [68]

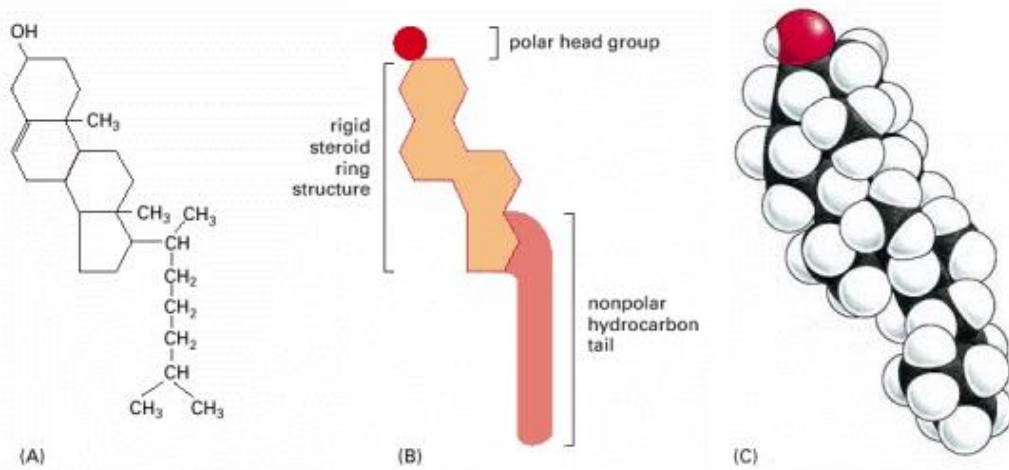
### Η λιπιδική διπλοστιβάδα

Μια σημαντική ιδιότητα των λιπιδικών διπλοστιβάδων είναι ότι συμπεριφέρονται ως δισδιάστατα υγρά στα οποία τα επιμέρους μόρια (λιπίδια και πρωτεΐνες) είναι ελεύθερα να περιστρέφονται και να κινούνται σε πλευρικές

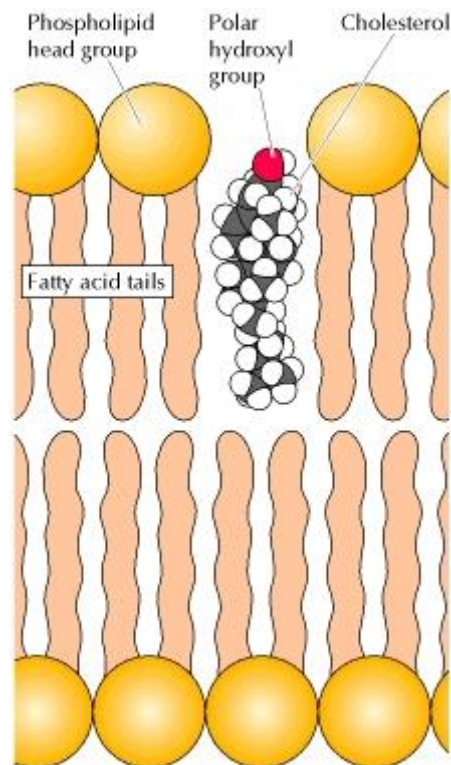
κατευθύνσεις (Εικόνα 9). Αυτή η ρευστότητα είναι μια κρίσιμη ιδιότητα των μεμβρανών και καθορίζεται τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από τη λιπιδική σύνθεση. Για παράδειγμα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βραχύτερων αλυσίδων λιπαρών οξέων είναι ασθενέστερες από εκείνες μεταξύ μεγαλύτερων αλυσίδων, έτσι οι μεμβράνες που περιέχουν μικρότερες αλυσίδες λιπαρών οξέων είναι λιγότερο άκαμπτες και παραμένουν στη υγρή φάση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Κάθε διπλός δεσμός δημιουργεί μια μικρή συστροφή στην ουρά. Οι διαφορές στο μήκος και τον κορεσμό των ουρών των λιπαρών οξέων είναι σημαντικές επειδή επηρεάζουν την ικανότητα των φωσφολιπιδίων να συσσωρεύονται μεταξύ τους, επηρεάζοντας έτσι τη ρευστότητα της μεμβράνης. Η λιπιδική διπλοστιβάδα πολλών κυτταρικών μεμβρανών δεν αποτελείται αποκλειστικά από φωσφολιπίδια. Συχνά περιέχει επίσης χοληστερόλη και γλυκολιπίδια. Λόγω της δομής του υδρογονανθρακικού δακτυλίου, η χοληστερόλη διαδραματίζει ξεχωριστό ρόλο στον προσδιορισμό της ρευστότητας της μεμβράνης. Τα μόρια χοληστερόλης εισάγονται στη διπλοστιβάδα με τις πολικές υδροξυλομάδες τους κοντά στις υδρόφιλες ομάδες κεφαλής των φωσφολιπιδίων (Εικόνα 11). Οι άκαμπτοι υδρογονανθρακικοί δακτύλιοι της χοληστερόλης συνεπώς αλληλεπιδρούν με τις περιοχές των αλυσίδων λιπαρών οξέων που είναι γειτονικές με τις κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Αυτή η αλληλεπίδραση μειώνει την κινητικότητα των εξωτερικών τμημάτων των αλυσίδων λιπαρών οξέων, καθιστώντας αυτό το τμήμα της μεμβράνης πιο άκαμπτο. Από την άλλη πλευρά, η εισαγωγή της χοληστερόλης επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αλυσίδων λιπαρών οξέων, διατηρώντας έτσι τη ρευστότητα της μεμβράνης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.



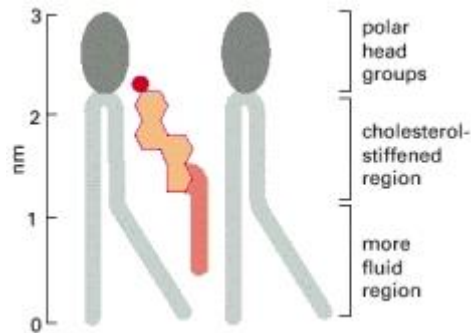
Εικόνα 9. Κινητικότητα των φωσfolιπιδίων σε μια μεμβράνη. Τα μεμονωμένα φωσfolιπίδια μπορούν να περιστρέφονται και να κινούνται πλευρικά μέσα σε μια διπλοστιβάδα. [68]



Εικόνα 10. Η δομή της χοληστερόλης. Η χοληστερόλη αντιπροσωπεύεται (Α) με τον τύπο της, (Β) με ένα σχηματικό μοντέλο, και (Γ) με ένα μοντέλο πλήρωσης χώρου. [68]



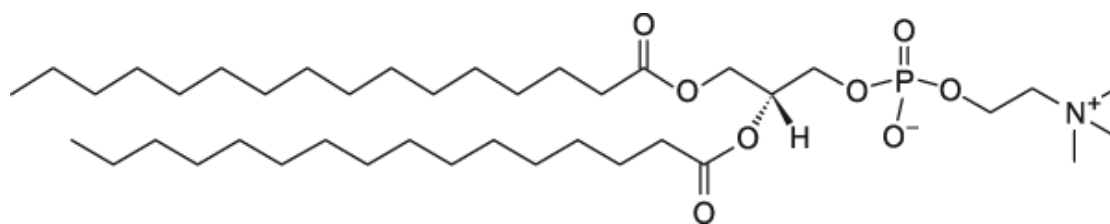
Εικόνα 11. Εισαγωγή της χοληστερόλης στη μεμβράνη με την πολική υδροξυλομάδα της κοντά στις ομάδες πολικών κεφαλών των φωσφολιπιδίων. [68]



Εικόνα 12. Η αλληλεπίδραση λιπιδίου-χοληστερόλης μειώνει την κινητικότητα των εξωτερικών τμημάτων των αλυσίδων των λιπαρών οξέων. [68]

### Μοντελοποίηση λιπιδικής διπλοστιβάδας

Όπως περιγράφεται και παραπάνω μία πραγματική κυτταρική μεμβράνη είναι πολύ σύνθετη και περίπλοκη για να μοντελοποιηθεί στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για το λόγο αυτό το μοντέλο της μεμβράνης που θα χρησιμοποιηθεί θα είναι μία λιπιδική διπλοστιβάδα που θα αποτελείται από φωσφολιπίδια DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine – Διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη) τα οποία είναι κύρια συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Στην κανονική θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος (36.6 °C) η κυτταρική μεμβράνη παρουσία στερολών βρίσκεται στην υγρή φάση. Όμως το DPPC απουσία στερολών που χρησιμοποιείται για το μοντέλο της διπλοστιβάδας στη θερμοκρασία σώματος βρίσκεται σε κατάσταση γέλης. Επειδή όμως αυτό δεν είναι ρεαλιστικό, οι προσομοιώσεις με τη διπλοστιβάδα γίνονται σε θερμοκρασία 323,16 K , δηλαδή 50 °C, όπου το DPPC βρίσκεται στην υγρή κατάσταση.



Εικόνα 13. Το μόριο DPPC.

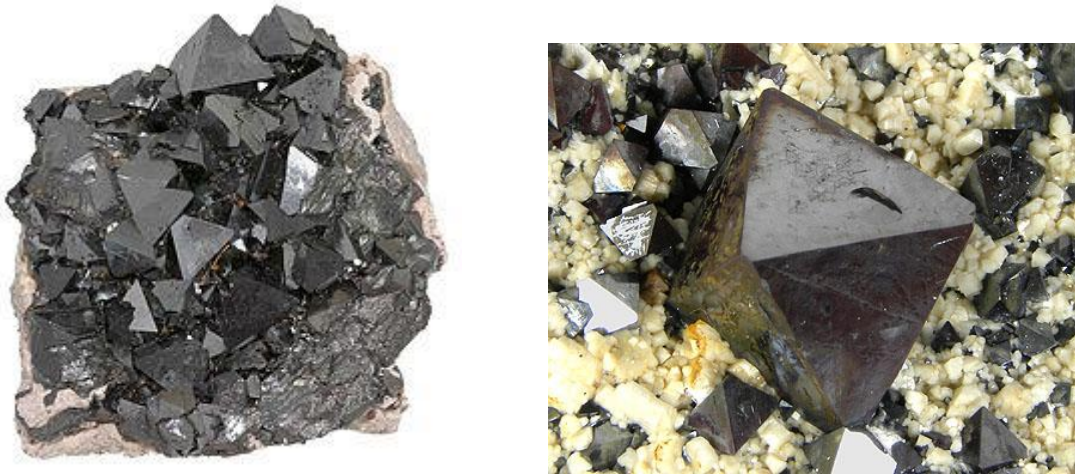
## 1.5 Λειτουργικό Νανοσωματίδιο

### Μαγνητίτης ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

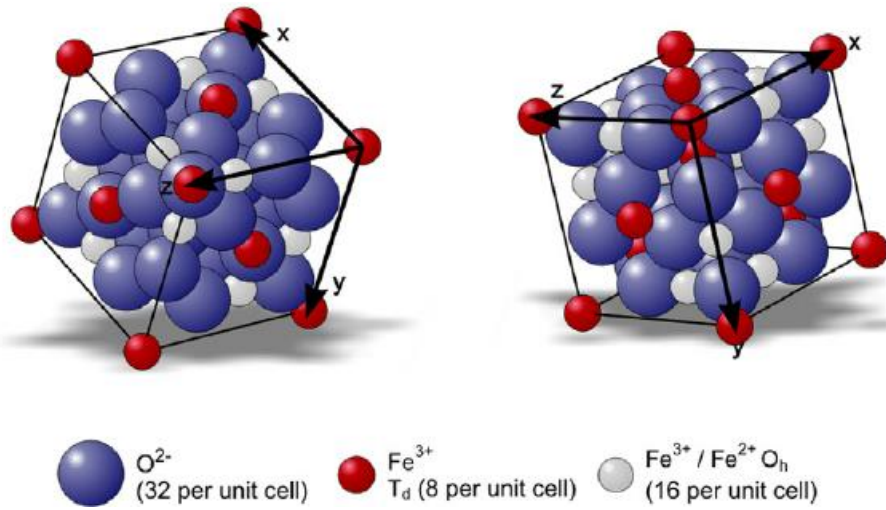
Από όλα τα γνωστά φυσικά ορυκτά στη Γη, ο μαγνητίτης είναι το πιο μαγνητικό και είναι επίσης ένα από τα δύο πιο κοινά οξειδία σιδήρου [69]. Ο μαγνητίτης μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει μια αντίστροφη δομή κρυσταλλικού σπινελίου (spinel), η οποία έχει τον γενικό τύπο  $\text{AB}_2\text{O}_4$ . Ωστόσο, οι πιο πρόσφατες μελέτες για το μαγνητίτη έχουν δείξει ότι το παραπάνω πρόκειται για μια ιδανική περίπτωση και αντ' αυτού η δομή βασίζεται σε κυβική προσωπο-κεντρωμένη σειρά ιόντων οξειδίων με ιόντα A, στην περίπτωση του μαγνητίτη  $\text{Fe}^{2+}$ , που καταλαμβάνει οκταεδρικές οπές και τα ιόντα B,  $\text{Fe}^{3+}$ , κατανέμονται εξίσου μεταξύ οκταεδρικών και τετραεδρικών οπών. Στον μαγνητίτη, τα ιόντα  $\text{Fe}^{2+}$  και  $\text{Fe}^{3+}$  έχουν μη συζευγμένα spin, οδηγώντας σε ενδιαφέρουσες μαγνητικές ιδιότητες. Στη μοναδιαία κυψελίδα περιέχονται 32 ανιόντα οξυγόνου και 24 κατιόντα σιδήρου. Ο  $\text{Fe}^{3+}$  έχει ηλεκτρονική διαμόρφωση  $d^5$  με πέντε μη συζευγμένα ηλεκτρόνια. Τα spin των 8 ιόντων  $\text{Fe}^{3+}$  με συν-ευθυγραμμισμένες μαγνητικές ροπές  $\sim 4 \mu\text{B}$  καταλαμβάνουν τετραεδρικές θέσεις και αλληλοαναιρούνται με τις μαγνητικές ροπές των  $\text{Fe}^{3+}$  που βρίσκονται σε οκταεδρικές θέσεις. Έτσι η μαγνητική ροπή των ιόντων  $\text{Fe}^{3+}$  σε οκταεδρικές και τετραεδρικές θέσεις θα είναι αντιπαράλληλη και δεν προκύπτει καθαρή μαγνήτιση από αυτά τα ιόντα. Τα ιόντα  $\text{Fe}^{2+}$  έχουν  $d^6$  ηλεκτρονική διαμόρφωση με τέσσερα μη



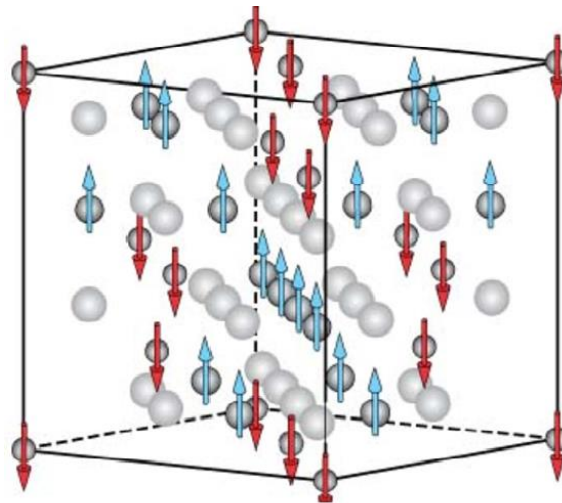
συζευγμένα ηλεκτρόνια και είναι υπεύθυνα για την καθαρή μαγνήτιση. Αυτά τα δισθενή ιόντα τείνουν να ευθυγραμμίζουν τα spin τους παράλληλα με αυτά των τρισθενών ιόντων σε γειτονικές οκταεδρικές σπές. Αυτή η ευθυγράμμιση από άνισες αντιπαράλληλες μαγνητικές ροπές παρέχει συνολική μαγνητική ροπή στον κρύσταλλο. Όλα αυτά οδηγούν στο γεγονός ότι ο μαγνητίτης είναι σιδηριμαγνητικός (Ferrimagnetic) (Εικόνα 16,17). Ο μαγνητίτης είναι γνωστός ότι αλληλεπιδρά πάνω από 106 φορές περισσότερο με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο από οποιοδήποτε άλλο φυσικό ορυκτό [70].



Εικόνα 14. Ορυκτά μαγνητίτη. Παρατηρούνται και οι οκταεδρικοί κρύσταλλοι.

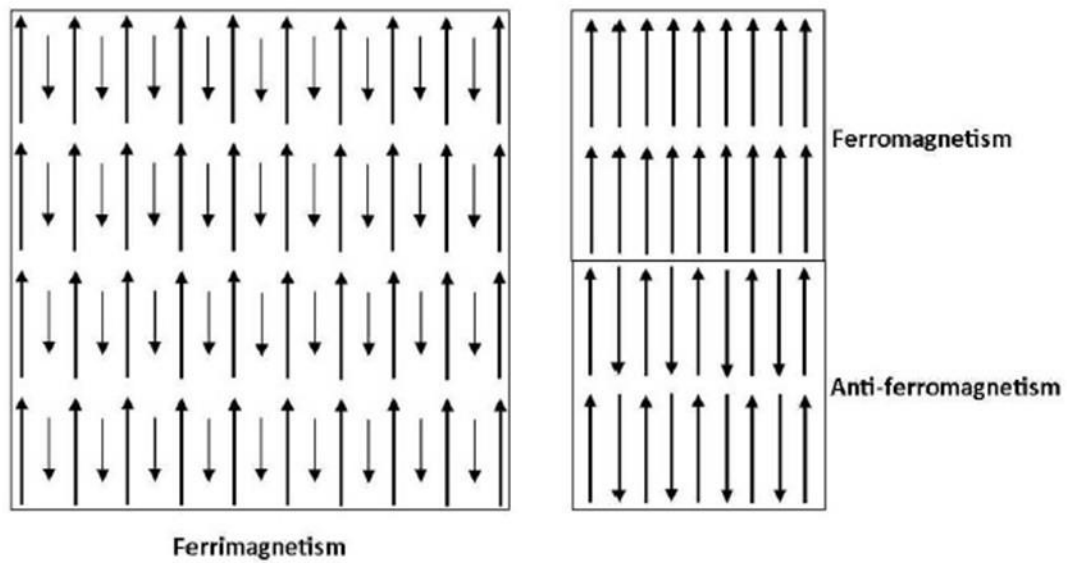


Εικόνα 15. Μοναδιαία κυψελίδα του μαγνητίτη.

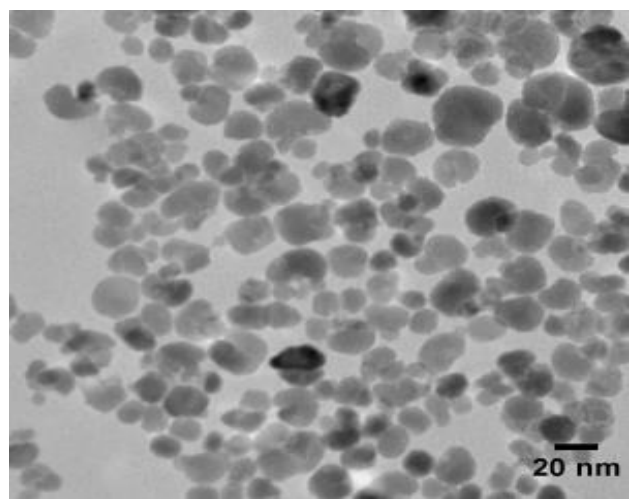


Εικόνα 16. Μοναδιαία κυψελίδα του μαγνητίτη με έμφαση στις μαγνητικές διπολικές ροπές.





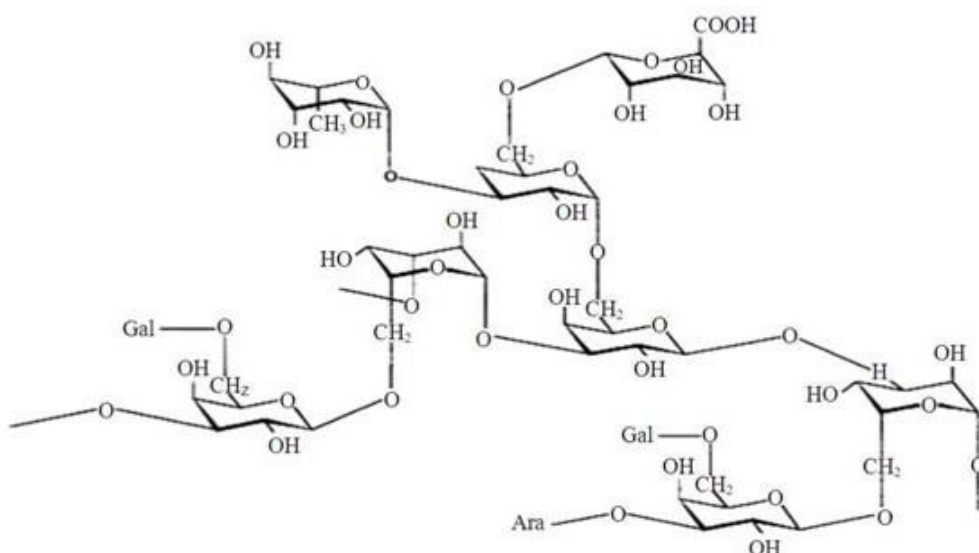
Εικόνα 17. Μαγνητικές διπολικές ροπές για α) σιδηριμαγνητικά υλικά (πχ. Μαγνητίτης). β) σιδηρομαγνητικά υλικά γ) αντι-σιδηρομαγνητικά υλικά



Εικόνα 18. Νανοσωματίδια μαγνητίτη.

**Πολυαραβικό οξύ (ARA)**

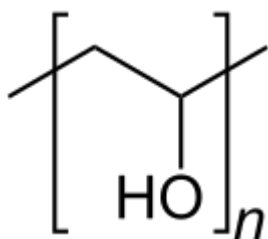
Το πολυαραβικό οξύ, ένας φυσικός σύνθετος πολυσακχαρίτης που προέρχεται από τα εκκρίματα των δέντρων *A. Senegal* και *A. seyal* υπό τη μορφή κόμμεως, και είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υδροκολλοειδή τροφίμων. Το πολυαραβικό οξύ χρησιμεύει ως ένας πολύ αποτελεσματικός γαλακτωματοποιητής και μακροπρόθεσμος σταθεροποιητής στα τρόφιμα και καλλυντικά προϊόντα. Επίσης βρίσκει πληθώρα εφαρμογών στη φαρμακοβιομηχανία καθώς είναι βιοσυμβατό και δεν προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα. Το έκκριμα αποτελείται κυρίως από τρία κλάσματα [71]. Το κύριο κλάσμα είναι ένας πολύ διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μία ραχοκοκαλιά γαλακτόζης με συνδεδεμένα κλάσματα αραβινόζης και ραμνόζης, τα οποία καταλήγουν σε ομάδες γλυκουρονικού οξέος που απαντάται στη φύση ως άλατα μαγνησίου, καλίου και ασβεστίου. Ένα μικρότερο κλάσμα είναι ένα σύμπλοκο αραβινογαλακτάνης-πρωτεΐνης υψηλότερου μοριακού βάρους (GAGP-GA γλυκοπρωτεΐνη) στο οποίο αλυσίδες αραβινογαλακτάνης συνδέονται ομοιοπολικά με αλυσίδες πρωτεΐνης μέσω των ομάδων σερίνης και υδροξυπρολίνης. Το μικρότερο κλάσμα που έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία διαφέρει στη σύνθεση των αμινοξέων της.



Εικόνα 19. Δομή πολυαραβικού οξέος. [71]

## Πολυ (βινυλο αλκοόλη) (PVA)

Η πολυ (βινυλο αλκοόλη) είναι ένα συνθετικό υδατοδιαλυτό πολυμερές με δομική ομάδα τη βινυλική αλκοόλη. Έχει τύπο  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$  και συνήθως πολυμερίζεται με το μοτίβο «ουρά-κεφαλή»  $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-]$  (1-3 διόλη), αλλά μπορεί σε λίγες περιπτώσεις να πολυμεριστεί με το μοτίβο «ουρά-ουρά»  $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-]$  (1-2 διόλη). Μπορεί να εμφανίσει διαμοριακούς και ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, είναι εξαιρετικός γαλακτοματοποιητής και εμφανίζει σταθερότητα ύπο ακτινοβολήση IR & UV. Επιπλέον είναι βιοσυμβατή ένωση και μη τοξική.



Εικόνα 20. Πολυ (βινυλο αλκοόλη) με  $n$  επαναλαμβανόμενες ομάδες

### 1.6 Στόχος μελέτης

Αυτή η μελέτη έχει στόχο να παραμετροποιηθούν πλήρως τα δύο συστήματα των λειτουργικών νανοσωματιδίων και να τα προσομοιωθούν με το πρόγραμμα GROMACS μαζί με ένα μοντέλο λιπιδικής διπλοστιβάδας που θα κατασκευαστεί για αυτή τη μελέτη. Απώτερος σκοπός είναι να αξιολογηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της διπλοστιβάδας και του νανοσωματιδίου και κατ' επέκταση να αξιολογηθούν τα συστήματα ως μεταφορείς φαρμάκων και τέλος να γίνει σύγκριση με πειραματικά αποτελέσματα.

## Κεφάλαιο 2: Μεθοδολογία

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ). Η ΜΔ είναι μία υπολογιστική τεχνική, όπου οι κλασσικές εξισώσεις κινήσεως χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της χρονικής εξέλιξης του συστήματος. Αφού λυθεί η εξίσωση του Νεύτωνα για κάθε άτομο ξεχωριστά, παράγονται οι τροχιές, πληροφορία απαραίτητη για τον υπολογισμό δομικών και δυναμικών ιδιοτήτων του συστήματος. Το τελευταίο είναι δυνατό μέσω των εξισώσεων της Στατιστικής Μηχανικής. Είναι εμφανές από τα παραπάνω ότι η θεωρία πίσω από αυτήν την τεχνική είναι πλούσια και σε ορισμένα σημεία απρόσμενα περίπλοκη. Για λόγους ευκρίνειας, στην προκειμένη εργασία θα αναφερθούν μόνο τα κυριότερα σημεία αυτής της θεωρίας, παραπέμποντας τον ενδιαφερόμενο αναγνώστη σε κατάλληλη βιβλιογραφία για περισσότερες πληροφορίες [72]-[75].

### 2.1 Αρχές Κλασσικής Μηχανικής

Για να υπολογίσουμε τις τροχιές των ατόμων είναι αναγκαίο να κατασκευάσουμε την εξίσωση κινήσεως του κάθε ατόμου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ο 2ος νόμος του Νεύτωνα:

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}$$

σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι δυνάμεις που ασκούνται κατά τη διάρκεια της προσομοιώσεως είναι συντηρητικές, δηλαδή ισχύει:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_i V$$

όπου  $V$  είναι η δυναμική ενέργεια που ορίζεται στο πεδίο δυνάμεων. Ισοδύναμα με την εξίσωση του Νεύτωνα μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις εξισώσεις του Hamilton για  $N$  σωματίδια:

$$\frac{\partial H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)}{\partial \mathbf{p}_i} = \dot{\mathbf{r}}_i, \forall i \in \{1, 2, \dots, N\}$$
$$\frac{\partial H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)}{\partial \mathbf{r}_i} = -\mathbf{p}_i, \forall i \in \{1, 2, \dots, N\}$$

όπου  $H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) = \sum_i^N \frac{p_i^2}{2m_i} + V(\mathbf{r}^N)$  είναι η συνολική ενέργεια του συστήματος (Hamiltonian function). Η αριθμητική επίλυση των εξισώσεων αυτών θα μας δώσει τις συναρτήσεις  $\mathbf{r}(t)$  και  $\mathbf{p}(t)$ , τις τροχιές δηλαδή όλων των ατόμων. Με τη γνώση αυτή, πλέον είμαστε σε θέση να κατασκευάσουμε την υπερεπιφάνεια  $(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)$  του συστήματος μας στον χώρο των φάσεων.

## 2.2 Αρχές Στατιστικής Μηχανικής

Πώς όμως θα χρησιμοποιήσουμε τις τροχιές των ατόμων προκειμένου να βγάλουμε συμπεράσματα για τις θερμοδυναμικές και δομικές ιδιότητες του συστήματος; Η σύνδεση μεταξύ του μικρόκοσμου (τροχιές ατόμων) και του μακρόκοσμου γίνεται μέσω της στατιστικής μηχανικής. Η θεμελιώδης έννοια της θεωρίας αυτής είναι το στατιστικό σύνολο, το σύνολο δηλαδή όλων των μικροσκοπικών καταστάσεων που αντιστοιχούν στο ίδιο μακροσκοπικό αποτέλεσμα.

### 2.2.1 Μικροκανονικό σύνολο (NVE)

Το πιο απλό στατιστικό σύνολο είναι το μικροκανονικό όπου ο αριθμός των μονοατομικών μορίων  $N$ , ο όγκος του συστήματος  $V$  και η ενέργεια  $E$  παραμένουν σταθερά. Η πυκνότητα πιθανότητας στο χώρο των φάσεων είναι ανάλογη του  $\delta(H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) - E)$  και η συνάρτηση επιμερισμού του μικροκανονικού συνόλου ορίζεται ως:

$$\Omega = \frac{1}{h^{3N}N!} \iint d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N \delta(H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) - E)$$

Ο όρος  $1/N!$  προκύπτει από το γεγονός ότι τα σωματίδια μεταξύ τους δεν μπορούν να διακριθούν και ο όρος  $1/h^{3N}$  προκύπτει από την αρχή της αβεβαιότητας του Heisenberg και αποτελεί όρο κοινωνικοποίησης. Το ολοκλήρωμα των θέσεων «τρέχει» σε όλο τον όγκο  $V$  του χώρου που εξετάζουμε ενώ το ολοκλήρωμα της ορμής τρέχει από  $-\infty$  έως  $+\infty$  για κάθε συνιστώσα της ορμής.

Σύμφωνα με τις αρχές της στατιστικής μηχανικής, οποιοδήποτε μέγεθος  $A$  μπορεί να υπολογιστεί σαν ένας στατιστικός μέσος όρος του συνόλου:

$$\langle A \rangle \equiv \frac{1}{\Omega h^{3N} N!} \iint d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N A(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) \delta(H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) - E)$$

### 2.2.2 Κανονικό σύνολο (NVT)

Αντίστοιχα για το κανονικό σύνολο η πυκνότητα των καταστάσεων ορίζεται ως  $\rho = e^{-H/kT}$ . Η είναι η χαμιλτωνιανή,  $k$  είναι η σταθερά του Boltzmann και  $T$  η θερμοκρασία. Η συνάρτηση επιμερισμού του NVT είναι:

$$Q(N, V, T) = C \iint d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N \exp\left(-\frac{H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)}{kT}\right)$$

Όπου,  $C = \frac{1}{h^{3N} N!}$  είναι η ίδια σταθερά με την αυτήν της συναρτήσεως επιμερισμού του μικροκανονικού συνόλου. Όπως και πριν τα μεγέθη εκφράζονται σαν στατιστικοί μέσοι όροι, για παράδειγμα ένα μέγεθος  $\langle A \rangle$  ορίζεται ως:

$$\langle A \rangle \equiv \frac{1}{Q h^{6N} N!} \iint d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N A(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) \exp\left(-\frac{H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)}{kT}\right)$$

Είναι εμφανής η σύνδεση μεταξύ των δύο συνόλων, αφού η συνάρτηση επιμερισμού του μικροκανονικού εκπροσωπεί τον εκφυλισμό του κάθε ενεργειακού επιπέδου κανονικό σύνολο. Ισχύει δηλαδή:

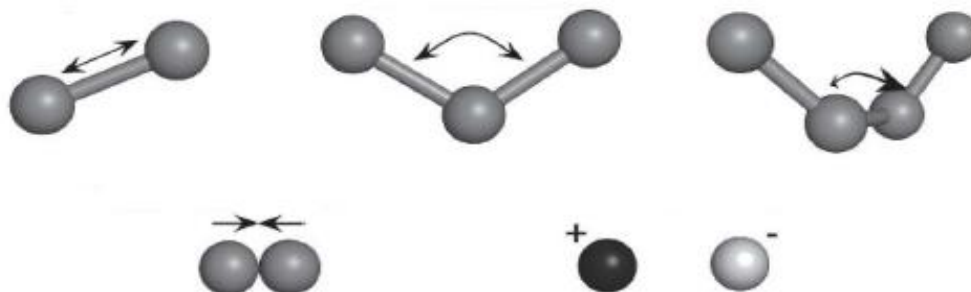
$$Q(N, V, T) = \int_0^\infty dE \Omega(E) \exp\left(-\frac{E}{kT}\right)$$

Το ολοκλήρωμα θα πρέπει να αντικατασταθεί από άθροισμα όσο το σύστημα απομακρύνεται από το συνεχές όριο. Παρατηρούμε λοιπόν ότι η συνάρτηση επιμερισμού του ενός συνόλου είναι ο μετασχηματισμός Laplace, ως προς την ενέργεια και με μεταβλητή το  $1/kT$ , του άλλου. Ένα σημαντικό θεώρημα είναι ότι ο μετασχηματισμός αυτός είναι μοναδικός που σημαίνει ότι οι δύο συναρτήσεις εμπεριέχουν την ίδια πληροφορία [75].

## 2.3 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

### 2.3.1 Πεδίο δυνάμεων

Το πεδίο δυνάμεων είναι ένα σύστημα από εξισώσεις που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων σε ένα μοριακό σύστημα [72]-[74]. Ουσιαστικά είναι η συνολική δυναμική ενέργεια του συστήματος και περιγράφεται από ένα άθροισμα δεσμικών και μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων. Οι δεσμικές αναφέρονται σε άτομα τα οποία είναι χημικώς συνδεδεμένα μεταξύ τους και οι μη δεσμικές μεταξύ ατόμων που δεν συνδέονται με χημικό δεσμό. Το ιδανικό θα ήταν να συμπεριληφθούν μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ όλων των ατόμων, όμως αυτό δεν είναι υπολογιστικά εφικτό. Για το λόγο αυτό, υπολογίζονται οι αλληλεπιδράσεις μέχρι μεταξύ δύο ατόμων, δηλαδή ανά ζεύγη.

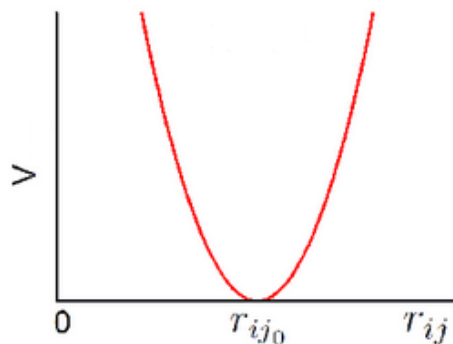


### Δεσμικές αλληλεπιδράσεις

Στην κατηγορία αυτή εμπίπτει η κάμψη δεσμού μεταξύ δύο ατόμων, η κάμψη γωνίας μεταξύ τριών ατόμων και η στρέψη δίεδρης γωνίας μεταξύ τεσσάρων ατόμων.

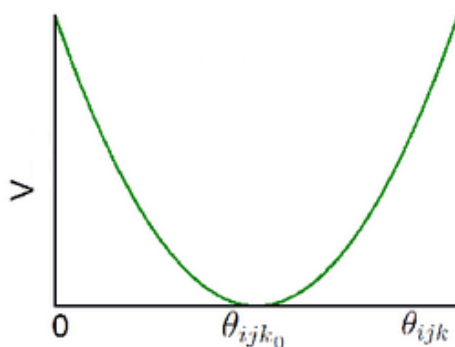
### Ομοιοπολικός Δεσμός

Μπορούμε να περιγράψουμε το δεσμό μεταξύ δύο ατόμων σαν ένα ελατήριο με συγκεκριμένη σταθερά ισορροπίας και σταθερά δυνάμεως. Η δυναμική ενέργεια εκφράζεται σαν  $V_{ij} = \frac{k_b}{2} (r_{ij} - r_{ij_0})^2$  και είναι μια παραβολική συνάρτηση γύρω από μία απόσταση ισορροπίας.



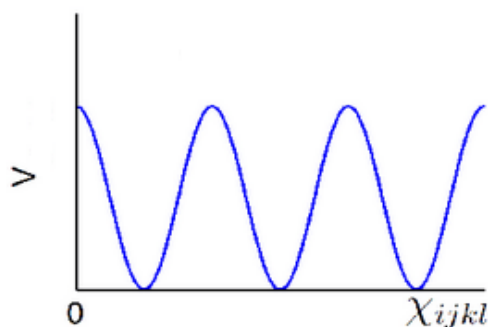
### Γωνία

Με τον ίδιο τρόπο περιγράφουμε και την κάμψη γωνίας μεταξύ τριών ατόμων. Έχουμε δηλαδή  $V_{ijk} = \frac{k_\theta}{2} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk_0})^2$ , μία παραβολή γύρω από γωνία ισορροπίας  $\theta_{ijk_0}$  όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



### Διέδρη γωνία

Για την μοντελοποίηση της διέδρης γωνίας μεταξύ τεσσάρων ατόμων γίνεται χρήση συνημιτονοειδούς συνάρτησης  $V_{ijkl} = k_\chi (1 + \cos(n\chi_{ijkl} + \chi_0))$ , όπου  $n$  είναι η περιοδικότητα,  $k_\chi$  είναι η σταθερά δυνάμεως και  $\chi_0$  η αρχική φάση.



### Μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις

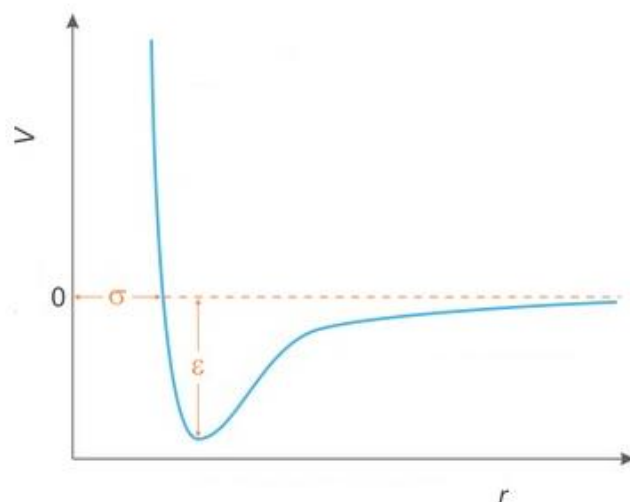


## Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Για την περιγραφή της ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ ομόσημων φορτίων και έλξης μεταξύ ετερόσημων φορτίων χρησιμοποιείται ο νόμος του Coulomb  $V = \sum_i \sum_j \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$ . Επειδή το άθροισμα αυτό συγκλίνει μόνο κάτω από ειδικές συνθήκες (υπό συνθήκη συγκλίνουσα σειρά), χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως η Ewald sum [77] ή η Particle Mesh Ewald [78] προκειμένου να είναι εφικτός και γρήγορος ο υπολογισμός.

## Van der Waals αλληλεπιδράσεις

Μη συνδεδεμένα άτομα χωρίς συνολικό φορτίο πάλι έλκονται σε κοντινές αποστάσεις αρκεί να μην πολύ κοντά, όπου και νιώθουν έντονη άπωση. Για την περιγραφή αυτής της μη δεσμικής αλληλεπίδρασης χρησιμοποιείται η συνάρτηση Lennard-Jones η οποία έχει την ακόλουθη μορφή:  $V = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right]$ , όπου  $\epsilon$  είναι το βάθος του δυναμικού και  $\sigma$  είναι η παράμετρος συγκρούσεως. Ο πρώτος όρος αντιπροσωπεύει την άπωση που νιώθουν τα άτομα όταν πλησιάσουν πολύ κοντά και οφείλεται στην αρχή του Pauli. Ο δεύτερος όρος αντιπροσωπεύει την έλξη μεταξύ των ατόμων σε σχετικά κοντινές αποστάσεις και οφείλεται στις δυνάμεις London.



### 2.3.2 Αριθμητική ολοκλήρωση

Από τη στιγμή που είναι γνωστή η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας, δηλαδή όλες οι δυνάμεις μεταξύ των ατόμων, μπορούν να λυθούν οι εξισώσεις κίνησης. Αναλυτική λύση δεν μπορεί να βρεθεί γιατί οι εξισώσεις είναι αρκετά περίπλοκες, μπορεί όμως να βρεθεί αριθμητική. Για αυτόν τον λόγο έχουν κατασκευαστεί διάφοροι αλγόριθμοι οι οποίοι έχουν ως στόχο την αποτελεσματική και γρήγορη επίλυση της εξίσωσης του Νεύτωνα, η οποία είναι μια διαφορική εξίσωση δευτέρου βαθμού. Κοινή βάση των αλγορίθμων αυτών είναι η μέθοδος των πεπερασμένων διαφορών, όπου ο χρόνος χωρίζεται σε επιμέρους τμήματα  $\Delta t$  (της τάξης του 1 με 2 fs). Γνωρίζοντας τις θέσεις και τις ταχύτητες τη χρονική στιγμή  $t$ , υπολογίζονται οι καινούριες θέσεις και ταχύτητες τη χρονική στιγμή  $t+\Delta t$ . Ο πιο απλός αλγόριθμος είναι ο Verlet integrator [79] και βασίζεται στην επέκταση Taylor της  $\mathbf{r}(t)$  ως προς το χρόνο, οδηγώντας στον εξής τύπο:

$$\mathbf{r}_{n+1} = 2\mathbf{r}_n - \mathbf{r}_{n-1} + \frac{\mathbf{F}_n}{2m} \Delta t^2$$

Όπου για τον υπολογισμό των καινούριων θέσεων  $\mathbf{r}_{n+1}$  χρησιμοποιούνται οι θέσεις των δύο προηγούμενων βημάτων.

### 2.3.3 Υπολογισμός θερμοκρασίας – πίεσης

#### Πίεση

Σε μία προσομοίωση, η πίεση συνήθως υπολογίζεται μέσω του θεωρήματος virial του Clausius [74]. Το virial ορίζεται ως η αναμενόμενη τιμή του αθροίσματος των γινομένων των συντεταγμένων των σωματιδίων και των δυνάμεων που ασκούνται σε αυτά. Συνήθως γράφεται ως  $\Xi = \sum x_i \dot{p}_i$  με το  $x_i$  να είναι η συντεταγμένη και  $\dot{p}_i$  να είναι η πρώτη παράγωγος της ορμής (η δύναμη δηλαδή) στην διεύθυνση της συνιστώσας της θέσης. Το θεώρημα δηλώνει ότι το virial είναι ίσο με  $-3N_A kT$ .  $N_A$  είναι ο αριθμός Avogadro,  $k$  η σταθερά του Boltzmann και  $T$  η θερμοκρασία. Για ένα ιδανικό αέριο, δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των

σωματιδίων παρά μόνο μεταξύ των τοιχωμάτων του κουτιού και των σωματιδίων. Σε αυτήν την περίπτωση το virial ισούται με  $-3PV$ . Οι δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων σε ένα αληθινό αέριο ή υγρό επηρεάζουν το virial και συνεπώς την πίεση. Το συνολικό virial για ένα αληθινό σύστημα είναι ίσο με το άθροισμα μεταξύ ενός όρου που αντιστοιχεί στο ιδανικό αέριο και σε έναν όρο που αντιστοιχεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων. Το αποτέλεσμα είναι ο ακόλουθος τανυστής πίεσης:

$$P(t) = \frac{1}{V} [N_A k_B T(t) - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N r_{ij} f_{ij}]$$

### Θερμοκρασία

Σε ένα κανονικό σύνολο η θερμοκρασία μένει σταθερή ενώ στο μικροκανονικό διακυμαίνεται συνεχώς. Η θερμοκρασία σχετίζεται άμεσα με την κινητική ενέργεια του συστήματος όπως είναι γνωστό από το θεώρημα ισοκατανομής της ενέργειας [74]:

$$T(t) = \frac{1}{(3N - N_c - N_{COM})k} \sum_{i=1}^N \frac{|\mathbf{p}_i(t)|^2}{2m_i}$$

Όπου  $N$  αριθμός σωματιδίων,  $N_c$  ο αριθμός των περιορισμών που θέτουμε στο σύστημα μας και  $N_{COM}$  είναι οι τρεις συνιστώσες της ορμής του κέντρου μάζας και αποτελούν σταθερές κινήσεως ενός μηχανικού συστήματος.

#### 2.3.4 Ισοβαρές – ισοθερμικό σύνολο (NPT)

Το πιο σημαντικό στατιστικό σύνολο στις μοριακές προσομοιώσεις βιολογικών συστημάτων είναι το ισοβαρές – ισοθερμικό σύνολο. Ο λόγος είναι ότι οι συνθήκες που επικρατούν σε ένα βιολογικό σύστημα είναι σταθερή πίεση (1 atm) και σταθερή θερμοκρασία (310 K) παρά σταθερή ενέργεια ή όγκος. Με λίγα λόγια το NPT αποτελεί πιο πιστή αναπαράσταση των συνθηκών ενός κυττάρου από ότι το NVE ή το NVT. Οποιοδήποτε θερμοδυναμικό μέγεθος σε αυτό το σύνολο μπορεί να εκφραστεί ως εξής [76]:

$$\langle A \rangle \equiv \frac{1}{\Delta h^{6N} N!} \int_0^\infty dV \iint d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N A(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) \exp\left(-\frac{[H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) + PV]}{kT}\right)$$

Όπου  $\Delta(N, P, T)$  είναι η συνάρτηση επιμερισμού του ισοθερμικού-ισοβαρούς στατιστικού συνόλου και έχει την ακόλουθη μορφή:

$$\Delta(N, P, T) = C \int_0^\infty dV \iint d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N \exp\left(-\frac{[H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) + PV]}{kT}\right)$$

### Θερμοστάτηση-Βαροστάτηση

Η Μοριακή Δυναμική είναι μια τεχνική που μελετά τη χρονική εξέλιξη ενός κλασσικού συστήματος  $N$  σωματιδίων που βρίσκονται σε όγκο  $V$ . Σε τέτοιες προσομοιώσεις, η ολική ενέργεια του συστήματος είναι μια σταθερά κινήσεως. Αν υποθέσουμε ότι ο μέσος όρος ενός μεγέθους (π.χ. θερμοκρασία) στο χρόνο, είναι ισοδύναμος με τον στατιστικό μέσο όρο, τότε τα αποτελέσματα που θα πάρουμε από μία προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής θα είναι ισοδύναμα με τους μέσους όρους του μικροκανονικού συνόλου. Πάρα ταύτα, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι επιθυμητό να προσομοιώσουμε συστήματα κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Είναι προτιμότερο για βιολογικά συστήματα, όπου η πίεση και η θερμοκρασία μένουν σταθερά, να χρησιμοποιηθεί το ισοβαρές-ισόθερμο στατιστικό σύνολο. Για το σκοπό αυτό, πρέπει να βρεθεί τρόπος ώστε κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης να μένει σταθερή η θερμοκρασία και η πίεση. Δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης του προβλήματος έχουν βρεθεί. Η πρώτη βασίζεται στην ιδέα ότι προσομοιώσεις Νευτώνειας δυναμικής μπορούν να αναμιχθούν με συγκεκριμένες Monte Carlo κινήσεις. Η δεύτερη προσέγγιση σχετίζεται μόνο με τη δυναμική χωρίς να εμπλέκεται καμία τυχαιότητα, βασίζεται στον μετασχηματισμό των εξισώσεων κινήσεως του Χάμιλτον ώστε αυτές να αναπαράγουν το επιθυμητό στατιστικό σύνολο.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι θερμοστάτες Berendsen [80], V-rescale [84] και Nose-Hoover [82]-[83] καθώς και οι βαροστάτες Berendsen και Parrinello-Rahman [81]. Η μαθηματική περιγραφή του κάθε αλγορίθμου είναι αρκετά περίπλοκη, οπότε δεν θα αναφερθεί στην παρούσα εργασία.

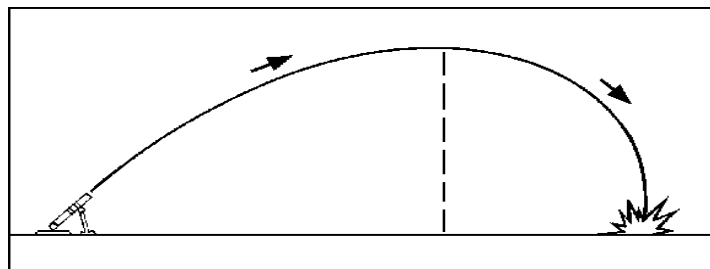
### 2.3.5 Η διαδικασία της προσομοίωσης

Μία προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής αποτελείται από επτά συγκεκριμένα βήματα. Αρχικά ορίζουμε τη δομή του συστήματος. Ορίζουμε τις αποστάσεις, τις γωνίες και τις δίεδρες γωνίες μεταξύ των ατόμων σε ένα αρχείο καθώς και τις παραμέτρους όλων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων. Αυτές οι πληροφορίες αποτελούν την τοπολογία του συστήματος. Στη συνέχεια ορίζουμε το κουτί της προσομοίωσης. Ανάλογα με το μέγεθος του συστήματος επιλέγεται και το μέγεθος του κουτιού αλλά και το σχήμα του. Το επόμενο βήμα είναι να επιδιαιτώσουμε το σύστημα. Το λογισμικό που χρησιμοποιείται υπολογίζει πόσα μόρια νερού μπορεί να προσθέσει στο σύστημα ανάλογα με τον διαθέσιμο όγκο. Το τρίτο βήμα είναι η προσθήκη ιόντων προκειμένου το συνολικό φορτίο του συστήματος να είναι μηδέν. Αυτό γίνεται με αντικατάσταση μορίων διαλύτη από ιόντα, τα οποία μπορεί να είναι είτε θετικά (π.χ. νατρίου) είτε αρνητικά (π.χ. χλωρίου) ανάλογα με το συνολικό φορτίο. Το επόμενο βήμα είναι η ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συστήματος. Είναι απαραίτητο να το κάνουμε αυτό καθώς μπορεί να υπάρχουν άτομα τα οποία επικαλύπτονται μεταξύ τους ή υψηλές τάσεις δεσμών, γωνιών και δίεδρων γωνιών. Η ελαχιστοποίηση χαλαρώνει τέτοιου είδους κακών αλληλεπιδράσεων και δίνει τη δυνατότητα να ξεκινήσει η προσομοίωση από μια λογική δομή. Θεωρείται ότι είναι επιτυχημένη όταν η δυναμική ενέργεια έχει συγκλίνει περίπου στο  $-10^5$  με  $-10^6$ . Μετά την ελαχιστοποίηση, ακολουθεί η εξισορρόπηση η οποία συμβαίνει σε δύο βήματα. Αρχικά προσομοιώνουμε το σύστημα σε συνθήκες NVT μέχρι το σύστημα να πιάσει την επιθυμητή θερμοκρασία και μετά προσομοιώνουμε σε NPT συνθήκες ώστε η πυκνότητα να σταθεροποιηθεί γύρω από την επιθυμητή τιμή. Πλέον το σύστημα έχει την επιθυμητή θερμοκρασία και πίεση οπότε είναι σε θέση να προσομοιωθεί προκειμένου να συλλεχθούν δεδομένα και να εξαχθούν συμπεράσματα για τη λειτουργία και τη δομή του.

### 2.4 Ανάλυση της τροχιάς

Η πληροφορία που προκύπτει από τη λύση των εξισώσεων κίνησης είναι η τροχιά των ατόμων. Τροχιά ονομάζεται πολύ απλά η αλλαγή της θέσης του ατόμου

με το χρόνο. Στην εικόνα φαίνεται η τροχιά της μπάλας όταν αυτή φεύγει από το κανόνι. Η τροχιά είναι πολύ βασική έννοια στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής καθώς από αυτήν μπορούν να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα (Συνάρτηση ακτινικής κατανομής, rms απόκλιση κ.λπ.) για το υπό μελέτη σύστημα [72]-[75].

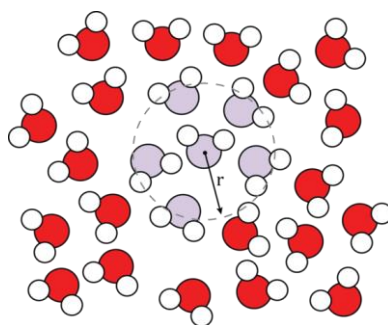


### Συνάρτηση Ακτινικής Κατανομής

Η συνάρτηση ακτινικής κατανομής  $g(r)$  είναι ένας χρήσιμος τρόπος για να μελετηθεί η δομή του συστήματος. Ειδικότερα, είναι η πιθανότητα ευρέσεως ενός σωματιδίου σε απόσταση  $r$ , σε σχέση με την ίδια πιθανότητα για ένα ιδανικό αέριο ίδιας πυκνότητας (δηλαδή για μία ομοιόμορφη κατανομή εφόσον στο ιδανικό αέριο δεν υπάρχουν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις). Η  $g(r)$  δίνεται από τον τύπο

$$g(r) = \frac{2V}{N^2} \left\langle \sum_{i < j} \delta(r - r_{ij}) \right\rangle$$

Όπου  $V$  είναι ο όγκος του συστήματος,  $N$  ο αριθμός των σωματιδίων και  $r_{ij}$  η απόσταση μεταξύ των ατόμων  $i$  και  $j$ .

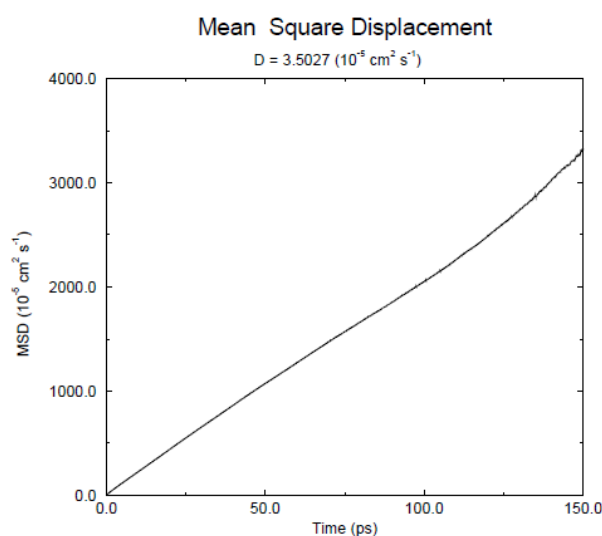


### Μέση τετραγωνική μετατόπιση (Mean Square Displacement-MSD)

Το MSD δίνει πληροφορίες για τη δυναμική του συστήματος. Πιο συγκεκριμένα μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστή διάχυσης ενός μορίου μέσω της εξίσωσης-Einstein:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle ||\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0)||^2 \rangle = 6Dt$$

Ο συντελεστής διαχύσεως υπολογίζεται από το πρόγραμμα gmx msd το οποίο δέχεται σαν input ένα αρχείο τροχιάς (\*.xtc), ένα αρχείο δομής (\*.tpr) και επιστρέφει σαν output ένα γράφημα της μορφής:



Η σχέση Einstein είναι γραμμική και παίρνει την παραπάνω μορφή μετά από την βαλλιστική κίνηση που λαμβάνει χώρα στην αρχή της τροχιάς ενός μορίου. Επίσης, προς το τέλος της προσομοίωσης το λάθος της μέτρησης είναι μεγάλο οπότε γίνεται γραμμική εφαρμογή στο ενδιάμεσο κομμάτι του γραφήματος. Από την κλίση της ευθείας εξάγεται ο συντελεστής διάχυσης.

## 2.5 Επαναληψιμότητα-Επιλογή λογισμικού

Επαναληψιμότητα είναι η δυνατότητα παραγωγής των ίδιων αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών προσομοιώσεων που γίνονται με το ίδιο λογισμικό ή ακόμα και μεταξύ διαφορετικών λογισμικών. Το πρώτο είναι σημαντικό για λόγους debugging και το δεύτερο για να μελετηθεί το implementation ενός πεδίου δυνάμεως.

## Επαναληψιμότητα μεταξύ ίδιου λογισμικού

Εφόσον οι εξισώσεις του Νεύτωνα είναι ντιτερμινιστικές θα έπρεπε ξεκινώντας από τις ίδιες αρχικές συνθήκες να ληφθούν ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα, στον ίδιο ηλεκτρονικό υπολογιστή. Αυτό όμως δεν είναι δυνατό να συμβεί καθώς κατά τη διάρκεια μιας προσομοίωσης υπεισέρχονται στοχαστικοί (τυχαίοι) παράγοντες. Ο πρώτος παράγοντας μη επαναληψιμότητας είναι η ανάθεση των αρχικών ατομικών ταχυτήτων από μια κανονικοποιημένη κατανομή Boltzmann. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται αυτό είναι ο εξής:

1. Επιλέγονται 12 τυχαίοι αριθμοί  $R_k$  από το διάστημα  $0 \leq R_k < 1$
2. Υπολογίζεται το άθροισμα τους
3. Αφαιρείται ο αριθμός 6 από το άθροισμα τους
4. Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με την τυπική απόκλιση της κατανομής ταχυτήτων, δηλαδή με  $\sqrt{\frac{k_B T}{m_i}}$

Προκειμένου να ανατεθούν ακριβώς οι ίδιες ατομικές ταχύτητες στα ίδια άτομα θα πρέπει να ορίσουμε μία γεννήτρια τυχαίων αριθμών στις παραμέτρους των input αρχείων. Σε ορισμένες περιπτώσεις αυτό μπορεί να μην αρκεί, καθώς υπάρχει και μια δεύτερη πηγή μη επαναληψιμότητας. Όπως αναφέρθηκε στη θεωρία οι τρόποι με τον οποίο μπορούν να γίνουν η θερμοστάτηση και η βαροστάτηση είναι δύο. Ο πρώτος τρόπος είναι η τροποποίηση της χαμιλτωνιανής συνάρτησης (δυναμικός τρόπος) και ο δεύτερος είναι μέσω ενός στοχαστικού αλγορίθμου. Επομένως, αν χρησιμοποιηθεί στοχαστικός αλγόριθμος τότε θα πρέπει να εισάγουμε και μια δεύτερη γεννήτρια τυχαίων αριθμών, πέρα από την προαναφερθείσα, ώστε να πάρουμε ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα.

## Επαναληψιμότητα μεταξύ διαφορετικών λογισμικών

Τα δύο βασικότερα λογισμικά για προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής είναι το GROMACS και το NAMD. Στην παρούσα εργασία το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations). Ο κύριος λόγος για την επιλογή του λογισμικού Gromacs έναντι του



NAMD είναι το ότι ο κώδικας της πρώτης είναι βελτιστοποιημένος για να τρέχει σε κεντρικές μονάδες επεξεργασίας (CPU) ενώ ο κώδικας της δεύτερης είναι βελτιστοποιημένος για να τρέχει σε κάρτες γραφικών μεγάλης υπολογιστικής ισχύος (GPU) πχ. NVIDIA Tesla. Επειδή οι κύριες προσομοιώσεις γίνονται στον εθνικό υπερυπολογιστή A.R.I.S. οι CPUs είναι σε μεγαλύτερη αφθονία σε σχέση με τις κάρτες γραφικών. Επιπλέον το λογισμικό Gromacs διαθέτει εύχρηστα και πληθώρα εργαλείων (tools) για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μίας προσομοίωσης. Το πεδίο δυνάμεως που χρησιμοποιήθηκε είναι το CHARMM36. Επειδή το πεδίο δυνάμεως αυτό έχει γραφτεί κυρίως για το λογισμικό NAMD, γίνανε προσομοιώσεις του ίδιου συστήματος με τα δύο λογισμικά ώστε να μελετηθεί κατά πόσο επαναλήψιμα είναι τα αποτελέσματα μεταξύ τους. Το σύστημα υπό μελέτη είναι ένα μόριο διαλανίνης στο νερό. Παρόλο που δεν είναι δυνατό να ληφθούν ακριβώς ίδια αποτελέσματα, μελετήθηκε κατά πόσο όμοια είναι η δομή και η δυναμική των συστημάτων υπό μελέτη.

### **Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα**

Σε κάθε κεφάλαιο χρειάζεται μια μικρή εισαγωγή/περιληψη για το τι θα ακολουθησει

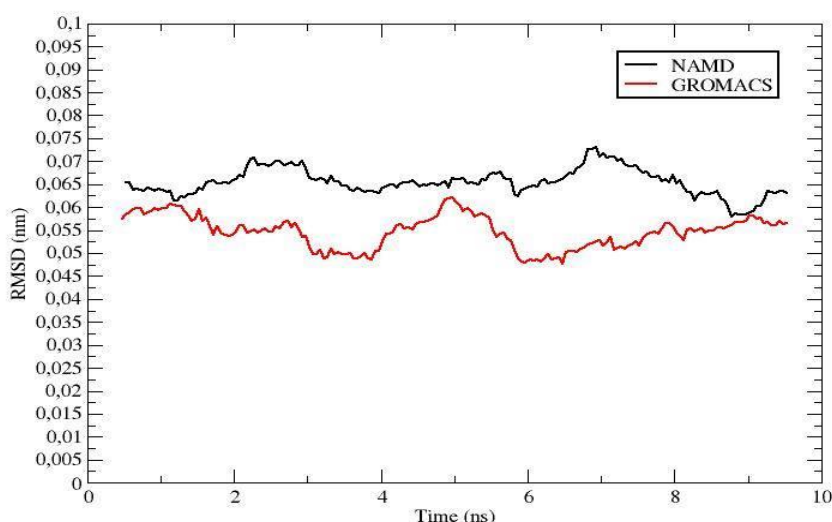
#### **3.1 Μοριακή Δυναμική Προσομοίωση διαλανίνης στο νερό**

Όπως προαναφερθηκε κάθε προσομοίωση MD ξεκινά με τις αρχικές συντεταγμένες όλων των ατόμων του συστήματος υπό μελέτη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση λαβαμε τις συντεταγμένες της διαλανίνης από την κρυσταλλική δομή που έχει προσδιοριστεί πειραματικά. Στη συνέχεια, ορίζουμε το μόριο της διαλανίνης επιδιαλυτώθηκε με XX νερά και οι διαστάσεις του κεντρικού κουτιού της προσομοίωσης ήταν  $28 \times 28 \times 28 \text{ \AA}^3$ . Τα μόρια του νερού προσομοιώνονται με το μοντέλο TIP3P και η διαλανίνη με το XXX. Στη συνέχεια εκτελείται ελαχιστοποίηση ενέργειας ώστε το σύστημα μας να βρεθεί στη χαμηλότερη δυνατή ενεργειακή διαμόρφωση. Για την ελαχιστοποίηση Οι δύο μηχανές διαφέρουν ως προς τον

αλγόριθμο που χρησιμοποιούν. Το Gromacs χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο Steepest decent και το NAMD χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο Conjugate Gradient.

Συνεχίζοντας την προσομοίωση με το λογισμικό NAMD το σύστημα θερμαίνεται ανά 10 βαθμούς K μέχρις ότου φθάσει τους 310 K. Ακολουθεί η εξισορρόπηση της θερμοκρασίας (Langevin dynamics αλγόριθμος) και της πίεσης (Langevin piston αλγόριθμος) προκειμένου να αναπαραχθεί το NPT στατιστικό σύνολο. Στο GROMACS η εξισορρόπηση γίνεται σε δύο διακριτά βήματα. Αρχικά είναι το NVT (Velocity rescale αλγόριθμος) και στη συνέχεια το NPT (Parrinello – Rahman αλγόριθμος). Και με τα δύο λογισμικά πραγματοποιήθηκε προσομοίωση διάρκειας 10 ns. Από το production run λαμβάνεται η τροχιά του συστήματος. Επειδή τα δύο λογισμικά χρησιμοποιούν διαφορετικούς αλγορίθμους δεν είναι δυνατό να ληφθούν ακριβώς ίδια αποτελέσματα αριθμητικώς όπως στην περίπτωση επαναληψιμότητας μεταξύ ίδιου λογισμικού. Για το λόγο αυτό μελετήθηκαν φυσικές ιδιότητες των δύο συστημάτων όπως το rmsd, η rdf και η χρονική εξέλιξη της διεδρης γωνίας του backbone του διπεπτιδίου.

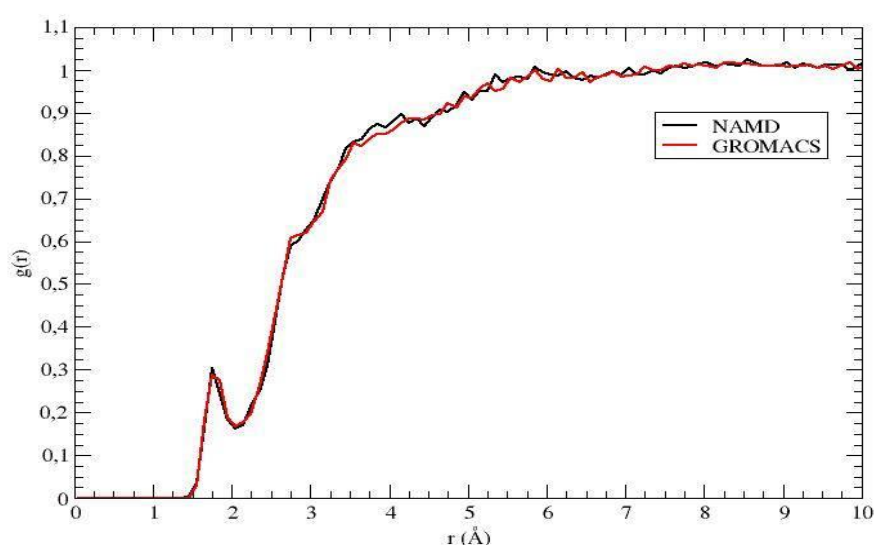
Αρχικά, υπολογίστηκε το rmsd της διαλανίνης ως προς τη δομή που προέκυψε μετά από την εξισορρόπηση της θερμοκρασίας και της πίεσης. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην εικόνα 21.



**Εικόνα 21.** Η εξέλιξη της rms απόκλισης με το χρόνο για τα δύο λογισμικά.

Η RMSD τιμή για το NAMD συγκλίνει στα 0.065 nm και για το GROMACS στα 0.055 nm. Οι τιμές αυτές είναι μικρές, ενδεικτικό της σταθερότητας των δύο δομών. Η διαφορά των 0.01 nm που παρατηρείται μεταξύ των δύο λογισμικών είναι αμελητέα και ουσιαστικά οφείλεται στο ότι έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετικός αλγόριθμος για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας, οδηγώντας σε ελάχιστα διαφορετικές αρχικές δομές.

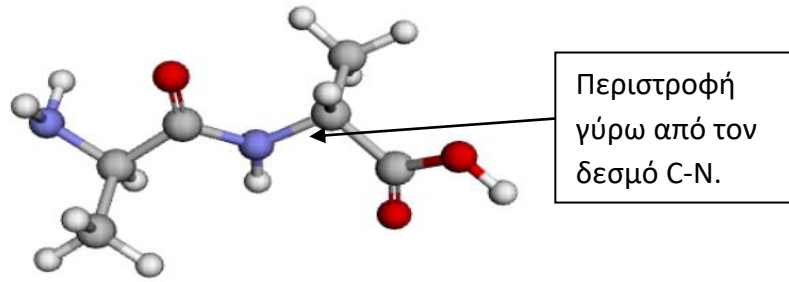
Στη συνέχεια υπολογίστηκε η rdf προκειμένου να μελετηθούν τυχόν δομικές διαφορές. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην εικόνα 22.



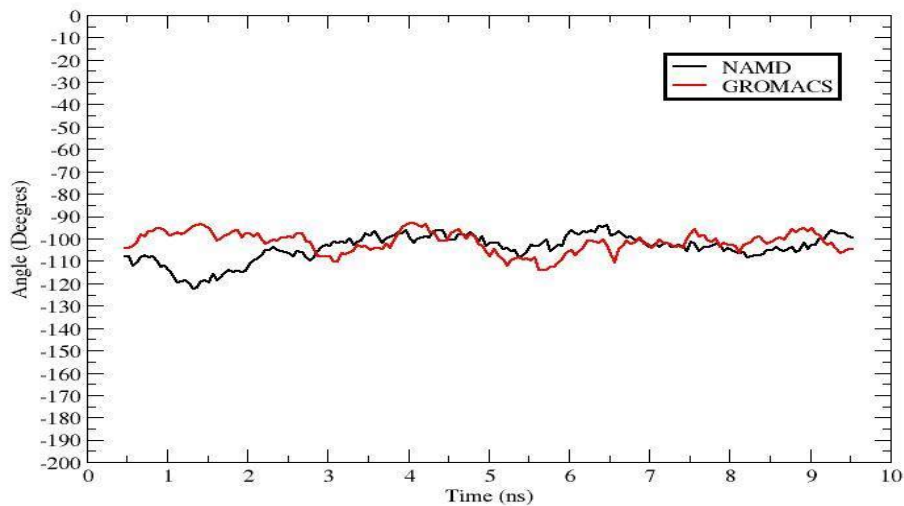
**Εικόνα 22. Rdf μεταξύ διαλανίνης και νερού για τα δύο λογισμικά.**

Και τα δύο λογισμικά παράγουν σχεδόν ταυτόσημα δομικά χαρακτηριστικά, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι υπάρχει επαναληψιμότητα μεταξύ τους.

Τέλος, μελετήθηκε κατά πόσο τα δύο λογισμικά μπορούν να παράγουν την ίδια διαμόρφωση του διπεπτιδίου. Η δομή της διαλανίνης καθώς και η δίεδρη γωνία του backbone φαίνονται στις παρακάτω εικόνες. Η διαμόρφωση του διπεπτι-



δίου γίνεται φανερή από την τιμή που θα πάρει η δίεδρη γωνία του backbone. Μελετήθηκε η χρονική εξέλιξη της γωνίας αυτής και με τα δύο λογισμικά. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 23. Τα δύο λογισμικά συμφωνούν σχεδόν απόλυτα μετά από 3 ns προσομοίωσης, πως η διαμόρφωση της δίεδρης γωνίας είναι -105 μοίρες. Συμπερασματικά, το GROMACS και το NAMD υποδεικνύουν την ίδια διαμόρφωση και συνεπώς υπάρχει επαναληψιμότητα.



Εικόνα 23. Η χρονική εξέλιξη της δίεδρης γωνίας C-C-N-C.

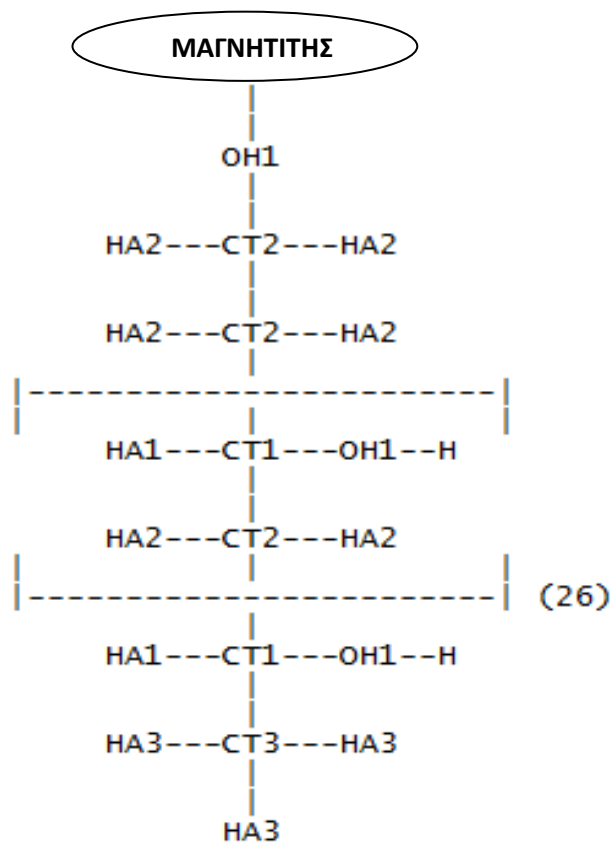
## 3.2 Παραμετροποίηση πολύ-βινυλικής αλκοόλης (PVA)

### Παραμετροποίηση

Αρχικά θα πρέπει να γίνει αντιστοίχιση του κάθε ατόμου με έναν κωδικό (atomtype), έτσι ώστε να είναι εμφανής η χημεία στην οποία συμμετέχει το άτομο αυτό. Επί παραδείγματι, ένα οξυγόνο υδροξυλίου έχει διαφορετικές φυσικές παραμέτρους (ατομικό φορτίο, παράμετροι Lennard-Jones κ.λπ.) από ένα οξυγόνο καρβονυλίου. Επιπρόσθετα, δύο οξυγόνα, τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες, μπορεί να κάνουν είτε απλούς είτε διπλούς δεσμούς (ο διπλός είναι πιο σκληρός δεσμός, έχει δηλαδή υψηλότερη τιμή  $K_b$ ). Για να αντιστοιχίσουμε τις σωστές παραμέτρους από το πεδίο δυνάμεων (CHARMM36) στον κάθε δεσμό πρέπει να ανατεθούν με προσοχή οι ακριβείς κωδικοί σε κάθε άτομο. Το ίδιο ισχύει για τις γωνίες και τις δίεδρες.

### PVA

Ο πρώτος υποκαταστάτης που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία είναι η πολύ-βινυλική αλκοόλη  $(CH_2CHOH)_n$ . Η κάθε αλυσίδα αποτελείται από  $n=28$  μονομερή βινυλικής αλκοόλης και πιάνεται από τον μαγνητίτη μέσω του οξυγόνου του πρώτου μονομερούς. Εδώ γίνεται εμφανής η χρησιμότητα των κωδικών. Διαφοροποιείται το υδρογόνο του υδροξυλίου (H) από τα υδρογόνα των ανθράκων (HA1, HA2, HA3) για να είναι πρώτον φανερό με ποια άτομα συνδέονται και δεύτερον να υποδεικνύεται ότι έχουν διαφορετικές φυσικές ιδιότητες. Στον πίνακα 1, φαίνεται η προαναφερθείσα διαφορά σε τρεις ενδεικτικές φυσικές παραμέτρους (φορτίο, δύο παράμετροι Lennard-Jones:  $\epsilon$  και  $\sigma$ ). Με βάση τον κωδικό του κάθε ατόμου, βρέθηκαν οι αντίστοιχες τιμές για τις παραμέτρους από το πεδίο δυνάμεων (CHARMM36 για GROMACS 5.1.4) και γράφτηκαν στο αρχείο με την τοπολογία του συστήματος (\*.itp). Γίνεται φανερό μέσω του ατομικού φορτίου ότι το υδρογόνο που είναι ενωμένο με οξυγόνο είναι πολύ πιο πολωμένο (5 φορές μεγαλύτερο φορτίο).



Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση PVA. Κάθε άτομο παρουσιάζεται με τον κωδικό του.

Κωδικός (atomtype)	q ( $1.602176565 \times 10^{-19} \text{C}$ )	$\sigma$ (nm)	E (kJ/mol)
H	0.43	0.040001352445	0.19246
HA1	0.09	0.238760856462	0.18828
HA2	0.09	0.238760856462	0.14226
HA3	0.09	0.238760856462	0.10042

Πίνακας 1

Αφού ορισθούν οι κωδικοί και οι φυσικές ιδιότητες, ανατίθεται ένας αριθμός-δείκτης (ξεκινώντας από το 1) σε κάθε άτομο για λόγους ευκολίας χειρισμού του αρχείου της τοπολογίας. Για παράδειγμα, τα νούμερα 1 έως 1192 έχουν αντιστοιχηθεί στα άτομα του μαγνητίτη, ενώ τα άτομα του PVA ξεκινάνε από το 1193 που είναι το οξυγόνο OH1 και τελειώνουν στο 14696 που είναι το τελευταίο υδρογόνο HA3 του 28ου μονομερούς της τελευταίας αλυσίδας (64η).

### Δεσμοί στο PVA

Στη συνέχεια πρέπει να δηλωθεί ο τρόπος με τον οποίο είναι συνδεδεμένα τα άτομα μεταξύ τους. Για τον ορισμό των δεσμών χρειάζεται η σταθερά του ελατηρίου  $K_b$  και η απόσταση ισορροπίας  $b_0$ . Στην εικόνα 25 φαίνεται ένα απόσπασμα από το αρχείο της τοπολογίας.

```
[bonds]
; i j funct length force.c.
1193 1196 1 0.142000 358150.40
1194 1196 1 0.111100 258571.20
1195 1196 1 0.111100 258571.20
1196 1197 1 0.153000 186188.00
1197 1198 1 0.111100 258571.20
1197 1199 1 0.111100 258571.20
1197 1203 1 0.153800 186188.00
```

**Εικόνα 25. Απόσπασμα τοπολογίας δεσμών από itp αρχείο (οι μονάδες είναι nm και  $\text{kJ}/(\text{mol} \cdot \text{nm}^2)$  αντίστοιχα).**

Οι πρώτες δύο στήλες είναι οι δείκτες του κάθε ατόμου. Η τρίτη στήλη δείχνει ποια συνάρτηση θα χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή του δεσμού. Σε αυτήν την περίπτωση είναι το αρμονικό δυναμικό. Η τέταρτη και η πέμπτη στήλη είναι τα  $b_0$  και τα  $K_b$  των δεσμών αντίστοιχα.

### Γωνίες στο PVA

Κατά πλήρη αναλογία με τους δεσμούς ορίστηκαν οι γωνίες μεταξύ τριών ατόμων και ανάλογα με το χημικό είδος του κάθε ατόμου ανατέθηκαν οι

κατάλληλοι παράμετροι γωνιών από το πεδίο δυνάμεων. Απόσπασμα της τοπολογίας γωνιών φαίνεται στην εικόνα 26.

```
[angles]
; i j k funct angle force.c.
1193 1196 1195 1 108.890000 384.091200
1194 1196 1195 1 109.000000 297.064000
1196 1197 1203 1 113.500000 488.272800
1198 1197 1199 1 109.000000 297.064000
1200 1201 1203 1 106.000000 481.160000
1201 1203 1202 1 108.890000 384.091200
```

**Εικόνα 26.** Απόσπασμα τοπολογίας γωνιών από itp αρχείο (οι μονάδες είναι degrees και kJ/(mol\*degrees2) αντίστοιχα).

### Διέδρες γωνίες στο PVA

Για την εύρεση των διέδρων γωνιών στο μονομερές της πολύ-βινυλικής αλκοόλης, αναγνωρίστηκαν όλες οι τετράδες ατόμων. Στην περίπτωση των διέδρων δεν χρησιμοποιείται παραβολικό δυναμικό αλλά συνημιτονοειδές. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3 η συνάρτηση που χρησιμοποιείται είναι η:

$V(\chi_{ijkl}) = k_{\chi}(1 + \cos(n\chi_{ijkl} - \chi_0))$  . Στην εικόνα 27 απεικονίζεται απόσπασμα από την τοπολογία των διέδρων.

```
[dihedrals]
; i j k l funct angle force.c. n
1195 1196 1197 1199 9 0.000000 0.79 3
1194 1196 1197 1198 9 0.000000 0.79 3
1202 1203 1204 1206 9 0.000000 0.84 3
1202 1203 1201 1200 9 0.000000 0.59 3
1202 1203 1197 1199 9 0.000000 0.84 3
1202 1203 1197 1198 9 0.000000 0.84 3
```

**Εικόνα 27.** Απόσπασμα τοπολογίας γωνιών από itp αρχείο (οι μονάδες είναι degrees και kJ/mol αντίστοιχα).

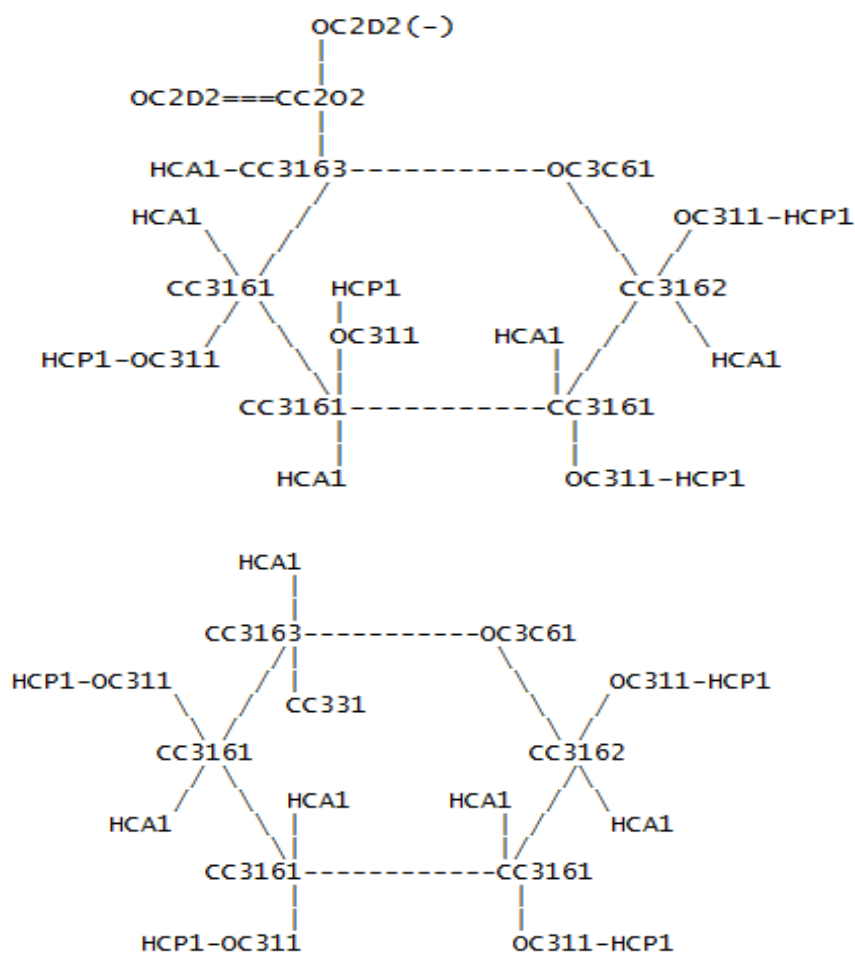
Οι πρώτες τρεις στήλες είναι οι δείκτες των ατόμων μεταξύ των οποίων ορίζεται η διέδρη γωνία. Η πέμπτη στήλη είναι η συνάρτηση που χρησιμοποιείται. Η έκτη και η έβδομη είναι το  $\chi_0$  (γωνία ισορροπίας σε degrees) και  $k_{\chi}$  (σταθερά διέδρης γωνίας σε kJ/mol). Η όγδοη στήλη είναι η πολλαπλότητα n. Θα μπορούσε να πάρει και πάνω από μια τιμές όπως θα γίνει φανερό στην τοπολογία του πολύ-αραβικού οξέος που ακολουθεί.

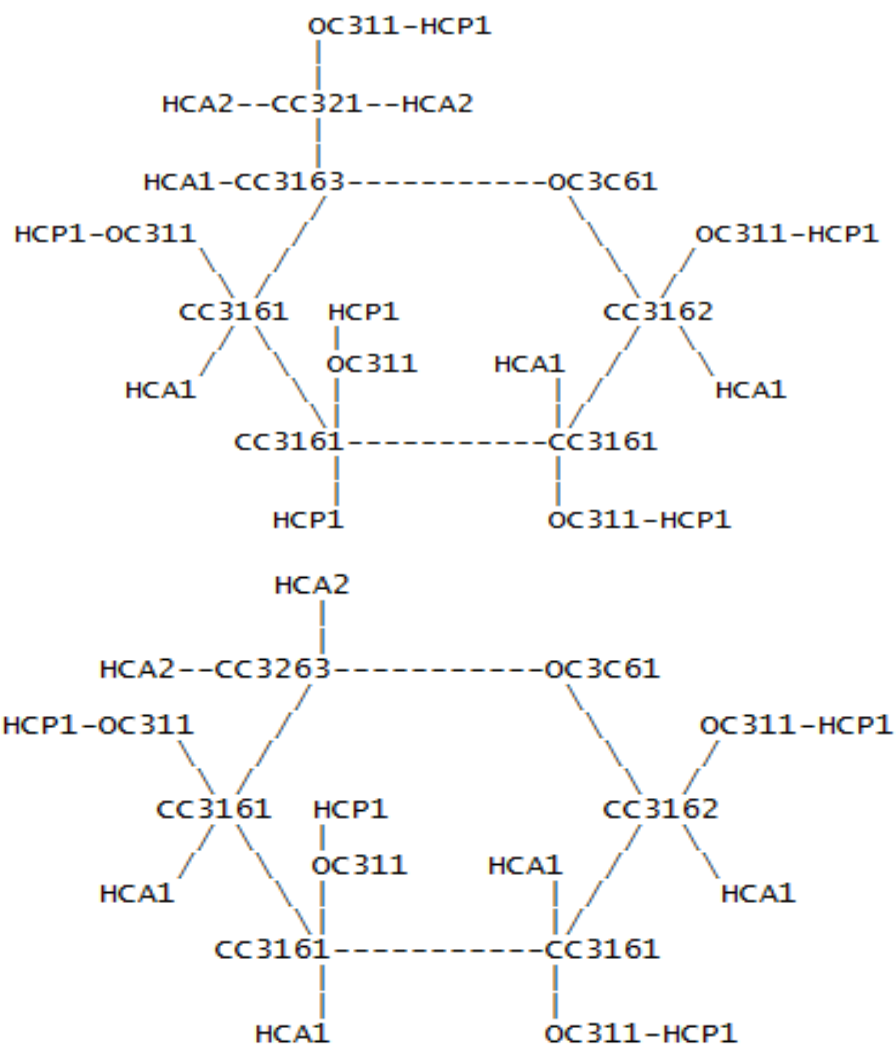


### 3.3 Παραμετροποίηση πολύ-αραβικού οξέος (ARA)

#### Δομή και τοπολογία ARA

Η πολυμερική αλυσίδα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από ένα β-D-γλουκουρονικό οξύ, μία β-L-ραμνόζη, τρία β-D-γαλακτόζες και τρεις L-αραβινόζες (Η πρώτη και η τρίτη βρίσκεται στην β ανωμερική μορφή ενώ η δεύτερη είναι α ανωμερική μορφή). Τα σάκχαρα είναι πιασμένα με τη σειρά που αναφέρθηκαν, με το γλουκουρονικό οξύ να είναι πιασμένο από τον μαγνητίτη. Οι δομές των τεσσάρων σακχάρων ξεχωριστά απεικονίζονται παρακάτω:

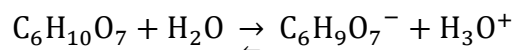




Εικόνα XXX.

### Πρωτονίωση Καρβοξυλίου γλουκουρονικού οξέος

Το οξυγόνο με κωδικό OC2D2 (Εικόνα XXX) διερευνήθηκε για το αν θα πρέπει να είναι πρωτονιωμένο ή όχι. Θεωρώντας την αντίδραση διάστασης του οξέος ως εξής:



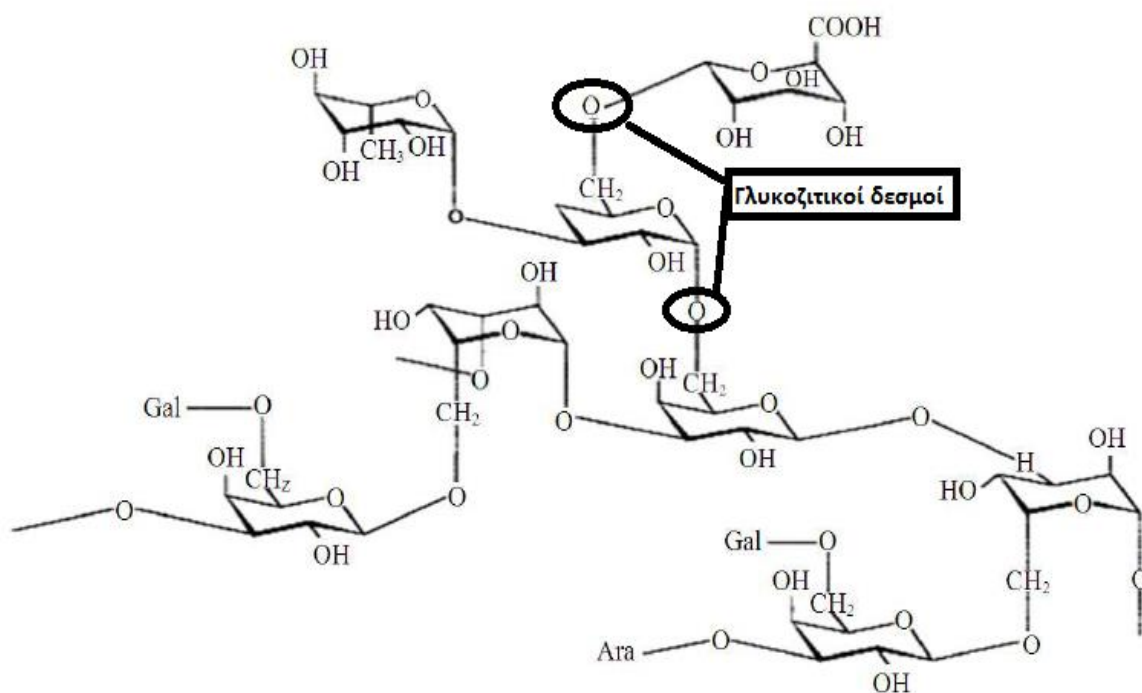
Το β-D-γλουκουρονικό οξύ έχει  $\text{pK}_a = 2.83$  σε υδατικό διάλυμα [87], ενώ το εξωκυτταρικό υγρό, στο οποίο θα βρεθεί έχει  $\text{pH} = 7.4$  [88]. Χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_7^-]}{[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7]} \rightarrow \frac{[\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_7^-]}{[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7]} \cong 31623$$

προκύπτει ότι η συγκέντρωση της μη πρωτονιωμένης μορφής είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή της πρωτονιωμένης. Με βάση αυτό, έγινε η παραδοχή ότι το γλουκουρονικό οξύ θα βρίσκεται αποπρωτονιωμένο καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης.

### Γλυκοζιτικοί δεσμοί

Τα σάκχαρα είναι ενωμένα σε μία ενιαία αλυσίδα. Κάθε μία αλυσίδα αποτελείται από 2 μονομερή, όπου το κάθε μονομερές έχει τα 8 σάκχαρα που προαναφέρθηκαν. Μια αλυσίδα έχει δηλαδή 16 σάκχαρα τα οποία είναι ενωμένα μεταξύ τους με γλυκοζιτικό δεσμό (Εικ. 28)



Εικόνα 28. Φαίνονται σε μαύρους κύκλους ενδεικτικά δύο γλυκοζιτικοί δεσμοί

Η δομή του πολύ-αραβικού οξέος στη φύση συναντάται σαν ένας πολυσακχαρίτης με πολύ περίπλοκες διακλαδώσεις (βλ. κεφάλαιο 2). Μία προσέγγιση που έγινε σε αυτό το σημείο, είναι ότι η δομή του πολυσακχαρίτη θεωρήθηκε γραμμική, χωρίς διακλαδώσεις. Υπάρχουν δηλαδή γλυκοζιτικοί δεσμοί 1-1 (OC302) και 1-3, 1-4 (OC301) (βλ. [89]). Τα οξυγόνα των δεσμών αυτών είναι ιδιαίτερα από άποψη παραμέτρων καθώς τα φορτία, οι παράμετροι L-J, οι δεσμοί,

οι γωνίες και οι διέδρες είναι διαφορετικές από ότι το οξυγόνο του καρβοξυλίου ή τα οξυγόνα των δακτυλίων των σακχάρων. Οι παράμετροι αυτοί αναζητήθηκαν με και εντοπίστηκαν στα αρχεία του πεδίου δυνάμεως και χαίρουν μεγάλης προσοχής, αφού θα καθορίσουν το πώς θα συνδεθούν τα σάκχαρα μεταξύ τους. Απόσπασμα της τοπολογίας των παραμέτρων αυτών φαίνεται στην εικόνα 29. Όλοι οι παράμετροι μπορούν να αναζητηθούν στο πεδίο δυνάμεων CHARMM (βλ. [9]).

```
[ atomtypes ]
;type      mass      atomic charge      sigma      epsilon
OC301      15.999400   -0.36              0.293996576986  0.41840
OC302      15.999400   -0.36              0.293996576986  0.41840

[ bondtypes ]
; i         j         func      b0          kb
CC3162     OC301      1         0.13950000  301248.00
CC3162     OC302      1         0.14150000  301248.00
CC3161     OC301      1         0.14150000  301248.00

[ angletypes ]
; i         j         k         func      theta0      ktheta
OC301     CC3161   CC3161    5         109.000000  376.560000
OC301     CC3161   CC3162    5         109.000000  376.560000
OC302     CC3162   CC3161    5         105.000000  376.560000
OC301     CC3162   CC3161    5         105.000000  376.560000

[ dihedraltypes ]
; i         j         k         l         func      chi0      kchi      mult
CC3161     CC3162   OC301     CC3161    9         180.000000  1.715440  1
CC3161     CC3162   OC301     CC3161    9         180.000000  2.761440  2
CC3161     CC3162   OC301     CC3161    9         0.000000    6.694400  3
OC301     CC3161   CC3161    OC311     9         180.000000  11.087600  1
OC301     CC3161   CC3161    OC311     9         0.000000    0.000000  2
OC301     CC3161   CC3161    OC311     9         180.000000  0.543920  3
OC301     CC3161   CC3162    OC311     9         180.000000  11.087600  1
OC301     CC3161   CC3162    OC311     9         0.000000    0.000000  2
OC301     CC3161   CC3162    OC311     9         180.000000  0.543920  3
OC301     CC3161   CC3162    OC301     9         180.000000  2.468560  1
OC301     CC3161   CC3162    OC301     9         0.000000    4.853440  2
OC301     CC3161   CC3162    OC3C61    9         180.000000  11.506000  1
OC301     CC3161   CC3162    OC3C61    9         180.000000  1.087840  2
OC301     CC3161   CC3162    OC3C61    9         0.000000    0.418400  3
OC301     CC3161   CC3163    OC3C61    9         180.000000  5.690240  1
OC301     CC3161   CC3163    OC3C61    9         0.000000    0.669440  2
OC301     CC3161   CC3163    OC3C61    9         0.000000    4.225840  3
HCA1      CC3161   CC3162    OC302     9         0.000000    0.836800  3
CC3163    OC3C61   CC3162    OC302     9         180.000000  1.715440  1
CC3163    OC3C61   CC3162    OC302     9         0.000000    3.723760  2
CC3163    OC3C61   CC3162    OC302     9         0.000000    0.209200  3
```

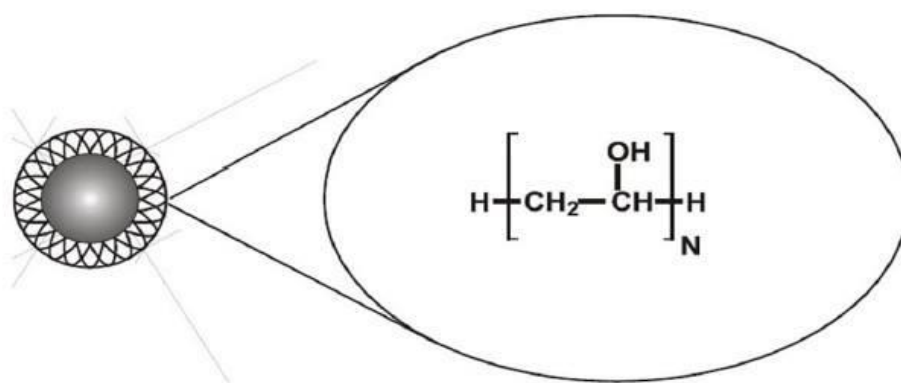
**Εικόνα 29. Απόσπασμα τοπολογίας των γλυκοζιτικών οξυγόνων**

Τα οξυγόνα αυτού του τύπου παρουσιάζουν διαφορετικές φυσικές ιδιότητες από τα OC311 και τα OC3161 όπως φαίνεται από τις τιμές στην εικ. 9.

### 3.4 Κατασκευή τοπολογίας λειτουργικού νανοσωματιδίου μαγνητίτη επικαλυπτόμενο από PVA (MAG-PVA) και από ARA (MAG-ARA)

#### Μαγνητίτης-PVA

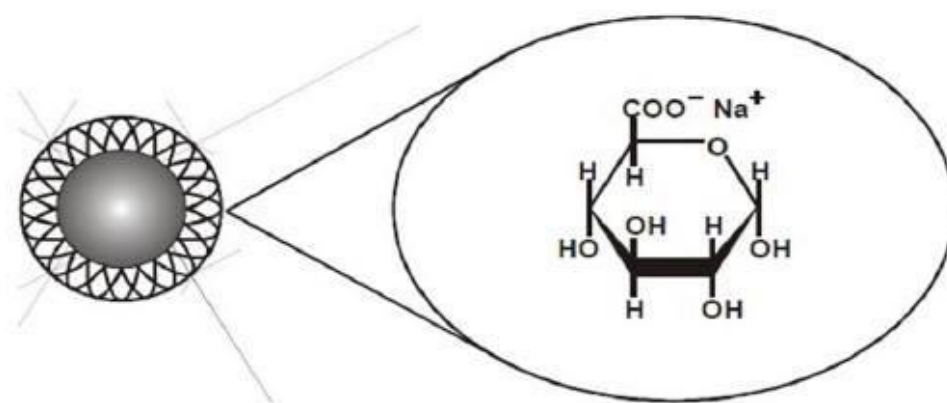
Από τη στιγμή που κατασκευάστηκε μία αλυσίδα PVA, θα πρέπει να πολλαπλασιασθεί 63 φορές με τη χρήση κατάλληλου script, γραμμένο σε Python. Υπάρχουν σύνολο 64 αλυσίδες πολύ-βίνυλοαλκοόλης πάνω στον μαγνητίτη. Το πρώτο μονομερές πιάνεται ομοιοπολικά από σίδηρο της επιφάνειας μέσω του οξυγόνου της αλκοόλης. Αυτό αποτελεί παραδοχή, καθώς στη φύση το PVA παραμένει πάνω στο μαγνητίτη μέσω προσρόφησης. Στην παρούσα εργασία θεωρήθηκε ομοιοπολικός δεσμός για να αποφθεχθούν μη φυσικά φαινόμενα, όπως το ξεκόλλημα μιας αλυσίδας, κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης (βλ. εικ. 30). Σε πλήρη αντιστοιχία με τα προηγούμενα, αναζητήθηκαν οι παράμετροι, με βάση τους κωδικούς των ατόμων, στα αρχεία της τοπολογίας του πεδίου δυνάμεως (CHARMM36) και ανατέθηκαν με ακρίβεια.



Εικόνα 30.

## Μαγνητίτης-ARA

Πιστεύεται ότι το γλυκουρονικό οξύ πιάνεται από το μαγνητίτη ως εξής: Η καρβοξυλική ομάδα του οξέος (αρνητικό φορτίο) αλληλεπιδρά με ιοντικό τρόπο με σίδηρο της επιφάνειας (θετικό φορτίο). Επειδή υπάρχει ο φόβος να παρατηρηθούν μη ρεαλιστικά φαινόμενα όπως και στην περίπτωση του Μαγνητίτη-PVA, έγινε η παραδοχή του ομοιοπολικού δεσμού (βλ. εικ. 31).

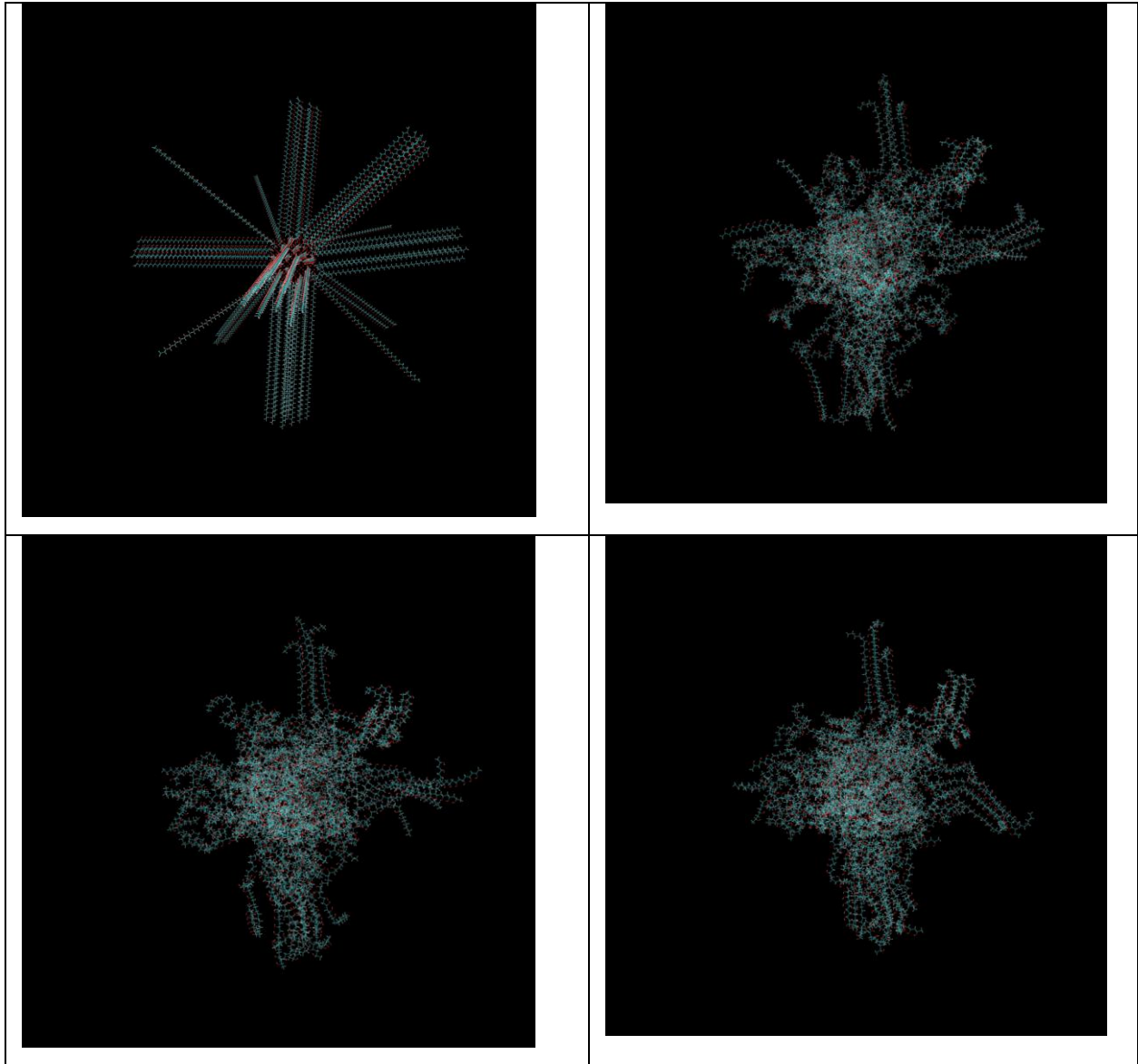


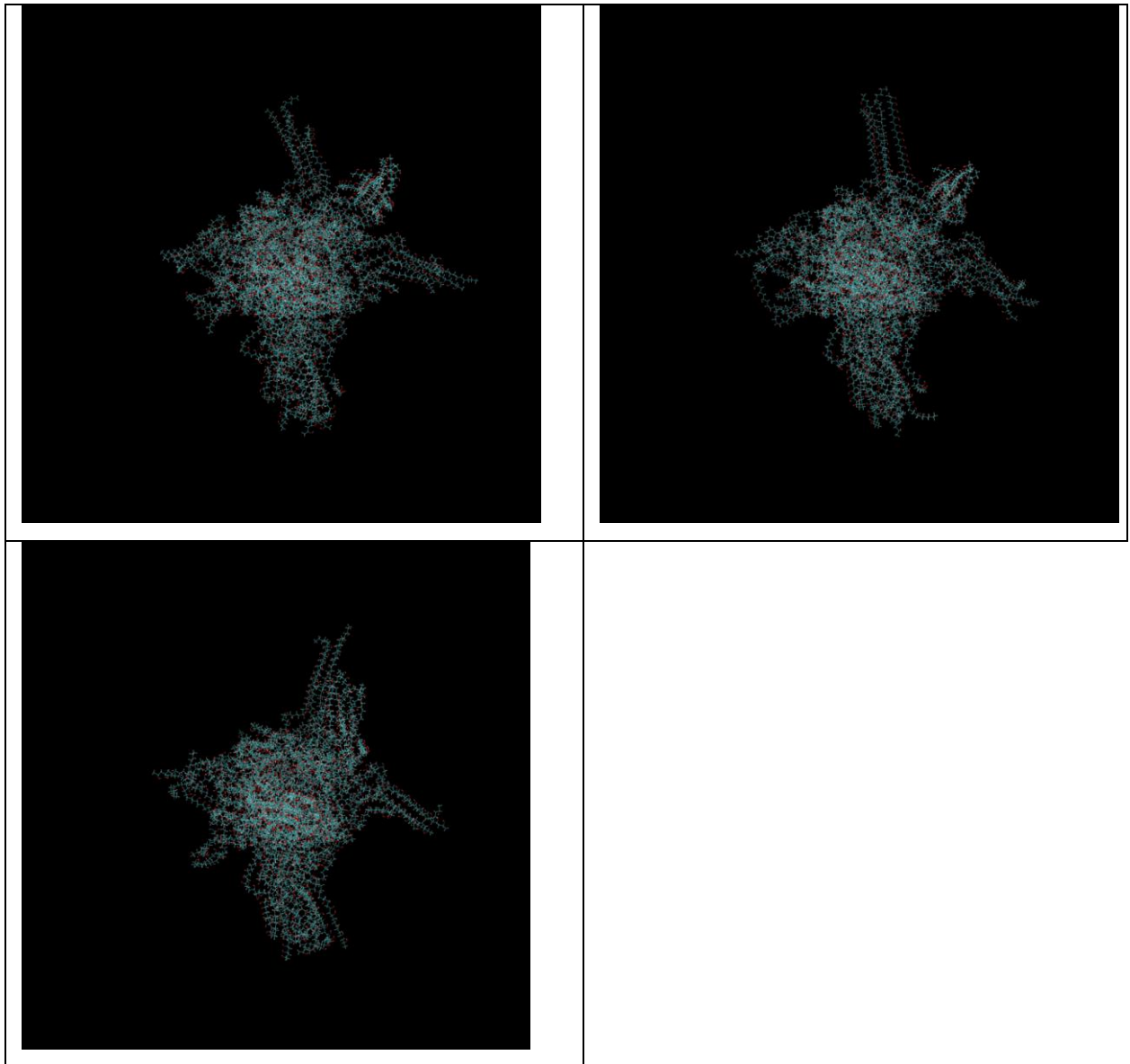
Εικόνα 10.

### 3.5 Προσομοίωση MAG-PVA και MAG-ARA σε κενό και νερό

Σε αυτό το σημείο έχει κατασκευαστεί πλήρως η τοπολογία για τα δύο λειτουργικά νανοσωματίδια και θα προσομοιωθούν στο κενό και στη συνέχεια στο νερό. Αρχικά, ελαχιστοποιείται η ενέργεια ώστε να ληφθεί μία λογική δομή για τα συστήματα, έπειτα γίνεται η εξισορρόπηση της θερμοκρασίας για 1 ns με τον αλγόριθμο θερμοστάτισης *v-rescale* και στη συνέχεια τα συστήματα προσομοιώνονται για 10 ns στο κενό το καθένα. Από τη στιγμή που δεν υπάρχει ο διαλύτης, οι πιο ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις για τις πλευρικές αλυσίδες θα είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ίδιων των αλυσίδων. Αυτό φαίνεται καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης καθώς παρατηρείται η αναδίπλωση των αλυσίδων.

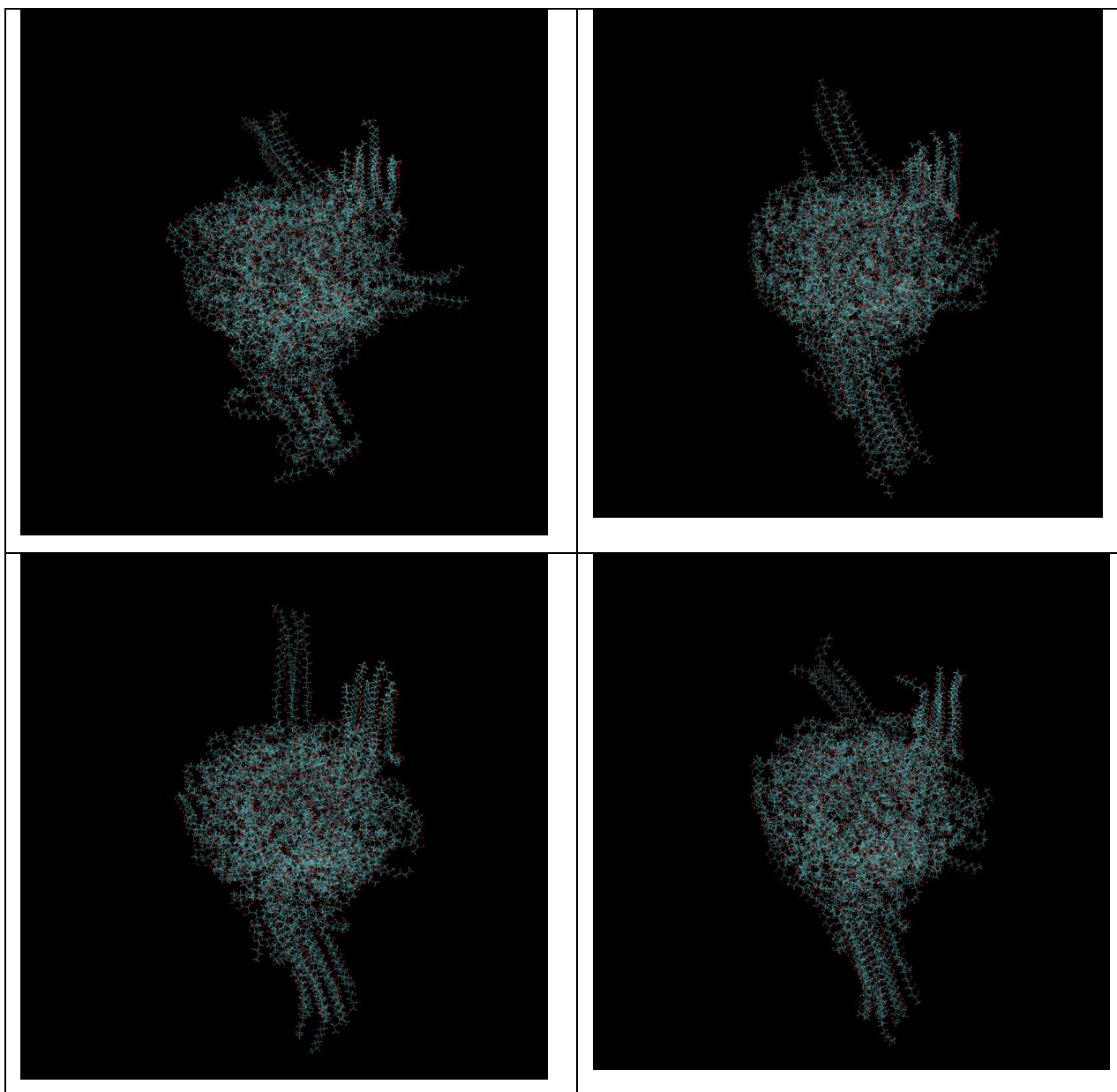
Παρακάτω παρουσιάζονται στιγμιότυπα για το σύστημα «μαγνητίτης – πολυ (βινυλο αλκοόλη)» ξεκινώντας από την ελαχιστοποιημένη δομή συνεχίζοντας στα 100-200-400-600-800-1000 ps και στη συνέχεια παρουσιάζονται τα 2-4-8-10 ns της προσομοίωσης στο κενό.





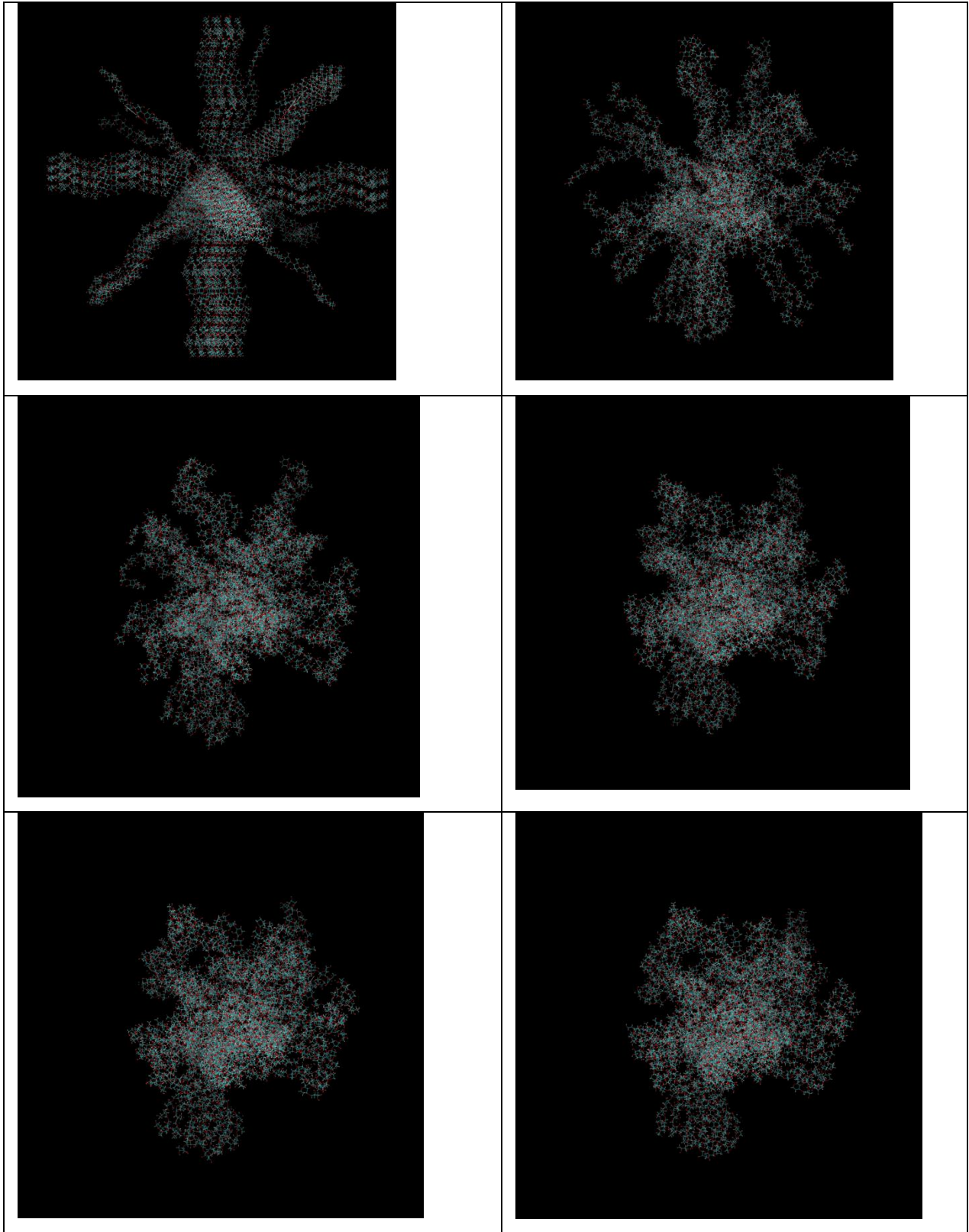
Εικόνα 31. Ελαχιστοποιημένη δομή – 100 ps -200 ps -400 ps -600 ps -800 ps -1ns προσομοίωσης του «μαγνητίτη – πολυ (βινυλο αλκοόλη)» στο κενό.

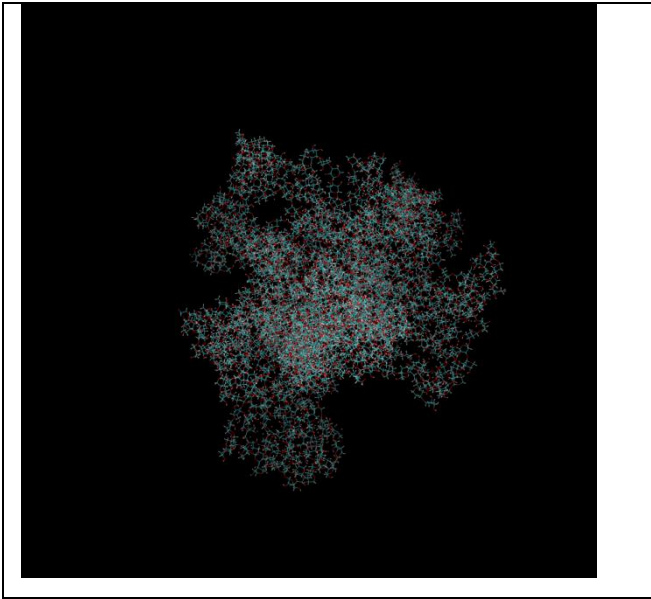




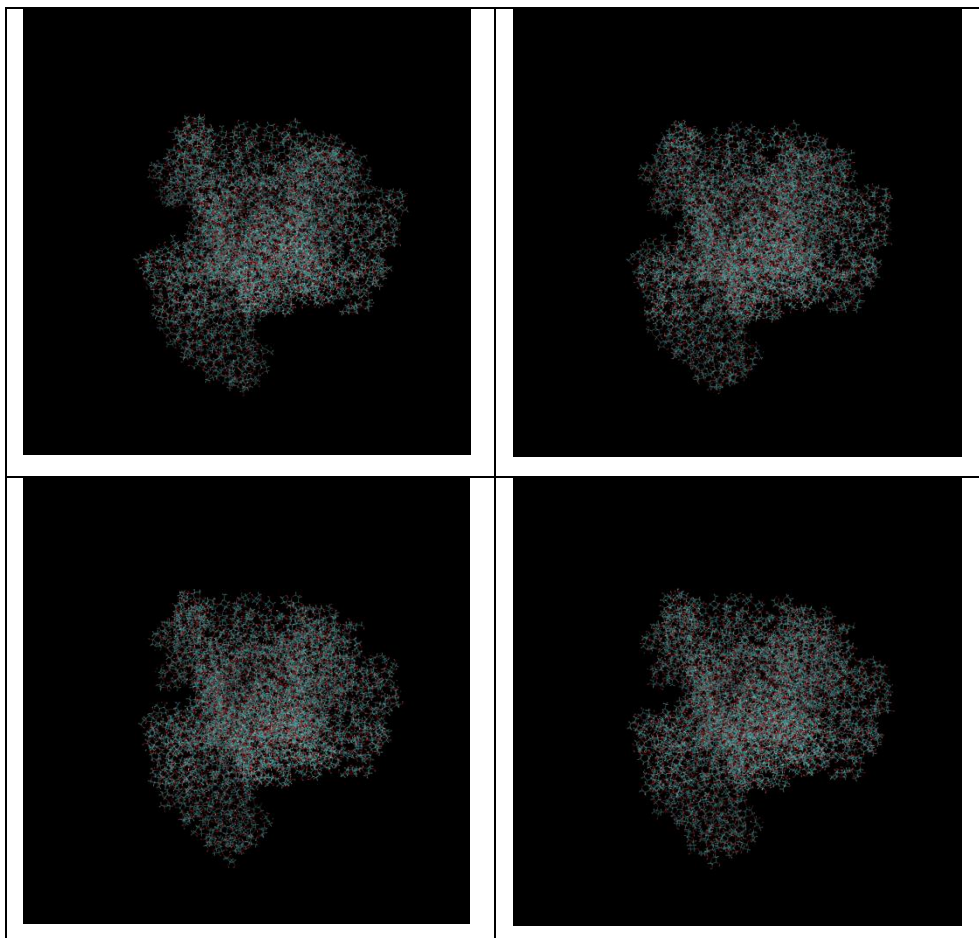
Εικόνα 32. 2 ns – 4 ns – 8 ns -10 ns προσομοίωσης του «μαγνητίτη – πολυ (βινυλο αλκοόλη)» στο κενό.

Και αντίστοιχα παρουσιάζονται για το σύστημα «μαγνητίτης - πολυαραβικό οξύ» ξεκινώντας από την ελαχιστοποιημένη δομή συνεχίζοντας στα 100-200-400-600-800-1000 ps προσομοίωσης στο κενό και έπειτα στα 2-4-6-8-10 ns προσομοίωσης στο κενό.



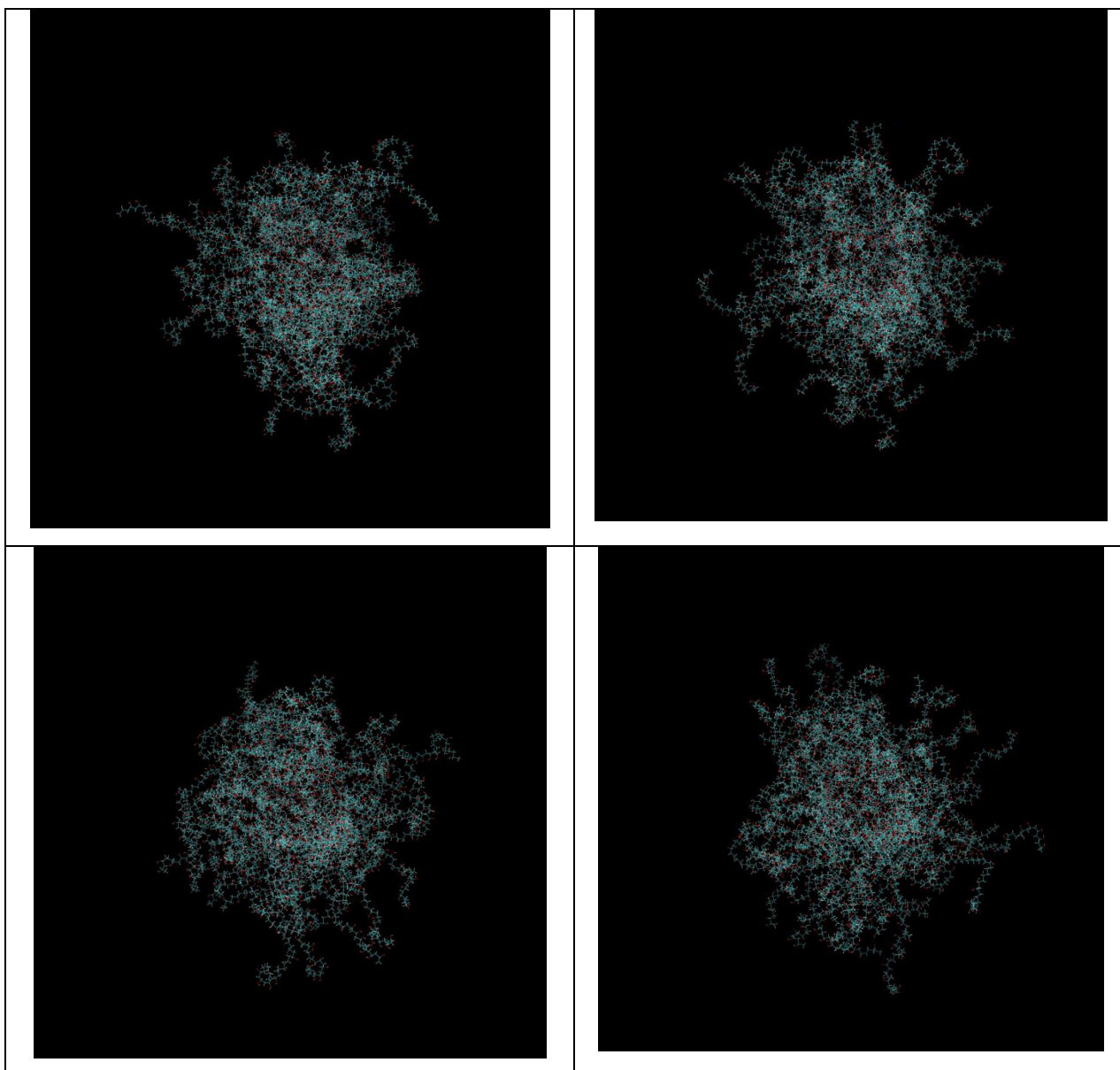


Εικόνα 33. Ελαχιστοποιημένη δομή – 100 ps -200 ps -400 ps -600 ps -800 ps -1ns  
προσομοίωσης του «μαγνητίτη – πολυ αραβικό οξύ» στο κενό.



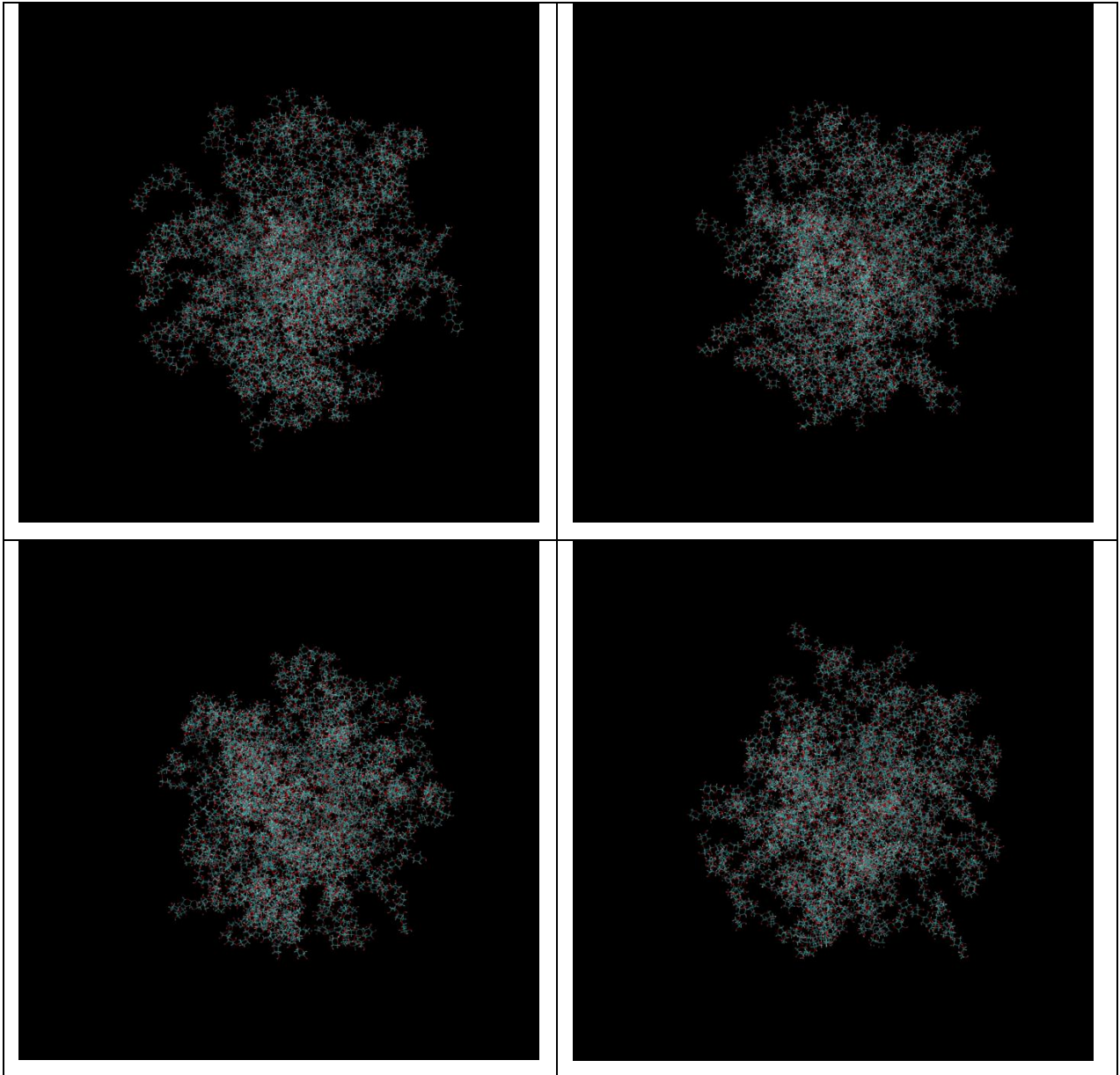
Εικόνα 34. Στιγμιότυπα της προσομοίωσης του «μαγνητίτη – πολυαραβικό οξύ» στο κενό για 2-4-8-10 ns.

Η δομή που προκύπτει μετά τα 10 ns προσομοίωσης στο κενό θα είναι η αρχική δομή από την οποία θα ξεκινήσει η προσομοίωση στο νερό. Κατασκευάζεται το κουτί της προσομοίωσης, γίνεται η προσθήκη του διαλύτη (νερό – μοντέλο TIP3) και προστίθενται αντισταθμιστικά ιόντα. Επειδή έχει γίνει προσθήκη νέων μορίων στο σύστημα και τα ιόντα αντικαθιστούν τυχαία μόρια νερού κατά της προσθήκη τους από το πρόγραμμα, πρέπει να επαναληφθεί η ελαχιστοποίηση της ενέργειας ώστε να μην υπάρχουν αλληλεπιδράσεις υψηλής ενέργειας μεταξύ των ιόντων και του νανοσωματιδίου. Έπειτα εξισορροπείται η θερμοκρασία και η πίεση σε δύο διακριτά στάδια, αναπαριστώντας τα στατιστικά σύνολα NVT και NPT αντίστοιχα. Πιο αναλυτικά για το σύνολο NVT τα συστήματα προσομοιώθηκαν για 300 ps με τον αλγόριθμο θερμοστάτισης *v-rescale* και για το σύνολο NPT τα συστήματα προσομοιώθηκαν για 300 ps με τον αλγόριθμο θερμοστάτισης Noose-Hoover και τον αλγόριθμο βαροστάτισης Parrinello-Rahman. Η διαδικασία συνεχίζεται με την προσομοίωση των δύο συστημάτων για 10 ακόμα nanoseconds. Από την οπτικοποίηση της τροχιάς φαίνεται πως το νερό αλληλεπιδρά με τις πλευρικές αλυσίδες των δύο συστημάτων και τις επιδιαλυτώνει, επιβεβαιώνοντας τη μεγάλη υδροφιλικότητα των πλευρικών αλυσίδων. Παρακάτω παρουσιάζονται τα στιγμιότυπα από τις προσομοιώσεις των δύο συστημάτων στο νερό για 10 ns.



Εικόνα 35. Στιγμιότυπα της προσομοίωσης του «μαγνητίτη – πολυ (βινυλο αλκοόλη)» στο νερό για 2.5-5-7.5-10 ns

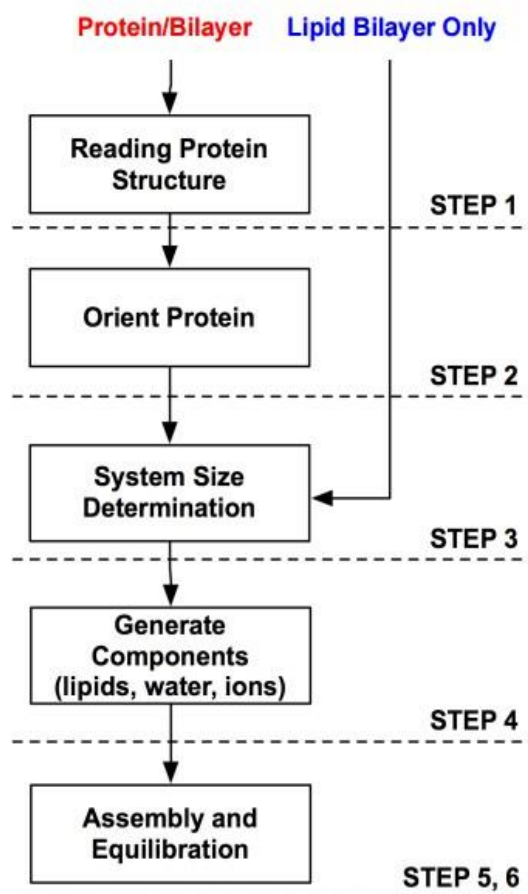




Εικόνα 36. Στιγμιότυπα της προσομοίωσης του «μαγνητίτη – πολυαραβικό οξύ» στο νερό για 2.5-5-7.5-10 ns

### 3.6 Κατασκευή και προσομοίωση μοντέλου κυτταρικής μεμβράνης

Ο δικτυακός τόπος CHARMM-GUI (<http://www.charmm-gui.org>) [90] παρέχει ένα γραφικό περιβάλλον χρήστη (GUI-Graphical User Interface) μιας συλλογής ενότητων (modules) που βοηθά τους χρήστες να προετοιμάσουν τις προσομοιώσεις MD σε ένα πρόγραμμα περιήγησης (web browser). Ο Κατασκευαστής Μεμβρανών (Membrane Builder), μία από τις ενότητες του CHARMM-GUI, στοχεύει να βοηθήσει τους χρήστες να δημιουργήσουν ένα εξελιγμένο σύστημα πρωτεϊνών / μεμβρανών ή μεμβρανών εύκολα και αλληλεπιδραστικά σε ένα web browser μέσω μιας γενικευμένης και αυτοματοποιημένης διαδικασίας κατασκευής, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού του μεγέθους του συστήματος καθώς και της δημιουργίας λιπιδικής διπλοστοιβάδας, διαλύτη (bulk water) και ιόντων. Η βασική ιδέα είναι να επιτρέψει στους χρήστες να ορίσουν διάφορες παραμέτρους, όπως το μέγεθος και το σχήμα του συστήματος, η συγκέντρωση ιόντων, ο τύπος λιπιδίων και η μέθοδος παραγωγής διπλής στιβάδας σε ένα γραφικό περιβάλλον. Υπάρχουν προεπιλεγμένες τιμές που έχουν δοκιμάστηκαν εκτενώς και δίνονται σε κάθε βήμα για να παρέχουν λογικές επιλογές και σημεία εκκίνησης τόσο για τους μη ειδικούς όσο και για τους ειδικούς χρήστες.



Εικόνα.37 Επισκόπηση γενικευμένης διαδικασίας κατασκευής συστημάτων πρωτεΐνης / μεμβράνης ή μεμβράνης σύμφωνα με το CHARMM-GUI. [90]

Υπάρχουν αρκετοί τύποι λιπιδίων που είναι διαθέσιμοι για την κατασκευή ομοιογενών λιπιδικών διπλοστοιβάδων, όπως DMPC (πειραματική περιοχή εγκάρσιας τομής  $60,7 \text{ \AA}^2$  στους  $303 \text{ K}$ ), DPPC ( $64,0 \text{ \AA}^2$  στους  $323 \text{ K}$ ) και POPC ( $68,3 \text{ \AA}^2$  στους  $303 \text{ K}$ ) [91]. Ο Κατασκευαστής Μεμβρανών προσδιορίζει το μέγεθος του συστήματος με βάση τις εισόδους των χρηστών για (1) τον αριθμό των λιπιδικών στρωμάτων, (2) τον αριθμό των λιπιδικών μορίων ή (3) τις διαστάσεις του συστήματος. Ο αριθμός των λιπιδικών στρωμάτων αντιστοιχεί στον αριθμό των μορίων λιπιδίων από μια πρωτεΐνη στο πιο κοντινό άκρο του συστήματος έτσι ώστε αυτή η επιλογή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί γρήγορα ο συνολικός



αριθμός των λιπιδικών μορίων. Για παράδειγμα, "1.5 στρώματα λιπιδίων" σημαίνει ότι τουλάχιστον τρία μόρια λιπιδίων θα τοποθετηθούν μεταξύ δύο πρωτεϊνών στο πρωτεύον σύστημα και στο εικονικό σύστημα. Το μέγεθος του συστήματος κατά μήκος του άξονα Z προσδιορίζεται προσδιορίζοντας το πάχος του όγκου νερού από την έκταση της πρωτεΐνης ή της μεμβράνης κατά μήκος του άξονα Z, όπως φαίνεται στην Εικόνα 39. Στην περίπτωση αυτής της εργασίας επιλέγονται 200 Å για το πάχος του όγκου του νερού από τη μεμβράνη κατά τον άξονα Z. Το λιπίδιο που επιλέγεται είναι το DPPC. Αφού ολοκληρωθεί ο προσδιορισμός του μεγέθους του συστήματος, ο Κατασκευαστής Μεμβρανών παρέχει μια λεπτομερή περίληψη του καθορισμένου μεγέθους συστήματος και μιας πιθανής εικόνας πακεταρισμένων λιπιδίων για να βοηθήσει τους χρήστες να ελέγξουν εάν το μέγεθος του συστήματος είναι σωστό. Τα συστήματα εικόνας εμφανίζονται επίσης για να δώσουν μια καλύτερη εικόνα για Μέγεθος του συστήματος. Εάν το σύστημα είναι μικρότερο ή μεγαλύτερο από το αναμενόμενο, οι χρήστες μπορούν να επιστρέψουν και να καθορίσουν τους αριθμούς των μορίων λιπιδίων ή τις διαστάσεις του συστήματος για μεγέθυνση ή μείωση του μεγέθους του συστήματος.

**Calculated Number of Lipids:**

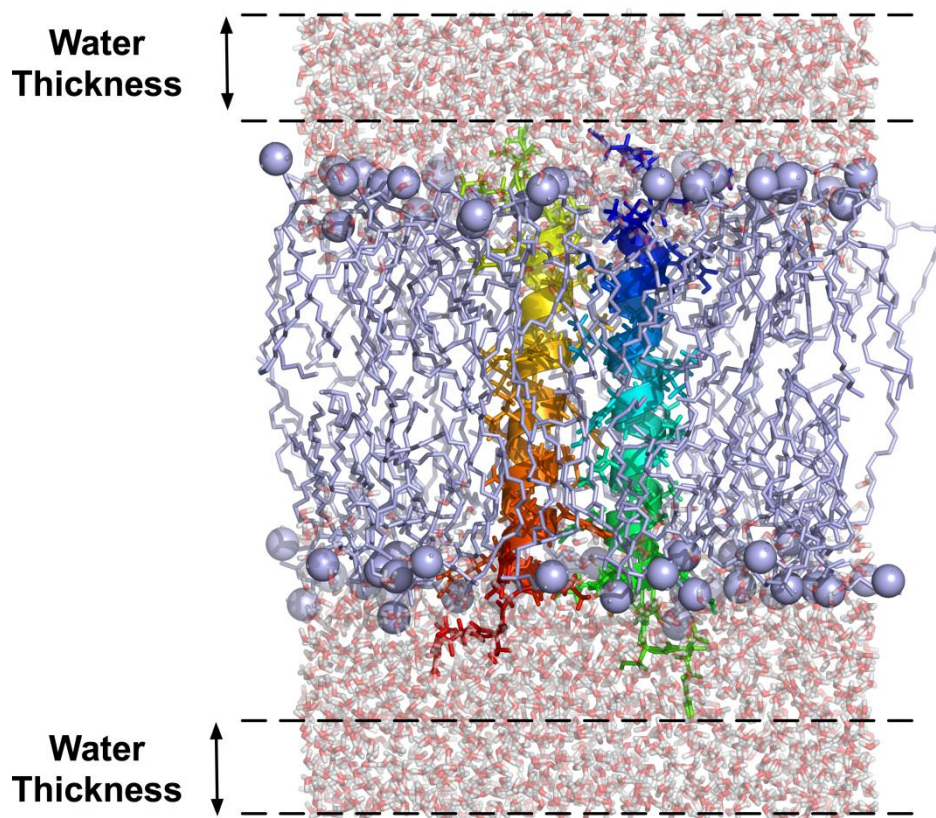
Lipid Type	Upperleaflet Number	Lowerleaflet Number
DPPC	635	635

□

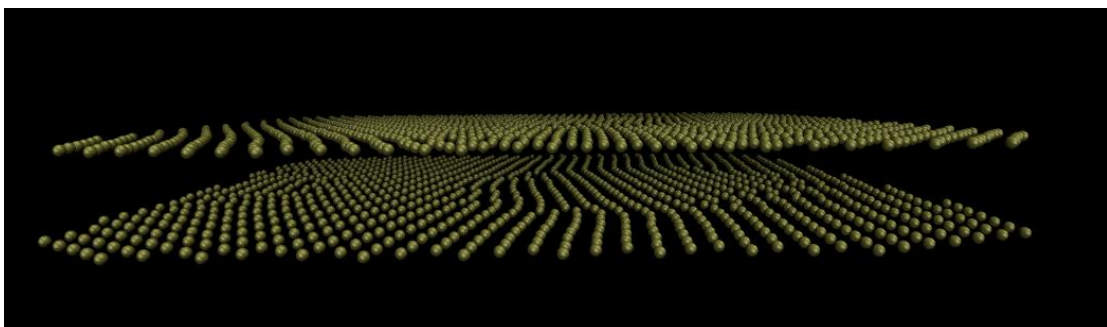
**Calculated XY System Size:**

	Upperleaflet	Lowerleaflet
Protein Area	0	0
Lipid Area	40005	40005
# of Lipids	635	635
Total Area	40005	40005
Protein X Extent	0.00	
Protein Y Extent	0.00	
Average Area	40005.00	
A	200.01	
B	200.01	

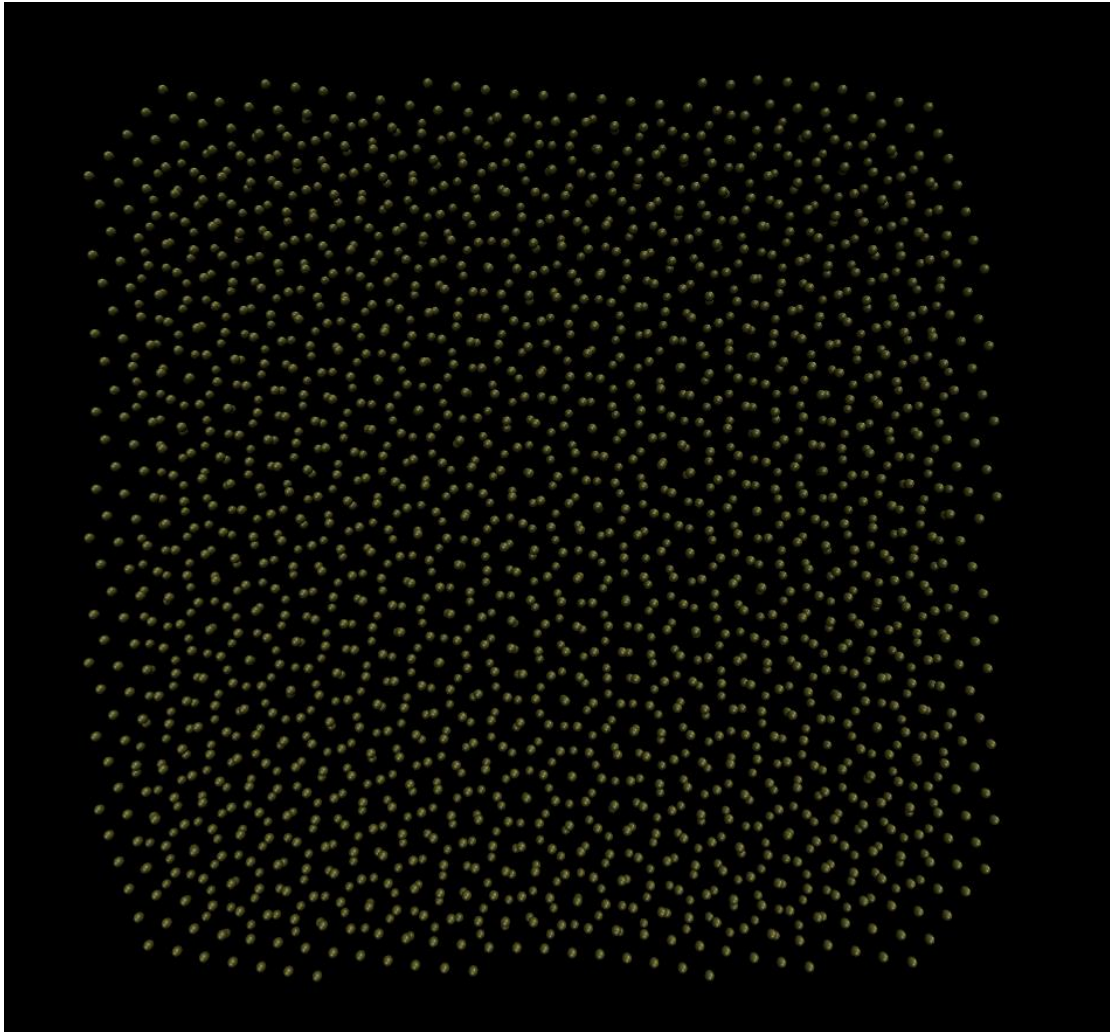
Εικόνα 38. Προεπισκόπηση των διαστάσεων του συστήματος και του αριθμού των συστατικών.



Εικόνα 39. Πάχος όγκου νερού από την έκταση της πρωτεΐνης κατά μήκος του άξονα Z. [90]



Εικόνα 40. Καθορισμός των διαστάσεων της διπλοστιβάδας.



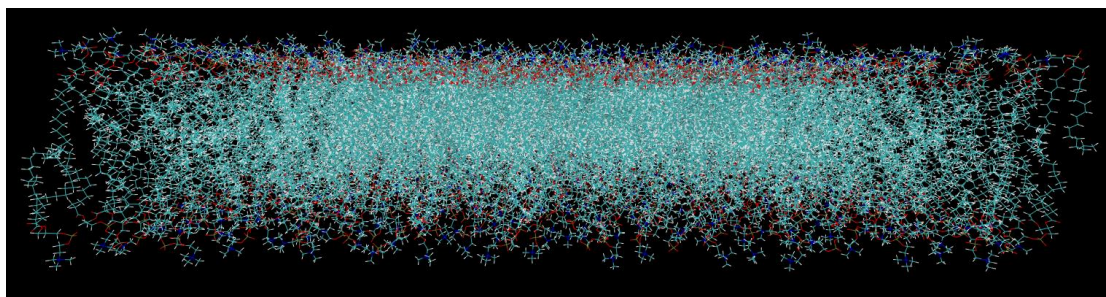
Εικόνα 41. Καθορισμός των διαστάσεων της διπλοστιβάδας.

Στη συνέχεια, δημιουργούνται τα συστατικά του συστήματος όπως η λιπιδική διπλοστιβάδα, το νερό, και τα ιόντα. Για να καταστεί το σύστημα ουδέτερο για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις σε μεγάλη απόσταση με τη χρήση της μεθόδου PME ( Particle Mesh Ewald ) , ο Κατασκευαστής Μεμβρανών δημιουργεί έναν κατάλληλο αριθμό ιόντων, ανάλογα με τη συγκέντρωση ιόντων που καθορίζεται από τον χρήστη (C). Οι αριθμοί των ιόντων NaCl ( $N_{Na}$  και  $N_{Cl}$ ) προσδιορίζονται από τον όγκο (V) και το συνολικό φορτίο του συστήματος ( $Q_{sys}$ ),

δηλ.  $N_{Na} = C \cdot V - Q_{sys} / 2$  και  $N_{Cl} = C \cdot V + Q_{sys} / 2$ , για να εξουδετερωθεί το συνολικό φορτίο του συστήματος. Επιλέγεται η κανονική συγκέντρωση NaCl στο ανθρώπινο σώμα (0.15 M). Η αρχική διαμόρφωση των ιόντων στη συνέχεια προσδιορίζεται μέσω προσομοιώσεων Monte Carlo χρησιμοποιώντας κλιμακούμενες άλληλεπιδράσεις Coulombic και van der Waals.

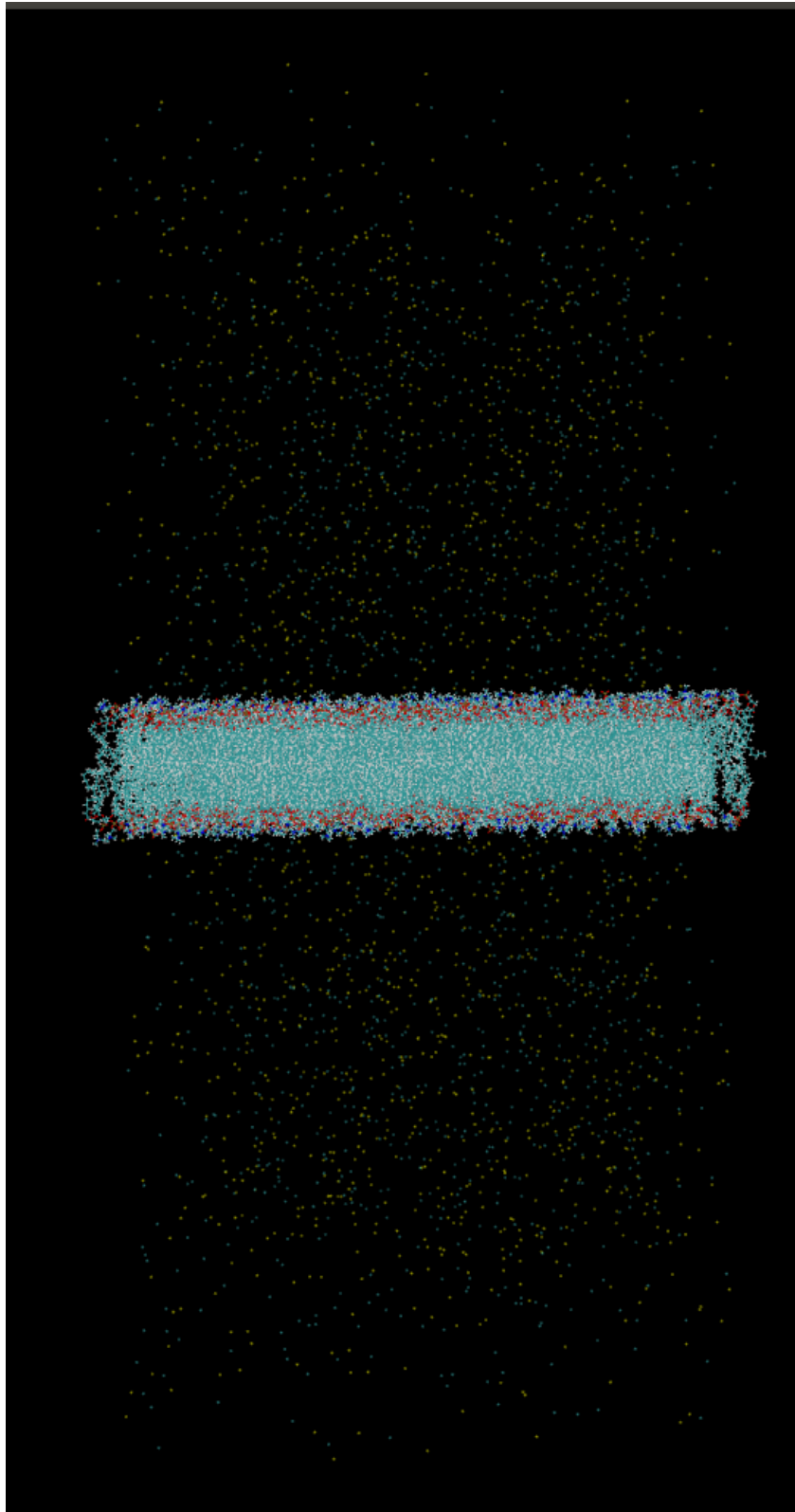
Κάθε συστατικό που έχει παραχθεί στο προηγούμενο βήμα θα συναρμολογηθεί όπως φαίνεται στην Εικόνα 42. Ένα από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της χρήσης του περιβάλλον web είναι ότι, αν βρεθεί ένα πρόβλημα, οι χρήστες μπορούν να επιστρέψουν και να επαναδημιουργήσουν ξανά ολόκληρο το σύστημα πριν κλείσουν το πρόγραμμα περιήγησης. Επομένως, η απεικόνιση της αρχικά συναρμολογημένης δομής είναι σημαντική για να εξακριβωθεί αν το σύστημα είναι λογικό. Αφού συναρμολογηθεί η μεμβράνη, η εξισορρόπηση πρέπει να πραγματοποιηθεί για να χαλαρώσει το αρχικό μη συνδεδεμένο σύστημα πριν από τις προσομοιώσεις MD. Ωστόσο, λόγω της σημαντικής ποσότητας υπολογιστικής ισχύος που δεν μπορεί να φιλοξενηθεί στο διακομιστή, ο κατασκευαστής μεμβρανών παρέχει έξι συνεχόμενα αρχεία εισόδου για την εξισορρόπηση, τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν για συνεχείς προσομοιώσεις. Για την εξασφάλιση σταδιακής εξισορρόπησης του αρχικά συναρμολογημένου συστήματος, εφαρμόζονται διάφορα συστήματα συγκράτησης στα μόρια, νερού, ιόντων και λιπιδίων κατά την εξισορρόπηση [92]: (1) αρμονικοί περιορισμοί στα ιόντα, (2) απωθητικοί επίπεδοι περιορισμοί για την αποτροπή εισόδου νερού στην υδρόφοβη περιοχή της μεμβράνης και (3) επίπεδοι περιορισμοί για τη συγκράτηση της θέσης των κεφαλών της μεμβράνης κατά μήκος του άξονα Z. Αυτές οι δυνάμεις συγκράτησης μειώνονται αργά καθώς εξελίσσεται η ισορροπία. Για να διασφαλιστεί η επιτυχής εξισορρόπηση, δηλαδή για να αποφευχθεί η αστάθεια δυναμικών ενσωματώσεων κατά την εξισορρόπηση, χρησιμοποιείται το σύνολο NVT για το πρώτο και το δεύτερο στάδιο και το σύνολο NPT για τα υπόλοιπα τέσσερα στάδια στους 323,15 K για το DPPC. Πιο αναλυτικά η διαδικασία της εξισορρόπησης:

Στάδιο	Αριθμός Βημάτων	Χρόνος Βήματος
6.1	25.000	1 fs
6.2	25.000	1 fs
6.3	25.000	1 fs
6.4	50.000	2 fs
6.5	50.000	2 fs
6.6	50.000	2 fs

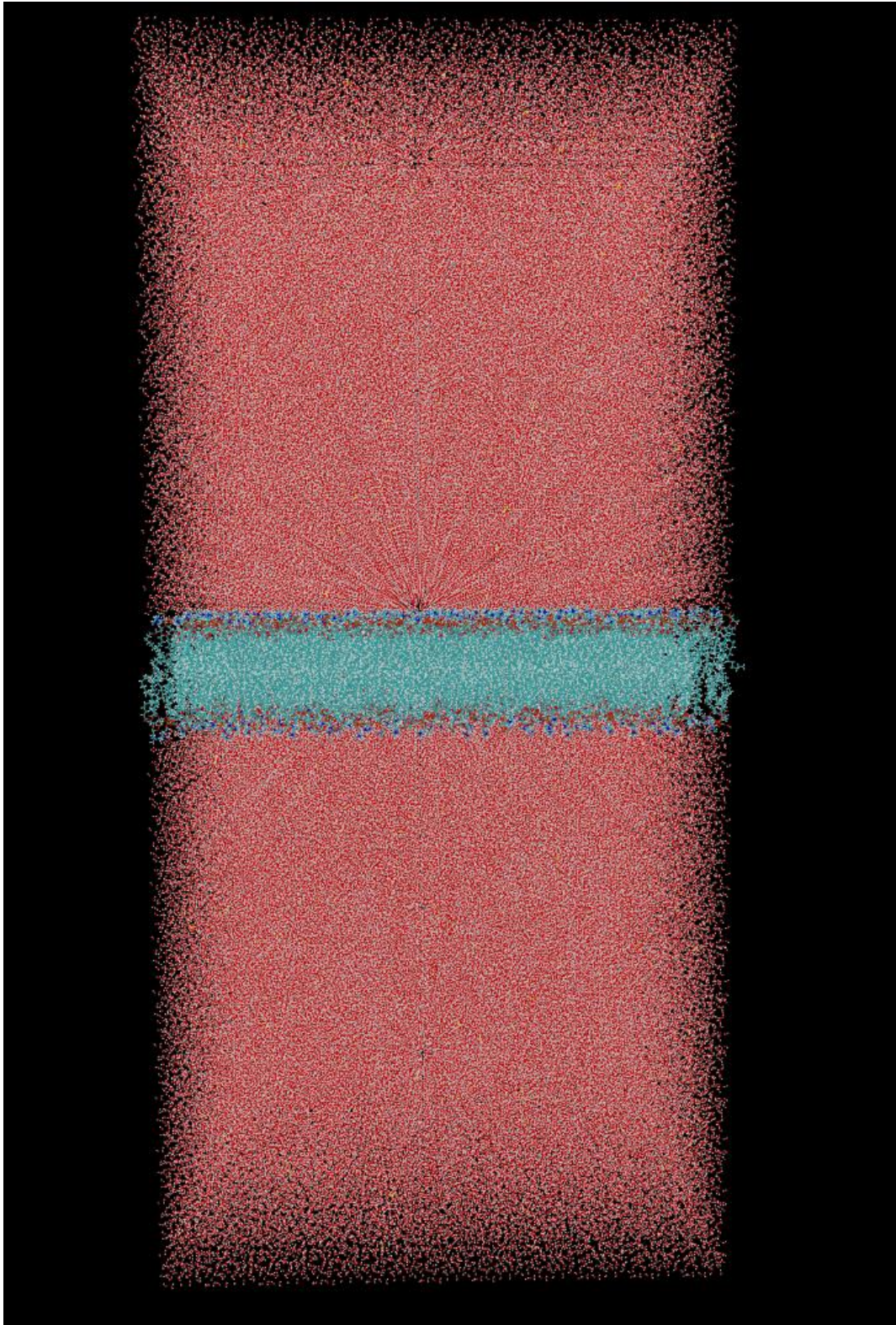


Εικόνα 42. Κατασκευή της λιπιδικής διπλοστιβάδας. 1270 μόρια DPPC





Εικόνα 43. Εισαγωγή των ιόντων στο σύστημα.



Εικόνα 44. Τελική εικόνα του συστήματος που κατασκευάζεται στο CHARMM-GUI.

### 3.7 Υπολογισμός βέλτιστου αριθμού επεξεργαστών για την προσομοίωση

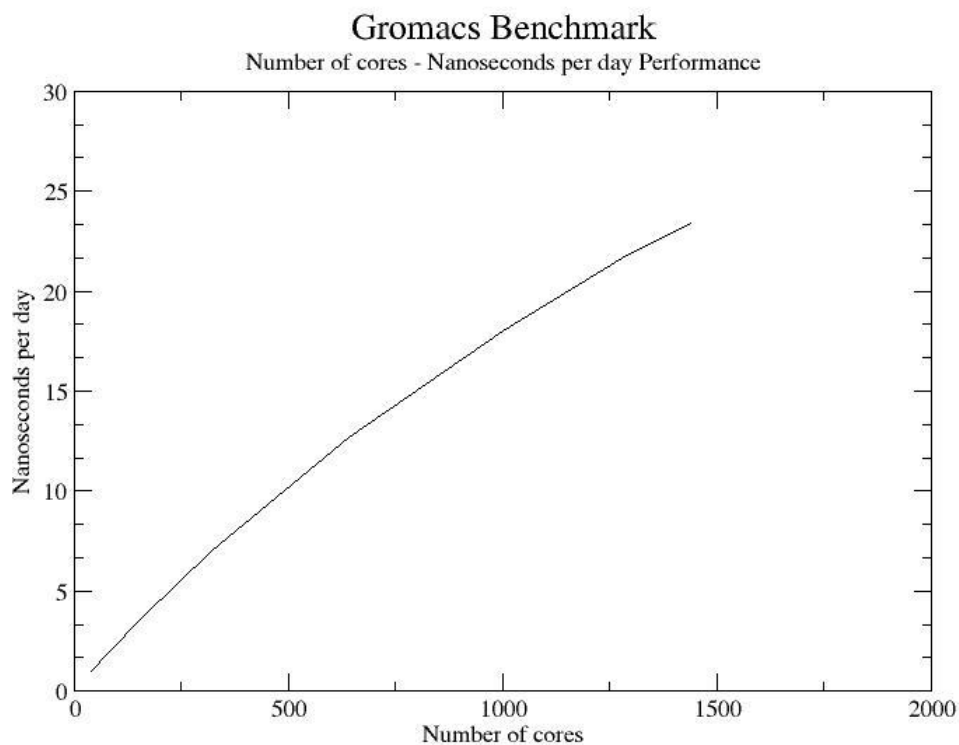
Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάζεται η παραλληλοποίηση του λογισμικού προσομοίωσης Gromacs μελετώντας την απόδοση του σε ns/day (nanoseconds per day) ανάλογα με τον αριθμό των επεργαστών. Το υπό εξέταση σύστημα είναι η λιπιδική διπλοστοιβάδα με 1.090.000 άτομα (ψαξε να βρεις το κανονικο νουμερο ) ή οποία προσομοιώνεται στο στάδιο της εξισορρόπησης της πίεσης αναπαριστώντας το στατιστικό σύνολο NPT για 100.000 βήματα και χρόνο βήματος τα 2 fs. Το σύστημα προσομοιώθηκε στον υπερυπολογιστή ARIS σε μία σειρά προσομοιώσεων ξεκινώντας από 40 πυρήνες και φθάνοντας τους 1440. Τα μηχανήματα του ARIS που έγιναν οι προσομοιώσεις είναι τα thin nodes που χαρακτηρίζονται από 2 επεξεργαστές με 10 πυρήνες ο καθένας και 10 threads ανά πυρήνα. Συνολικά δηλαδή 20 πυρήνες και 20 threads ανά μηχανήμα, καθώς και 56 GB μνήμης RAM. Στο τέλος κάθε προσομοίωσης σημειώνονται τα ns/day και ο αριθμός των πυρήνων και υπολογίζεται η επιτάχυνση που επιτυγχάνεται για κάθε προσομοίωση. Η επιτάχυνση υπολογίζεται από το λόγο των ns/day κάθε προσομοίωσης ως προς τον αριθμό των ns/day της πρώτης προσομοίωσης. Κατασκευάζεται ο πίνακας:

Αριθμός πυρήνων	ns/day	Επιτάχυνση
40	0,974	1
80	1,896	1,95
160	3,702	3,80
320	6,988	7,17
640	12,665	13,00
1000	17,988	18,47
1280	21,644	22,22
1440	23,432	24,06

Πίνακας . Αριθμός πυρήνων – Απόδοση σε ns/day και οι τιμές επιτάχυνσης

Στη συνέχεια κατασκευάζεται το διάγραμμα «ns/day ως προς τον αριθμό των πυρήνων».





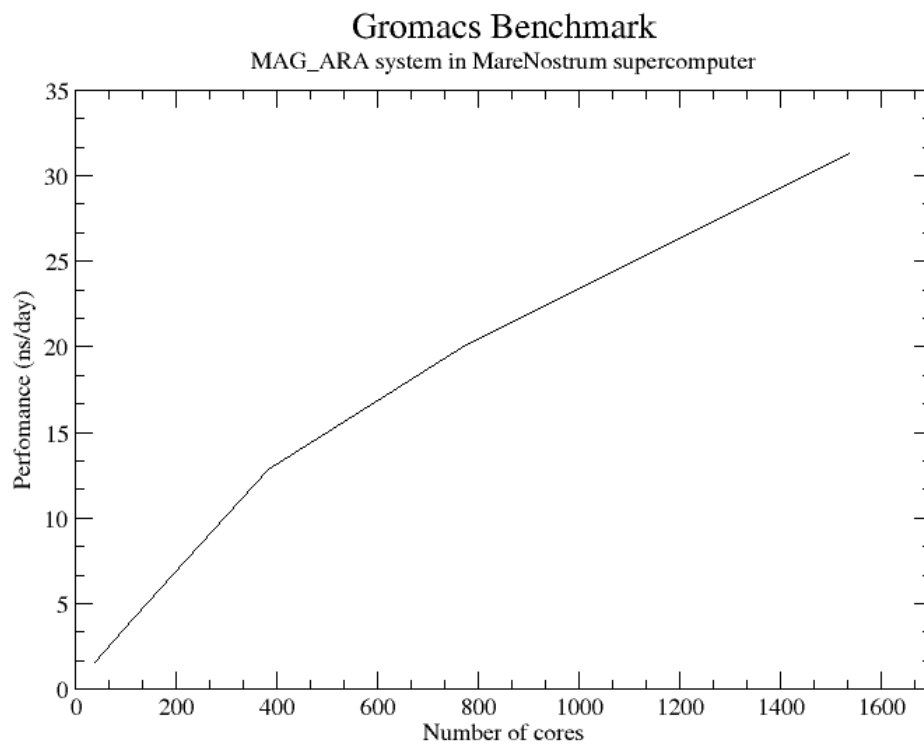
Εικόνα 45. Διάγραμμα απόδοσης ns/day – αριθμός πυρήνων για το σύστημα XXX στον εθνικό υπερ-υπολογιστή ARIS.

Παρατηρείται από την εικόνα 45 ότι η τάση είναι σχεδόν γραμμική. Φαίνεται λοιπόν ότι το λογισμικό είναι πολύ καλώς προσαρμοσμένο για να παραλληλοποιείται σε πολλαπλούς πυρήνες για αυτό το μέγεθος του συστήματος. Ακολουθεί η προσομοίωση της λιπιδικής διπλοστιβάδας για 100 ns και επιλέγονται οι 800 πυρήνες, άρα και τα 40 μηχανήματα (nodes) για την πραγματοποίηση της.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για το σύστημα «Μαγνητίτη – Πολυαραβικό οξύ» αυτή τη φορά στον υπερυπολογιστή MareNostrum του υπερυπολογιστικού κέντρου της Βαρκελώνης. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε εκεί διαθέτει 2 επεξεργαστές 24 πυρήνων ο καθένας ανά μηχανήμα συνεπώς είναι διαθέσιμοι 48 πυρήνες ανά μηχανήμα (node). Τα αποτελέσματα της απόδοσης καταγράφονται σε ανάλογο πίνακα.

Αριθμός Πυρήνων	ns/day	Επιτάχυνση
40	1,597	1
96	3,421	2,14
192	6,623	4,15
384	12,874	8,06
768	19,942	12,49
1536	31,305	19,6

Πίνακας . Αριθμός πυρήνων – Απόδοση σε ns/day και οι τιμές επιτάχυνσης



Εικόνα 46. Διάγραμμα απόδοσης ns/day – αριθμός πυρήνων

Μπορείτε εδώ να συγκρίνετε ARIS + MN?

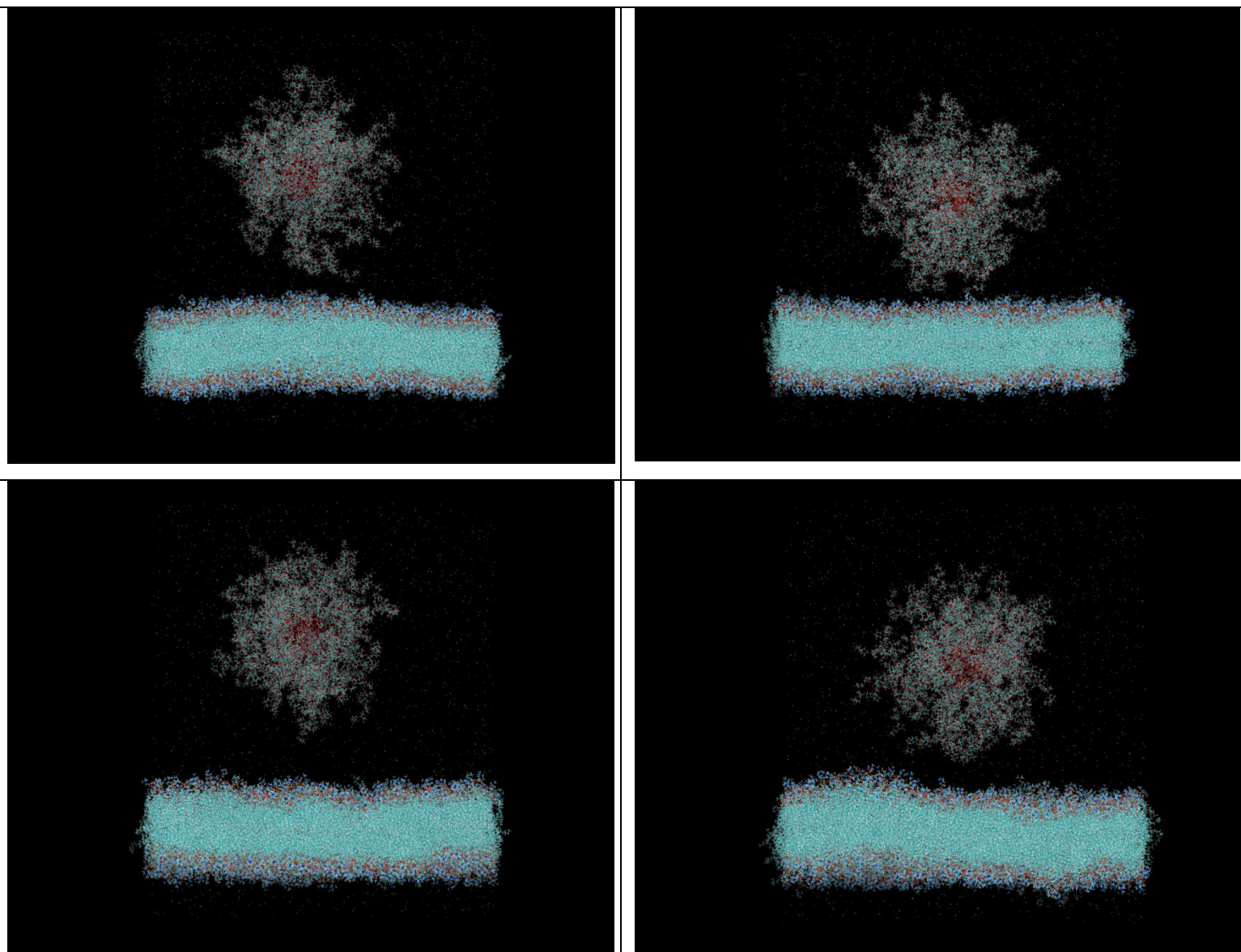
### 3.8 Εισαγωγή νανοσωματιδίου στη μεμβράνη

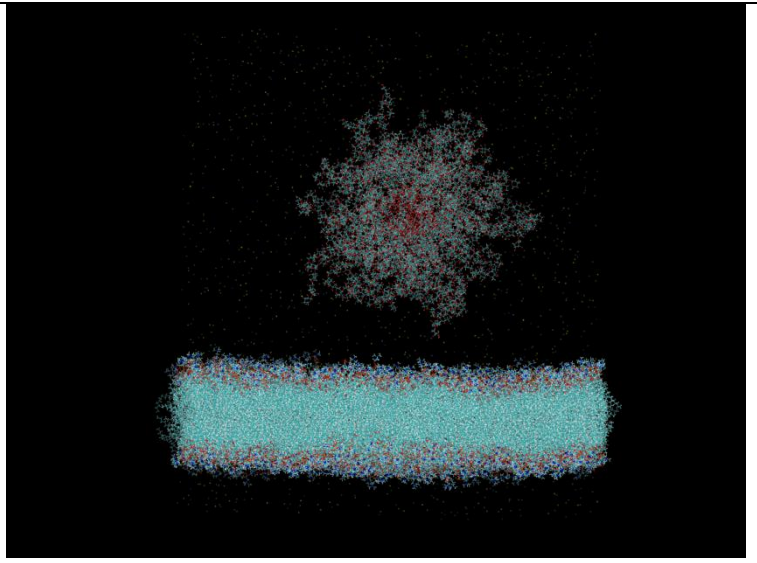
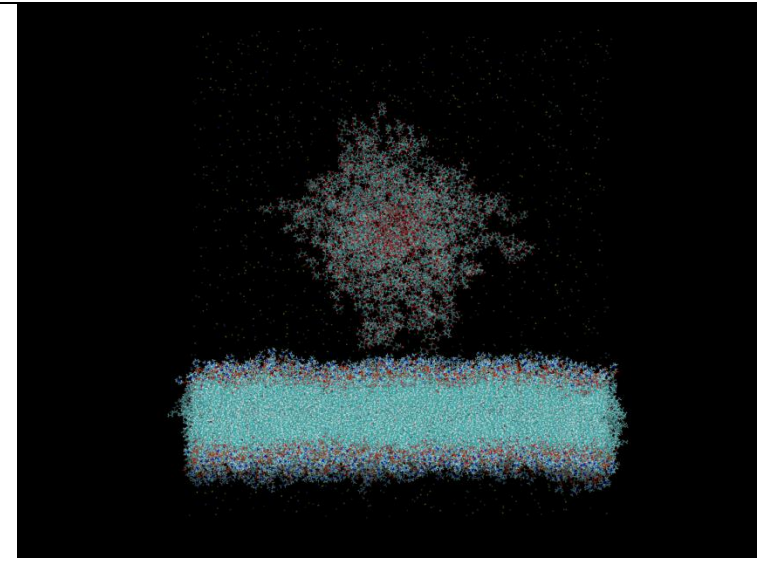
Τα συστήματα «Μαγνητίτης – Πολυαραβικό οξύ» και «Μαγνητίτης – πολύ βινυλική αλκοόλη» βρίσκονται σε ισορροπία κατά τις προσομοιώσεις τους στο νερό για 10 ns καθώς και η διπλοστιβάδα είναι σε ισορροπία για τα 100 ns που προσομοιώνεται. Το στάδιο που ακολουθεί είναι να εισαχθούν τα νανοσωματίδια στο σύστημα της διπλοστιβάδας. Λαμβάνεται η τελευταία δομή που προκύπτει από τα 10 ns προσομοίωσης των νανοσωματιδίων στο νερό και η τελευταία δομή που προκύπτει από την προσομοίωση της διπλοστιβάδας. Με την κατάλληλη επεξεργασία μέσω εργαλείων του προγράμματος GROMACS κατασκευάζεται νέο κουτί προσομοίωσης για το καθένα από τα δύο συστήματα. Επίσης αφαιρούνται μόρια νερού και ιόντων κατά τη διεύθυνση Z ώστε να μην σπαταλείται άσκοπα υπολογιστικός χρόνος. Οι νέες διαστάσεις των κουτιών είναι :19,74959 20,27020 22,90769 nm<sup>3</sup> για το σύστημα «Μαγνητίτης – Πολυαραβικό οξύ», 20,14302 19,70820 20,97879 nm<sup>3</sup> για το σύστημα «Μαγνητίτης – πολύ (βινυλο αλκοόλη)» και ο νέος αριθμός των ατόμων είναι : 916.332 και 833.638 αντίστοιχα.

### 3.9 Προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής νανοσωματιδίου στη μεμβράνη

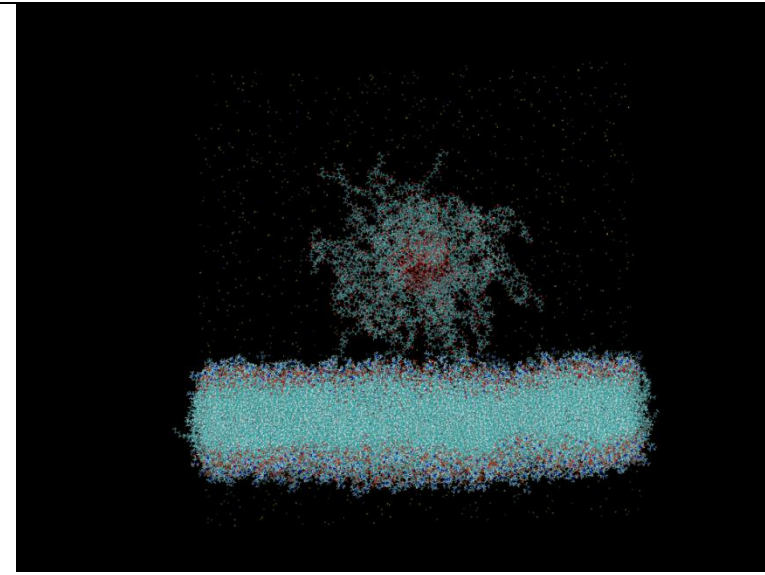
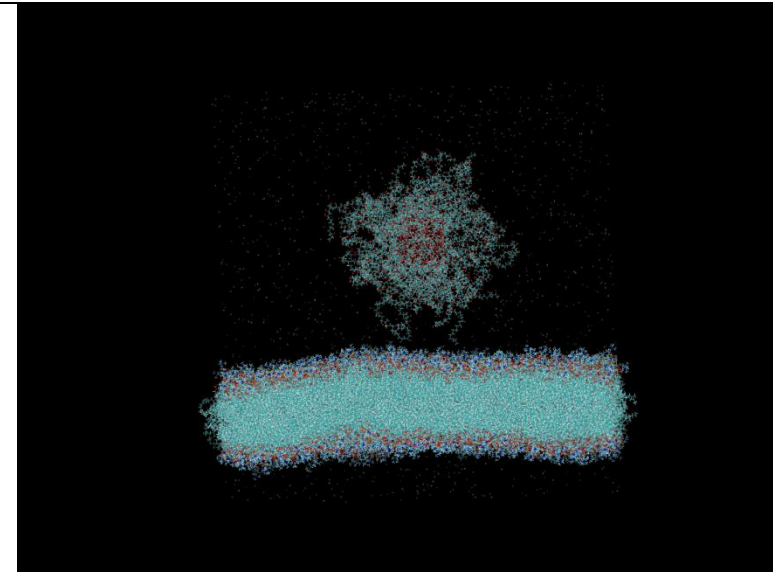
Παρόλο που τα νέα συστήματα προέρχονται από εξισορροπημένες δομές, η αλλαγή στον αριθμό των μορίων του νερού και των ιόντων προϋποθέτει την ανάγκη να ελαχιστοποιηθεί η ενέργεια για μία ακόμη φορά. Αφότου επιτευχθεί η ελαχιστοποίηση, πρέπει να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία στους 323.15 K και η πίεση στο 1 bar. Για τη θερμοκρασία η προσομοίωση τέθηκε για 300ps με και για την εξισορρόπηση της πίεσης έγιναν δύο διακριτά στάδια. Το πρώτο τέθηκε για 300 ps με τους αλγορίθμους v-rescale & Berendsen (θερμοκρασία και πίεση αντίστοιχα) και το δεύτερο στάδια τέθηκε για 1 ns με τους αλγορίθμους Nose-Hoover & Parrinello-Rahman (θερμοκρασία και πίεση αντίστοιχα). Τέλος τα συστήματα νανοσωματιδίων – λιπιδική διπλοστιβάδα προσομοιώνονται για 100 ns το καθένα

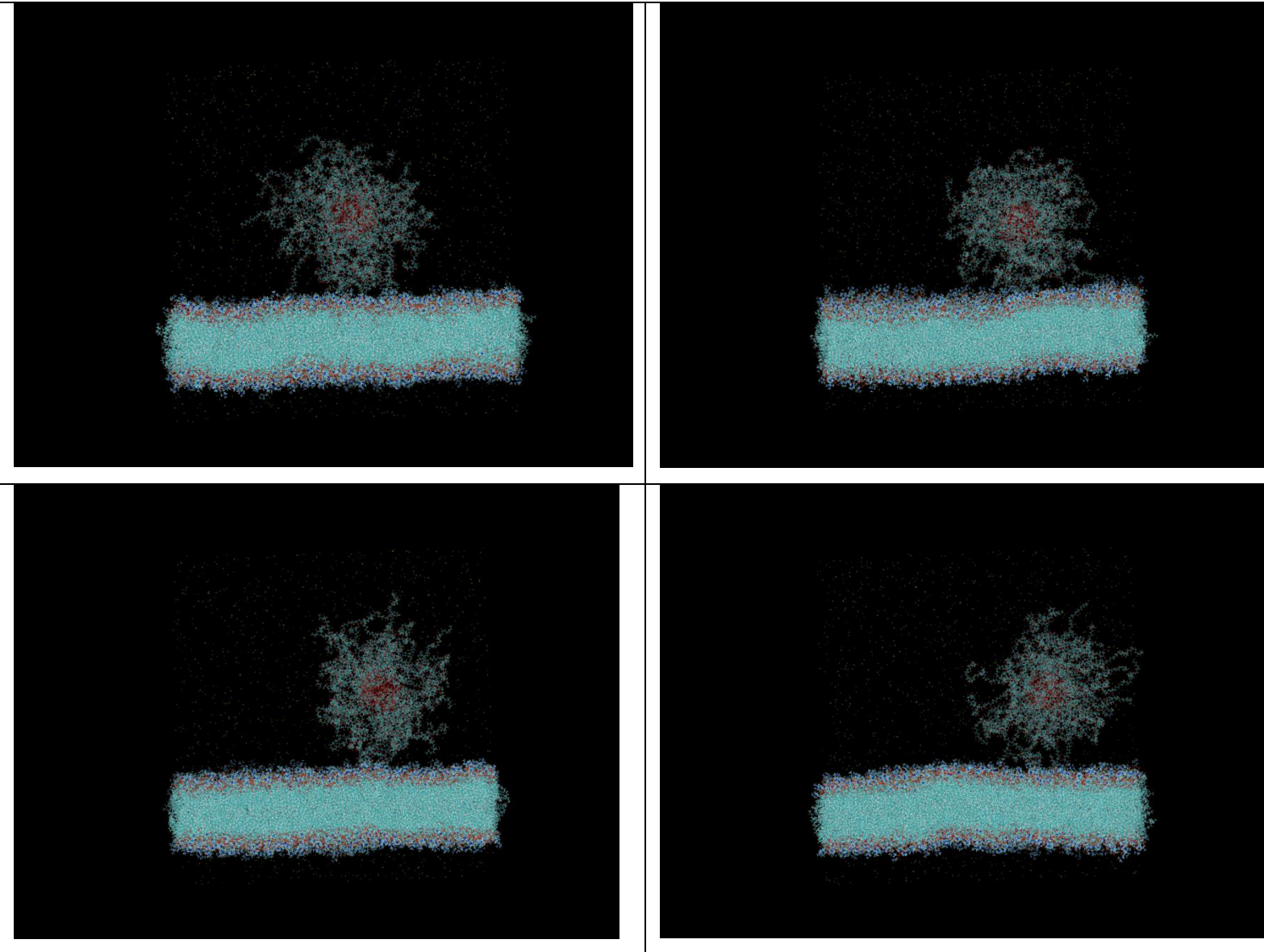
στον υπερυπολογιστή ARIS. Για το μαγνητίτη - PVA - διπλοστιβάδα η τελευταία προσομοίωση είχε διάρκεια 76 ώρες σε 1120 πυρήνες (112 επεξεργαστές Intel Xeon E5-2680v2 της οικογένειας Ivy Bridge) με απόδοση 31,58 ns/day. Για το σύστημα μαγνητίτη - ARA – διπλοστιβάδα η προσομοίωση είχε διάρκεια 82 ώρες στον ίδιο αριθμό πυρήνων και η απόδοση σημειώθηκε 28.87 ns/day. Παρακάτω παρουσιάζονται τα στιγμιότυπα από την προσομοίωση του «μαγνητίτη – πολυαραβικό οξύ» ξεκινώντας από την δομή που έρχεται από τη διαδικασία της εξισορρόπησης και συνεχίζοντας στα 20-40-60-80-100 ns αντίστοιχα.





Αντίστοιχα για το σύστημα «μαγνητίτης με πολύ (βίνυλο αλκοόλη)» από το πρώτο στιγμιότυπο και για τα επόμενα 20-40-60-80-100 ns παρουσιάζονται οι παρακάτω εικόνες.



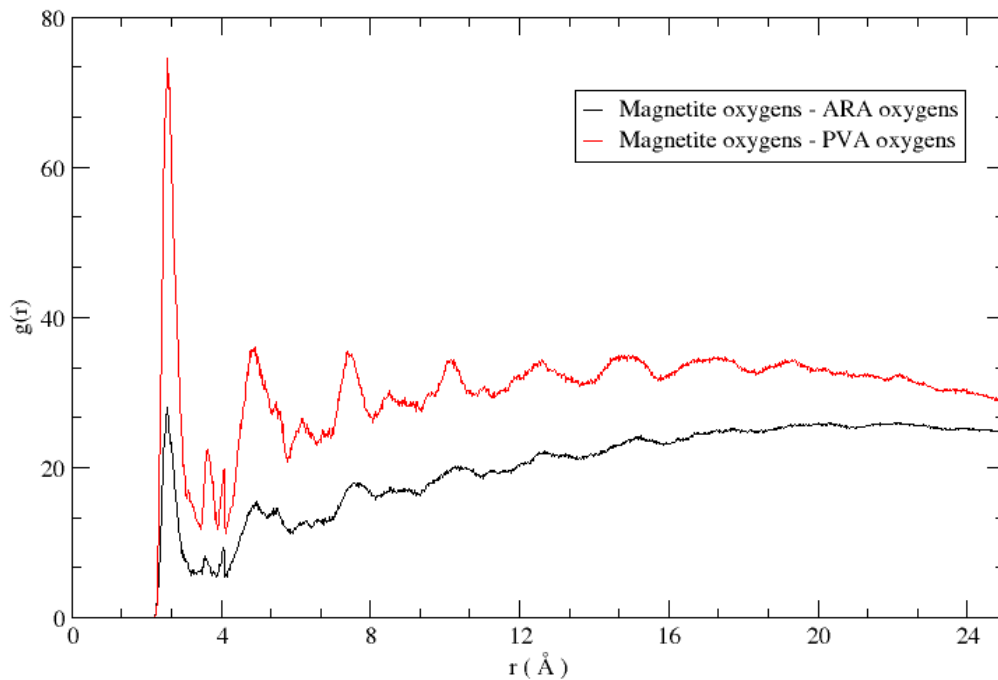


### 3.10 Ανάλυση προσομοιώσεων

Για την ανάλυση της τροχιάς μελετήθηκαν τα μεγέθη της μέσης τετραγωνικής μετατόπισης, της συνάρτησης ακτινικής κατανομής και της μέσης επιφάνειας ανά λιπιδική κεφαλή (area per lipid).

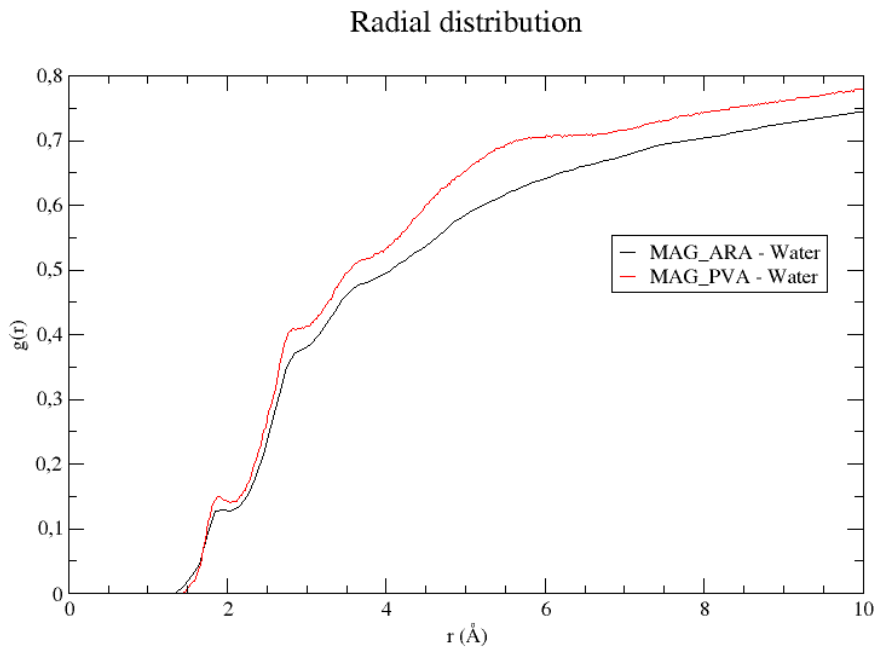


## Radial distribution



Εικόνα 47. Συνάρτηση ακτινικής κατανομής για τις ομάδες «οξυγόνα μαγνητίτη-οξυγόνα πολυαραβικού οξέως» και «οξυγόνα μαγνητίτη-οξυγόνα πολύ (βίνυλο αλκοόλης)».

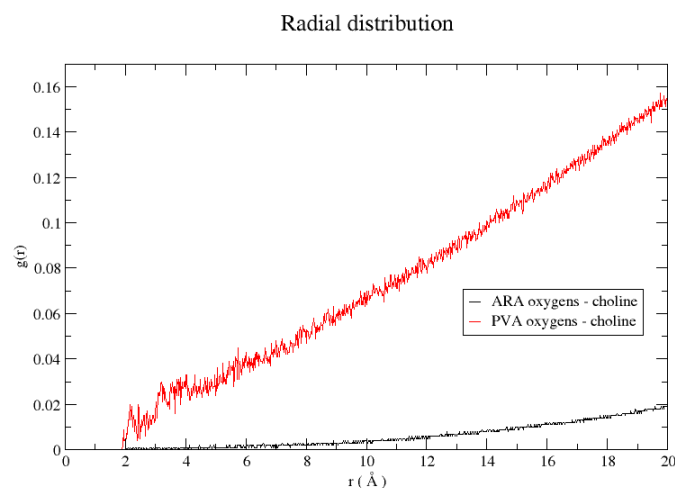
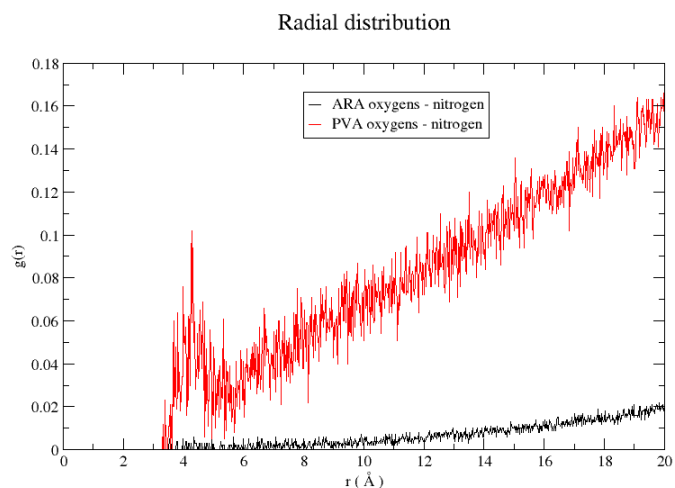
Ολοκληρώνοντας τις δύο καμπύλες και εντοπίζοντας το πρώτο ελάχιστό τους είναι δυνατό να υπολογισθεί ο αριθμός των οξυγόνων κάθε πλευρικής αλυσίδας που βρίσκεται στη σφαίρα συντονισμού στην απόσταση που εντοπίζεται το ελάχιστο. Στην παραπάνω περίπτωση το πρώτο ελάχιστο για τις καμπύλες εντοπίζεται στα 3.5 Å και μετά από την ολοκλήρωση υπολογίζονται ότι 1.5 οξυγόνα πολυαραβικού οξέως και 4 οξυγόνα πολύ (βίνυλο αλκοόλης) βρίσκονται σε αυτή την απόσταση από τα οξυγόνα του μαγνητίτη.



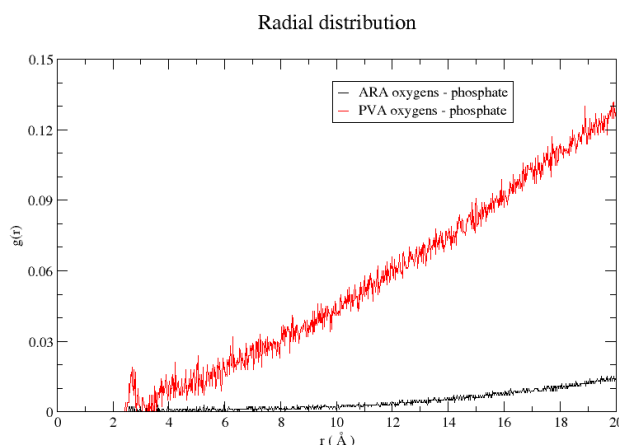
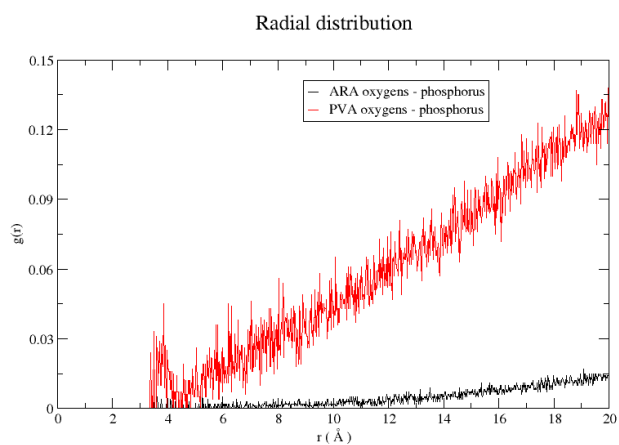
Εικόνα 48. Συνάρτηση ακτινικής κατανομής για τις ομάδες «μαγνητίτης με πολυαραβικό οξύ – νερό» και «μαγνητίτης με πολύ (βίνυλο αλκοόλη)-νερό»

Το ελάχιστο και για τις δύο καμπύλες εντοπίζεται στα 2.05 Å και ο αριθμός των μορίων των νερών σε αυτή την απόσταση από τα συστήματα MAG\_ARA και MAG\_PVA είναι 0.0502 και 0.0536 αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι το σύστημα «μαγνητίτης - πολύ (βίνυλο αλκοόλη)» επιδιαλυτώνεται ελαφρώς περισσότερο από την τάση της καμπύλης.

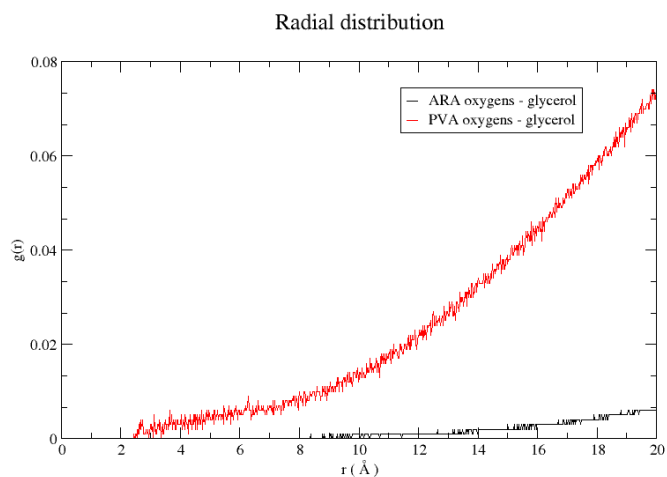




Εικόνα 49. Συνάρτηση ακτινικής κατανομής για τις ομάδες «οξυγόνα πολυαραβικού οξέως- άζωτα χολίνης» και «οξυγόνα πολύ (βίνυλο αλκοόλης)-άζωτα χολίνης» (αριστερά) και συνάρτηση ακτινικής κατανομής για τις ομάδες «οξυγόνα πολυαραβικού οξέως- ομάδες χολίνης» και «οξυγόνα πολύ (βίνυλο αλκοόλης)- ομάδες χολίνης» (δεξιά)



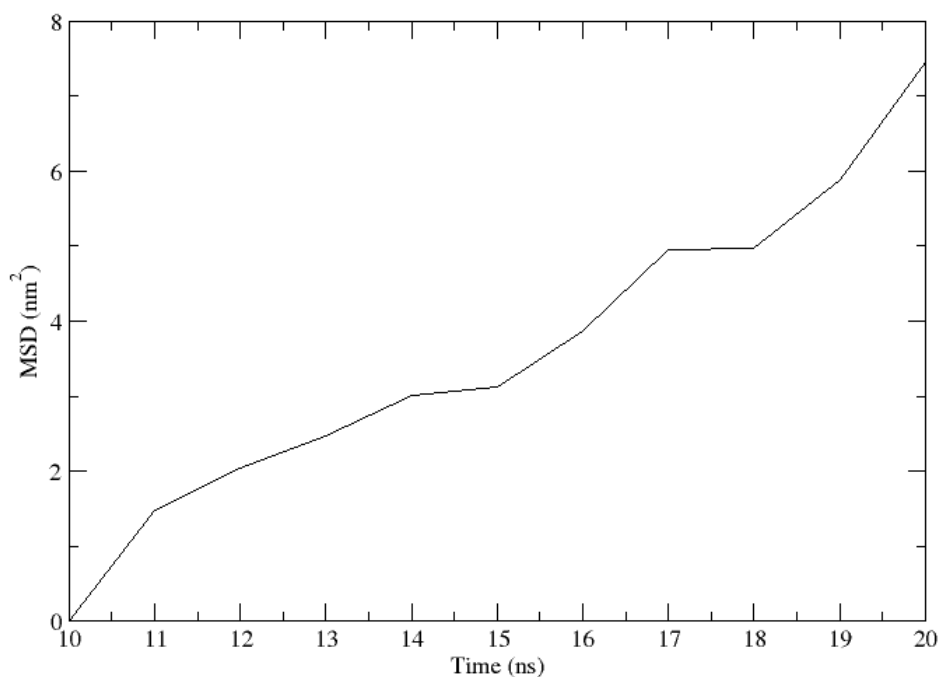
Εικόνα 50. Συνάρτηση ακτινικής κατανομής για τις ομάδες «οξυγόνα πολυαραβικού οξέως- φωσφόρος φωσφορικής ομάδας» και «οξυγόνα πολύ (βίνυλο αλκοόλης)-φωσφόρος φωσφορικής ομάδας» (αριστερά) και συνάρτηση ακτινικής κατανομής για τις ομάδες «οξυγόνα πολυαραβικού οξέως- φωσφορικές ομάδες» και «οξυγόνα πολύ (βίνυλο αλκοόλης)- φωσφορικές ομάδες» (δεξιά)



Εικόνα 51. Συνάρτηση ακτινικής κατανομής για τις ομάδες «οξυγόνα πολυαραβικού οξέως-γλυκερόλη» και «οξυγόνα πολύ (βίνυλο αλκοόλης)- γλυκερόλη»

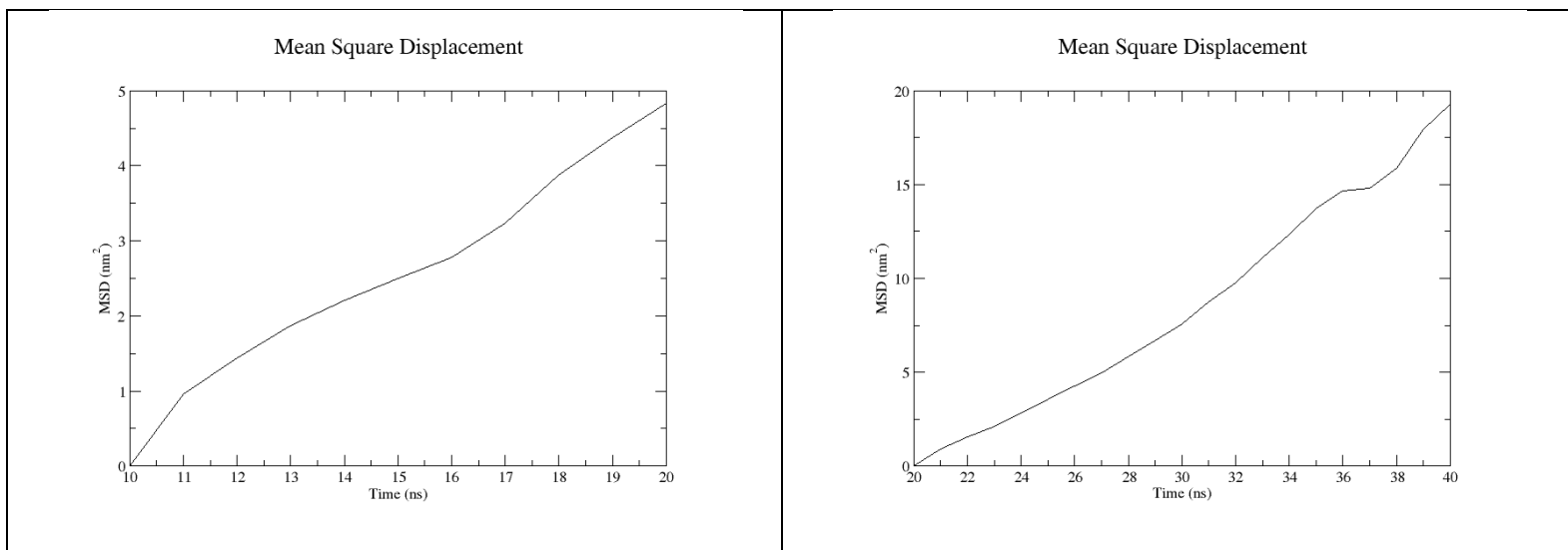
Για την τροχιά των 100 ns που λήφθηκε μετά την προσομοίωση γίνεται η μελέτη της μέσης τετραγωνικής μετατόπισης (Mean Squared Displacement). Για το σύστημα «μαγνητίτης - πολυ (βίνυλο αλκοόλη)» υπολογίζεται ο συντελεστής διαχύσεως από την κλίση της καμπύλης του γραμμικού τμήματος (10-20 ns) (Εικόνα XX??). Ο συντελεστής είναι  $D=0,094 \pm 0,0269 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

### Mean Square Displacement



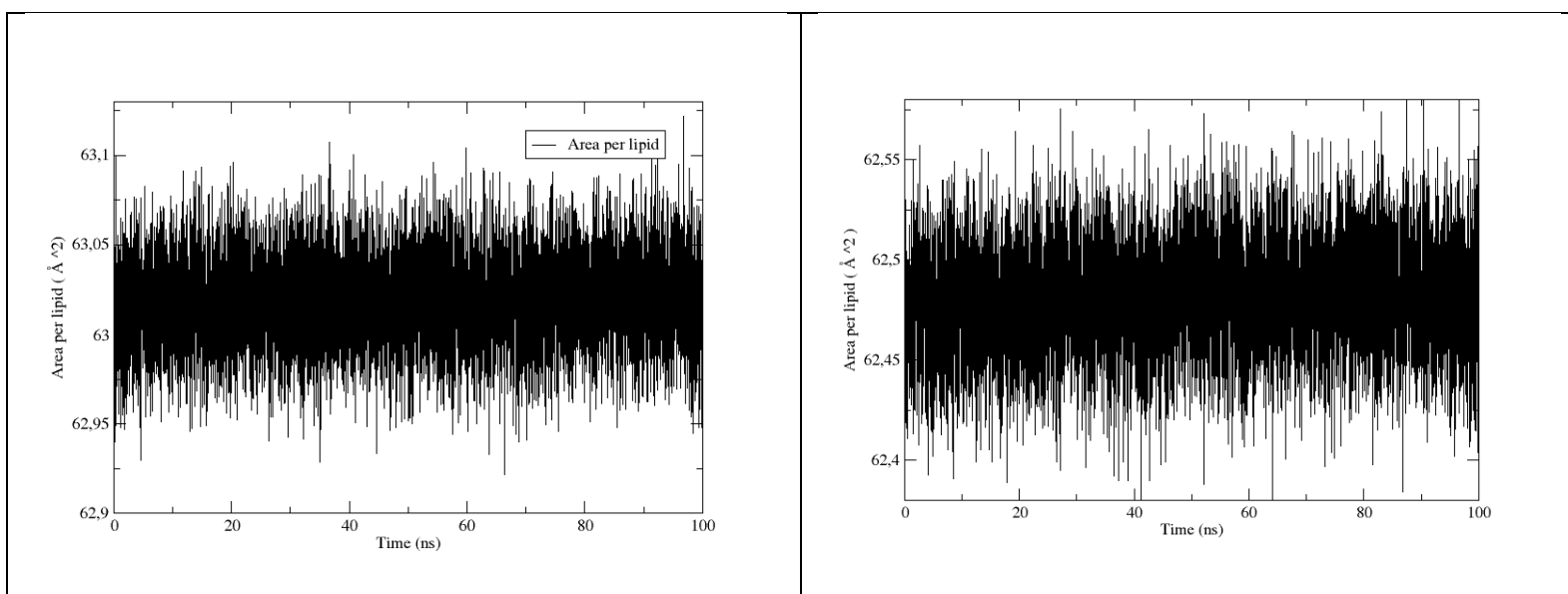
Εικόνα 52. Μέση τετραγωνική μετατόπιση για το σύστημα «μαγνητίτης - πολυ (βινυλο αλκοόλη)» μετά από γραμμική εφαρμογή στο τμήμα 10 έως 20 ns της αρχικής καμπύλης.

Για το σύστημα «μαγνητίτης - πολυαραβικό οξύ» παρατηρούνται δύο γραμμικά τμήματα στην καμπύλη του msd για τη συνολική τροχιά. Συνεπώς παρουσιάζονται δύο γραφήματα, καθένα για το γραμμικό τμήμα που αντιπροσωπεύει. Οι συντελεστές διαχύσεως που υπολογίζονται για τις δύο περιπτώσεις (10-20 ns και 20-40 ns) είναι  $D_{10-20} = 0.0675 \pm 0.0064 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  και  $D_{20-40} = 0.1577 \pm 0.0622 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ .



Εικόνα 53. Μέση τετραγωνική μετατόπιση για το σύστημα «μαγνητίτης - πολυαραβικό οξύ» για τα διαστήματα 10-20 ns και 20-40 ns.

Τέλος εξετάζεται και η σταθερότητα της λιπιδικής διπλοστιβάδας κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης 100 ns με τον υπολογισμό του μεγέθους μέσης επιφάνειας ανά λιπιδική κεφαλή (area per lipid). Για κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης πολλαπλασιάζονται οι διαστάσεις του κουτιού X\*Y και διαιρούνται με τον αριθμό των λιπιδικών κεφαλών ανά λιπιδικό φύλλο, στην περίπτωση μας  $1270/2=635$  λιπιδικές κεφαλές). Έτσι προκύπτουν τα παρακάτω διαγράμματα για τα δύο συστήματα υπό μελέτη.



Εικόνα 54. Μέση επιφάνεια ανά λιπιδική κεφαλή (area per lipid) για το σύστημα «μαγνητίτης - πολυαραβικό οξύ» (αριστερά) και για το σύστημα «μαγνητίτης - πολυ (βινυλο αλκοόλη)» (δεξιά).

Στην πρώτη περίπτωση η μέση τιμή υπολογίζεται  $63,019 \pm 0,025 \text{ \AA}^2$  και στη δεύτερη περίπτωση η μέση τιμή υπολογίζεται  $62,480 \pm 0,027 \text{ \AA}^2$  οι οποίες αναπαριστούν την πειραματική τιμή για διπλοστιβάδα DPPC που υπολογίσθηκε  $62.9 \pm 1,3 \text{ \AA}^2$ .

### 3.11 Σύγκριση με πειραματικά αποτελέσματα

Σύμφωνα με πειράματα των Patitsa et al. [1] σε συστήματα MAG-ARA και MAG-ARA-DOX (όπου DOX: δοξορουβικίνη) δείξαν ότι εμφανίζουν εξαιρετικές ιδιότητες εισχώρησης στο κύτταρο, εξαιρετική βιοσυμβατότητα και ελάχιστη, αν όχι καθόλου κυττοτοξικότητα. Καταλήγουν στο ότι η επικάλυψη του μαγνητίτη με πολυαραβικό οξύ είναι μία επιθυμητή επικάλυψη για νανοσωματίδια στη μεταφορά φαρμάκων καθώς και για διαγνωστικές εφαρμογές και τέλος ότι το ολικό σύστημα είναι ένας ικανός και πολύ αποδοτικός μεταφορέας φαρμάκων.

## Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα-Συζήτηση

Από την ανάλυση των τροχιών των προσομοιώσεων συμπεραίνουμε ότι ο υπολογιστικός χρόνος δεν είναι αρκετός για να παρατηρηθεί η προσάρτηση των νανοσωματιδίων στη διπλοστιβάδα και η οποιαδήποτε τάση τους να ενσωματωθούν στη στιβάδα. Παρόλα αυτά τα συστήματα δείχνουν προοπτικές να πετύχουν τα παραπάνω και κατά συνέπεια να είναι ικανοί μεταφορείς φαρμάκων.

## Κεφάλαιο 5: Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Επειδή ο χρόνος προσομοίωσης δεν ήταν αρκετός για να παρατηρηθούν οι αλληλεπιδράσεις και η τάση για ενσωμάτωση του νανοσωματιδίου στη διπλοστιβάδα προτείνεται η επέκταση των προσομοιώσεων των δύο συστημάτων για τουλάχιστον επιπλέον 200 ns και η επανεξέταση των τροχιών τους.

## Βιβλιογραφία

1. World Health Organization (2011) Cancer. Fact Sheet #297
2. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ (2009) Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136:823–837
3. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70
4. Park JH, von Maltzahn G, Xu MJ et al (2010) Cooperative nanomaterial system to sensitize, target, and treat tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:981–986
5. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ (2007) The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 3:20–31
6. Sahoo SK, Labhasetwar V (2003) Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today* 8:1112–1120
7. Shaffer C (2005) Nanomedicine transforms drug delivery. *Drug Discov Today* 10:1581–1582
8. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC (2005) Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J* 19:311–330
9. Davis ME, Chen ZG, Shin DM (2008) Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 7:771–782

10. Allen TM, Cullis PR (2004) Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303:1818–1822
11. Bae KH, Chung HJ, Park TG (2011) Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Mol Cells* 31:295–302
12. Panyam J, Labhasetwar V (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 55:329–347
13. Kohandel M, Kardar M, Milosevic M, Sivaloganathan S (2007) Dynamics of tumor growth and combination of anti-angiogenic and cytotoxic therapies. *Phys Med Biol* 52:3665–3677
14. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC (2008) Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 5:505–515
15. Kazuo M (2011) Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev* 63:161–169
16. Owens DE 3rd, Peppas NA (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 307:93–102
17. Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD et al (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11613–11618
18. Gupta AK, Gupta M (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26:3995–4021
19. Mirkovic B, Lah Turnsek T, Kos J (2010) Nanotechnology in the treatment of cancer. *Zdrav Vestn* 79:146–155
20. Alexiou C, Jurgons R (2007) Magnetic drug targeting. In: Andra<sup>sc</sup> W, Nowak H (eds) *Magnetism in medicine: a handbook*, 2nd edn. Wiley-VCH, Berlin, pp 596–605
21. Leszczynski D (2005) Rapporteur report: cellular, animal and epidemiological studies of the effects of static magnetic fields relevant to human health. *Prog Biophys Mol Biol* 87:247– 253
22. Huth S, Lausier J, Gersting SW et al (2004) Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* 6:923–936
23. Jahnke A, Hirschberger J, Fischer C et al (2007) Intra-tumoral gene delivery of feIL-2, feIFN-gamma and feGM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas: a phase-I study. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54:599–60

24. Kim JS, Yoon TJ, Yu KN et al (2006) Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J Vet Med Sci* 7:321–326
25. Krotz F, de Wit C, Sohn HY et al (2003) Magnetofection—a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. *J Vasc Res* 7:700–710
26. Mykhaylyk O, Sanchez-Antequera Y, Vlaskou D et al (2007) Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat Protoc* 2:2391–2411
27. Mykhaylyk O, Zelphati O, Hammerschmid E et al (2009) Recent advances in magnetofection and its potential to deliver siRNA in vitro. *Methods Mol Biol* 487:111–146
28. Plank C, Scherer F, Schillinger U et al (2003) Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J Liposome Res* 13:29–32
29. Scherer F, Anton M, Schillinger U et al (2002) Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 9:102–109
30. Prabha S, Zhou WZ, Panyam J et al (2002) Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm* 244:105–115
31. Zauner W, Farrow NA, Haines AMR (2001) In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J Control Release* 71:39–51
32. McBain SC, Yiu HP, Dobson J (2008) Magnetic nanoparticles for genes and drug delivery, *International Journal of Nanomedicine*3(2): 169-180
33. S. Bucak, B. Yavuztürk, and A. D. Sezer (2012) Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Surface Modifications and Application in Drug Delivery, *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, edited by Ali Demir Sezer, InTech Chap. 7, p. 165.
34. K. K. Jain (2010) *BMC Med.* 8, 83.
35. A. Singh, F. Dinawaz, S. Mewar, U. Sharma, N. R. Jagannathan, and S. K. Sahoo (2011) *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3, 842.
36. R. Mejias, S. Perez-Yaguee, L. Gutierrez, L. I. Cabrera, R. Spada, P. Acedo, C. J. Serna, F. J. Lazaro, A. Villanueva, M. D. P. Morales, and D. F. Barber (2011) *Biomaterials* 32, 2938.



37. C. Sanson, O. Diou, J. Thevenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Brulet, S. Miraux, E. Thiaudiere, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre, and S. Lecommandoux (2011) *ACS Nano* 5, 1122.
38. X. Yang, H. Hong, J. J. Grailer, I. J. Rowland, A. Javadi, S. A. Hurley, Y. Xiao, Y. Yang, Y. Zhang, R. Nickles, W. Cai, D. A. Steeber, and S. Gong (2011) *Biomaterials* 32, 4151.
39. K. Widder, A. Senyei, and D. Scarpelli, (1978) *P. Soc. Exp. Bio. Med.* 158, 141.
40. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer (2007) *Nat. Nanotechnol.* 2, 751.
41. T. Jones and N. Saba (2011) *Pharmaceutics* 3, 171.
42. C. J. Cheng and W. M. Saltzman (2012) *Nat. Nanotechnol.* 7, 346.
43. L. Basile, R. Pignatello, and C. Passirani (2012) *Current Drug Delivery* 9, 255.
44. K. Bourzac (2011) *Nature* 491, 558
45. B. Koppolu, Z. Bhavsar, A. S. Wadajkar, S. Nattama, M. Rahimi, F. Nwariaku, and K. T. Nguyen (2012) *J. Biomed. Nanotechnol.* 8, 983.
46. S. Yu, G. Wu, X. Gu, J. Wang, Y. Wang, H. Gao, and J. Ma (2013) *Colloids Surf., B Biointerfaces* 103, 15.
47. G. Mikhaylov, U. Mikac, A. A. Magaeva, V. I. Itin, E. P. Naiden, I. Psakhye, L. Babes, T. Reinheckel, C. Peters, R. Zeiser, M. Bogyo, V. Turk, S. G. Psakhye, B. Turk, and O. Vasiljeva (2011) *Nat. Nanotechnol.* 6, 594.
48. M. Li, H. S. Kim, L. Tian, M. K. Yu, S. Jon, and W. K. Moon, (2012) *Theranostics* 2, 76.
49. E. K. Schlachter, H. R. Widmer, A. Bregy, T. Loennfors-Weitzel, I. Vajtai, N. Corazza, V. J. P. Bernau, T. Weitzel, P. Mordasini, J. Slotboom, G. Herrmann, S. Bogni, H. Hofmann, M. Frenz, and M. Reinert, (2011) *Int. J. Nanomed.* 6, 1793.
50. J. J. Lai, J. M. Hoffman, M. Ebara, A. S. Hoffman, C. Estournes, A. Wattiaux, and P. S. Stayton, (2007) *Langmuir* 23, 7385.
51. T. Liu, S. Hu, K. Liu, D. Liu, and S. Chen, (2008) *J. Control Release* 126, 228.
52. D. Muller-Schulte and T. Schmitz-Rode, (2006) *J. Magn. Magn. Mater.* 302, 267.
53. M. Rahimi, M. Yousef, Y. Cheng, E. I. Meletis, R. C. Eberhart, and K. Nguyen, (2009) *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 4128.
54. A. Gupta and A. Curtis, (2004) *J. Mater. Sci-Mater. M* 15, 493.

55. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC (2010) Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev* 62:28–41
- 56 S.E. Song, et al., (2015) *Cancer Imaging* 15 (1)
- 57 G.M. Thurber, et al., (2010) *J. Surg. Oncol.* 102 (7) 758.
- 58 R. Hao, et al., (2010) *Adv. Mater.* 22 (25) 2729.
- 59 H. Maeda, et al.,(2000) *J. Control. Release* 65 (1–2) 271.
- 60 P.A. Chiarelli, et al., (2015) *Surg. Neurol. Int.* 6 (Suppl. 1) S45.
- 61 D. Peer, et al., (2007) *Nat. Nanotechnol.* 2 (12) 751.
- 62 G. Subbiahdoss, et al., (2012) *Acta Biomater.* 8 (6) 2047.
- 63 M.D. Anderson Cancer Center, (2015) Ferumoxytol – Iron Oxide Nanoparticle Magnetic Resonance Dynamic Contrast Enhanced MRI, National Library of Medicine, USA, Bethesda, MD
- 64 Massachusetts General Hospital, (2013) Pre-Operative Nodal Staging of Thyroid Cancer Using Ultra-Small Superparamagnetic Iron Oxide Magnetic Resonance Imaging (USPIO MRI): Preliminary Study, National Library of Medicine, USA, Bethesda, MD
- 65 M.D. Anderson Cancer Center, (2015) USPIO Magnetic Resonance Imaging (MRI), National Library of Medicine, USA, Bethesda, MD
- 66 OHSU Knight Cancer Institute, (2014) Imaging Vascular Properties of Pediatric Brain Tumors Using Ferumoxytol and Gadolinium in a Single Imaging Session, National Library of Medicine, USA, Bethesda, MD
67. Neuberger, T., et al., (2005) *J. Magn. Mater.* 293, 483
68. Cooper GM, (2000) *The cell*, 2<sup>nd</sup> edition, Boston University, Sunderland (MA):Sinauser Associates.
69. Park, S. I., et al., *J. Magn. Mater.* (2006) 304, e406
- 70 S. Laurent, et al. (2014) *Exp. Opin. Drug Del.* 11 (9) 1449.
71. Dauqan E. , Abdullah A. (2013) Utilization of gum arabic for industries and human health, *American Journal of Applied Sciences* 10 (10): 1270-1279
72. *The Art of Molecular Dynamics Simulation* - D.C. Rapaport
73. *Understanding Molecular Simulation* - D. Frenkel, B. Smit
74. *Molecular Modelling* - A.R. Leach
75. *Introduction To Modern Statistical Mechanics* - D. Chandler

76. Hans C. Andersen (1980) Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature, *J. Chem. Phys.* 72(4), 15 Febr. 1980
77. Ewald P.P. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale, *Ann. Phys.* 1921
78. Darden T. , et al. (1993) Particle mesh Ewald: An  $N\log(N)$  method for Ewald sums in large systems
79. Verlet L. (1967) Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules, *Physical Review* 1967
80. Berendsen H.J.C. , et al. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (8), 15 October 1984
81. Parrinello M. , et al. (1980) Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study, *Phys. Rev. Lett.* 1980
82. Nosé, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* 52:255–268, 1984
83. Hoover, W. G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* 31:1695–1697, 1985
84. Bussi, G., Donadio, D., Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126:014101, 2007.
85. Gromacs Manual
86. Για τις μονάδες των μεγεθών που αναφέρονται βλ. Gromacs-5.1.4 Manual σελ. 140
87. Wang H., Loganathan D., Linhardt R.J., Determination of the pKa of glucuronic acid and the carboxy groups of heparin by  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy, *Biochem. J.* (1991) 278, 689-695
88. Deutsch C., Taylor J.S., Wilson D.F., Regulation of intracellular pH by human peripheral blood lymphocytes as measured by  $^{19}\text{F}$ -NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 79, pp. 7944-7948, December 1982
89. Guvench O., Hatcher E., Venable R. M., Pastor R.W., MacKerell A.D., CHARMM Additive All-Atom Force Field for Glycosidic Linkages between Hexopyranoses, *J. Chem. Theory Comput.* 2009, 5, 2353-2370

90. Jo S, Kim T, Im W (2007) Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. PLoS ONE 2(9): e880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000880>
91. Nagle JF, Tristram-Nagle S (2000) Structure of lipid bilayers. Biochim Biophys Acta 1469: 159–195. JF Nagle S. Tristram-Nagle 2000 Structure of lipid bilayers. Biochim Biophys Acta 1469 159 195
92. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, et al. (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. J Comp Chem 4: 187–217. BR Brooks RE Bruccoleri BD Olafson DJ States S. Swaminathan 1983 CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. J Comp Chem 4 187 217