



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА ФИЗИКОХИМИЯ



ИЗСЛЕДВАНЕ ПРОНИКВАНЕТО НА ПЕПТИД-ЛЕКАРСТВЕН КОМПЛЕКС ПРЕЗ МОДЕЛНИ КЛЕТЪЧНИ МЕМБРАНИ

Николета Георгиева Иванова

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „доктор“
по професионално направление 4.2 – Химически науки (Теоретична химия)

Научен ръководител: доц. д-р Анела Иванова

СОФИЯ, 2017

Дисертационната работа е обсъдена и насочена за защита от катедрен съвет на Катедра Физикохимия на Факултета по химия и фармация на Софийския университет „Св. Климент Охридски“ проведен на 13. 07. 2017 г.

Дисертационната работа съдържа 138 страници, 56 фигури, 49 уравнения и 6 таблици в 8 глави, заключение, приноси и литература. Библиографията обхваща 249 заглавия.

Получаването и разпространението на част от резултатите е финансирано от проекти № 80.10-112/2017 г. на НИС-СУ и № ДН 09/14 от 16. 12. 2016 г. на Фонд „Научни изследвания“. Достъп до суперкомпютъра „Авитохол“ е осигурен от Център за Иновативни Пресмятания и Обработка на Данни в ИИКТ-БАН

Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата отговаря на тази в дисертацията. Литературните източници са преномерирани.

Съдържание

1.	Увод.....	1
2.	Литературен обзор.....	2
2.2	Пептиди, преминаващи клетъчната мембрана, и доксорубини.....	3
2.3	Състав и свойства на еритроцитната мембрана.....	4
2.3.1	Фосфолипиден състав на клетъчните (еритроцитните) мембрани.....	5
2.3.2	Фазови състояния на мембраните.....	6
3.	Изчислителни методи – теоретични основи.....	7
4.	Атомистични молекулно-динамични модели.....	7
4.2	Изчислителен протокол.....	10
5.	Влияние на метода за скалиране на налягането.....	11
5.1	Профили на плътността.....	12
5.2	Зарядова плътност и електростатичен потенциал.....	14
5.3	Параметър на порядък.....	16
5.4	Площ за липид.....	18
5.5	Латерален дифузионен коефициент.....	20
5.6	Радиално-разпределителни функции.....	21
5.7	Структурни параметри на DOX-CPP.....	24
5.7.1	Карти на Ramachandran за пептидната верига.....	24
5.7.2	Наклон на DOX спрямо нормалата.....	24
6.	Влияние на периодичните гранични условия.....	27
6.1	Профили на плътността.....	27
6.2	Зарядова плътност и електростатичен потенциал.....	29
6.3	Параметър на порядък.....	30
6.4	Площ за липид.....	32
6.5	Латерален дифузионен коефициент.....	32
6.7	Структурни параметри на DOX-CPP.....	34
6.7.1	Карти на Ramachandran за пептидната верига.....	34
6.7.2	Наклон на DOX спрямо нормалата.....	34

7.	Umbrella sampling симулации	37
7.1	Модели и pulling процедура	37
7.2	Анализ на PMF профили.....	40
8.	Проникване на DOX-CPP	41
8.1.	Моделна система	42
8.2	Общ анализ	42
9.	Заключение.....	47
10.	Приноси.....	49
11.	Литература	50

1. Увод

Акцентът в настоящата разработка е върху изследване на процеса на преминаването на пептид-лекарствен комплекс през моделна клетъчна мембрана с помощта на молекулно моделиране на атомистично ниво. Използвани са молекулно-динамични симулации базирани на класическо молекулно-механично силово поле. Отчетено е експлицитно и влиянието на водната среда. Оценени са ключови параметри на взаимодействието на комплекса с липидни молекули от мембраната, изследвана е енергетиката на процеса на преминаване и са дадени насоки за механизма му на молекулно ниво. Получените резултати спомагат за подбор на адекватен състав на такива модели и на изчислителни параметри и условия, за да се получи коректна представа за механизма на транспортния процес. Познаването на начина на пренос на лекарството и на факторите, които влияят на преминаването през мембраната, позволява осъществяване на фина настройка на молекулния преносител насочена към подобряване ефективността на доставка.

Цели:

1. Да се съставят реалистични модели на клетъчните мембрани в условия близки до физиологичните.
2. Да се определят оптимални изчислителни параметри на молекулно-динамични симулации за описание на преминаването на пептид-лекарствен комплекс през липиден бислой, с които да се възпроизведат известни експериментални факти.
3. Да се оценят енергетичните бариери, които комплексът трябва да преодолее, за да премине през липидния бислой.
4. Посредством атомистични молекулно-динамични симулации да се даде информация за механизма на проникване на пептид-лекарствен комплекс през клетъчната мембрана; да се оцени характеристичен времеви интервал на процеса, който трудно може да се определи експериментално.

2. Литературен обзор

Мембранен транспорт или транспорт на вещества през биомембрани се наричат процеси свързани с преминаването на малки молекули или йони през клетъчните мембрани. Цялата жизнена дейност на клетката се дължи на мембранный транспорт, поради което той има огромно значение за живите организми. Благодарение на него се осъществява регулацията в обема на клетката, поддържането на йонния баланс, изхвърлянето на токсични вещества и преобразуването на енергията. Увреждането на мембраните води до патологични състояния заради нарушената проницаемост и транспорт.

Процесите на пренос без участие на липидната част от мембраната спадат към директния транспорт. Той е характерен и за други затворени системи в клетката като ядро, митохондрии, лизозоми и т.н. При него по различни механизми се осъществява директното преминаване на вещества през клетъчната мембрана, без да се променя нейната структура или да се нарушава трайно нейната цялост. Най-често преминаването става чрез дифузия.

Ако частицата прониква непосредствено през мембраната дифузията се нарича „свободна“. При наличие на някакъв вид преграда тя е „несвободна“. Освен това дифузията може да бъде „проста“ или „облекчена“ в зависимост от това дали частицата се движи самостоятелно или с помощта на друга частица-преносител, като двете подсистеми образуват комплекс.

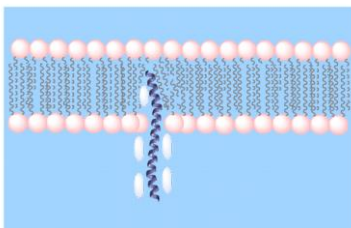
При преноса на активни вещества, но под действие на градиент на електричния потенциал, породеното електрично поле с интензитет E действа със сила f на заредените частици. Такъв тип транспорт се нарича електрогенен.

И двата типа проста дифузия – „свободна“ и „несвободна“ – са сравнително бавни процеси. За сметка на това „облекчената“ дифузия е доста по-бърза. Има два типа преносители: подвижни и неподвижни. При подвижните пренасяното вещество се свързва в комплекс с молекулата на преносителя и дифундира през мембраната. Кинетиката на процеса е подобна на тази на ензимна реакция, като преносителят играе ролята на субстрата. В биологичните мембрани все още не е открит естествен транспорт с подвижни преносители, но това е обещаваща стратегия при създаването на синтетични системи за доставка

на лекарства. Особено перспективни са транспортерите на основата на биосъвместими молекули като например пептидите.

2.2 Пептиди, преминаващи през клетъчната мембрана, и доксорубин

Някои къси пептиди могат да преминават през цитоплазмената мембрана, това са т.нар. пептиди преминаващи през клетъчната мембрана (cell-penetrating peptides, CPPs) (Фигура 7). Пренасяните молекулни „товари“ се свързват с пептидите чрез ковалентни връзки или чрез нековалентни взаимодействия.^[1]

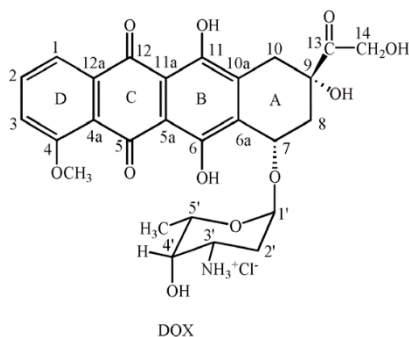


Фигура 7: Схема на проникване на комплекс CPP-лекарство през клетъчна мембрана.

Във връзка с предходни изследвания за транспорт на химиотерапевтици внимателно са разгледани начините за свързване на химиотерапевтици към CPP.^[2] По-подробно ще се опишат възможностите на транспортни системи с CPP за пренос на определен представител от антрациклиновите антибиотици – доксорубин (DOX) (Фигура 8). Той е химиотерапевтик активен към широк набор от туморни образувания, но прилагането му е съпроводено с тежки нежелани странични ефекти: главно цитотоксичност към недиференцирани клетки, кардиотоксичност и миелосупресия, гадене и повръщане.

Насоченият транспорт и доставката на лекарството в засегнатите клетки биха намалили драстично проявата на тези нежелани странични ефекти. За целта са разработени редица системи улесняващи преноса на активната съставка.^[3,4] Съществуват три основни теории за механизма на транслокация на CPPs: директно проникване в мембраната, ендоцитоза-медирано преминаване; транслокация чрез формирането на преходна структура.

Експериментално са изследвани два вида CPP свързани с доксорубин.^[5] Те се различават по заряд и вторична структура. Клетъчното поглъщане и степента на токсичност са установени с тестове върху MCF-7 и HT-29 ракови клетъчни линии, като е показано, че и двата типа CPP могат ефективно да транспортират доксорубин през клетъчната мембрана. Открити са и няколко предимства в сравнение със свободното лекарство. Намалена е токсичността му и могат да служат като прототипен тумор-насочващ вектор *in vivo*. Тези комплекси могат да бъдат включени в липозоми или наночастици, които ще помогнат за бързото изчистване на всички CPP от организма.



Фигура 8: Структурна формула на антрациклиновия антибиотик доксорубин.

Предимство на CPPs за носители на терапевтици е липсата на токсичност в сравнение с други системи за пренос като липозоми, полимери и други. Сериозна пречка при употребата им е провокирането на имунен отговор, но това може да се реши чрез модифициране на молекулите с различни видове лиганди разпознаваеми за съответния тип рецептори. Молекулната динамика може да се прилага успешно за изследване на проблеми свързани със структурата и механизмите на проникване на CPP в клетъчните мембрани.

2.3 Състав и свойства на еритроцитната мембрана

Еритроцитната мембрана често се използва при теоретични^[6] и експериментални^[7] изследвания на свойствата на различни биомембрани по няколко причини. В сравнение с мембраните на другите клетки тя е лесно

достъпна и има сравнително прост строеж. Еритроцитните клетки притежават само една (плазмена) мембрана и нямат други клетъчни органели. Модел на такава мембрана е използван и в работата. Затова по-долу са обобщени основните характеристики на човешките еритроцитни мембрани, които следва да бъдат взети предвид при изграждането на моделите.

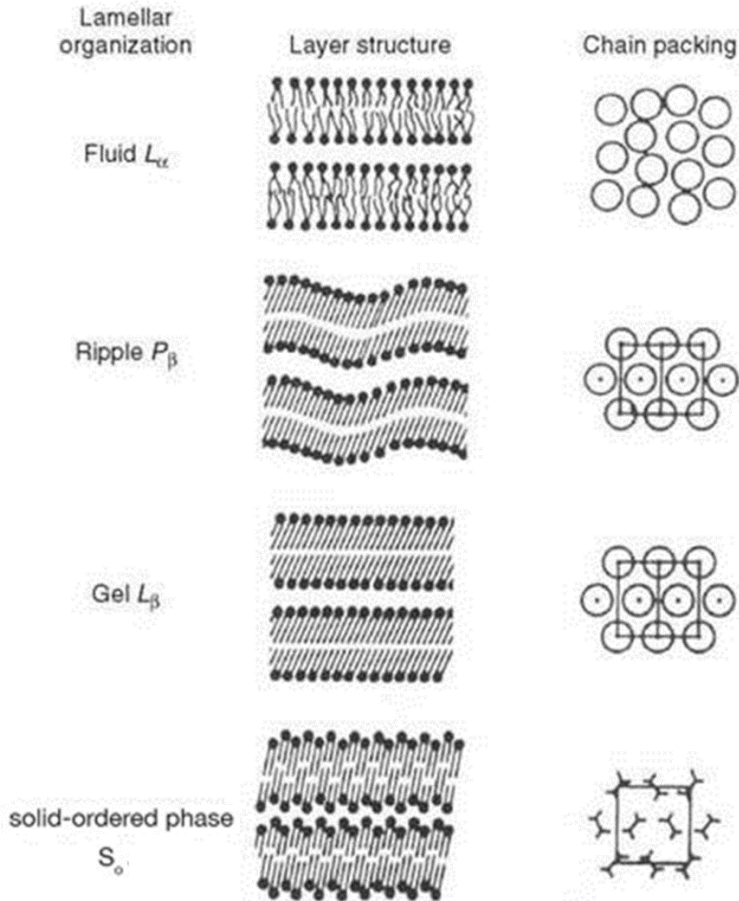
2.3.1 Фосфолипиден състав на клетъчните (еритроцитните) мембрани

Еритроцитната мембрана е изградена от 50 % липиди и 50 % протеини.^[8] В нея, чрез електрофореза, с носител полиакриламиден гел в присъствие на натриев додещилсулфат, са установени периферни и интегрални белтъци. Периферните белтъци се намират от вътрешната страна на клетката, почти в цитозола. Към тях спада спектринът, който изгражда 20 % от масата на еритроцитната мембрана. На него се дължи механичната стабилност и еластичност на клетката. Интегралните белтъци от своя страна са вградени сред липидните молекули в клетъчната мембрана. Техен представител е гликопротеинът гликофорин. Той е с добре изучена структура и топография, но функциите му в мембраната не са напълно изяснени.

За целите на настоящото изследване от значение е фосфолипидният състав на еритроцитната мембрана и поради тази причина той е разгледан по-подробно. Експериментално е показано, че човешката клетъчна мембрана съдържа следните типове фосфолипиди: фосфатидилхолини (PC),^[9] фосфатидилетаноламини (PE),^[10] фосфатидилсерин (PS),^[11] и сфингомиелин (SM).^[12] Един пети тип фосфолипид, фосфатидилинозитол (PI)^[13], също е локализиран в мембраната. Въпреки че количеството му е почти незначително спрямо другите мембранни компоненти, той играе важна роля в клетъчната сигнализация.^[14] Virtanen и съавтори^[15] предоставят подробно описание на липидния състав на човешка еритроцитна мембрана и показват, че хексагоналното подреждане на липидите е за предпочитане. Механичните и функционалните характеристики на клетъчните мембрани се определят от съотношението на тези основни типове липиди. За еритроцитната мембрана е установен следният липиден състав: 19 % PC; 16 % PE; 11 % PS; 9 % SM; 6 % други липиди и 40 % холестерол.^[16]

2.3.2 Фазови състояния на мембраните

В зависимост от подредбата на опашките липидните молекули в бислоя може да се намират в три основни фазови състояния: твърдо-кристално (solid-ordered S_0), течно-кристално (L_β) или течно (liquid disordered L_D).



Фигура 11: Класификация на фазовите състояния: означение на фазата (ляво), разположение на липидите в бислоя (срещу) и опаковка на молекулите (дясно) за всяка фаза.^[17]

Прието е течно-кристалното състояние при мембраните да се нарича гел. Впоследствие са открити нови фазови състояния характерни само и единствено за мембраните и моделните им липидни бислоеве. Те се реализират в смес от три или повече липида при различна дължина на опашките и различен състав на главите. Тези фазови състояния определят характерната вълнообразна форма на мембраните и различна площ на молекула в бислоя, като при всички се запазва плътната хексагонална опаковка, това е т. нар. ripple състояние P_{β} . На Фигура 11 са показани възможните фазови състояния и положението на липидите в бислоя при тях.

3. Изчислителни методи – теоретични основи

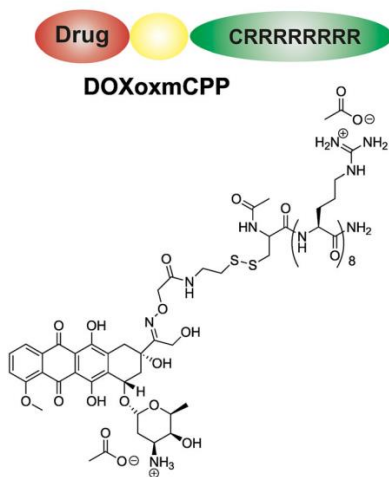
В дисертацията са разгледани основните числени методи използвани за получаването на реалистично описание на клетъчните мембрани чрез молекулно моделиране. Подробно са представени свойствата оценени с цел количествено охарактеризиране на поведението на липидните молекули и на пептид-лекарствения комплекс. Обобщени са параметрите на изчислителните процедури, чието влияние върху поведението на бислоеве е проследено в рамките на работата по дисертацията. Също така са показани статистическите подходи приложени за анализ на моделните системи.

4. Атомистични молекулно-динамични модели

Не е напълно изяснен механизмът на преминаване на CPP през клетъчните мембрани както и механизмът и скоростта на проникване на техни комплекси с лекарства. Поради тези причини е удачно да се направи модел на клетъчна мембрана и с методите на молекулната динамика да се проследи взаимодействието ѝ с комплекс DOX-CPP (Фигура 23).

За да се разбере връзката между структура и активност на този препарат по-рано са направени атомистични молекулно-динамични симулации. Подробно е описано поведението на комплекса във воден разтвор при стайна и телесна температура.^[18] В рамките на настоящата дисертация изследването е разширено,

като е изследвано взаимодействието на комплекса DOX-CPP с моделна клетъчна мембрана представена чрез липиден бислой.

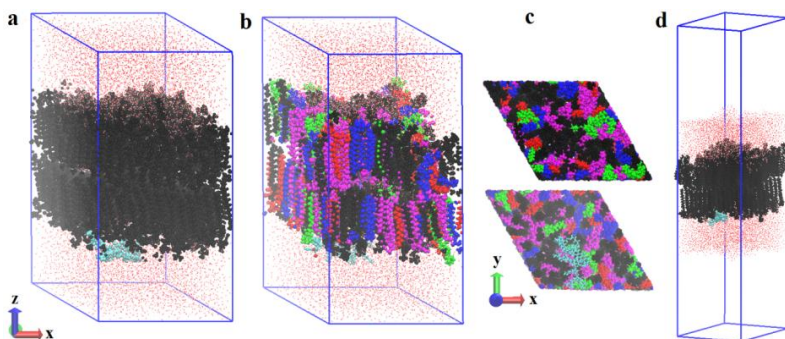


Фигура 23: Структурна формула на DOX-CPP моделна система за лекарствен пренос през клетъчната мембрана.^[19]

Построени са два типа модели на бислоеве от 162 липида (по 81 липида във всеки монослой) в хексагонални периодични условия.

Първият е съставен само от *DPPC* (Фигура 24a) и е получен от монослой. Хидрофилните глави на липидите са солватирани с 7845 молекули вода. Установено е в литературата, че площта на една опашка в гел състояние, без да се отчита площта на главата и привличането от другата опашка, е 0.21 nm^2 .^[20] Наличието на липидна глава и хидрофобно привличане ще намали тази площ. От геометрични съображения в смесени системи с холестерол е предложена 0.40 nm^2 средна площ за липид.^[21] При $35 \text{ }^\circ\text{C}$ и повърхностно налягане 30 mN/m е измерена площ 0.45 nm^2 . В човешкия организъм температурата е $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и при тази стойност за еритроцитната мембрана е измерено повърхностно налягане 32 mN/m .^[22,23] Известно е, че с нарастване на повърхностното налягане нараства и степента на опаковане на липидите. Поради тази причина моделът е построен така, че да съответства на зададена

площ за липид $A = 0.40 \text{ nm}^2$ и общата площ на мембраната е 32.40 nm^2 . Тази стойност е избрана близка до експериментално определената в човешки клетки,^[24] тъй като целта е симулациите да бъдат проведени при условия максимално сходни до тези в живия организъм.



Фигура 24: Начална конфигурация на моделите за (a) система от *DPPC* бислои – поглед от страни, (b) *смесен* липиден бислои – поглед от страни с различните типове липиди и комплекса оцветени в съответен цвят и (c) поглед отгоре и отдолу към повърхността на *смесения* бислои; (d) модел на липиден бислои в двумерни периодични гранични условия.

Вторият тип модел, който ще бъде наричан *смесен* бислои (Фигура 24b), е конструиран като представителен за еритроцитна мембрана на човешка клетка и наподобява нейния липиден състав. За съставянето на началната геометрия на *смесения* бислои е използвано приложението CHARMM-GUI. Началните площи за липид са зададени така, че общата площ на бислоя да съвпада с тази на *DPPC* системата. *Смесеният* бислои съдържа следния брой липидни молекули от всеки вид: 70 *DPPC*¹ с $A = 0.40 \text{ nm}^2$, 22 *DLPC*² с $A = 0.39 \text{ nm}^2$, 38 *DPPE*³ с $A = 0.42 \text{ nm}^2$, 18 *DMPS*⁴ с $A = 0.40 \text{ nm}^2$, 14 *PSM*⁵ с $A = 0.36 \text{ nm}^2$. Липидите от всеки

1 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
 2 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
 3 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine
 4 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine
 5 *N*-palmitoyl-d-sphingomyelin

тип са разпределени поравно във всеки монослой, като средната площ на молекула отново е около 0.40 nm^2 . Хидрофилните части са хидратирани с 8114 молекули вода и са добавени 18 Na^+ за компенсиране на отрицателния заряд на DMPS. Структурите и на двата бислоя са еквилибрирани по МД процедурата, описана по-долу, и за всеки от тях е проведена 50 ns продуктивна симулация. Последните геометрии на бислоеве от нея са използвани като начални структури за следващите симулации в присъствието на пептид-лекарствения комплекс.

И в двата типа модели в близост до повърхността на бислоя е ситуирана по една молекула пептид-лекарствен комплекс (DOX-CPP), чийто положителен заряд е неутрализиран с 9 ацетатни йона. В началната конфигурация дългата ос на комплекса е ориентирана паралелно на оста x .

Получените по описания начин модели са поставени в хексагонални периодични кутии с размери съответно $x = 6.12 \text{ nm}$, $y = 4.32 \text{ nm}$, $z = 12 \text{ nm}$. Всички симулации са проведени с наложени периодични гранични условия в трите направления на пространството, които ще бъдат наричани 3D PBC. Видът на хексагоналните периодични условия е показан на Фигура 24c.

За да се изследва влиянието на периодичните гранични условия вследствие на мултиплицирането на периодичната кутия са построени още два модела. От вече получените системи на DPPC и смесен бислоя с комплекс периодичната кутия е увеличена в направление z . Новият размер по z е 30 nm, като липидните бислоеве са центрирани в средата на кутията. Така съседните бислоеве са разделени в нормално направление от 36 nm вакуум, което прекъсва периодичността в тази посока, а се отчитат взаимодействията с периодичните образи само по x и y направленията. Тези моделни системи ще бъдат обозначавани по-долу като 2D PBC. На Фигура 24d е представена DPPC системата в 2D PBC.

4.2 Изчислителен протокол

Изчисленията са проведени със силово поле CHARMM36, използван е leap-frog интегратор на уравненията за движение в комбинация с PME метод за електростатичните взаимодействия при switched cut-off 1.2/1.4 nm. Същият cut-

off е наложен и за ван дер Ваалсовите взаимодействия, които са оценени с потенциал на Lennard-Jones. Водният модел е TIP3P, а всички симулации са проведени в NPT ансамбъл при температура 310 K и налягане 1 bar поддържани постоянни съответно с термостат V-rescale и баростат на Berendsen. Приложено е два типа скалиране на налягането – зависимо по всички координати (x, y, z) за всички модели и независимо по z и в равнината xy за моделите в 3D PBC, с еднакви референтни стойности от 1 bar. Системите са преминали през минимизация на енергията, нагряване и релаксация, като последната е удостоверена чрез достигане на постоянна средна стойност на общата енергия, температурата и налягането. Проследено е и RMSD на координатите на липидите и комплекса. Продуктивната част на всяка симулация е 1 μ s, като представените резултати са след първите 300 ns. Времевата стъпка е $\Delta t = 2$ fs, всеки кадър в траекториите е запазван през 10 ps. За да се проследи по-детайлно еволюцията на поведението на комплекса статистическите анализи в 3D PBC са направени за три интервала от симулациите, от по 100 ns всеки: от 300 ns до 400 ns, от 600 ns до 700 ns и от 900 ns до 1000 ns, а в 2D PBC – в два такива интервала: от 500 ns до 600 ns и от 800 ns до 900 ns. МД пресмятанията са извършени с програмен пакет GROMACS 5.2.1, а за визуализация на резултатите е използвана програмата VMD 1.9.1. Вороной анализ е проведен с програмата APL@Voro. Точността на статистическите оценки на свойствата, анализирани в работата, е оценена чрез стандартни грешки.

5. Влияние на метода за скалиране на налягането

Проверено е влиянието на състава на липидния слой и на начина на скалиране на налягането (изотропно, означено по-долу като *iso-P*, спрямо полуизотропно, означено по-долу като *semiiso-P*) върху структурирането на мембраната и на комплекса и върху описанието на началния етап на навлизане. Представени са статистически оценки на някои основни физични и структурни параметри на липидните бислоеве и комплекса в *iso-P* (A – DPPC и B – смесен) и *semiiso-P* (C – DPPC и D – смесен) в три времеви интервала (до 400 ns, до 700 ns и до 1000 ns) с дължина от по 100 ns.

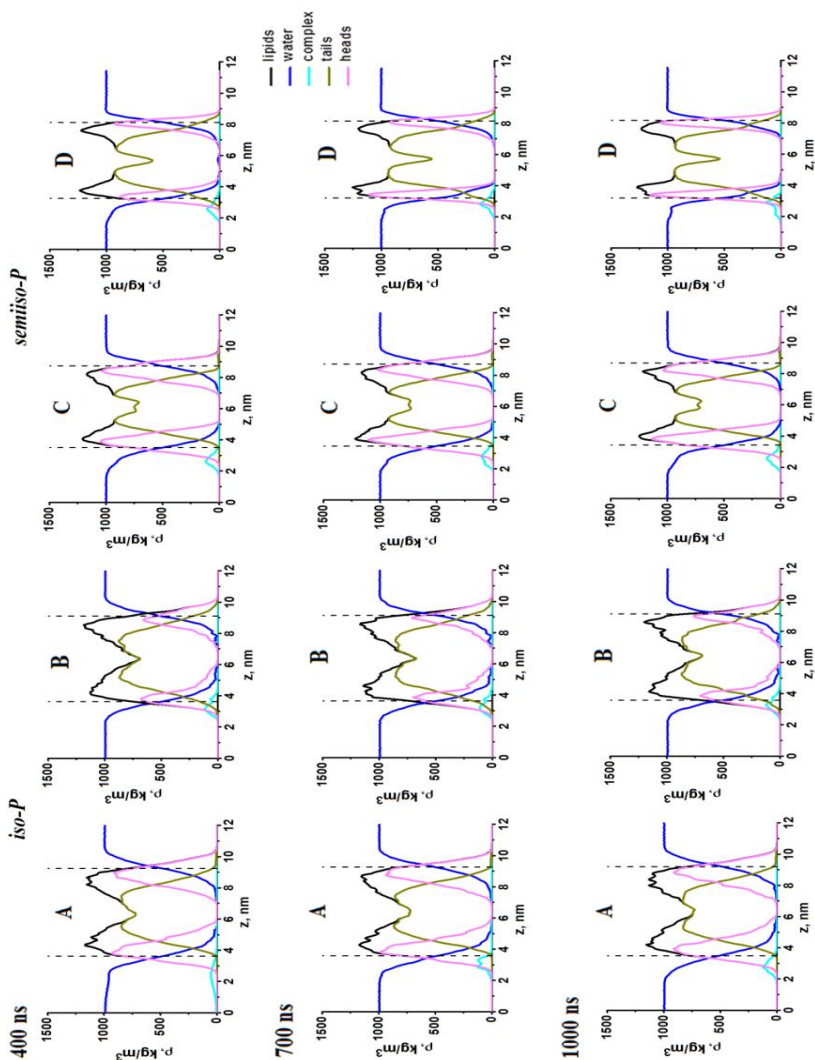
5.1 Профили на плътността

Построени са профилите на плътността в направление перпендикулярно на повърхността на изследваните мембрани. От получените профили могат да се определят основните характеристики на липидните бислоеве: дебелина на слоя, дебелина на опашките, дебелина на сухия хидрофобен слой, дълбочина на потапяне на главите. С помощта на блокови средни стойности е пресметната стандартна грешка от 0.4 kg/m^3 за липидните бислоеве; 0.5 kg/m^3 за комплекса; 0.9 kg/m^3 за водата за траектория с времетраене 100 ns.

В първите 400 ns при *iso-P* (Фигура 26А) дебелината на слоя, съставен от DPPC, е 5.74 nm, а на *смесения* е 5.48 nm. Дебелината на опашките е съответно 3.95 nm и 4.47 nm. Сухият хидрофобен слой е по-дебел при *смесената* мембрана: 1.10 nm спрямо 0.93 nm за чистия DPPC. Същата дебелина в непертурбираните бислоеве е значително по-голяма: 1.60 nm за *смесения* и 1.05 nm за DPPC. Наличието на по-къси опашки определя като цяло по-дълбокото потапяне (0.91 nm) на липидите от *смесения* слой във водната фаза, докато при DPPC то е 0.72 nm. Комплексът всъщност взаимодейства с липидните глави, като пертурбира структурата им локално, където те се дехидратират частично. Това води до по-голямото им потапяне в областта далече от комплекса с цел цялостно компенсиране на нарушението в структурата.

При *semiiso-P* (Фигура 26С, D) в първия период (400 ns) се наблюдава компресиране на двата бислоя в сравнение с *iso-P*. Общата дебелина на DPPC слоя намалява с 0.51 nm до 5.23 nm. Дебелината на *смесения* бислой достига до 4.90 nm. В *смесената* мембрана става по-малка и дълбочината на потапяне на главите (0.59 nm) и дебелината на опашките (3.47 nm), а дебелината на сухия хидрофобен слой нараства до 1.71 nm. В по-малка степен намалява при DPPC дебелината на опашките до 3.32 nm и дълбочината на потапяне на главите до 0.54 nm, а сухият хидрофобен слой става със средна дебелина 0.76 nm. Особено очевидно е влиянието на *semiiso-P* скалирането върху *смесения* бислой. Там с течение на времето се наблюдава систематично свиване на пиковите на хидрофилните глави (полуширината на пика намалява от 0.75 nm до 0.63 nm между 400 ns и 1000 ns). Също така почти изчезват неравностите в липидните

максимуми, което свидетелства за хомогенизиране на системата и засилен порядък.



Фигура 26: Еволюция на профилите на плътността нормално на бислоя при *iso-P* (А – *DPPC* и В – смесен) и *semiiso-P* (С – *DPPC* и D – смесен); с пунктирна линия е означена еквимолекулярната разделителна повърхност.

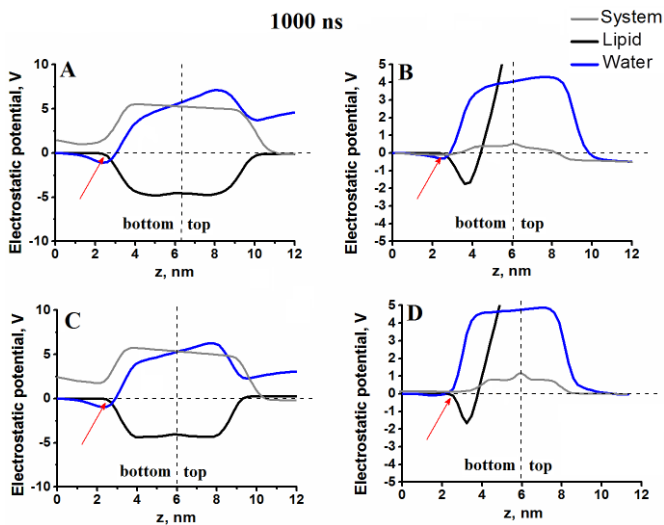
От профилите на плътността може ясно да се види положението на комплекса спрямо повърхността на мембраната и това дава възможност да се направи оценка за степента на навлизането му между липидите. При *iso-P* (Фигура 26B) се наблюдава втори пик в разпределението на плътността на комплекса в *смесената* мембрана, който обаче е отвъд еквимолекулярната разделителна повърхност (ЕМП). Това е ясна индикация за по-доброто му навлизане между липидните глави. И при двата типа скалиране обаче най-заселеният максимум остава близо до ЕМП и не се наблюдава систематично навлизане на комплекса след 700 ns. При *DPPC* и за двата типа скалиране се осъществява отдалечаване и приближаване на комплекса от главите, но той почти не преминава граничната повърхност. Очевидно съставът на липидния бислой е от съществено значение за описанието на процеса на навлизане на комплекса в мембраната. Моделната система изградена от *смесен* липиден бислой при *iso-P*, дава най-правдоподобно описание и е най-подходяща за изследвания процес.

5.2 Зарядова плътност и електростатичен потенциал

Чрез обработка на траекториите от проведените молекулно-динамични симулации е изчислен профилът на изменение на зарядовата плътност в направление z за двата типа бислой. Методът на скалиране на налягането не променя качествено ρ_z , но влияе съществено върху количественото разпределение на заряда на липидите. В мембраните от *DPPC* поведението на комплекса е подобно при двата вида скалиране, като максимумът в разпределението на ρ_z е в областта на положителния липиден пик. При *смесената* мембрана с *iso-P* се наблюдава двупиково разпределение на ρ_z на комплекса, което беше забелязано и по-горе в профилите на масовата плътност. По-вътрешният пик на ρ_z съвпада с отрицателния максимум на липидите. Това може да се обясни със силно електростатично взаимодействие между положително заредения комплекс и отрицателно натоварените фосфатни групи на липидите.

Трябва да се отбележи и фактът, че в проведеното изследване комплексът се намира откъм по-положителната страна на мембраната, т.е. в монослоя, в който отрицателните молекули DMPS са с две по-малко. Преминването на първата молекула се осъществява още в първите 100 ns, а на втората – около 600 ns.

Построени са профилите на електростатичния потенциал в направление нормално на повърхността за всички системи в последния етап до 1000 ns (профилите за останалите времеви интервали са много сходни). От минимума в профила на масовата плътност за опашките (Фигура 26) е определена границата между двата монослоя, т.е. средата на липидния слой (Фигура 30).



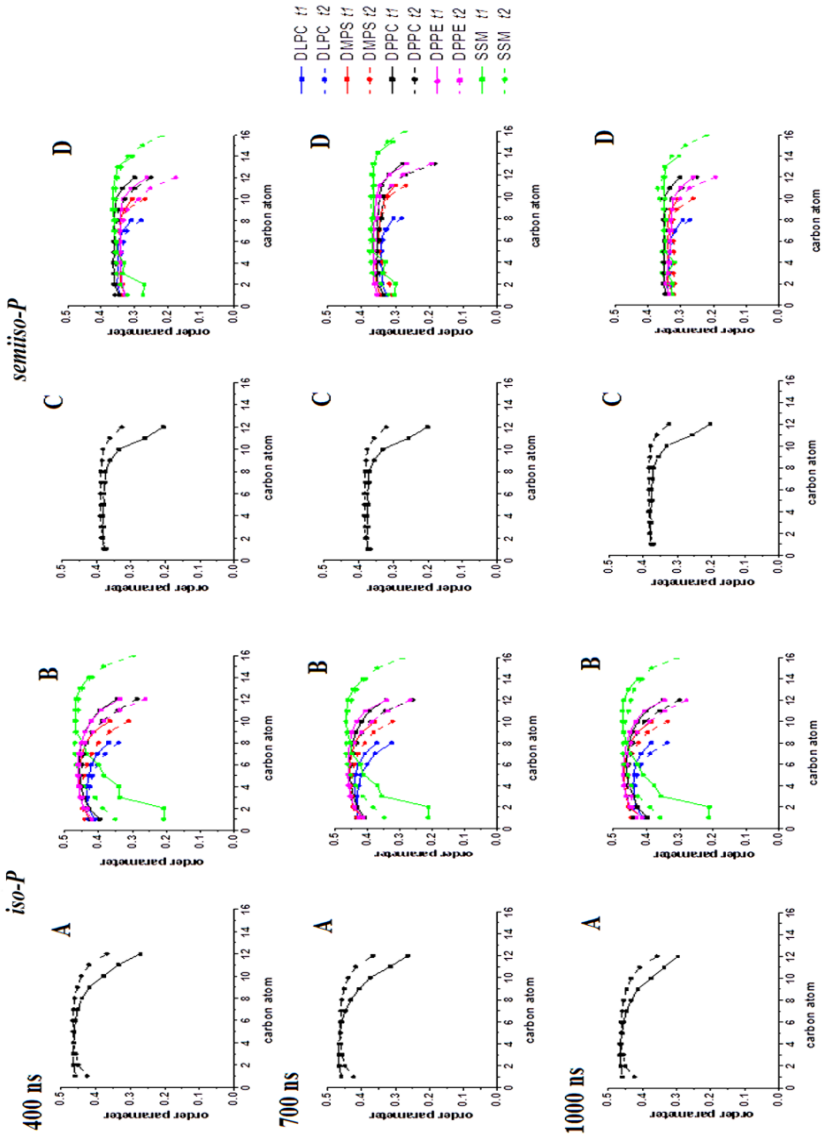
Фигура 30: Профили на електростатичния потенциал в нормално на бислоя направление при *iso-P* (A – DPPC и B – смесен) и *semiiso-P* (C – DPPC и D – смесен); графиките за *смесения* бислой са дадени до потенциал 10 V с цел сравнение с DPPC, но се достига до стойност около 70 V в десния край на кутията; с пунктирна линия е обозначена условната граница между двата монослоя, а със стрелка – предпочетената позиция на комплекса DOX-CP.

Определени са приносът от подреждането на диполите χ_m от пика на главите във Фигура 26 (1000 ns), повърхностният потенциал ψ_s като разликата между стойността на ψ в еквилекулярната разделителна повърхност и нулевия потенциал за двете фазови граници и трансмембраният потенциал $\Delta\psi$ като разлика между стойностите на потенциала в обемните водни фази от двете страни на бислюка за всички системи.

При *DPPC* в *iso-P* $\Delta\psi = 1.93$ V, $\psi_s = 4.68|4.96$ V, $\chi_m = 5.57|4.96$ V. От тези стойности ясно личи силното влияние на комплекса. Той води до по-голяма ориентация на диполите в граничния слой и слабо понижение на повърхностния потенциал. В *semiiso-P* профилът на потенциалните криви не се различава съществено, като $\Delta\psi = 1.72$ V, $\psi_s = 5.01|4.97$ V, $\chi_m = 5.91|5.07$ V. В тази система комплексът не е навлязъл в мембраната и няма значима промяна в повърхностния потенциал от двете страни. В *смесената* мембрана в *iso-P* $\Delta\psi = 0.68$ V, $\psi_s = 0.07|-0.42$ V, $\chi_m = 0.38|-0.35$ V. Цялостно тези стойности са значително по-ниски от съответните в *DPPC* системите. В *semiiso-P*, $\Delta\psi = 0.09$ V, $\psi_s = 0.16|0.11$ V, $\chi_m = 0.21|0.31$ V. При тази система бе наблюдавано пълното изтласкване на комплекса от мембраната и диполният потенциал е по-висок в горния слой, който не съдържа лекарствената частица. Най-близки до откритите в литературата стойности са на мембраните в *iso-P*.

5.3 Параметър на порядък

Като характеристика на подреждането на опашките е използван деутериевият параметър на порядък на въглеродните атоми. За всички липиди от *смесената* мембрана при *iso-P* S_{CD} е ~ 0.45 (отговарящ на предпочетен наклон на опашките $\sim 37^\circ$ спрямо оста z) и не се променя значимо в хода на симулацията, като при краищата на опашките има очаквано разподредане. PSM се очертава като единствения липид в смесения слой с неподредена верига и откъм главите. Не се наблюдава и съществена промяна в стойността на параметъра за DPPC в чистия и *смесения* слой.



Фигура 32: Параметър на порядък на въглеродните атоми от липидните опашки при *iso-P* (А – DPPC и В – смесен) и *semiiso-P* (С – DPPC и D – смесен). Данните за едната опашка на даден вид липид са дадени с плътна линия, а за другата – с пунктирана.

От стойностите и поведението на S_{CD} по дължината на опашките би могъл да се направи изводът, че в тази моделна система липидите се намират в състояние наподобяващо течно подредено L_O . Такова състояние се постига експериментално при наличие на холестерол в липидните бислоеве, т.е. бихме могли да твърдим, че изотропното скалиране на налягането в случая наподобява влиянието на молекулите холестерол в реалните системи.

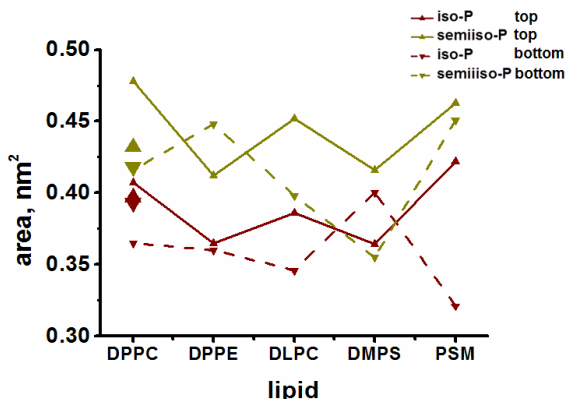
От данните за S_{CD} може да се направи заключението, че методът на скалиране на налягането силно повлиява подредбата на липидите и в двата бислоя. При *semiiso-P* настъпва цялостно изпъване на опашките, уеднаквяване на конформацията, промяна на ъгъла на хидрофобните вериги спрямо оста z и видимо изменение на дебелината на слоя. От проведените оценки на параметъра на порядък се вижда ясна промяна във фазовото състояние на липидите и настъпващ преход в мембраните от течно подредено към твърдо кристално състояние. Протича ‚замръзване‘ на системата, в такова състояние опашките на липидите са по-трудно подвижни и навлизането на комплекса е затруднено. От друга страна в живите организми не се очаква или наблюдава подобно поведение на липидите в клетъчните мембрани, а ако има то би довело до различни видове патологии.

За изследвания процес на преминаване на комплекса и по този показател по-подходящ се оказва методът на изотропно скалиране. При него се реализира течно подредено състояние, няма значима промяна в подредбата на опашките в хода на симулациите и добре възпроизвежда поведението им при физиологични условия.

5.4 Площ за липид

Средната площ заемана от даден вид липид (A) в бислои са определени с диаграми на Вороной. Получените резултати от последния етап са обобщени на Фигура 33.

За слой *DPPC* получените площи в това изследване са значително занижени, което се дължи най-вече на по-ниската температура и фазовото състояние.



Фигура 33: Средна площ за липид в горния (top) и долния (bottom) слой от последния времеви интервал 900-1000 ns в *iso-P* и *semiiso-P* системите. С удебелени триъгълници са показани стойностите за чист *DPPC* слой.

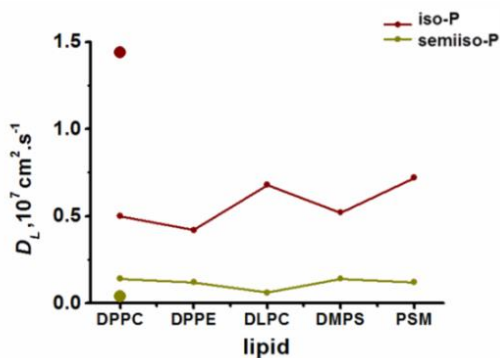
В смесената мембрана при *iso-P* площта на DPPC се запазва в хода на симулацията, като в горния слой е $\sim 0.41 \text{ nm}^2$, докато в долния е $\sim 0.37 \text{ nm}^2$. При *semiiso-P* получените данни са по-близки до откритите в литературата, но подреждането на молекулите се различава от това при физиологични условия и затова този метод не е напълно подходящ за симулации изследващи пренос през мембраната. Получената в тази разработка стойност за DPPE молекулите е $\sim 0.37 \text{ nm}^2$ за двата начина на скалиране на налягането. За DLPC в *iso-P* площта е $\sim 0.38 \text{ nm}^2$, а при *semiiso-P* е $\sim 0.45 \text{ nm}^2$. Площите за DMPS варират от $\sim 0.35 \text{ nm}^2$ до $\sim 0.41 \text{ nm}^2$. При PSM се наблюдава най-голяма разлика в площите на горния и долния слой. В горния слой с *iso-P* площите за молекула са $\sim 0.44 \text{ nm}^2$. При *semiiso-P* площите в горния слой са $\sim 0.47 \text{ nm}^2$, докато в долния са малко по-малки. В хода на симулацията разликата в площите на горния и долния слой намалява и достига до $\sim 0.012 \text{ nm}^2$ при *semiiso-P*, докато при *iso-P* е $\sim 0.12 \text{ nm}^2$ и е относително постоянна.

От направения анализ на разпределението на площите на липидите се вижда, че за част от липидите (DPPC, DMPS, PSM) са получени стойности сравнително близки до експерименталните и със сравнима точност (DPPC, PSM) или малко по-точни (DMPS) от досега определяните теоретично. Площите на

останалите два типа липиди (DPPE, DLPC) се получават значително занижени спрямо известните в литературата. Както беше споменато трябва да се има предвид, че наличните експериментални данни са за чисти бислоеве от дадения липид, докато в смес с други молекули междумолекулните взаимодействия могат да доведат до промяна в средната площ заемана от даден вид липиди и до сравнително хомогенизиране на стойностите, каквото показват резултатите от Вороной анализа в настоящите симулации. Също важно е да се отбележи, че в работата се разглежда пертурбиран от комплекса бислои.

5.5 Латерален дифузионен коефициент

Коефициентът на латерална дифузия (D_L) е осреднен за всички липиди от даден вид.



Фигура 34: Осреднен латерален дифузионен коефициент (D_L) от последния времеви интервал 900-1000 ns в *iso-P* и *semiiso-P* системите. С удебелени точки са показани стойностите за чист *DPPC* слой.

В настоящата работа за двата начина на скалиране получените резултати са близки до откритите в литературата за течно състояние на липидни бислоеве, като при *semiiso-P* са занижени. В хода на симулациите при *iso-P* дифузионният коефициент намалява. Това показва, че в първата половина на симулацията е имало по-интензивно латерално движение на липидите, след което реорганизацията спира и се установява равновесно латерално разпределение,

като дифузията най-вероятно е забавена и вследствие на взаимодействието на липидите с комплекса.

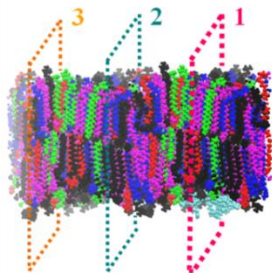
При *semiiso-P* се наблюдава силно понижаване на дифузионния коефициент в еднаква степен за двата вида липиден бислои. В този случай системата изглежда „замръзнала“ и на практика не се осъществява никакво латерално движение на липидите в мембраната. Това може да се дължи на стремежа на липидите да запазят своята равновесна позиция в кристализирания бислои вследствие на настъпилата подредба на опашките и накланянето на липидите спрямо оста *z*. От анализа на дифузионния коефициент като цяло се вижда, че стойностите при изотропно скалиране в смесения липиден бислои са по-близки до експериментално получените за течен тип състояние.

5.6 Радиално-разпределителни функции

Влиянието на комплекса върху липидните слоеве, което беше забелязано при Вороной анализа, е проследено количествено посредством радиално-разпределителни функции – RDF. За всички системи са дефинирани три латерални области с дебелина по 2 nm показани на Фигура 35. Областта, съдържаща комплекса, условно е наречена първа, а най-отдалечената от него – трета. За всяка област са пресметнати радиално-разпределителните функции на разстоянието между фосфорните атоми от липидите (gP-P), а за първата – и RDF на разстоянието между фосфорните атоми от липидите и всички азотни атоми от аргининовата верига (gP-ArgN). RDF кривите са дадени на Фигура 36.

От данните се вижда, че за почти всички системи най-смутен е подслоят съдържащ комплекса, като с постепенното навлизане на пептида между липидите нараства пертурбацията в подреждането на фосфорните атоми. При *iso-P* комплексът е по-навлязъл в хидрофилната част на моделните мембрани и съответно влиянието му върху липидния монослой е по-голямо в сравнение с *semiiso-P*, където настъпва изтласкване на молекулата-преносител. Поради тази причина в системата със смесения липиден слой при 1000 ns и *semiiso-P* трите латерални липидни участъка са еднакво повлияни и техните RDF се припокриват. При този начин на скалиране прави впечатление, че пиковете на

комплекса са много по-високи и тесни. В последния интервал дори вторият пик изчезва и предпочетеното разстояние е едно за всички азотни атоми.

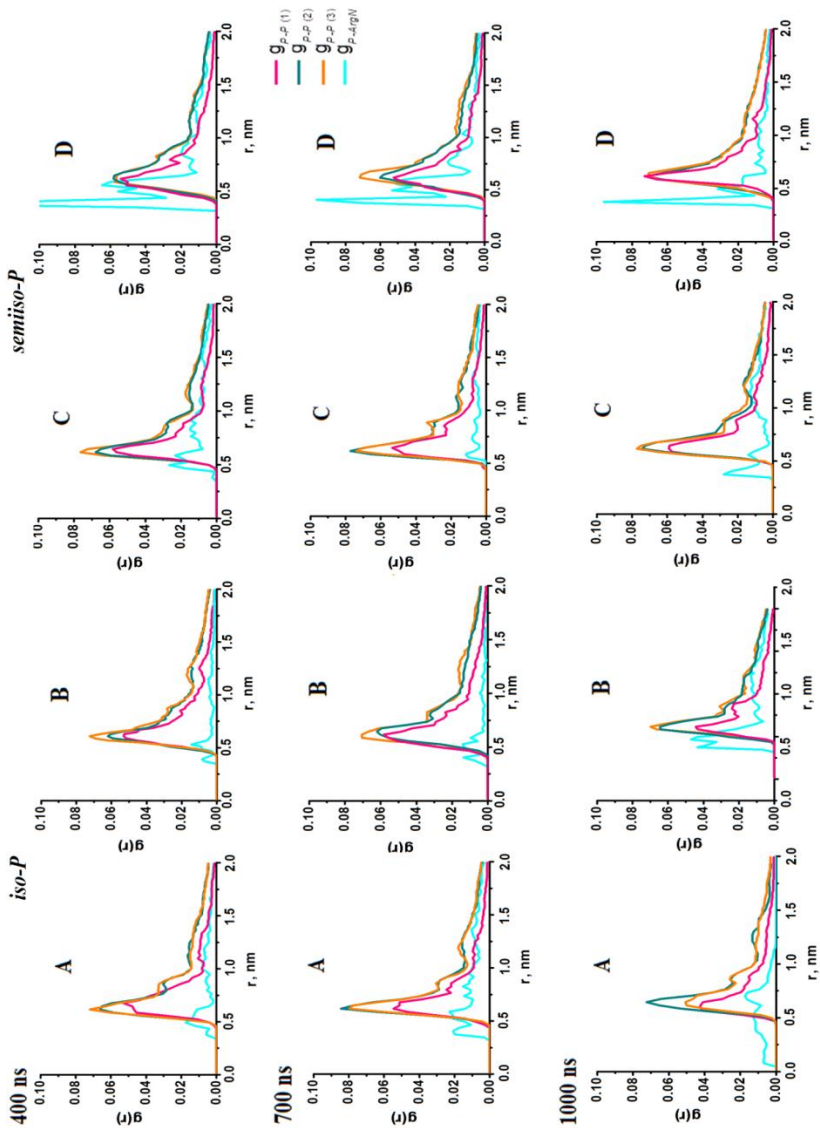


Фигура 35: Схематично представяне на латералното разделяне на липидния бислой на области, за всяка от които са пресметнати радиално-разпределителни функции.

При *semiiso-P* движението на комплекса (както в латерално, така и в нормално направление) е значително по-малко, отколкото в *iso-P* симулация на смесения слой, където пиковете са много по-ниски и разлати. В хода на симулацията на смесения слой с *iso-P* се оформят два пика и комплексът вече има предпочетено разстояние до главите на липидите, но във всички времеви интервали са заселени голям обхват от разстояния.

Появата на втори пик в RDF на комплекса в хода на симулацията може би е свързана с постъпателното навлизане и отдръпване на комплекса в тази система. В близост до комплекса настъпва разподреджане на липидните молекули и подреджане в по-далечната област.

В DPPC слоя при *iso-P* фосфорните атоми са по-слабо смутени, тъй като комплексът е по-слабо навлязъл. При *semiiso-P* се очертава трети пик в RDF показващ далечната подредба на липидите. За комплекса при DPPC с *semiiso-P* се очертават два размити пика, т.е. азотните атоми от цялата пептидна верига нямат точно определено предпочетено разстояние спрямо фосфорните атоми и променят своето положение.



Фигура 36: Радиално-разпределителни функции за три подобласти от бислота при *iso-P* (**A** – *DPPC* и **B** – *смесен*) и *semiiso-P* (**C** – *DPPC* и **D** – *смесен*) скалиране на налягането.

5.7 Структурни параметри на DOX-СРР

Дотук беше разгледано влиянието на комплекса върху структурирането на бислоя, но е важно да се проследи и поведението на пептида и лекарството по време на симулациите. Определени са вторичната структура на пептида с карти на Ramachandran и ориентацията на лекарството спрямо повърхността на мембраната чрез ъгъла, който антрациклиновата част на лекарството сключва с оста z .

5.7.1 Карти на Ramachandran за пептидната верига

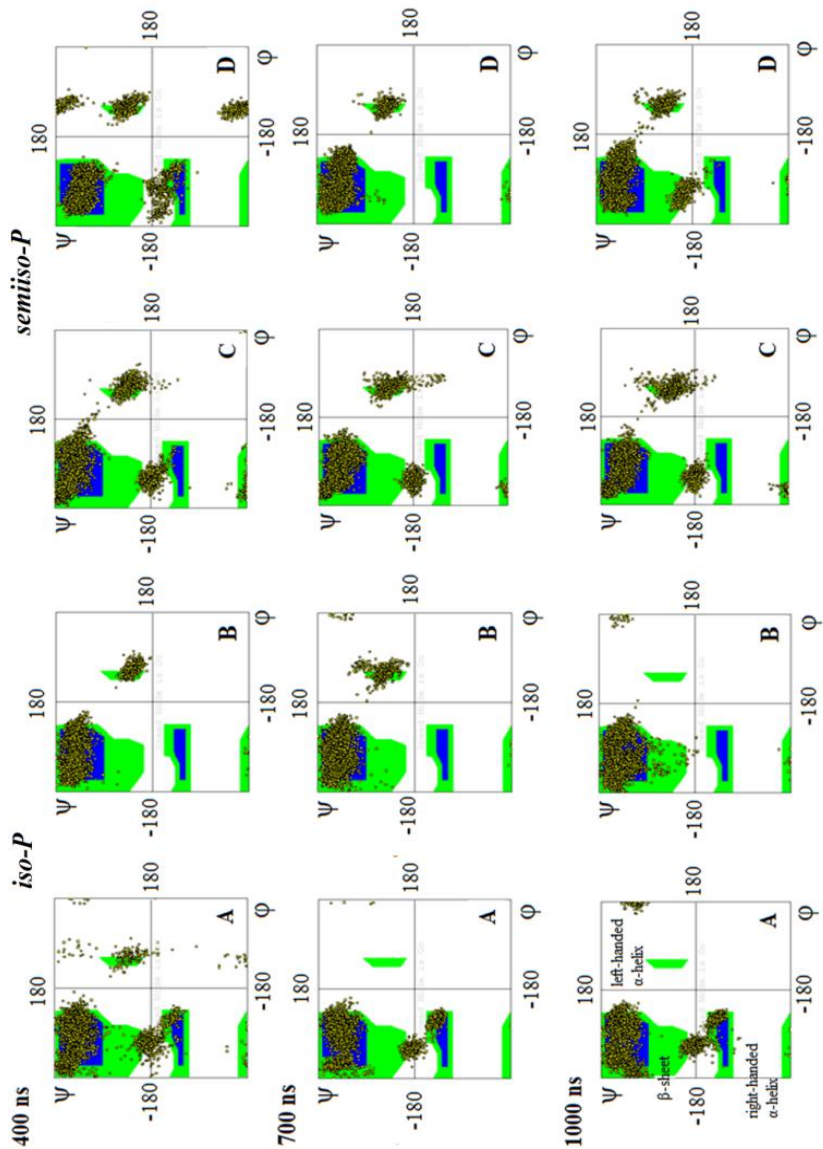
За да се установи как пептидът от лекарствения комплекс е повлиян от вида скалиране на налягането е характеризирана неговата вторична структура. За определянето ѝ е използвана карта на Ramachandran (Фигура 37). Областите на всяка графика, които са оцветени в синьо (и допустимите им граници в зелено) съответстват на различните типове вторична структура, които са допустими за пептидите.

В *смесения* липиден слой с *iso-P* почти не се заселват забранените зони, което е индикация за по-слаба пертурбация върху пространствената структура на пептида в тази система въпреки същественото навлизане между липидните глави. При 1000 ns най-силно застъпена е β -лист областта. Това е породено от начина, по който комплексът навлиза между липидите.

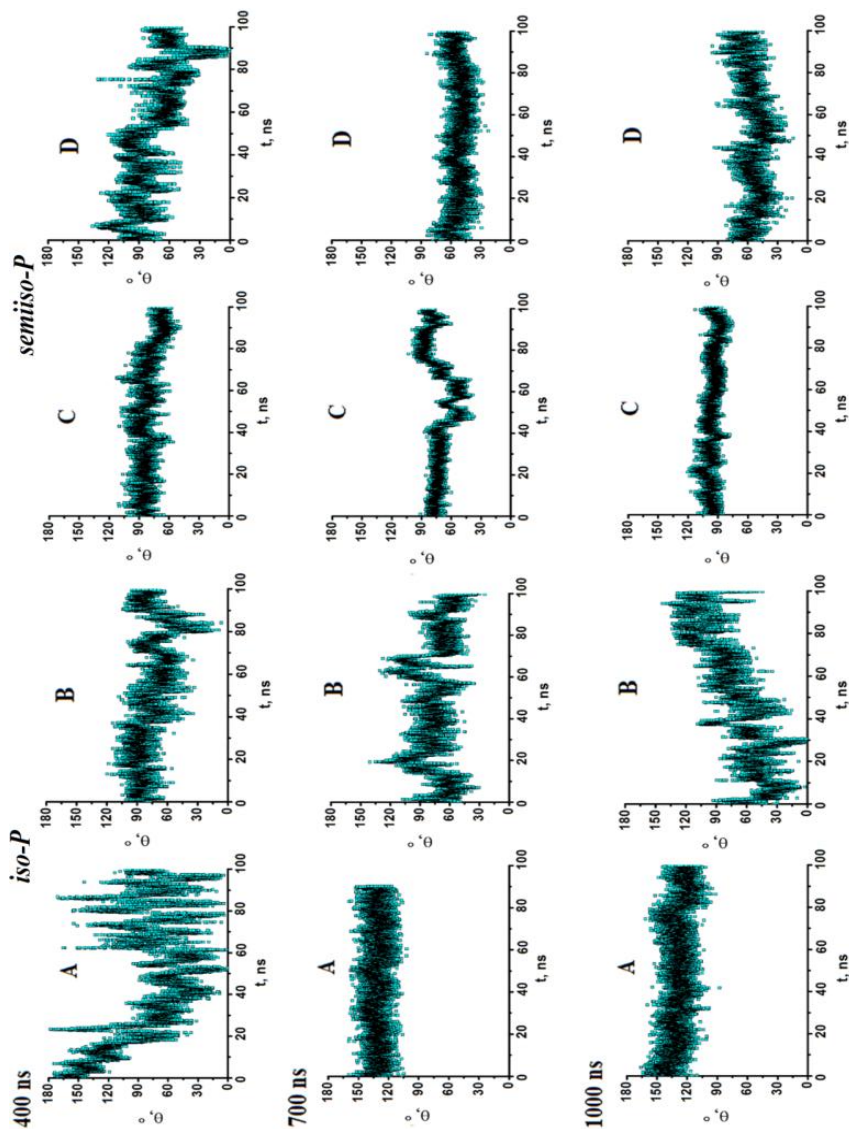
5.7.2 Наклон на DOX спрямо нормалата

Построен е вектор по диагонал на антрациклиновата част на DOX и е пресметнат ъгълът (θ), който сключва с оста z . Изчислените стойности на θ по време на МД симулациите са представени на Фигура 39.

При *semiiso-P* и за двата типа бислои стремежът на лекарството е да застане почти успоредно на повърхността, докато при *iso-P* – да е по-скоро перпендикулярно с насочен навън от бислоя захарен остатък. За *смесения* бислои с *iso-P* ширината на интервала е голяма и съществените флукуации се запазват. Поведението на ориентацията на DOX показва, че в първите 400 ns от всички симулации (и до края за система В) лекарството е участвало при навлизането на комплекса в *DPPC* бислоя. Само за *смесения* слой при *iso-P* се осъществява навлизане на комплекса, което води и до нарастване на интервала от ъгли.



Фигура 37: Карти на Ramachandran илюстриращи вторичната структура на пептида в трите интервала от МД симулациите при *iso-P* (A – DPPC и B – смесен) и *semiiso-P* (C – DPPC и D – смесен) скалиране на налягането.



Фигура 39: Еволюция на ъгъла (в градуси) ключван между антрацилиновата част на доксорубин и оста перпендикулярна на повърхността на липидните бислоеве при *iso-P* (А – *DPPC* и В – *смесен*) и *semiso-P* (С – *DPPC* и D – *смесен*) скалиране на налягането.

6. Влияние на периодичните гранични условия

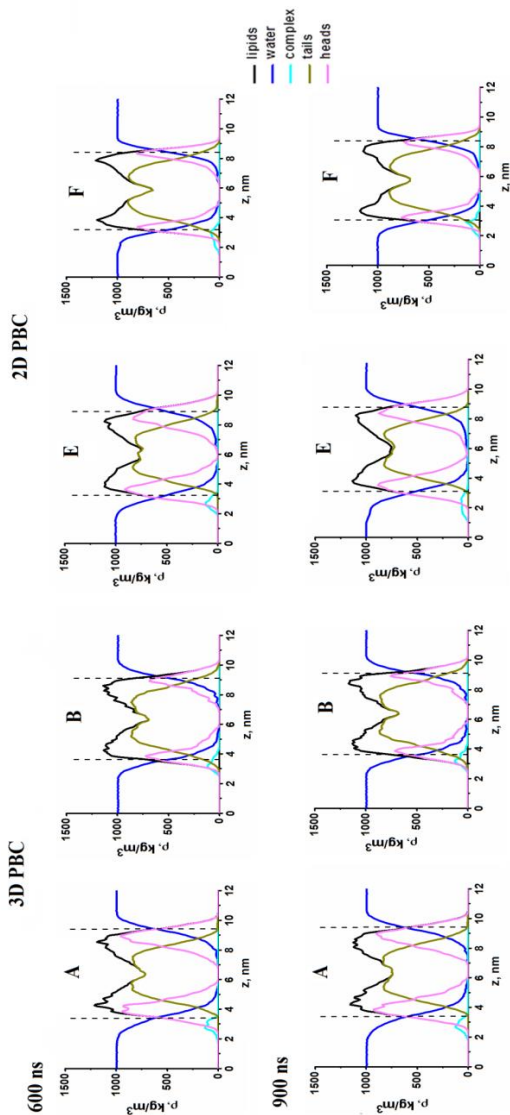
Изследвано е влиянието на периодичните гранични условия – *3D* спрямо *2D* върху структурирането на мембраната и комплекса и върху начина на навлизането му в липидните бислоеве. Използвано е изотропно скалиране на налягането. Разгледани са основните физични и структурни параметри на липидните бислоеве и комплекса, представени в предходната глава, в *3D* (**A** – *DPPC* и **B** – *смесен*) и *2D* (**E** – *DPPC* и **F** – *смесен*) периодични условия в два времеви интервала (до 600 ns и до 900 ns) с дължина от по 100 ns.

6.1 Профили на плътността

Дебелината на *DPPC* слоя при *3D* PBC в първите 600 ns е 5.69 nm и в *2D* PBC е 5.65 nm. Измерената дебелина на *смесената* мембрана в *3D* PBC е 5.48 nm и в *2D* PBC – 5.33 nm. Дебелината на опашките в *DPPC* при *3D* PBC е по-малка (4.01 nm) отколкото при *2D* PBC – 4.18 nm. В профилите за *смесената* система е налице същата тенденция (*3D* PBC – 4.47 nm *2D* PBC – 4.32 nm). Сухият хидрофобен слой и при двата типа мембрани е значително по-дебел в *3D* PBC. При *DPPC* получените стойности са съответно 0.94 nm в *3D* PBC спрямо 0.31 nm в *2D* PBC и за смесения слой съответно 1.09 nm спрямо 0.77 nm. Тези резултати показват, че в изолираната мембрана липидите са много по-хидратирани. Получените глобални характеристики на бислоеве в *2D* PBC са близки до публикуваните от предишни молекулно-динамични симулации.

Действително в най-голяма степен от вида на граничните условия се повлиява дълбочината на потапяне на главите, като при чистия *DPPC* е по-значимо. В *3D* PBC тя е 0.72 nm, докато в *2D* PBC е 1.42 nm. При *смесената* система дълбочината на потапяне е 0.91 nm в *3D* PBC, а в *2D* PBC – 1.36 nm. Наличието на по-къси опашки в *смесената* мембрана предполага по-дълбокото потапяне на главите. Значимата разлика при потапянето на главите обаче няма особено съществено влияние върху навлизането на комплекса.

Видът на граничните условия почти не повлиява дълбочината на проникване на комплекса. От направените анализи се вижда, че най-подходяща за изследвания процес на лекарствен транспорт е *смесената* мембрана в *3D* или *2D* PBC.

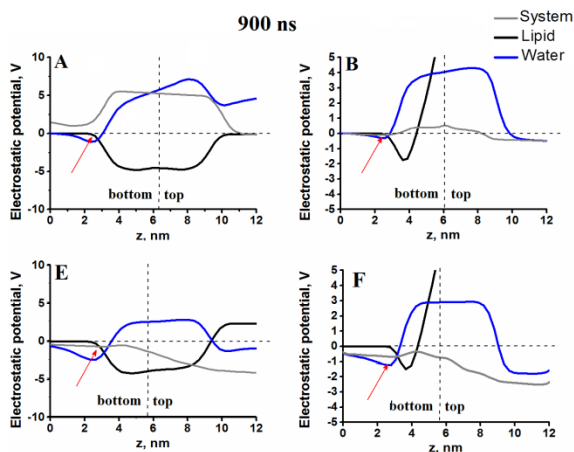


Фигура 40: Еволюция на профилите на плътността нормално на бислюва при *3D* (**A** – *DPPC* и **B** – *смесен*) и *2D* (**E** – *DPPC* и **F** – *смесен*) периодични гранични условия; с пунктирана линия е означена *еквимолекулярната* разделителна повърхност.

От получените резултати се вижда, че видът на граничните условия повлиява в малка степен дебелината на изследваните бислоеве, като те леко се компресират, когато мембраната е изолирана в нормално направление. Това води до реорганизация на липидните глави в 2D PBC поради по-силно хидратиране. Тя е най-съществена в *DPPC* слоя, което предизвиква и изхвърлянето на пептид-лекарствения комплекс от мембраната. Видът на граничните условия обаче почти не повлиява дълбочината на проникване на комплекса. От направените анализи се вижда, че най-подходяща за изследвания процес на лекарствен транспорт е *смесената* мембрана в 3D или 2D PBC.

6.2 Зарядова плътност и електростатичен потенциал

Изчислен е профилът на изменение на зарядовата плътност в направление z за двата типа бислои. От зарядовата плътност са получени профилите на електростатичния потенциал в направление нормално на повърхността за всички системи в последния етап от симулациите.



Фигура 42: Профили на електростатичния потенциал в нормално на бислоя направление при 3D (**A** – *DPPC* и **B** – *смесен*) и 2D (**E** – *DPPC* и **F** – *смесен*) периодични гранични условия; с пунктирана линия е обозначена условната граница между двата монослоя, а със стрелка – предпочетената позиция на комплекса DOX-CP.

От профила на електростатичния потенциал са определени χ_m , ψ_s и $\Delta\psi$ за всички системи. В 3D PBC полученият профил е идентичен с този в т. 5.2 и смесената мембрана възпроизвежда по-добре експерименталните резултати. Получените стойности в 2D PBC за границите вода|липид са: за DPPC, $\Delta\psi = -3.74$ V, $\psi_s = -0.57$ |-3.14 V, $\chi_m = -0.63$ |-3.17 V и смесена мембрана, $\Delta\psi = -2.08$ V, $\psi_s = -0.79$ |-1.99 V, $\chi_m = -0.71$ |-2.09 V. Част от забелязаните тенденции са налице, но като цяло тези данни не са подходящи за определянето на електростатичните свойства на липидните бислоеве.

При смесената мембрана освен наличието на градиент в потенциала в 3D PBC липсва подредба на липидните глави и опашки, което я прави неподходящата система за изследване транспорта на молекули през клетъчни мембрани.

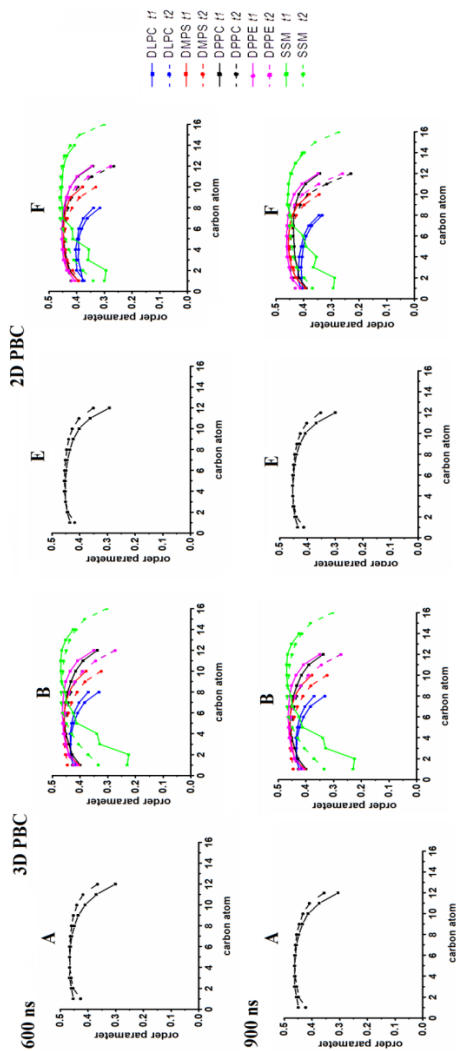
6.3 Параметър на порядък

Параметърът е пресметнат поотделно за всяка липидна опашка и е представен на Фигура 43.

В системите с DPPC и при двата вида периодични гранични условия (3D и 2D) няма промяна в параметъра на порядък. Липидите не променят съществено фазовото си състояние и то остава близко до течно подредено L_0 .

При смесената система стойностите за DPPC са от същия порядък и не се променят от вида на PBC. При DLPC молекулите има сближаване на стойностите за двете опашки в 2D PBC и с напредване на симулацията все повече се уеднаквяват по дължината на опашките. За DMPS молекулите параметърът на порядък е практически еднакъв при двата вида гранични условия. Отново най-силно е повлиян PSM (опашка C_{16}), като в 2D PBC има слабо подреждане на двойната връзка в близост до главата

Получените стойности за всички липиди в смесената система при 2D PBC предполагат състояние междинно между течно подредено и гел. При 3D PBC мембраната по-скоро е в течно подредено състояние, което е и физиологичното, т.е. тя е подходящата система за описание на изследвания процес и по този показател.

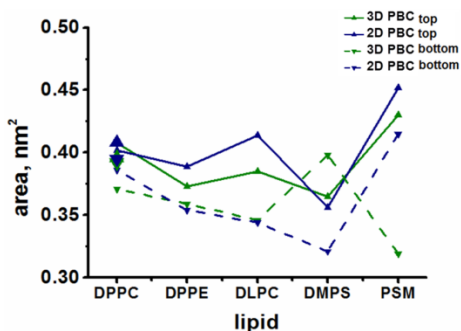


Фигура 43: Параметър на порядък на въглеродните атоми от липидните опашки при 3D (A – DPPC и B – смесен) и 2D (E – DPPC и F – смесен) периодични гранични условия. Данните за едната опашка на даден вид липид са дадени с пълтна линия, а за другата – с пунктирна.

6.4 Площ за липид

С диаграми на Вороной са определени средната площ, заема на даден вид липид (A) в бислой, като получените резултати от последния времеви етап интервал са обобщени графично на Фигура 44.

В чистия *DPPC*, при който навлизане почти не се осъществява, не се наблюдава съществена промяна в средните площи за липид в зависимост от периодичните гранични условия. Въпреки близките стойности на площите в *3D* PBC и *2D* PBC още веднъж се потвърждава значимостта на състава на мембраната за изготвянето на моделни системи. Също така отново става ясно, че PSM има по-голямо участие за навлизането на пептид-лекарствения комплекс в мембраната и се установява, че DPPE в най-малка степен усеща присъствието на DOX-CPP. От предложените системи най-подходяща за изследването лекарствен транспорт е *смесената* мембрана в *3D* PBC.



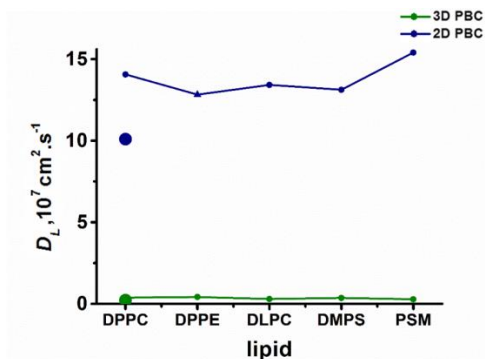
Фигура 44: Средна площ за липид в горния (top) и долния (bottom) слой от последния времеви интервал 800-900 ns в *3D* и *2D* периодични гранични условия. С удебелени триъгълници са показани данните за чист *DPPC* слой.

6.5 Латерален дифузионен коефициент

Осредненият за всички липиди от даден вид коефициент на латерална дифузия (D_L) от последния времеви етап е представен на Фигура 45.

При *2D* PBC D_L нараства във времето и в края на симулациите получените стойности са значително по-големи.. Молекулите *DPPC* в *3D* PBC са

с по-голям D_L в чистия *DPPC* слой отколкото в *смесения*, т.е. са с по-затруднено движение в смесената мембрана. При *2D PBC* в *смесената* мембрана стойността за *DPPC* достига до $14.06 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ и молекулите са значително по-подвижни отколкото в *DPPC* слоя. С най-голям дифузионен коефициент ($D_L = 15.40 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) в *2D PBC* е *PSM*, стойността му остава относително постоянна във времето за разлика от системата в *3D PBC*, където от „най-бърз“ става „най-бавния“ липид. Това забавяне се дължи на взаимодействието между комплекса и липидните глави от бислоя. При другите липиди от *смесената* мембрана (*DPPE*, *DLPC*, *DMPS*) в хода на симулациите с *2D PBC* стойността на латералния дифузионен коефициент нараства и е значително по-висока от тази в *3D PBC*.



Фигура 45: Осреднен латерален дифузионен коефициент (D_L) от последния времеви интервал 800-900 ns в *3D* и *2D* периодични гранични условия. С удебелени точки са показани стойностите за чист *DPPC* слой.

Получените стойности в *2D PBC* за D_L са доста по-високи от експерименталните дори и за течно състояние. Подвижността на липидите оказва съществено влияние върху навлизането на пептид-лекарствения комплекс между главите. Забързването на молекулите в бислоевите води до забавяне на процеса на преминаване на *DOX-CPP* в *смесената* и изхвърляне на комплекса от *DPPC* мембраната. Стойностите при *3D PBC* в *смесения* липиден бислой са по-близки до експериментално получените при течен тип подредба.

6.7 Структурни параметри на DOX-СРР

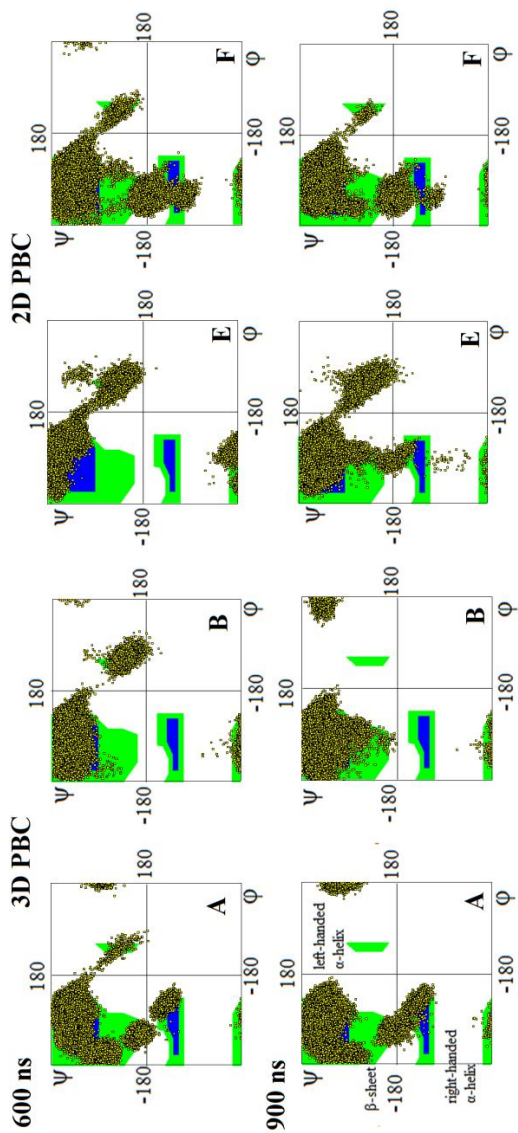
Поведението на пептид-лекарствения комплекс в хода на симулациите е анализирано чрез карти на Ramachandran, описващи вторичната структура на пептида, и е разгледан ъгълът, който антрациклиновата част на лекарството сключва с оста z.

6.7.1 Карти на Ramachandran за пептидната верига

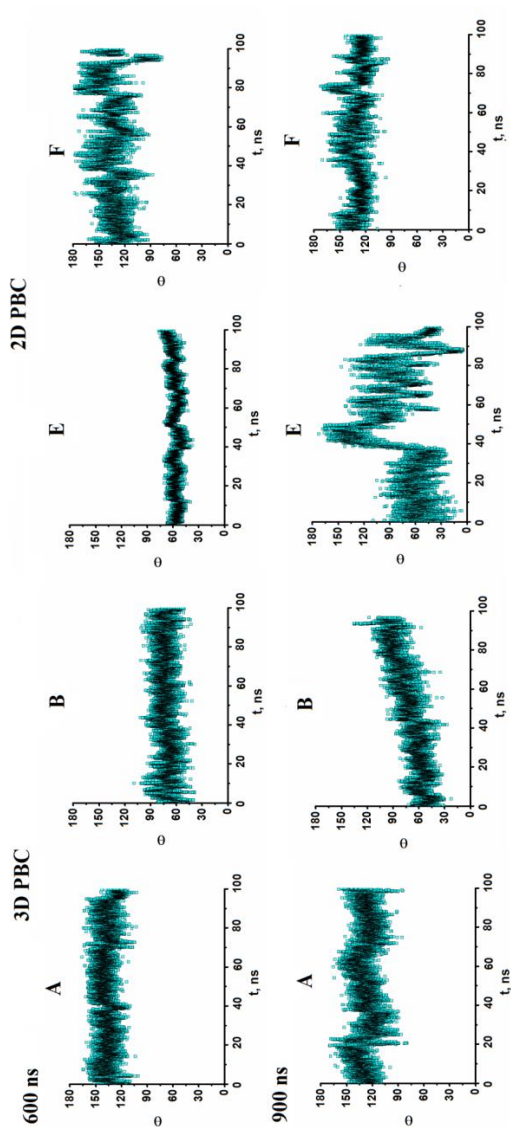
В 3D РВС при *смесения* слой почти не се заселват забранените зони и в последния интервал (900 ns) най-силно застъпени са областите съответстващи на β -лист и на лявовъртяща α -спирала. Тук пертурбацията върху пространствената структура на пептида е по-слаба и предпочетената област е определена от начина на навлизане на комплекса в мембраната. Вижда се и еволюция в структурата на пептида с напредване на симулацията, която се измества предимно към β -лист областта. В 2D РВС също като *DPPC* има заселване в забранените зони породено от затрудненото навлизане на лекарствената частица между липидните глави.

6.7.2 Наклон на DOX спрямо нормалата

За *смесената* система в 3D РВС стремежът на лекарството е да застане почти успоредно на повърхността. Ширината на интервала е голяма и флукуациите се запазват в хода на симулацията, като има нарастване на ъглите до $\sim 120^\circ$. В този случай лекарството е насочено предимно навън от бислоя. При 2D РВС е по-слабо инициализиран процес на преминаване и има обръщане на захарния остатък спрямо повърхността на мембраната. След изтласкването на комплекса от мембраната в края на траекторията интервалът от заемани ъгли се стеснява и се установява постоянна ориентация подобна на тази на комплекса в 3D РВС *DPPC*. Това е индикация за прекратения процес на навлизане. Резултатите показват, че в *смесената* мембрана и при двата вида периодични гранични условия лекарството е участвало при навлизането на комплекса в бислоя. В *смесения* слой при 3D РВС се осъществява навлизане на комплекса, на което съответства и еволюционното поведение в последната част от симулацията. Това е и указание, че процесът на навлизане продължава единствено там.



Фигура 47: Карти на Ramachandran илюстриращи вторичната структура на пептида в два интервала от МД симулациите при 3D (А – DPPC и В – смесен) и 2D (Е – DPPC и F – смесен) периодични гранични условия.



Фигура 48: Еволюция на ъгъла (в градуси) ключван между антрациклиновата част на доксорубин и оста перпендикулярна на повърхността на липидните бислоеве при 3D (A – DPPC и B – смесен) и 2D (E – DPPC и F – смесен) периодични гранични условия.

7. Umbrella sampling симулации

Симулациите тип US позволяват определянето на енергетичните бариери при преминаването на даден обект по определена реакционна координата.

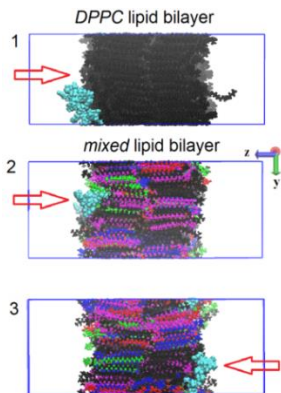
Тъй като от представените дотук резултати стана ясно, че комплексът DOX-CPP се задържа предимно в областта на липидните глави и навлиза много бавно в мембраната може да се предположи, че е налице енергетична бариера, която възпрепятства процеса на транспорт. Затова в следващия етап от работата по дисертацията са приложени US симулации, с които е оценено изменението на свободната енергия при преместване на комплекса от единия до другия край на периодичната кутия в направление нормално на повърхността на липидните бислоеве. С други думи, като реакционна координата е използвана оста z .

7.1 Модели и pulling процедура

За симулациите са съставени три вида модели, които за удобство ще се наричат **1**, **2**, и **3** (Фигура 49). Модел **1** е съставен от *DPPC* липиден бислой с комплекс намиращ се отдолу на мембраната, т. е. при по-малки стойности на z . В модел **2** е използван *смесеният* липиден бислой при време 800 ns, като отново комплексът се намира на повърхността на долния монослой. *Смесената* мембрана не е симетрична както в латерално направление, така и в нормално направление. Това означава, че мястото на комплекса спрямо повърхността на мембраната е от значение. Поради тази причина е изготвен модел **3**, в който комплексът е поставен от другата страна на липидния бислой в сравнение с модел **2**. Използван е кадър при 800 ns от симулацията. В този липиден бислой вече се е осъществило преминаването на две DMPS молекула.

В първия подготвителен етап се прилага външна сила, която да ускори навлизането му в липидните бислоеве и да осигури начални геометрии на US прозорците, в които да има структури по цялото продължение на реакционната координата. Посоката на приложената сила е показана на Фигура 49 и е насочена към центъра на масите на липидния бислой. Този потенциал се въвежда за всички системи с хармоничен потенциал със силова константа 1200 [kJ.mol⁻¹.nm⁻²] между центъра на масата на DOX-CPP и определена референтна

позиция по оста z . В случая референтната позиция е $z = 0$, средата на мембраните. Разстоянието между центъра на масите и нея се изменя с постоянна скорост.

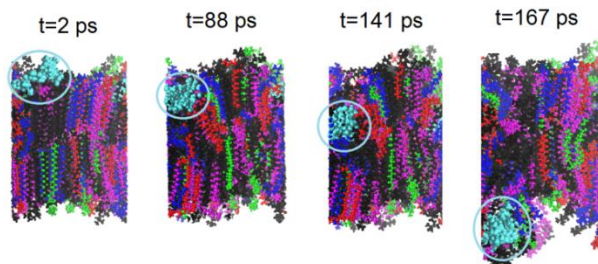


Фигура 49: Начална геометрия на липидните бислоеве и положение на комплекса спрямо тях. С червена стрелка е показана посоката на приложената външна сила.

При провеждането на pulling симулациите е използвана геометрията *direction-periodic*, която позволява изминатото разстояние от частицата да бъде по-голямо от половината от размера на кутията. С тази геометрия приложената сила не се добавя към вириала за изчисление на обема на кутията. Поради тази причина в pulling кода се изключва скалирането на налягането и не се осъществява промяна в обема на кутията. Координатите и силата на цялата „изтеглена“ група се записват на 1 ps. Стъпката, с която се променя позицията на комплекса, е 0.05 nm/ps и дължината на pulling симулациите е съответно: модел 1 – 190 ps; модел 2 – 185 ps; модел 3 – 170 ps. Вижда се, че в модел 3 на комплекса е било необходимо най-малко време, за да прекоси бислоя.

На Фигура 50 е показан начинът, по който комплексът пресича *смесената* мембрана, тръгвайки отгоре, по време на pulling симулацията в модел 3. Навлизането започва в област съдържаща отрицателно заредения DMPS. Положително заредените аргинини се залепват за липида и на следващ

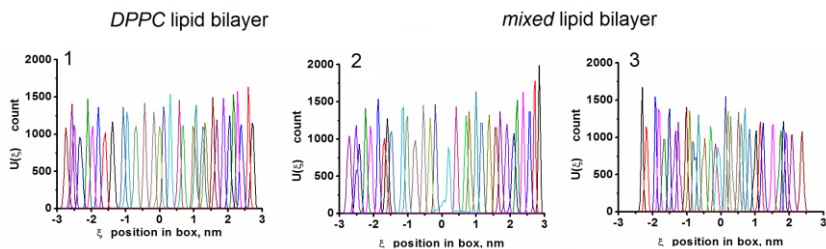
етап леко го изместват по z оста. Този липид участва в целия процес на преминаване на комплекса. След като DOX-CPP достигне средата на липидния бислой много бързо бива изтласкан от мембраната, като увлича със себе си няколко липидни молекули от долния монослой. Въпреки избиването на молекули и образуването на пора в мембраната не се достига нейното разрушаване.



Фигура 50: Механизъм на преминаване на DOX-CPP през *смесения* липиден слой в pulling симулацията на система **3**.

Получените траектории от pulling симулациите се разделят на кадри и от тях се избират такива, които да съответстват точно на 0.2 nm отместване на комплекса по реакционната координата. Тези кадри са начални за т.нар. прозорци, от които започва по една US симулация. При трите вида системи скоростта на процеса е различна и като така броят на избраните кадри също е различен, тъй като е необходимо максимално добро припокриване на хистограмите (Фигура 51). За модел **1** броят прозорци е 32, за **2** е 31 и за **3** е 29. За всеки прозорец се провежда по една umbrella sampling симулация, чиято продължителност е 10 ns. След това се генерира хистограма на силите по реакционната координата в рамките на прозореца.

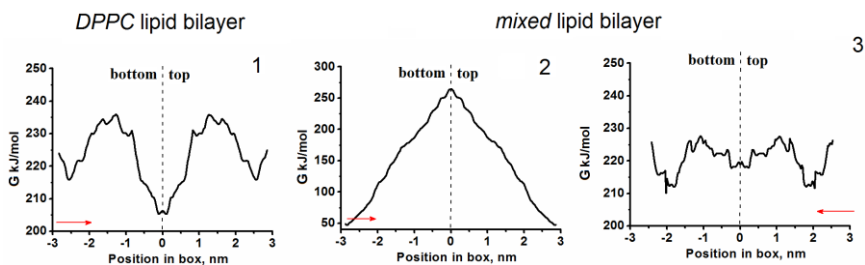
След приключване на всички симулации чрез WHAM метода се построява профилът на потенциала на средната сила за дадената система, от който се определят енергетичните бариери при навлизането на комплекса в мембраните.



Фигура 51: Припокриване на хистограмите получени от съответния брой прозорци след приключване на US симулациите за всеки модел.

7.2 Анализ на PMF профили

На следващата графика (Фигура 52) са показани симетризираните спрямо $z = 0$ профили на свободната енергия.



Фигура 52: Профили на свободната енергия при преминаването на пептид-лекарствения комплекс през липидните бислоеве.. С червена стрелка е показана посоката на навлизане в мембраните.

В модел **1** навлизането се осъществява от $-z$ страната и се наблюдава понижение на енергията в областта на главите, $\Delta G = -9$ kJ/mol. Това предполага комплексът сравнително бързо да навлезе между главите и да се задържи там. Следващият етап от процеса е достигането на комплекса до хидрофобната част от мембраната. За да се осъществи това съединението трябва да преодолее енергетичен бариер с $\Delta G = 20$ kJ/mol. Сравнително високата бариера обаче обяснява наблюдаваното изтласкване на комплекса от DPPC системата в края на

равновесните МД симулации. В средата на мембраната е отчетен рязък спад в енергията от профила става ясно, че DOX-CPP най-вероятно ще остане в *DPPC* мембраната и няма да достигне цитозола, тъй като енергетичният барьер за излизане от хидрофобната сърцевина е $\Delta G = 40$ kJ/mol.

За модел **2** в PMF профила се наблюдава систематично покачване на свободната енергия с навлизане в мембраната. В този случай изчислената бариера е $\Delta G = 216$ kJ/mol. Това показва, че комплексът няма как да премине *смесената* мембрана от долната страна.

В модел **3**, където комплексът навлиза от +z посоката, ходът на свободната енергия има значително по-различна форма. Отново се наблюдава спад в енергията в областта на липидните глави, $\Delta G = -15$ kJ/mol. За достигането до опашките е необходима енергия около $\Delta G = 15$ kJ/mol. Този барьер е по-малък от съответния в *DPPC* бислоя и може да се предположи, че комплексът сравнително лесно ще продължи навлизането в мембраната, когато проникването започва от тази страна. Отново в средата на хидрофобния слой има минимум в профила на свободната енергия $\Delta G = -9$ kJ/mol. Ще се наблюдава известно задържане на комплекса между двата монослоя, но преминаването е възможно, за разлика от другите две системи.

От генерираните PMF профили се получи информация за енергетиката и възможния механизъм на преминаване на DOX-CPP през моделните мембрани. Навлизането на комплекса от горната страна на бислоя е най-изгодният процес. Тези резултати дават основание да се състави допълнителен модел и да се изследва поведението на такава система.

8. Проникване на DOX-CPP

От анализа направен в предходните точки стана ясно, че най-удачна за навлизането на комплекса е *смесената* мембрана в *3D* PBC при *iso-P*. Проведените US симулации показаха, че комплексът би преминал по-лесно от тази страна на липидния бислой, при която DMPS молекулите са с две има по-малко. Това съответства на по-големите стойности на *z* на фигурите по-горе и

налага построяването на допълнителен модел, с който да се разгледа процесът на навлизане.

8.1. Моделна система

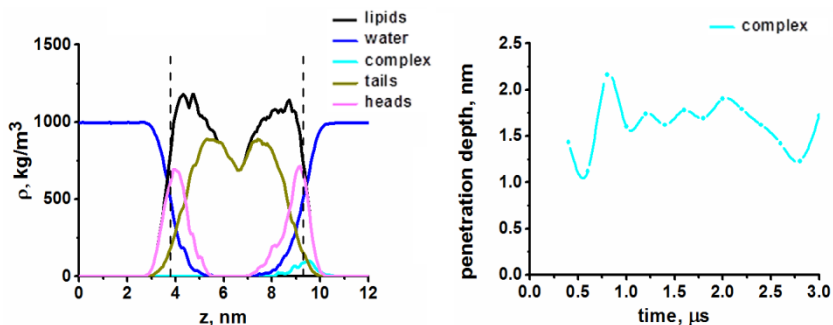
За начална геометрия на системите е използван кадърът, от който стартира pulling симулацията (Фигура 49-3). Общата площ на мембраната е слабо понижена, като е достигнала до 32.21 nm². Началните площи за липид в бислоя са близки до представените в т. 5.4.

Използван е същият изчислителен протокол като описания в т. 4.2. Общата продължителност на продуктивната част от симулацията е значително по-голяма от показаните досега: 3 μ s. В литературата не са открити данни за толкова дълги атомистични молекулно-динамични симулации на системи с подобен брой атоми (44 608). Анализът на траекториите е направен в няколко времеви интервала от по 100 ns, в които поведението на комплекса е по-различно от досега показаното. Акцентът в представените резултати е върху навлизането на комплекса между липидните молекули, а не толкова върху характеризирането на липидния бислой. Представен е общ профил на плътността, от който е определена степента на навлизане на комплекса. Разгледан е електростатичният потенциал в системата и как е повлиян от присъствието на DOX-CPP. Представено е положението на лекарственото вещество във времеви интервали, при които комплексът е най-навлязъл в липидната мембрана.

8.2 Общ анализ

Подобно на предходните системи и за тази е построен профил на плътността, от който е оценена степента на навлизане на комплекса (Фигура 53). В последния етап от симулацията общата дебелина на липидния бислой е 5.51 nm. Тази стойност е малко по-голяма от получената за същата система, при която комплексът се намира отдолу на мембраната – 5.48 nm и дебелината на опашките е намалела: 4.26 nm спрямо 4.47 nm. По-интересна величина е дълбочината на потапяне на главите, тя е 1.29 nm. В тази система вече има промяна в хидратацията на липидите заради наличието на комплекса.

Степента на навлизане на комплекса е изчислена в 14 времеви интервала и еволюцията ѝ в хода на симулацията е представена на Фигура 53, като първият етап е от 300 ns до 400 ns.



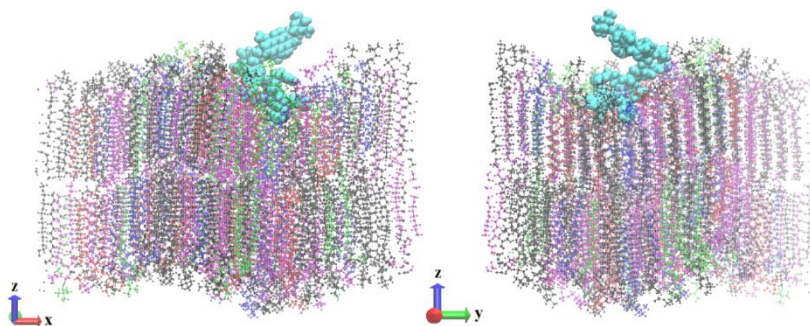
Фигура 53: Профил на плътността нормално на бислой при 3 μ s (ляво) и еволюция на дълбочината на проникване на комплекса в липидния бислой (дясно).

Както се вижда от графиката, процесът на навлизане става постъпково. Частицата избутва част от липидите, след което се отдалечава и настъпва последващо навлизане. Наблюдава се следната тенденция: при по-голямо отдалечаване от главите на следващата стъпка той навлиза в по-голяма степен между тях. В най-голяма степен DOX-CPP е навлязъл при 800 ns. Там дълбочината на проникване е 2.16 nm, което съответства на достигане почти до средата на мембраната. При 2000 ns също е отчетено добро навлизане: 1.91 nm, след което се вижда отблъскване на комплекса от мембраната. Следвайки хода на графиката, може да се очаква на следващ етап още по-дълбоко навлизане на частицата между главите.

Ясно личи, че при навлизането си комплексът избутва липидите навътре (Фигура 54). От предишни изследвания се знае, че при навлизането на същия CPP, но в несвързано състояние, се образува пора, през която освен пептида преминават и водни молекули, но не се дава ясно механизма на образуване на пората.

Скоростта на навлизане на подобни частици през клетъчната мембрана не е известна и е трудно да бъде експериментално измерена. С такава средна

скорост може да се очаква, че комплексът ще достигне цитозола след минимум 10 – 11 μ s. Все още такъв времеви интервал е трудно да бъде проследен с атомистични молекулно-динамични симулации. За живите организми е достатъчно бърз процес и както вече беше отбелязано експериментално е доказано, че се осъществява и води до значително нарастване на количеството на лекарственото вещество в клетките.

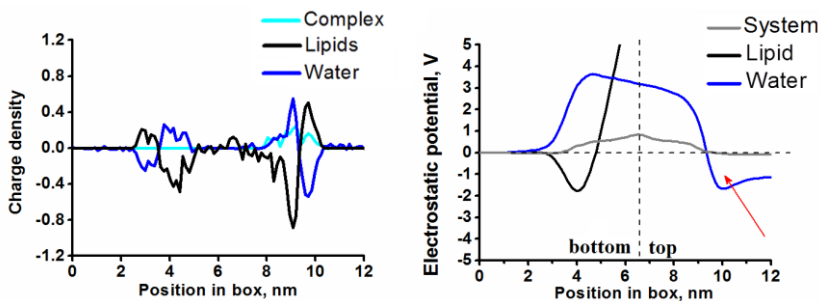


Фигура 54: Състояние на моделната мембрана при най-значимото навлизане на пептид-лекарствения комплекс между главите на липидните молекули – 800 ns; показани са ракурси по осите y (ляво) и x (дясно).

Също така при по-голяма разлика в зарядите на двата монослоя на мембраната е възможно и по-бързото осъществяване на транспортния процес. Подобно на другите системи, и тук е направен анализ на зарядовата плътност и електростатичния потенциал (Фигура 55).

Профилът на зарядовата плътност е подобен на предходните по разпределение на положителните и отрицателните пикове по z оста. Прави впечатление значително увеличаване на пика на отрицателните заряди в ρ_z на липидите от страната, където се намира комплексът. Това предполага съществено имобилизиране на молекулите DMPS поради осъществяващо се електростатично взаимодействие с комплекса. Също така в ρ_z на комплекса се очертава трети пик в близост до средата на липидния бислой. Това разпределение показва, че комплексът почти е преодолел електростатичното

отблъскване от главите и е напълно възможно по-нататъшното му преминаване през мембраната. Цялостно профилите на ρ_z са по-назъбени, което говори за непрекъснато променящите се позиции на зарядите.

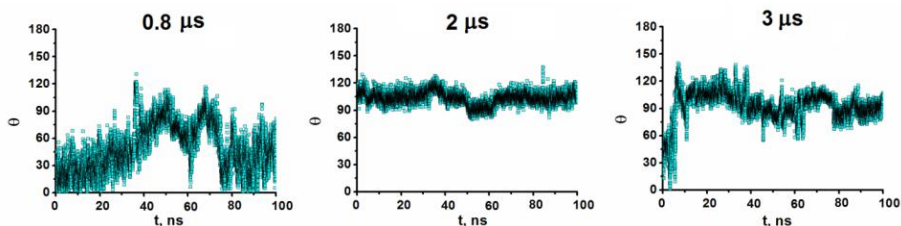


Фигура 55: Профил на зарядовата плътност в направление нормално на повърхността на мембраната (ляво) и профил на електростатичния потенциал (дясно) при 3 μ s. С червена стрелка е означена позицията на комплекса.

В профила на електростатичния потенциал за цялата система очаквано няма съществена разлика спрямо другите модели. Получените са следните стойности за потенциалите: $\Delta\psi = 0.22$ V, $\psi_s = 0.16|-0.05$ V, $\chi_{lm} = -0.211|-0.01$ V. От всички разгледани системи само при тази има пълно съвпадение с експерименталните данни. Също така отново в областта на комплекса е налице минимум в потенциала на водата. Оттук се вижда, че този пад се дължи единствено и само на DOX-CPP, а не е вследствие компенсирането на повърхностни заряди или изчислителна неточност. Освен това минимумът в профила на липидите се дължи на различния брой заредени липидни молекули от двете страни на мембраната и не е свързан с наличието на комплекса. Може да се изкаже предположението, че веднъж преминал лекарственият преносител ще остане от вътрешната страна на мембраната и няма да се върне обратно, което пък гарантира стартиране на процеса на освобождаване на лекарството и на осъществяване на лекарственото действие.

Интересно е да се проследи и положението на лекарството спрямо повърхността на мембраната при транспортния процес. В трите времеви

интервала, при които бе отчетено най-добро навлизане, е пресметнат ъгълът на DOX с z оста, както е направено в т. 5.7.2.



Фигура 56: Еволюция на ъгъла сключван между антрациклиновата част на доксорубин и оста перпендикулярна на повърхността на липидния бислой.

Въпреки че при 800 ns се осъществява най-доброто навлизане, областта от заемани стойности на DOX е широка и няма точно предпочетена позиция. Това също е възможна причина за отблъскването на комплекса от мембраната. В хода на симулацията флукуациите в стойностите на ъгъла намаляват и при 2 μs се установява средна стойност около 100° . В този времеви интервал комплексът е навлязъл между главите и не се наблюдава изтласкването му от липидния бислой. Захарният остатък, който е положително зареден, се насочва към мембраната и най-вероятно участва в процеса. При 2.8 μs е отчетено лекото излизане на комплекса (Фигура 53) от липидните глави и около 3 μs започва наново да навлиза. Това си личи и по поведението на DOX в последния времеви интервал показан на Фигура 56. В началото на интервала се заема по-широка област от ъгли и при навлизането те отново се стабилизират около 100° . Оттук може да се направи изводът, че DOX има предпочетено положение спрямо z оста при навлизането на комплекса. Най-вероятно при осъществяване на процеса по-голямото количество отрицателен заряд на повърхността привлича положителния захарен остатък.

В тази моделна система се наблюдава добро навлизане на комплекса, въпреки установения ‚пулсиращ‘ механизъм. Отчетената средна скорост на навлизане е 0.54 nm/ μs . От профила на зарядовата плътност се вижда, че преносителят почти е преодолял електростатичното отблъскване и е възможно да продължи навътре в бислоя. При навлизането лекарството се обръща със

захарния си остатък към мембраната. От всички изследвани системи тази еднозначно е най-подходяща за определяне механизма на навлизане на DOX-CPP и при нея се осъществява най-голямо проникване между липидните глави.

9. Заключение

Целта на тази работа бе да се установи механизмът на проникване на пептид-лекарствен комплекс DOX-CPP през моделна клетъчна мембрана на молекулно ниво. За постигането ѝ се наложи да бъде проверено влиянието на няколко изчислителни параметъра и да се намерят моделни системи на еритроцитната клетъчна мембрана максимално доближаващи се до тази в човешкия организъм. Бяха съставени два вида липидни бислоеве: един изграден само от молекули (*DPPC* мембрана) и втори съставен от *DPPC*, *DPPE*, *DMPS*, *DLPC* и *PSM* липидни молекули в съотношение подобно на това в плазмената мембрана (смесена мембрана). Беше установено, че липидният състав съществено влияе върху разпределението на масовата и зарядовата плътност, площта за липид и е от решаващо значение за взаимодействието с комплекса.

Молекулно-динамичните симулации бяха проведени при два начина на скалиране на налягането: изотропно (*iso-P*) и полуизотропно (*semiiso-P*). Установи се, че методът на скалиране на налягането влияе върху параметъра на порядък на опашките, върху площта на липидите и върху латералния дифузионен коефициент. От получените данни стана видно, че изотропното скалиране е по-подходящо за анализ на изследвания транспортен процес.

За да се провери дали липидните бислоеве взаимодействат със своя периодичен образ по *z* направлението системите бяха поставени в условия на вакуум и бяха разгледани в два типа периодични гранични условия: *2D PBC* с вакуум и *3D PBC* без вакуум. Видът на граничните условия значимо повлия на латералния дифузионен коефициент и на параметъра на порядък и в по-слаба степен на площта на липидите и разпределението на масовата плътност. От използваните гранични условия за изчислението на зарядовата плътност и електростатичния потенциал профилите на двете съществено се различаваха в *2D* и *3D PBC*. По-добро навлизане на комплекса бе отчетено в *3D PBC* и може

да се заключи, че при тези размери на кутиите липидните бислоеве не взаимодействат значимо със своя периодичен образ.

С така подобрите изчислителни параметри бяха проведени *umbrella sampling* симулации, чрез които да се определи енергетичната бариера за преминаването на комплекса през двата вида липидни бислоеве. Частицата-преносител бе поставена до условно наречената „долна“ страна на мембраните. Тъй като *смесената* система не е изцяло симетрична бе разгледана възможността за преминаване и през „горната“ страна на бислоя. Установи се, че енергетично най-изгодният процес ($\Delta G = 15 \text{ kJ/mol}$) е при *смесената* система през „горната“ страна на мембраната. Този резултат даде основание да се построи и такъв модел, като еволюцията на процеса беше разгледана в продължение на 3 μs . От представените системи най-подходяща за определяне механизма на навлизане на DOX-CPP е тази. Механизмът на проникване е постъпково с редуващи се навлизане и изтласкване на комплекса. Очаква се образуване на мини пора в моделната мембрана и пептидната частица да увлече няколко липидни молекули при излизането си.

Проведеното изследване доведе до установяване на адекватен модел на клетъчна мембрана и подходящ изчислителен протокол за изследване на процеса на преминаване на биоактивни комплекси през липидната част на бислоя. Също така беше разкрит на молекулно ниво механизма на навлизане на пептид-лекарствен комплекс, както и положението на енергетичните бариери, които трябва да бъдат преодолени, за да се извърши успешно транслокацията. Беше показано, че конкретният пептид е подходящ преносител за антрациклинови антибиотици и че самото лекарство също участва активно в процеса на пренос през клетъчната мембрана.

10. Приноси

От извършената работа могат да бъдат формулирани следните научни приноси:

1. Установено е поведението на смесени липидни бислоеве при физиологична температура и налягане в слабо изследвана до момента фазова точка и са открити разликите спрямо еднокомпонентен липиден модел.

2. Съставен е модел на смесен липиден бислой с хомогенно разпределение на молекулите и е показано влиянието на състава за навлизането на лекарствения комплекс в мембраната.

3. Забелязани и коментирани са ефекти, които досега не са наблюдавани поради липсата на толкова дълги симулации (1 μ s), а именно – flip-flop на отрицателно заредени липидни молекули между двата монослоя на мембраната и реализиране на ‚нежелан‘ фазов преход на втвърдяване на мембраната при полуизотропен метод за скалиране на налягането, който не позволява навлизане на комплекса. Това позволи да се заключи, че наличието на течно подредено състояние на мембраната е ключово за транспортния процес.

4. Получена е информация за механизма на навлизане на пептид-лекарствения комплекс в клетъчната мембрана и е дадена оценка за енергетичните бариери и характеристикния времеви период, от който да се определи продължителността на такъв транспортен процес.

5. Проведена е атомистична МД симулация с продължителност 3 μ s, като до момента не е получавана такава.

11. Литература

- [1] I. Nakase, H. Akita, K. Kogure, A. Graslund, U. Langel, H. Harashima, S. Futaki, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1132.
- [2] Я. Цонева, *Молекулно-динамично структурно изследване на пептид-лекарствен комплекс* (дипломна работа), София, **2012**.
- [3] A. Rabbani, J. Davoodi, *Gen. Pharmacol.* **1994**, 25, 787.
- [4] K. M. Tewey, *Science* **1984**, 226, 466.
- [5] M. Lelle, S. U. Frick, K. Steinbrink, K. Peneva, *J. Peptide Sci.* **2014**, 20, 323.
- [6] E. J. Luna, A. L. Hitt, *Science* **1991**, 258, 955.
- [7] S. Chien, K. L. Sung, R. Skalak, S. Usami, A. Tözeren, *Biophys. J.* **1978**, 24, 463.
- [8] P. L. Yeagle, *The Membranes of Cells*, Second Edition, Academic Press, San Diego CA, **1993**.
- [9] W. S. Singleton, M. S. Gray, M. L. Brown, J. L. White, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **1965**, 42, 53.
- [10] H. Rose, M. Oklander, *J. Lipid Res.* **1965**, 6, 428.
- [11] P. Comfurius, R. F. Zwaal, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 488, 36.
- [12] B. Ramstedt, J. P. Slotte, *FEBS Lett.* **2002**, 531, 33.
- [13] G. Gavin, E. W. McHenry, *J. Biol. Chem.* **1941**, 139, 485.
- [14] R. F. Irvine, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1992**, 4, 212.
- [15] J. A. Virtanen, K. H. Cheng, P. Somerharju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 4964.
- [16] G. M. Cooper, R. E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach*, Fourth Edition, ASM Press, Washington DC, USA **2007**.
- [17] M. K. Jain, *Introduction to Biological Membranes*, Wiley, New York, USA **1988**.
- [18] Y. Tsoneva, H. R. A. Jonker, M. Wagner, A. Tadjer, M. Lelle, K. Peneva, A. Ivanova, *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, 3000.
- [19] M. Lelle, S. U. Frick, K. Steinbrink, K. Peneva, *J. Peptide Sci.* **2014**, 20, 323.
- [20] M. B. Jackson, *Molecular and Cellular Biophysics*, Cambridge University Press, New York, USA **2006**.
- [21] И. Панайотов, *Увод в биофизикохимията*, Университетско издателство „Св. Климент Охридски“, София, **2007**.
- [22] R. A. Demel, W. S. G. van Kessel, R. F. Zwaal, B. Roelofsen, L. L. van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, 406, 97.
- [23] M. Derek, *Biochim. Biophys.* **1996**, 1286, 183.
- [24] D. M. Engelman, *Nature* **1969**, 223, 1279.

Публикации по темата на дисертацията:

1. Testing the limits of model membrane simulations – bilayer composition and pressure scaling, Nikoleta Ivanova, Anela Ivanova, *J. Comput. Chem.* **2017**, *изпратена за печат*
2. Complex systems for drug transport across cell membranes, Nikoleta Ivanova, Yana Tsoneva, Nina Ilkova, Anela Ivanova, *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education* **2015**, 6, 825.
3. Influence of the type of periodic boundary conditions on the transport of drug-peptide complex across model cell membranes, Nikoleta Ivanova, Anela Ivanova **2017**.
(в подготовка за изпращане)
4. Energy barriers for the transfer of a drug-peptide complex through lipid bilayers obtained from umbrella sampling simulations, Nikoleta Ivanova, Anela Ivanova **2017**.
(в подготовка за изпращане)
5. Elucidation of the penetration mechanism of a drug-CPP complex through a model erythrocyte membrane by atomistic molecular dynamics simulations, Nikoleta Ivanova, Anela Ivanova **2017**.
(в подготовка за изпращане)

Участия в конференции и семинари по темата на дисертацията

1. **XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти**, София, България, 17-19 май 2017 г. с устен доклад “Влияние на изчислителната процедура върху проникването на пептид-лекарствен комплекс в моделни клетъчни мембрани“, N. Ivanova, A. Ivanova.
2. **Научна сесия на Факултет по химия и фармация**, София, България, 24.11. 2016 г. с постерно съобщение “Влияние на изчислителния протокол върху навлизането на пептид-лекарствен комплекс в клетъчни мембрани”, N. Ivanova, A. Ivanova.

-
3. **Ninth National Conference on Chemistry, Science and Technology for Better Life**, Sofia, Bulgaria, 29.09. - 01.10. 2016 г. с устен доклад „Transfer of a drug-peptide complex through model cell membranes“, N. Ivanova, A. Ivanova.
 4. **Научен семинар на Катедра „Физикохимия“ на ФХФ**, София, България, 06. 06. 2016 г с устен доклад „Молекулно-динамични симулации на пептид-лекарствен комплекс до повърхността на клетъчни мембрани“, N. Ivanova, A. Ivanova.
 5. **XV Национална конференция по химия за студенти и докторанти**, София, България, 18-20 май 2016 г. с устен доклад „Взаимодействие на пептид-лекарствен комплекс с клетъчни мембрани“, N. Ivanova, A. Ivanova.

Други публикации и участия:

1. Parallel Stability Analysis of Membrane Lamellar Structures and Foam Films, Nikoleta Ivanova, Roumen Tsekov, *Chemistry* **2015**, 24, 877.
2. Comparison of Thermal Fluctuations in Foam Films and Bilayer Structures, Nikoleta Ivanova, Roumen Tsekov, *Ann. Univ. Sofia, Fac. Chem.* **2013**, 104, 93.
1. **XV deMon Developers Workshop**, May 28-31, 2015, Sofia, Bulgaria с постерно съобщение „Parallel stability analysis of membrane lamellar structures and foam films“, N. G. Ivanova, R. Tsekov.
2. **XI Национална конференция по химия за студенти и докторанти**, София, България, май 2012 г. с устен доклад “Взаимодействие между тангенциалните диполни моменти на цвитерйонни ПАВ в 2D-кристали”, N. G. Ivanova, R. Slavchov.