



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

**ΑΤΟΜΙΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ
ΕΝΤΟΣ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ**

Αμπντουλχάντι Βιργινία

Επιβλέπων:

Καθηγητής: Θεόδωρος Ν. Θεοδώρου

Αθήνα, Φεβρουάριος 2017

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract.....	6
Ευχαριστίες.....	7
Εισαγωγή	9
1.1. Λιπίδια και λιπιδικές μεμβράνες	11
1.2. Πολυμορφισμός των λιπιδίων	12
1.3. Σύστημα DPPC και νερού	13
1.4. Ειδικά για το DPPC	15
1.5. Φαρμακοδυναμικές Ιδιότητες του Candesartan-cilexetil	16
1.5.1. Φαρμακοδυναμικές ιδιότητες.....	16
1.5.2. Φαρμακοκινητικές ιδιότητες	20
1.5.3. Θεραπευτικές ενδείξεις του Candesartan-cilexetil	21
1.6. Μηχανισμός Υπέρτασης	22
1.6.1. Ορισμός	22
1.6.2. Παθοφυσιολογία της αρτηριακής υπέρτασης	22
1.7. Αλληλεπίδραση Candesartan-cilexetil σε διπλοστοιβάδα DPPC.....	27
2.1. Εισαγωγή	32
2.1.1. Στατιστικό σύνολο (ensemble).....	32
2.2. Εξισώσεις κίνησης	33
2.3. Συναρτήσεις συσχέτισης (correlation functions)	35
2.4. Υπολογισμός αλληλεπιδράσεων μικρής και μεγάλης εμβέλειας	36
2.4.1. Πεδίο δυνάμεων (ForceField)	37
2.4.2. Συνθήκες διεξαγωγής των ατομιστικών προσομοιώσεων.....	39
2.5. Μέθοδος Ανάλυσης Σταθμισμένου Ιστογράμματος (WHAM) και Υπολογισμός της Δυνητικής Μέσης Δύναμης (PMF).....	40
2.6. Μία ενδεδειγμένη επισκόπηση των εξαρτημάτων του Υπερυπολογιστή ARIS.....	41
Κεφάλαιο 3: Υπολογιστικό μέρος	48
3.1. Περιγραφή των προσομοιώσεων	48
3.2 Υπολογισμός Δυναμικών Ιδιοτήτων του συστήματος	52
Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα από τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων και μελλοντικές μελέτες.....	70

4.1: Συμπεράσματα από αποτελέσματα προσομοιώσεων κι έλεγχος συμβατότητας με αντίστοιχες δημοσιεύσεις πειραματικών μελετών	70
4.2 Μελλοντικές προοπτικές έρευνας	73
Βιβλιογραφία	74

Περίληψη

Η παρούσα Διπλωματική εργασία αφορά τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων αντιυπερτασικού φαρμάκου εντός λιπιδικής μεμβράνης, η οποία αποτελείται από 72 μόρια DPPC (διπαλμιτοϋλο φωσφατιδυλο χολίνη) στην υγροκρυσταλλική φάση. Συγκεκριμένα, το προαναφερθέν φάρμακο είναι η καντεσαρτάνη (candesartan cilexetil) και ανήκει στην κατηγορία των ειδικών ανταγωνιστών των υποδοχέων της αγγειοτασίνης II (AT₁R) των οποίων ο μηχανισμός δράσης μπορεί να περιγραφεί από ένα μοντέλο δύο σταδίων.^[1] Το πρώτο εξ αυτών είναι η είσοδος του φαρμάκου εντός λιπιδικής μεμβράνης και ακολούθως, κατά το δεύτερο στάδιο, το φάρμακο διαχέεται μέχρι προσδέσεως στο ενεργό κέντρο της AT₁R.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη του πρώτου σταδίου μέσω ατομιστικών προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής μεγάλης κλίμακας που πραγματοποιήθηκαν στον ελληνικό υπερυπολογιστή ARIS. Αρχικά, το φάρμακο τοποθετείται στην υδατική φάση και μελετάται λεπτομερώς η διαδικασία εισόδου στο εσωτερικό της λιπιδικής μεμβράνης, η οποία είναι προσανατολισμένη με τρόπο ώστε ο άξονας Z να είναι κάθετος στις δύο μονοστιβάδες της. Το εν λόγω φάρμακο διεισδύει εύκολα στο υδρόφοβο τμήμα της λιπιδικής φάσης εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητάς τους στην υδατική φάση. Το προτιμητέο βάθος, εκφρασμένο ως απόσταση κατά τον άξονα Z, καθορίζεται αφενός από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής διάρκειας εκατοντάδων νανοδευτερολέπτων και αφετέρου από προσομοιώσεις δειγματοληψίας κάλυψης (umbrella sampling).

Από τις προσομοιώσεις δειγματοληψίας κάλυψης υπολογίζονται μεγέθη όπως είναι το προτιμητέο βάθος του φαρμάκου στη μεμβράνη, η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας λόγω της μεταφοράς του φαρμάκου από τη μία στην άλλη φάση, καθώς και κατά πόσον είναι εφικτή η μεταπήδηση των μορίων του φαρμάκου μεταξύ των δύο μονοστιβάδων. Ακόμη υπολογίζονται δυναμικές ιδιότητες όπως είναι οι μερικές πυκνότητες κατά μήκος του άξονα Z, οι μέσες τετραγωνικές μετατοπίσεις για υπολογισμό πλευρικών συντελεστών διάχυσης (επίπεδο XY), παράμετροι δευτέρας τάξης, δεσμοί Υδρογόνου των μορίων DPPC και του φαρμάκου. Τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν είναι σε εξαιρετική συμφωνία τόσο με υπολογιστικά όσο και με πειραματικά δεδομένα.^[2] Επίσης, η ισχύς της παρούσης μεθοδολογίας έχει εφαρμοστεί επιτυχώς και σε άλλα αντιυπερτασικά φάρμακα.^[3,4]

Abstract

Studying the interactions between an antihypertensive drug and the lipid membrane, which consists of 72 molecules of DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) in the liquid-crystalline phase, is the objective of this Diploma thesis. Specifically, the considered drug is the candesartan (candesartan-cilexetil) belongs to the category of the specific inhibitors of the angiotensin II receptor (AT₁R) and its mechanism of action can be described by the two-stage model^[1]; the first stage is the penetration of the drug into the lipid membrane, while in the second stage the drug diffuses until it binds to the active center of the AT₁R.

The purpose of this thesis is to study the first stage of the mechanism through atomistic Molecular Dynamics (MD) simulations that were conducted to the Greek supercomputer ARIS. Initially, the drug is placed in the aqueous phase where the process of entering the inner part of the lipid membrane, which is oriented in a way that the axis Z is perpendicular to the two monolayers, is analysed in detail. The drug easily penetrates in the hydrophobic part of the lipid phase due to its low solubility in the aqueous phase. The preferred depth, expressed as a distance along the Z axis, is on the one hand determined by Molecular Dynamics simulations lasting hundreds of nanoseconds and on the other hand by using the umbrella sampling method.

The preferred depth of the drug in the membrane, the difference in free energy due to the transfer of the drug from one phase to the other and the feasibility of switching of the molecules between the two monolayers are calculated by the umbrella sampling method. Moreover, dynamical properties such as the partial density profiles along the Z axis, the mean square displacements in order to determine the lateral diffusion coefficients (plane XY), the deuterium-order parameters, the hydrogen bonds of the DPPC molecules and drug are also calculated. The results presented are in excellent agreement with both computational and experimental data.^[2] Also, the validity of this methodology has been successfully applied to other antihypertensive drugs.^[3,4]

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Υπολογιστικής Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών, το οποίο διευθύνεται από τον καθηγητή Θεόδωρο Ν. Θεοδώρου. Με την επιτυχή διεκπεραίωση της Διπλωματικής κλείνει ο κύκλος των προπτυχιακών μου σπουδών αποκομίζοντας πλούσια γνώση, ενδιαφέρουσες εμπειρίες και σωστό προσανατολισμό για τα μετέπειτα επαγγελματικά μου εγχειρήματα. Επίσης, αποτελεί το εφιαλτήριο για τη χάραξη μίας φιλόδοξης πορείας στον Τομέα της Χημικής Μηχανικής.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή της Διπλωματικής μου εργασίας κ. Θεοδώρου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου ένα ρηξικέλευθο και καινοτόμο θέμα στον κλάδο των μοριακών προσομοιώσεων που αφορά το κομμάτι των βιομορίων, συναντώντας εύστοχα τις προτιμήσεις και την κλίση μου προς αυτόν τον κλάδο. Ο κ. Θεοδώρου αποτελούσε πάντα για μένα ένα πρότυπο επιστήμονα, διδάσκοντα αλλά και ανθρώπου, που πάντοτε προσέφερε τη βοήθειά του και μεταλαμπάδευε τη γνώση του με μεγάλη ευχαρίστηση. Χαίρομαι πάρα πολύ που συνεργάστηκα μαζί του σε διαφορετικά φάσματα των προπτυχιακών μου σπουδών.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα Γρηγόρη Μεγαριώτη που αποτέλεσε κινητήρια δύναμη της Διπλωματικής μου Εργασίας. Ήταν πάντα πρόθυμος να αναλύσει όλες μου τις απορίες, να δώσει εξαιρετικές συμβουλές και να ενισχύσει τη γνώση μου πάνω σε ένα κομμάτι αρκετά ειδικευμένο στο οποίο δύσκολα άλλοι προπτυχιακοί φοιτητές έχουν δυνατότητα να εντρυφήσουν. Μέσα από συνεχείς αλληλεπιδράσεις και τροφή για σκέψη αλλά και μέσα από το συγγραφικό του έργο δημιούργησε ένα πλαίσιο όπου μπορούσα συνεχώς να εξελιχθώ και να εμβαθύνω γνωσιολογικά στο συγκεκριμένο επιστημονικό τομέα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Υπολογιστικής Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών για την όμορφη ατμόσφαιρα και διαρκή υποστήριξη τους, τον Ορέστη Γ. Ζιώγο, Στέφανο Κωνσταντινόπουλο, Άρη Σγούρο, Αποστόλη Λάκκα, Κωνσταντίνο Ζηνέλη, Χρήστο Μπάρδα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στο Μιχάλη Κιτσία και τη συνεργασία που αναπτύξαμε με το παράρτημα της φαρμακευτικής εταιρίας Astra Zeneca στην Αθήνα, ελληνικό προμηθευτή του φαρμάκου που αναλύθηκε στην παρούσα Διπλωματική με δεδομένα από πρόσφατες κλινικές μελέτες και μελέτες ελέγχου ποιότητας.

Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω ένα ευχαριστώ και στους συναδέλφους μου στο Διεθνές Προεδρείο του εθελοντικού οργανισμού για Ευρωπαίους φοιτητές Μηχανικούς που

δραστηριοποιούμαι για την αρωγή τους και την αμέριστη εμπιστοσύνη που δείχνουν στη δουλειά μου καθημερινώς.

Αυτή η Διπλωματική Εργασία υποστηρίχθηκε από υπολογιστικό χρόνο που διατέθηκε από το Ελληνικό Δίκτυο Έρευνας και Τεχνολογίας στην εθνική HPC παροχή – ARIS- υπό το έργο *IDs pr001042 (MultiCLC) and pr002023 (HMSM)*.

This work was supported by computational time granted from the Greek Research & Technology Network (GRNET) in the National HPC facility –ARIS- under project IDs pr001042 (MultiCLC) and pr002023 (HMSM).

Εισαγωγή

Η παρούσα Διπλωματική εργασία πραγματεύεται ατομιστικές προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD) φαρμάκων σε διπλοστιβάδες λιπιδικών μεμβρανών και ειδικότερα του φαρμάκου candesartan-cilexetil και της DPPC λιπιδικής μεμβράνης. Μείζων σκοπός της εργασίας είναι ο υπολογισμός χαρακτηριστικών ιδιοτήτων σε θερμοδυναμική ισορροπία χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Μοριακής Δυναμικής (MD) με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος **GROMACS**.

Υψηλής σημασίας απεδείχθη η αρωγή του Τμήματος Τροποποίησης κι Ελέγχου Ποιότητας της εταιρίας Astra Zeneca για την πολύτιμη βοήθειά τους στην άμεση παροχή πειραματικών αποτελεσμάτων για το candesartan-cilexetil, προϊόν που προμηθεύεται η εταιρία και πραγματοποιεί κλινικές μελέτες.

Η διπλωματική εργασία δομείται σε τέσσερα κεφάλαια εκ των οποίων τα δύο πρώτα αποτελούν το θεωρητικό τμήμα της διπλωματικής που εκπονείται, ενώ τα υπόλοιπα δύο σχετίζονται με την εξαγωγή και παρουσία των αποτελεσμάτων που υπολογίστηκαν. Η προσομοίωση βιομορίων (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, κτλ) είναι ένας τομέας που προσελκύει πολυάριθμες δημοσιεύσεις λόγω των εφαρμογών τους σε Βιολογία, Ιατρική και Χημεία. Στη συγκεκριμένη διατριβή έχουμε εστιάσει την προσοχή μας μόνο σε λιπιδικές μεμβράνες οι οποίες παρεμπιπτόντως ανήκουν στη κατηγορία των λυοτροπικών υγρών κρυστάλλων, λόγω της εξάρτησης από τη συγκέντρωση του διαλύτη των σχηματιζόμενων φάσεων

Το πρώτο κεφάλαιο επικεντρώνεται σε βασικές έννοιες των βιομορίων, αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων και λιπιδικών μεμβρανών, περιγραφή των μορίων DPPC και candesartan-cilexetil, του διαγράμματος φάσης DPPC-H₂O, με εκτενή αναφορά στο μηχανισμό της υπέρτασης.

Το δεύτερο κεφάλαιο διατίθεται για την εξέταση στατιστικών συνόλων τα οποία έχουν ιδιαίτερη σημασία στις μοριακές προσομοιώσεις αφού επιβάλλουν μακροσκοπικούς περιορισμούς στο κουτί προσομοίωσης (λ.χ σταθερός όγκος, σταθερή πίεση και θερμοκρασία). Στη συνέχεια περιγράφεται η μέθοδος της Μοριακής Δυναμικής η οποία θεωρείται μια από τις κλασσικές μεθόδους προσομοίωσης. Ακόμα αναφέρεται λεπτομερώς η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία αρχικών δομών και απεικονίσεων του συστήματος candesartan-cilexetil-DPPC και νερό για συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του candesartan-cilexetil στη διπλοστιβάδα της λιπιδικής μεμβράνης σε υδατικό περιβάλλον.

Το τρίτο κεφάλαιο επικεντρώνεται στα υπολογιστικά αποτελέσματα που προκύπτουν μετά την επεξεργασία των τροχιών των προσομοιώσεων. Αυτά τα υπολογιστικά αποτελέσματα συνίστανται στον προσδιορισμό χαρακτηριστικών ιδιοτήτων όπως προφίλ πυκνότητας, μέσες τετραγωνικές μετατοπίσεις, αλληλεπιδράσεις λόγω σχηματισμών δεσμών Υδρογόνου, παράμετρος δευτέρας τάξης και ανάλυση σύγκρισης συμβατότητας με τα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Το τελευταίο κεφάλαιο συνίσταται από την εξαγωγή συμπερασμάτων με βάση τις υπολογιστικές λεπτομέρειες του τρίτου κεφαλαίου. Επίσης στο ίδιο κεφάλαιο συμπεριλαμβάνονται και προτάσεις για μελλοντική έρευνα και ολοκληρώνουν τη διάρθρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Κεφάλαιο 1: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιπιδικών μεμβρανών και φαρμάκων

1.1. Λιπίδια και λιπιδικές μεμβράνες

Τα λιπίδια είναι οργανικά μόρια που υπάρχουν στη φύση και μπορούν να απομονωθούν κατά την εκχύλιση κυττάρων και ιστών σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες.[85] Η συστηματική μελέτη των λιπιδίων αναφέρεται ως lipidomics και είναι ιδιαίτερα σημαντική για την Κυτταρική Βιολογία. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ταξινομήσεις λιπιδίων οι οποίες να είναι συμβατές με τις ανάγκες της Βιοπληροφορικής (Bioinformatics), ώστε να είναι όσο το δυνατόν ευκολότερη η διαχείριση και αξιοποίηση των δεδομένων που προκύπτουν από τον επιστημονικό κλάδο. Όπως φαίνεται παρακάτω, διακρίνονται οκτώ κατηγορίες λιπιδίων, οι οποίες αναφέρονται στον Πίνακα 1.1. Το λιπίδιο που θα προσομοιωθεί στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής είναι το DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine (Διπαλμιτούλο φωσφατιδυλο χολίνη)), το οποίο ανήκει στη κατηγορία των γλυκεροφωσfolιπιδίων (GP). Αυτά τα λιπίδια βρίσκονται στη φύση και είναι βασικά συστατικά των λιπιδικών διπλοστοιβάδων στα κύτταρα.[86]

Κατηγορία	Συντομογραφία
Fatty acyls (ακύλια λιπαρών οξέων)	FA
Glycerolipids (γλυκερολιπίδια)	GL
Glycerophospholipids (γλυκεροφωσfolιπίδια)	GP
Sphingolipids (σφιγγολιπίδια)	SP
Sterol lipids (στερολικά λιπίδια)	ST
Prenol lipids (πρενολικά λιπίδια)	PR
Saccharolipids (σακχαρολιπίδια)	SL
Polyketides (πολυκετίδια)	PK

Πίνακας 1.1: Κατηγορίες λιπιδίων

1.2. Πολυμορφισμός των λιπιδίων

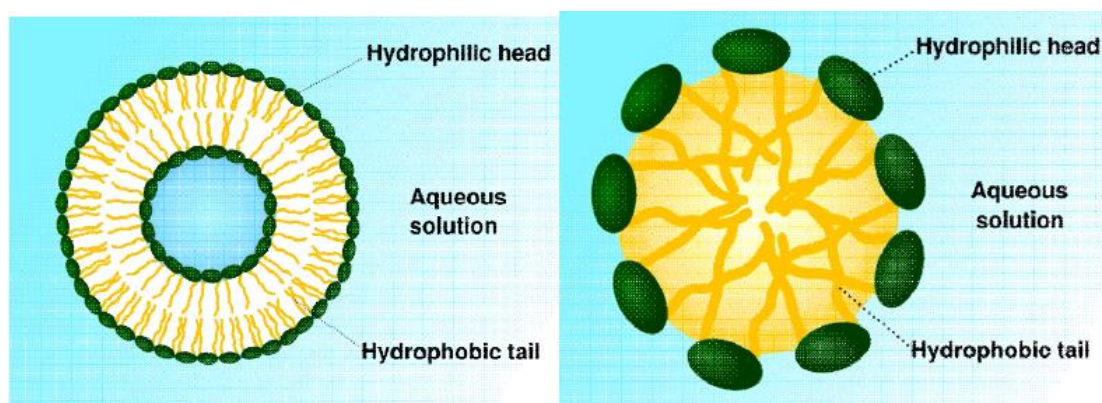
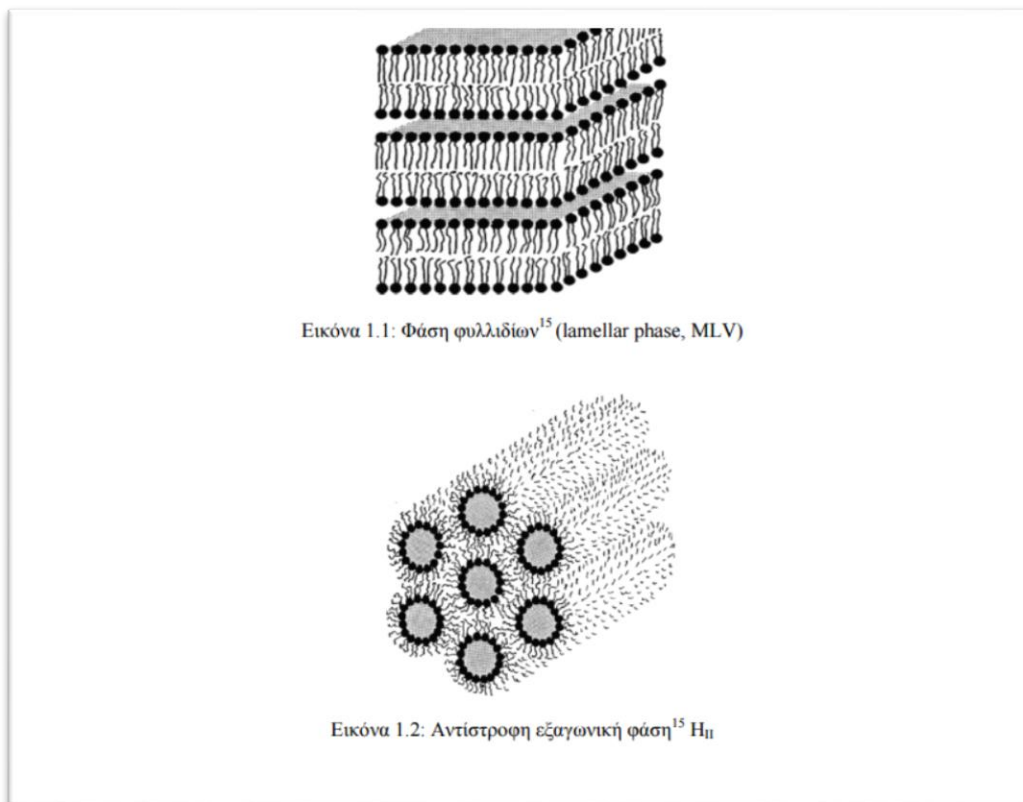
Τα λιπίδια παρουσία ύδατος στις βιολογικές μεμβράνες σχηματίζουν πρωτίστως διπλοστιβάδες. Μερικές φορές η απλούστερη οργανωμένη φάση που σχηματίζεται από διπλοστιβάδες αναφέρεται ως φάση φυλλιδίων (lamellar phase) για να διακριθεί από την περίπτωση των δισυνεχών κυβικών φάσεων (bicontinuous cubic phases), στις οποίες πάλι τα λιπίδια σχηματίζουν διπλοστιβάδες.^[87] Εν συντομία η διαφορά είναι ότι η κυβική φάση αποτελεί μια τρισδιάστατη δομή, ενώ το σύνηθες είδος διπλοστιβάδας αποτελεί μια επίπεδη δομή δύο διαστάσεων.

Μια επίπεδη διπλοστιβάδα πολύ μεγάλης έκτασης θα είχε υδρόφοβες άκρες οι οποίες θα ήταν εκτεθειμένες στην υδατική φάση. Σαφώς κάτι τέτοιο θα αποτελούσε παράγοντα αποσταθεροποίησης, παρόλο που στην περίπτωση των διοργανωμένων κυτταρικών μεμβρανών προβλέπεται η ύπαρξη τμημάτων επίπεδης διπλοστιβάδας με εκτεθειμένες υδρόφοβες άκρες. Όμως, σε αυτή τη περίπτωση, τα εν λόγω τμήματα είναι αρκούντως μεγάλα οπότε οι άκρες αποτελούν ένα μικρό μόνο ποσοστό της συνολικής επιφάνειας.

Παρά το προαναφερθέν παράδειγμα, η πιο συνηθισμένη περίπτωση είναι τα λιπίδια που βρίσκονται στη φάση φυλλιδίων να σχηματίζουν σφαιρικές κοιλότητες (vesicles) στις οποίες δεν υπάρχουν εκτεθειμένες υδρόφοβες ομάδες. Όταν αυτές οι κοιλότητες βρίσκονται η μια μέσα στην άλλη ονομάζονται κυστίδια πολλών φυλλιδίων (MLV: Multilamellar Vesicles) (Εικόνα 1.1).

Αυτές οι δομές είναι αρκετά μεγάλες (μερικά μικρόμετρα) ώστε σε μοριακό επίπεδο μπορούν να θεωρηθούν τοπικά ως επίπεδες. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι τα κυστίδια (vesicles) δεν πρέπει να συγχέονται με τα μικκύλια (micelles).

Η Εικόνα 1.4 δείχνει σχηματικά τις διαφορές μεταξύ μικκυλίων και κυστιδίων. Τα μικκύλια σχηματίζουν κλειστές επιφάνειες, αλλά δεν έχουν την δομή διπλοστιβάδας. Θα μπορούσε κάποιος να τα σκεφτεί ως μια μονοστιβάδα που έχει μορφοποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίσει μια κλειστή επιφάνεια.^{[79][88]}



Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση κυστιδίου (αριστερά) και μικυλλίου (δεξιά) ^[79]

1.3. Σύστημα DPPC και νερού

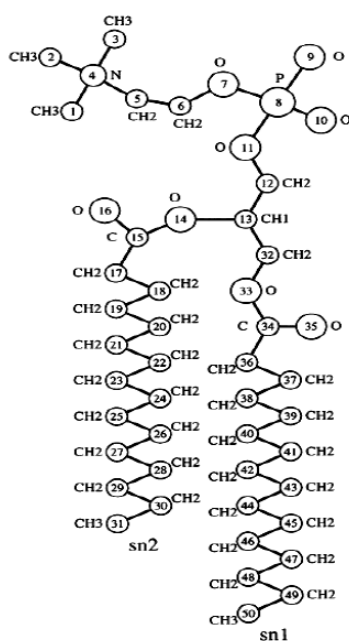
Στην Εικόνα 1.4 φαίνεται ο συντακτικός τύπος του DPPC. Κοιτώντας προσεκτικά διακρίνονται οι ουρές του μορίου Sn1 και Sn2. Αυτά τα τμήματα δεν είναι ισοδύναμα μεταξύ τους, κάτι που θα ληφθεί υπόψιν σε επίπεδο επεξεργασίας του ατομιστικού μοντέλου. Επίσης, το εν λόγω μόριο έχει ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο κομμάτι. Λόγω αυτού του γεγονότος, τα μόρια DPPC σχηματίζουν διπλοστιβάδες και άλλες δομές βιολογικής σημασίας.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι δείκτες D και L (μερικές φορές αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως + και - αντίστοιχα) εξάγονται πειραματικά και δεν συνδέονται με κανένα τρόπο με τις διαμορφώσεις S και R^{[79][87]}. Τα οπτικώς ενεργά μόρια που στρέφουν το πολωμένο φως προς τα αριστερά συμβολίζονται με L (-), ενώ τα μόρια που στρέφουν το πολωμένο φως προς τα δεξιά συμβολίζονται με D (+). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το στερεογονικό κέντρο είναι ένα άτομο άνθρακα συνδεδεμένο με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες.

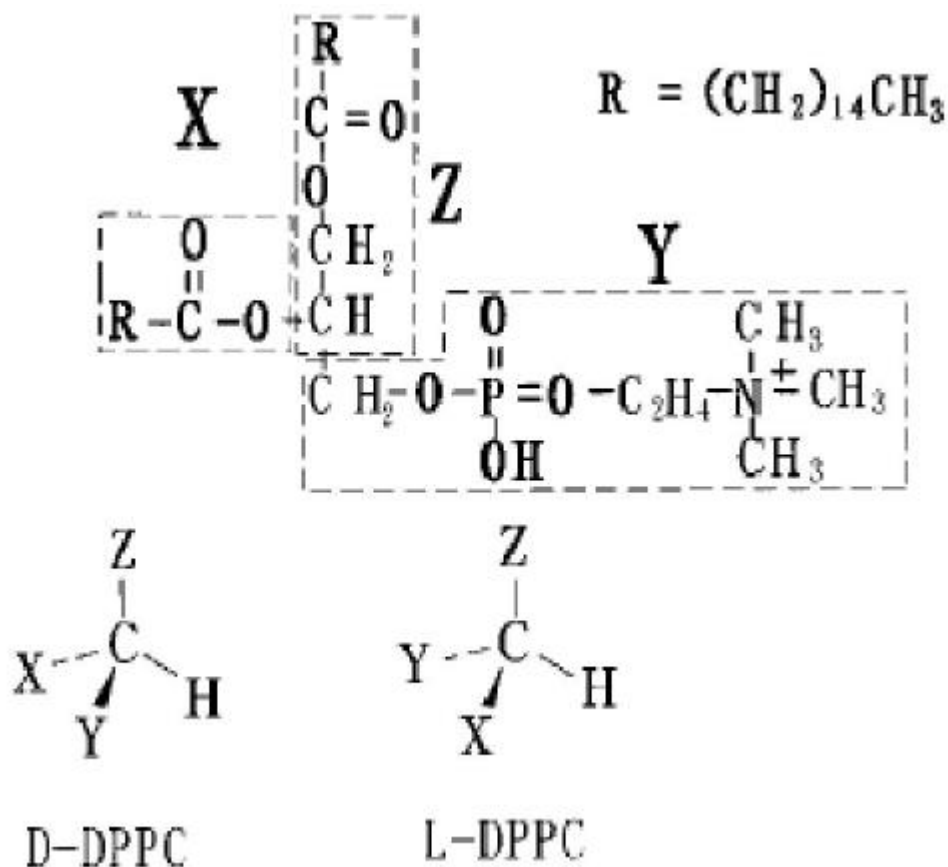
Κάθε τέτοιο κέντρο μπορεί να οριστεί ως R ή S. Ο χαρακτηρισμός ως R ή S γίνεται σύμφωνα με τον ακόλουθο κανόνα 1^[85]. Κάθε ομάδα ατόμων έχει έναν αριθμό προτεραιότητας. Ο υψηλότερος ατομικός αριθμός έχει προτεραιότητα. Ο αντίχειρας προσανατολίζεται έτσι ώστε να κατευθύνεται από τον άνθρακα προς την ομάδα χαμηλότερης προτεραιότητας. Εάν χρησιμοποιώντας το δεξί χέρι τα δάχτυλα κλείνουν προς την κατεύθυνση των τριών ομάδων με ελαττούμενη προτεραιότητα (1-2-3) τότε το στερεογονικό κέντρο έχει απεικόνιση R. Σε αντίθετη περίπτωση έχει απεικόνιση S. Εάν δεν μπορεί να προσδιοριστεί η προτεραιότητα σύμφωνα με τον κανόνα 1, τότε συγκρίνουμε τους ατομικούς αριθμούς των δεύτερων κατά σειρά ατόμων κάθε υποκαταστάτη.

Εάν κριθεί αναγκαίο μπορεί να φθάσουμε και στο τρίτο ή τέταρτο άτομο μέχρι να βρεθεί ένα σημείο διαφοροποίησης. Γίνεται σαφές από την Εικόνα 1.5, εφόσον εφαρμοστούν οι παραπάνω κανόνες, ότι το L-DPPC έχει την απεικόνιση R.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι μόνο η απεικόνιση S του DPPC χρησιμοποιείται καθ' όλη την έκταση της διπλωματικής εργασίας. Αυτό συμβαίνει λόγω της βιολογικής σημασίας που εμφανίζει η προαναφερθείσα απεικόνιση^{[79][87]}



Εικόνα 1.4 Συντακτικός τύπος του DPPC με εμφανή την παρουσία των δύο ανισοδύναμων τμημάτων sn1 και sn2.^[79]



Εικόνα 1.5 Στερεοχημικοί τύποι και μοριακός τύπος του DPPC.^[79]

1.4. Ειδικά για το DPPC

Η φωσφολιπιδική δομή δείχνει τις θέσεις των διαφόρων ομάδων μεθυλενίου $(CH_2)_n$, όπου $n=14$. Αυτές οι δομές ανιχνεύονται μέσω πειραμάτων φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού NMR.

Η DPPC είναι ένα δικαρβοδεκαεξάδικό λιπίδιο, που λειτουργεί σαν το λιπίδιο “οικοδεσπότη” που δίνει μορφή στη διπλοστιβάδα και παρέχει την κύρια θερμοκρασία μετάπτωσης της ακυλικής αλυσίδας 41°C . Το DPPC αποτελεί ένα από τα συστατικά του LTSL (Low Temperature Sensitive Liposome) της λιπιδικής μεμβράνης.

Δομικά, οι διαστάσεις αυτών των λιπιδίων μπορούν να υπολογιστούν από μετρήσεις διπλοστοιβάδας και του πάχους της υδρογονοανθρακικής περιφέρειας, όπως προσδιορίστηκε από ταυτόχρονη ανάλυση νετρονίων μικρής γωνίας και έδασης ακτίνων X.

Όπως η υγρή φάση των διπλοστοιβάδων, η ακυλική αλυσίδα περιφέρειας του DPPC

είναι μήκους 2,9 nm. Σε σχέση με τις αναμενόμενες αυτοδιαμορφούμενες δομές, το DPPC δημιουργεί δομές φυλλιδίων και παρέχει στη διπλοστιβάδα τον διαλύτη όπου τα υπόλοιπα συστατικά του LTSL διαλύονται.

Το DPPC χαρακτηρίζεται σαν ένα από τα ιδανικά λιπίδια “οικοδεσπότες” με θερμοκρασία μετάπτωσης λίγο υψηλότερη από τη συνήθη θερμοκρασία σώματος, όπου το λιπίδιο διπλοστιβάδας μπορεί να γίνει πιο παροδικά διαπερατό, η πρόσθετη παροδική διαπερατότητά του στη μεταβατική φάση δεν είναι πολύ περισσότερο μεγαλύτερη από την υγρή λιπιδική φάση στην ίδια θερμοκρασία και γενικώς κλίνει προς το να αυξάνει τη συγκράτηση του φαρμάκου, κάνοντας τη διπλοστιβάδα δυνατότερη και λιγότερο συμπιεστή.

Τα ένυδρα DPPC λιπίδια χρησιμοποιούνται επειδή αυθόρμητα σχηματίζουν διπλοστιβάδες φυλλιδίων των οποίων οι μεσομορφικές αλλαγές συμβαίνουν σε μια ευνοϊκή θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 25 και 50 ° C.

1.5. Φαρμακοδυναμικές Ιδιότητες του Candesartan-cilexetil

1.5.1. Φαρμακοδυναμικές ιδιότητες

Φαρμακοθεραπευτική κατηγορία:

Ανταγωνιστές της αγγειοτασίνης II, απλοί, κωδικός ATC C09CA06

Η αγγειοτασίνη II είναι η κύρια αγγειοδραστική ορμόνη του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης και παίζει ρόλο στην παθοφυσιολογία της υπέρτασης, της καρδιακής ανεπάρκειας και άλλων καρδιαγγειακών διαταραχών.

Παίζει επίσης ρόλο στην παθογένεση της υπερτροφίας και βλάβης των τελικών οργάνων - στόχων της υπέρτασης. Οι κύριες φυσιολογικές δράσεις της αγγειοτασίνης II, όπως αγγειοσύσπαση, διέγερση παραγωγής αλδοστερόνης, ρύθμιση της ομοιοστασίας άλατος/ύδατος και διέγερση της αύξησης των κυττάρων, πραγματοποιούνται μέσω των υποδοχέων τύπου 1 (AT1).^[80]

Το candesartan cilexetil είναι ένα προφάρμακο κατάλληλο για από του στόματος χορήγηση. Μετατρέπεται ταχέως στη δραστική ουσία, candesartan, με υδρόλυση του εστέρα κατά τη διάρκεια της απορρόφησης από το γαστρεντερικό σωλήνα. Το candesartan είναι ένας εκλεκτικός ανταγωνιστής των υποδοχέων AT1 της αγγειοτασίνης II, με ισχυρή σύνδεση και βραδεία αποδέσμευση από τον υποδοχέα. Δεν έχει δράση διεγέρτη.^[80]

Το candesartan δεν αναστέλλει το ΜΕΑ (Μετατρεπτικό Ένζυμο Αγγειοτενσίνης), το οποίο ένζυμο μετατρέπει την αγγειοτασίνη I σε αγγειοτασίνη II και διασπά την βραδυκινίνη. Δεν υπάρχει καμία δράση στο ΜΕΑ ούτε ενίσχυση της δράσης της βραδυκινίνης ή της ουσίας P. Σε ελεγχόμενες κλινικές μελέτες που συγκρίθηκε το candesartan με αναστολείς του ΜΕΑ, η συχνότητα εμφάνισης βήχα ήταν μικρότερη στους ασθενείς που έπαιρναν candesartan cilexetil.

Το candesartan δεν συνδέεται, ούτε αποκλείει άλλους ορμονικούς υποδοχείς ή διαύλους ιόντων, που είναι γνωστό ότι παίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του καρδιαγγειακού συστήματος. Ο ανταγωνισμός των υποδοχέων AT1, της αγγειοτασίνης II έχει σαν αποτέλεσμα δοσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων της ρενίνης, της αγγειοτασίνης I και αγγειοτασίνης II και μείωση της συγκέντρωσης της αλδοστερόνης στο πλάσμα.

Υπέρταση

Στην υπέρταση, το candesartan προκαλεί δοσοεξαρτώμενη, μακράς διάρκειας μείωση της αρτηριακής πίεσης του αίματος. Η αντιυπερτασική του δράση οφείλεται στη μείωση των συστηματικών περιφερικών αντιστάσεων, χωρίς αντανακλαστική αύξηση του καρδιακού ρυθμού. Δεν υπάρχουν ενδείξεις για σοβαρή ή υπερβολικού βαθμού υπόταση "πρώτης δόσης" ή φαινόμενο rebound μετά τη διακοπή της θεραπείας.

Μετά από χορήγηση μιας μεμονωμένης δόσης candesartan cilexetil, η έναρξη της αντιυπερτασικής δράσης παρατηρείται κατά κανόνα εντός 2 ωρών. Με την συνεχιζόμενη θεραπεία, η μεγαλύτερη μείωση της αρτηριακής πίεσης, επιτυγχάνεται γενικά, με κάθε δοσολογικό σχήμα, εντός τεσσάρων εβδομάδων και διατηρείται σ' όλη τη διάρκεια της μακρόχρονης χορήγησης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μίας μετα-ανάλυσης, το μέσο επιπρόσθετο αντιυπερτασικό αποτέλεσμα από την αύξηση της δόσης από 16 mg σε 32 mg μια φορά ημερησίως ήταν μικρό. Λαμβάνοντας υπόψη την διαφορά ανταπόκρισης από άτομο σε άτομο, σε κάποιους ασθενείς αναμένεται αποτέλεσμα μεγαλύτερο του μέσου όρου. Το candesartan cilexetil χορηγούμενο μία φορά ημερησίως εξασφαλίζει αποτελεσματική και ομαλή μείωση της αρτηριακής πίεσης για διάστημα 24 ωρών με μικρή διαφορά μεταξύ του μέγιστου και ελάχιστου αποτελέσματος μεταξύ των δόσεων. Η αντιυπερτασική δράση και η ανεκτικότητα του candesartan και του losartan συγκρίθηκαν σε δύο τυχαιοποιημένες, διπλές-τυφλές μελέτες σε σύνολο 1.268 ασθενών με ήπια έως μέτρια υπέρταση. Η ελάχιστη μείωση της αρτηριακής πίεσης (συστολική/διαστολική) ήταν 13,1/10,5 mmHg με το candesartan cilexetil 32 mg χορηγούμενο μια φορά ημερησίως και 10,0/8,7 mmHg με το μετά καλίου άλας του losartan 100 mg χορηγούμενο μία φορά ημερησίως (διαφορά στην μείωση της αρτηριακής πίεσης 3,1/1,8 mmHg, 38p<0,0001/p<0,0001).

Όταν το candesartan cilexetil χορηγείται μαζί με υδροχλωροθειαζίδη, η μείωση της αρτηριακής πίεσης είναι αθροιστική. Παρατηρείται, επίσης, αύξηση της αντιυπερτασικής δράσης όταν το candesartan cilexetil συνδυάζεται με αμλοδιπίνη ή φελοδιπίνη.^[80]

Τα φαρμακευτικά προϊόντα που αναστέλλουν το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης έχουν λιγότερο έντονη αντιυπερτασική δράση σε ασθενείς της μαύρης φυλής (πληθυσμός με συνήθως χαμηλά επίπεδα ρενίνης) σε σύγκριση με τους ασθενείς των άλλων φυλών. Το ίδιο συμβαίνει και με το candesartan. Σε μια ανοικτή μελέτη κλινικής εμπειρίας σε 5.156 ασθενείς με διαστολική υπέρταση, η μείωση της αρτηριακής πίεσης κατά τη θεραπεία με candesartan ήταν σημαντικά μικρότερη σε ασθενείς της μαύρης φυλής από ό,τι σε ασθενείς των άλλων φυλών.

Το candesartan αυξάνει τη νεφρική αιματική ροή και διατηρεί ή αυξάνει το ρυθμό της σπειραματικής διήθησης, ενώ οι νεφρικές αγγειακές αντιστάσεις και το κλάσμα διήθησης μειώνονται. Σε μια κλινική μελέτη διάρκειας 3 μηνών σε υπερτασικούς ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και μικρολευκωματινουρία, η αντιυπερτασική αγωγή με candesartan cilexetil μείωσε την απέκκριση

πρωτεϊνών από τα ούρα (μέση αναλογία πρωτεΐνης/κρεατινίνης 30%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 15-42%). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την επίδραση του candesartan στην εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας.

Η επίδραση του candesartan cilexetil σε δόσεις 8-16 mg (μέση δόση 12 mg) εφάπαξ ημερησίως, στην νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακά συμβάματα αξιολογήθηκε σε μια τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη σε 4937 ηλικιωμένους ασθενείς (ηλικίας 70-89 ετών, 21% ηλικίας 80 ετών ή και μεγαλύτερης) με ήπια έως μέτρια υπέρταση, οι οποίοι παρακολούθηθηκαν για μέσο διάστημα 3,7 έτη οι ασθενείς έλαβαν candesartan cilexetil ή εικονικό φάρμακο μαζί με άλλη αντιυπερτασική θεραπεία, που προστέθηκε όταν ήταν αναγκαίο. Η αρτηριακή πίεση μειώθηκε από 166/90 σε 145/80 mmHg στην ομάδα του candesartan και από 167/90 σε 149/82 mmHg στην ομάδα ελέγχου. Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στο κύριο καταληκτικό σημείο, μείζον καρδιαγγειακό σύμβαμα (θνησιμότητα από καρδιαγγειακά συμβάματα, μη θανατηφόρο εγκεφαλικό επεισόδιο, μη-θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου).

Υπήρξαν 26,7 περιστατικά ανά 1000 έτη-ασθένειας (patient-years) στην ομάδα του candesartan cilexetil σε σύγκριση με 30,0 περιστατικά ανά 1000 έτη-ασθένειας (patient-years) στην ομάδα ελέγχου (σχετικός κίνδυνος 0.89%, 95% CI 0.75 έως 1.06, $p=0.19$).^[80]

Καρδιακή ανεπάρκεια

Η θεραπεία με το candesartan cilexetil μειώνει τη θνησιμότητα, μειώνει τη νοσηλεία λόγω καρδιακής ανεπάρκειας και βελτιώνει τα συμπτώματα σε ασθενείς με συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας όπως αποδεικνύεται από το κλινικό πρόγραμμα Candesartan in Heart failure - Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM). Αυτό το διπλά-τυφλό, ελεγχόμενο με εικονικό φάρμακο, κλινικό πρόγραμμα σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια κατηγορίας II-IV κατά NYHA αποτελείται από τρεις ξεχωριστές μελέτες: CHARM - Alternative (Εναλλακτική αγωγή) (n=2.028) σε ασθενείς με κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας $\leq 40\%$ που δεν έλαβαν αναστολέα MEA λόγω δυσανεξίας (κυρίως εξαιτίας του βήχα, 72%), CHARM-Added (Προστιθέμενη αγωγή) (n=2.548) σε ασθενείς με κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας $\leq 40\%$ που έλαβαν αναστολέα MEA και την CHARM-Preserved (Διατηρημένη λειτουργία αριστερής κοιλίας) (n=3.023) σε ασθενείς με κλάσμα εξώθησης $>40\%$. Ασθενείς σε βέλτιστη θεραπεία για την καρδιακή ανεπάρκεια τυχαιοποιήθηκαν σε εικονικό φάρμακο ή candesartan cilexetil (με ρύθμιση της δόσης από 4 mg ή 8 mg μια φορά ημερησίως σε 32 mg μία φορά ημερησίως ή έως τη μέγιστη ανεκτή δόση, μέση δόση 24 mg) και παρακολούθηθηκαν για μια μέση διάρκεια 37,7 μήνες.^[80]

Μετά από 6 μήνες θεραπείας το 63% των ασθενών που εξακολουθούσε να λαμβάνει candesartan cilexetil (89%) ελάμβανε τη δόση-στόχο των 32 mg.

Στην CHARM-Alternative το σύνθετο τελικό σημείο, θάνατος καρδιαγγειακής αιτιολογίας ή πρώτη νοσηλεία λόγω χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, μειώθηκε σημαντικά με το candesartan σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, αναλογία σχετικού κινδύνου 0,77 (95%CI: 0,67-0,89, $p<0,001$). Αυτό αντιστοιχεί σε μια μείωση του σχετικού κινδύνου κατά 23%. Από τους ασθενείς υπό candesartan 33,0% (95%CI: 30,1-36,0) και από τους ασθενείς υπό το εικονικό φάρμακο 40,0% (95%CI: 37,0-43,1) υπήρξε απόλυτη διαφορά 7,0% (95%CI: 11,2-2,8) όσον αφορά το τελικό σημείο ασθενούς. Το σύνθετο τελικό σημείο, θνησιμότητα κάθε αιτιολογίας ή η πρώτη νοσηλεία λόγω χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, μειώθηκε επίσης σημαντικά με το candesartan αναλογία σχετικού κινδύνου 0,80 (95%CI: 0,70-0,92, $p=0,001$). Από τους

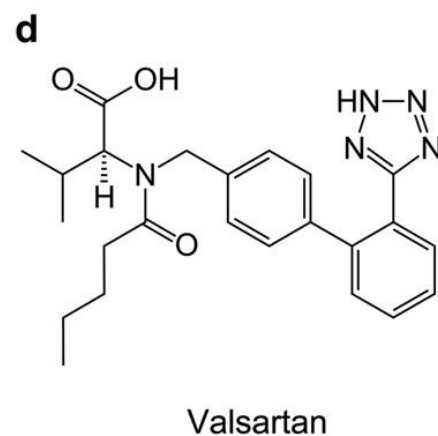
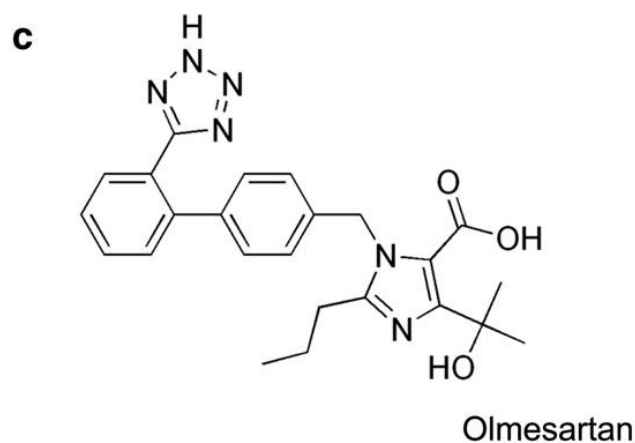
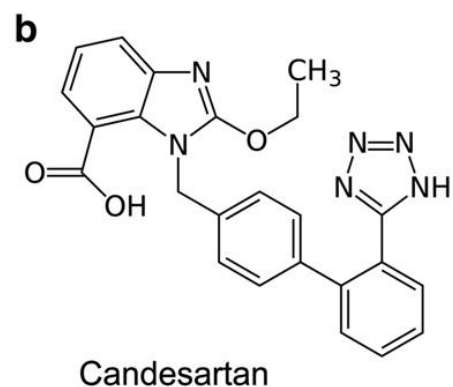
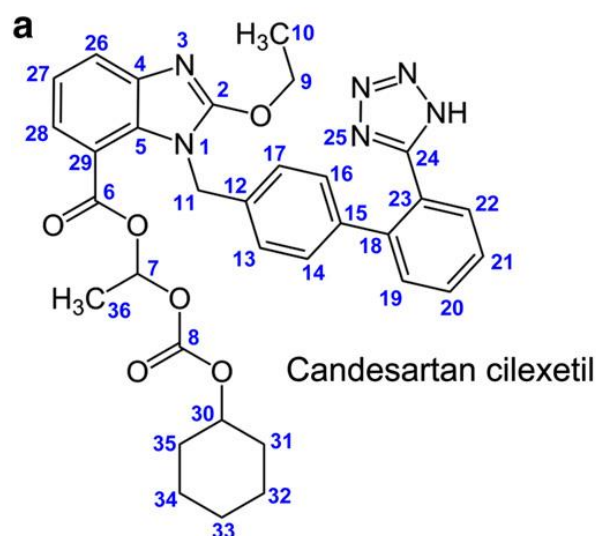
ασθενείς υπό candesartan 36,6% (95%CI: 33,7-39,7) και από τους ασθενείς υπό το εικονικό φάρμακο 42,7% (95%CI: 39,6-45,8) υπήρξε απόλυτη διαφορά 6,0% (95%CI: 10,3-1,8) όσον αφορά αυτό το τελικό σημείο. Και οι δύο παράμετροι του σύνθετου τελικού σημείου, η θνησιμότητα και η νοσηρότητα (νοσηλεία λόγω της χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας) συντελούν στα θετικά αποτελέσματα του candesartan. Η θεραπεία με candesartan cilexetil επέφερε βελτίωση της κατηγορίας κατά NYHA (p=0,008). Στην CHARM-Added το σύνθετο τελικό σημείο, θάνατος καρδιαγγειακής αιτιολογίας ή πρώτη νοσηλεία λόγω χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, μειώθηκε σημαντικά με το candesartan σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, αναλογία σχετικού κινδύνου 0,85, (95%CI: 0,75-0,96, p=0,011). Αυτό αντιστοιχεί σε σχετική μείωση του κινδύνου 15%. Από τους ασθενείς υπό candesartan 37,9% (95%CI: 35,2-40,6) και από τους ασθενείς υπό το εικονικό φάρμακο 42,3% (95%CI: 39,6-45,1) υπήρξε απόλυτη διαφορά 4,4% (95%CI: 8,2-0,6) όσον αφορά το τελικό αυτό. Είκοσι τρεις ασθενείς χρειάστηκε να λάβουν θεραπεία για όλη τη διάρκεια της μελέτης, ώστε να προληφθεί ένας θάνατος από καρδιαγγειακή αιτιολογία ή νοσηλεία για θεραπεία καρδιακής ανεπάρκειας ενός ασθενούς.^[80]

Το σύνθετο τελικό σημείο, θνησιμότητα κάθε αιτιολογίας ή η πρώτη νοσηλεία λόγω χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, μειώθηκε επίσης σημαντικά με το candesartan, αναλογία σχετικού κινδύνου 0,87 (95%CI: 0,78-0,98, p=0,021). Από τους ασθενείς υπό candesartan 42,2% (95%CI: 39,5-45,0) και από τους ασθενείς υπό το εικονικό φάρμακο 46,1% (95%CI: 43,4-48,9) υπήρξε απόλυτη διαφορά 3,9% (95%CI: 7,8-0,1). όσον αφορά το τελικό αυτό. Και οι δύο παράμετροι του σύνθετου τελικού σημείου, η θνησιμότητα και η νοσηρότητα, συντελούν στα θετικά αποτελέσματα του candesartan. Η θεραπεία με candesartan cilexetil επέφερε βελτίωση της κατηγορίας κατά NYHA (p=0,020).

Στην CHARM-Preserved το σύνθετο τελικό σημείο, θάνατος καρδιαγγειακής αιτιολογίας ή πρώτη νοσηλεία λόγω χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας δεν μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά, αναλογία σχετικού κινδύνου 0,89 (95%CI: 0,77-1,03, p=0,118). Η θνησιμότητα κάθε αιτιολογίας δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, όταν εξετάστηκε σε κάθε μία από τις τρεις υπομελέτες του κλινικού προγράμματος CHARM. Εντούτοις, η θνησιμότητα κάθε αιτιολογίας αξιολογήθηκε επίσης στο σύνολο των ασθενών από τις CHARM-Alternative και CHARM-Added, αναλογία σχετικού κινδύνου 0,88 (95%CI: 0,79-0,98, p=0,018) καθώς και από τις τρεις υπομελέτες, αναλογία σχετικού κινδύνου 0,91 (95%CI: 0,83-1,00, p=0,055). Η ευεργετική δράση του candesartan ήταν σταθερή, ανεξάρτητα από ηλικία, φύλο και συγχρηγούμενη φαρμακευτική αγωγή. Το candesartan ήταν επίσης αποτελεσματικό σε ασθενείς που ελάμβαναν συγχρόνως β-αποκλειστές και αναστολείς MEA, και το όφελος επετεύχθη είτε οι ασθενείς ελάμβαναν αναστολείς MEA στις δόσεις που συστήνονται από τις κατευθυντήριες οδηγίες, είτε όχι.^[80]

Σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και μειωμένη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας (κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας \leq 40%), το candesartan ελαττώνει τις συστηματικές αγγειακές αντιστάσεις και την πίεση εσφηνωσης των πνευμονικών τριχοειδών, ενισχύει τη δράση της ρενίνης στο πλάσμα, αυξάνει τη συγκέντρωση της αγγειοτασίνης II και μειώνει τα επίπεδα της αλδοστερόνης.

Ακολουθούν οι συντακτικοί τύποι διαφόρων σαρτανών.^[78]



1.5.2. Φαρμακοκινητικές ιδιότητες

Απορρόφηση και κατανομή

Μετά την από του στόματος χορήγηση το candesartan cilexetil μετατρέπεται στην δραστική ουσία candesartan. Μετά από τη λήψη πόσιμου διαλύματος candesartan cilexetil η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα του candesartan είναι περίπου 40%. Η βιοδιαθεσιμότητα είναι η καταμέτρηση της σχετικής ποσότητας ενός χορηγημένου φαρμάκου που φθάνει στη γενική κυκλοφορία του αίματος σε συνάρτηση με το ρυθμό που συμβαίνει. Η σχετική βιοδιαθεσιμότητα του candesartan υπό την μορφή δισκίων συγκριτικά με το πόσιμο διάλυμα είναι περίπου 34%, με πολύ μικρή μεταβλητότητα. Συνεπώς, η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα του δισκίου εκτιμάται 14%. Η μέγιστη συγκέντρωση (C_{max}) στον ορό επιτυγχάνεται 3-4 ώρες μετά τη λήψη του δισκίου. Οι συγκεντρώσεις του candesartan στον ορό αυξάνουν γραμμικά με την αύξηση των δόσεων εντός του θεραπευτικού εύρους. Δεν έχουν παρατηρηθεί διαφορές στη φαρμακοκινητική του candesartan που να σχετίζονται με το γένος (φύλο). Το εμβλαδόν

κάτω από την καμπύλη των συγκεντρώσεων του candesartan στο πλάσμα σε σχέση με το χρόνο (AUC) δεν επηρεάζεται σημαντικά από την τροφή.^[80]

Το candesartan συνδέεται σε υψηλό ποσοστό με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (περισσότερο από 99%). Ο φαινομενικός όγκος κατανομής του candesartan είναι 0,1-1/kg. Η βιοδιαθεσιμότητα του candesartan δεν επηρεάζεται από τη λήψη τροφής.^[80]

Βιομετασχηματισμός και απομάκρυνση

Το candesartan αποβάλλεται αμετάβλητο κυρίως με τα ούρα και τη χολή και σε μικρό μόνο ποσοστό αποβάλλεται μέσω ηπατικού μεταβολισμού (CYP2C9). Υπάρχουσες μελέτες αλληλεπίδρασης δεν δείχνουν κάποια δράση στα CYP2C9 και CYP3A4. Σύμφωνα με *in vitro* δεδομένα, δεν αναμένεται να παρατηρηθεί *in vivo* αλληλεπίδραση με δραστικές ουσίες των οποίων ο μεταβολισμός εξαρτάται από τα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 ή CYP3A4. Ο τελικός χρόνος ημιζωής του candesartan είναι περίπου 9 ώρες. Δεν υπάρχει συσσώρευση του φαρμάκου μετά από επανειλημμένη χορήγηση. Η συνολική κάθαρση του candesartan από το πλάσμα είναι περίπου 0,37 ml/min/kg, με τιμή νεφρικής κάθαρσης περίπου 0,19 ml/min/kg. Η νεφρική απέκκριση του candesartan cilexetil πραγματοποιείται τόσο με πειραματική διήθηση όσο και με ενεργητική σωληναριακή έκκριση.^[80]

Φαρμακοκινητικές ιδιότητες σε ειδικές ομάδες πληθυσμού

Στους ηλικιωμένους (άνω των 65 ετών) η C_{max} και η AUC του candesartan είναι αυξημένες περίπου κατά 50% και 80% αντίστοιχα, συγκριτικά με άτομα νεαρής ηλικίας. Ωστόσο, η ανταπόκριση της αρτηριακής πίεσης και η συχνότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών, για μία δεδομένη δόση Atacand (εμπορική ονομασία του φαρμάκου με δραστική δόση candesartan-cilexetil), είναι παρόμοιες σε νέους και ηλικιωμένους ασθενείς (βλέπε παράγραφο 4.2). Σε ασθενείς με ήπια έως μέτριο βαθμού νεφρική δυσλειτουργία η C_{max} και η AUC του candesartan αυξήθηκαν κατά τη χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων περίπου 50% και 70%, αντίστοιχα, αλλά ο χρόνος ημίσειας ζωής (t_{1/2}) παρέμεινε αμετάβλητος, σε σύγκριση με ασθενείς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Οι ανάλογες αλλαγές σε ασθενείς με σοβαρή νεφρική δυσλειτουργία ήταν περίπου 50% και 110%, αντίστοιχα. Ο τελικός χρόνος ημίσειας ζωής του candesartan ήταν περίπου διπλάσιος σε ασθενείς με σοβαρή νεφρική δυσλειτουργία. Η AUC του candesartan σε ασθενείς που υπόκεινται σε αιμοδιύλιση ήταν παρόμοια με των ασθενών με σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια. Δεν υπάρχει εμπειρία από ασθενείς με σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία.^[80]

1.5.3. Θεραπευτικές ενδείξεις του Candesartan-cilexetil

Το Candesartan cilexetil ενδείκνυται για την:

- Θεραπεία της ιδιοπαθούς υπέρτασης σε ενήλικες
- Θεραπεία της υπέρτασης σε παιδιά και εφήβους ηλικίας 6 έως 18 ετών.
- Η θεραπεία ενηλίκων ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και μειωμένη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας.^[80]

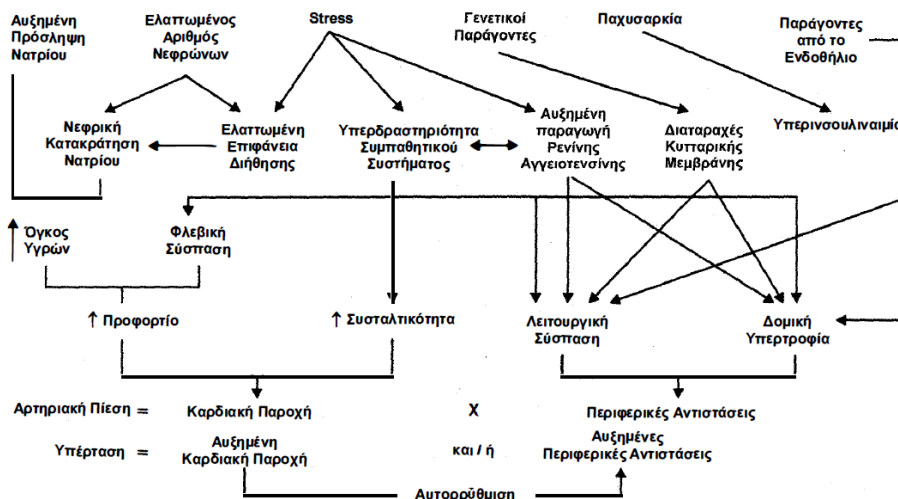
1.6. Μηχανισμός Υπέρτασης

1.6.1. Ορισμός

Η υπέρταση είναι μια νόσος με προϊούσα εξέλιξη στην οποία ο ασθενής έχει αρτηριακή πίεση μεγαλύτερη από την φυσιολογική σε περισσότερες από μία μετρήσεις. Η υπέρταση διακρίνεται σε συστολική και διαστολική. Η συστολική υπέρταση παρατηρείται περισσότερο σε ηλικιωμένους και σχετίζεται με μείωση της ευενδοτότητας της αορτής και των αρτηριολίων. Αντίστοιχα η διαστολική υπέρταση συνδυάζεται με αύξηση των συστηματικών αγγειακών αντιστάσεων. Τις περισσότερες φορές η αιτία είναι άγνωστη και σε ποσοστό >90% η υπέρταση ορίζεται ως ιδιοπαθής. Παθήσεις των νεφρών, των ενδοκρινών αδένων και του νευρικού συστήματος μπορεί να ευθύνονται για την πρόκληση υπέρτασης.^[80]

1.6.2. Παθοφυσιολογία της αρτηριακής υπέρτασης

Ο μηχανισμός ελέγχου της αρτηριακής πίεσης (ΑΠ) και ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της αρτηριακής υπέρτασης είναι εξαιρετικά περίπλοκοι και δεν γίνεται παρά να περιγραφούν με συντομία. Στην Εικόνα 1.6 μπορεί να προσδιοριστεί ο μηχανισμός με τη μορφή διαγράμματος ροής.



Εικόνα 1.6 : Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη ρύθμιση της Αρτηριακής Πίεσης και επιδρούν στην βασική εξίσωση: Αρτηριακή Πίεση= Καρδιακή Παροχή · Περιφερικές Αντιστάσεις.^[80]

1) Νευρογενής έλεγχος.

Το αγγειοκινητικό κέντρο περιλαμβάνει τον πυρήνα του πνευμονογαστρικού στον νωτιαίο μυελό (τασεοϋποδοχείς), και άλλα κέντρα στο στέλεχος και τον μεσεγκέφαλο. Οι αρτηριακοί τασεοϋποδοχείς οκρίνονται στη διάταση του

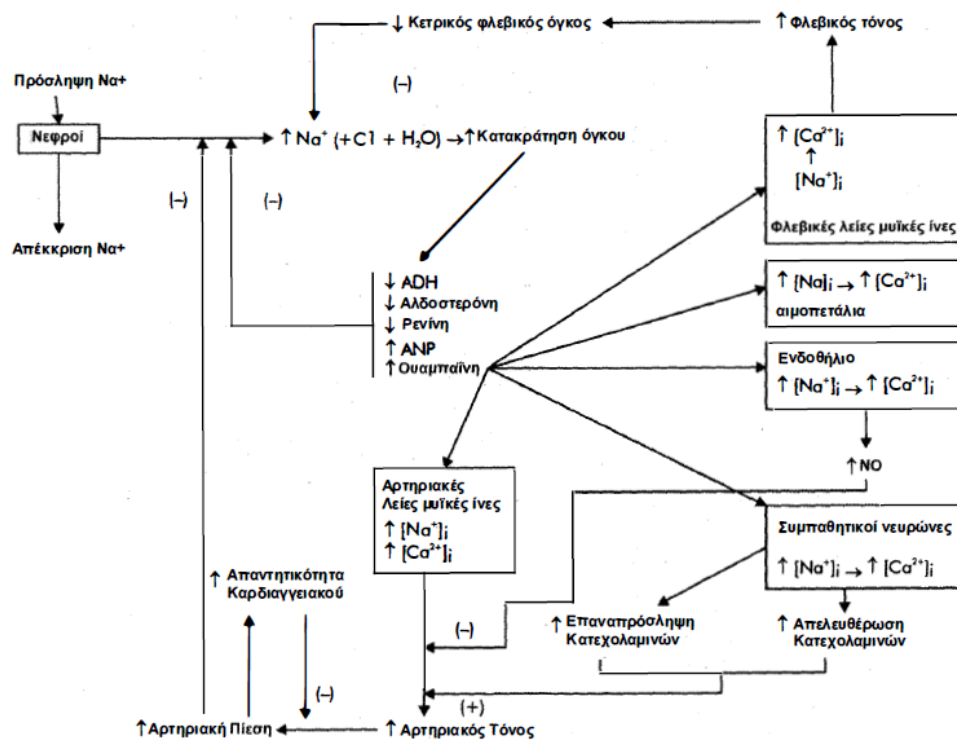
αγγειακού τοιχώματος με αύξηση της δραστηριότητας των προσαγωγών οδών. Αυτό από την άλλη ελαττώνει τη δραστηριότητα των απαγωγών συμπαθητικών ιών και προάγει τον τόνο του παρασυμπαθητικού. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η βραδυκαρδία και η αγγειοδιαστολή.^[80]

2) Σύστημα ρενίνης- αγγειοτενσίνης.

Η πρωτεάση ρενίνη μετατρέπει την αγγειοτενσίνη στο ανενεργό πεπτίδιο αγγειοτενσίνη I που με τη σειρά του μετατρέπεται στο ενεργό οκταπεπτίδιο αγγειοτενσίνη II μέσω του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ΜΕΑ). Αν και το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης βρίσκεται παντού στον οργανισμό, η κύρια πηγή ρενίνης είναι η παρασπειραματική συσκευή του νεφρού. Η συσκευή αυτή ανιχνεύει την πίεση διήθησης του νεφρού και τη συγκέντρωση του Na στο υγρό των άπω εσπειραμένων σωληναρίων. Επιπλέον η απελευθέρωση της ρενίνης προκαλείται από τη διέγερση των β-αδρενεργικών υποδοχέων ενώ ελαττώνεται με την διέγερση των α-αδρενεργικών υποδοχέων. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αγγειοτενσίνης II αναστέλλουν την έκκριση της ρενίνης με αρνητικό παλίνδρομο μηχανισμό (negative feedback). Η αγγειοτενσίνη II δρα σε ειδικούς υποδοχείς της αγγειοτενσίνης AT1 και AT2 και προκαλεί σύσπαση των λείων μυϊκών ιών και απελευθέρωση αλδοστερόνης, προστακυκλίνης και κατεχολαμινών. Το σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ΑΠ συμπεριλαμβανομένης της ομοιόστασης του Na.^[80]

3) Κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο (ANP).

Το ANP, απελευθερώνεται από κοκκία των κόλπων. Προκαλεί νατριούρηση, διούρηση και μια ήπια ελάττωση της ΑΠ, ελαττώνοντας παράλληλα τα επίπεδα ρενίνης και αλδοστερόνης στο πλάσμα. ANPs επίσης μεταβάλουν την συναπτική μετάδοση από τους οσμωτικούς υποδοχείς. Το ANP απελευθερώνεται μετά από διέγερση κολπικών τασεοϋποδοχέων. Οι συγκεντρώσεις του ANP αυξάνονται με την αύξηση των πιέσεων πλήρωσης καθώς και σε ασθενείς με ΑΠ και υπερτροφία της αριστερής κοιλίας επειδή το τοίχωμα της συμμετέχει στην έκκριση του ANP.^[80]



Εικόνα 1.7: Στο διάγραμμα απεικονίζονται διάφοροι παλίνδρομοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αύξηση της ΑΠ σαν αποτέλεσμα της προσπάθειας του οργανισμού να αντιροπήσει την αύξηση του ενδαγγειακού όγκου που προκαλείται από την πρόσληψη περίσσιας Na^+ (πρόσληψη μεγαλύτερης ποσότητας απ' αυτήν που μπορούν να απεκκρίνουν οι νεφροί). Η αύξηση στο ενδοκυττάριο Na^+ είναι άμεσο αποτέλεσμα της αναστολής της αντλίας Na^+ από την ουαμπαΐνη. Η αύξηση στο ενδοκυττάριο Ca^{++} οφείλεται στην αύξηση Na^+ και στην ανταλλαγή $\text{Na}^+ \text{Ca}^{++}$. (-)= αρνητικός παλίνδρομος μηχανισμός, (+)=θετικός παλίνδρομος μηχανισμός, ADH = αντιδιουρητική ορμόνη, ANP = κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο, $[\text{Na}^+]_i$ = ενδοκυττάρια συγκέντρωση Na^+ , $[\text{Ca}^{++}]_i$ = ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{++} .^[80]

4) Σύστημα κίνησης- καλικρεΐνης.

Οι καλικρεΐνες των ιστών αντιδρούν με το κινινογόνο και σχηματίζουν αγγειοδραστικά πεπτίδια. Το πιο σημαντικό είναι το αγγειοδιασταλτικό πεπτίδιο βραδυκινίνη. Οι κινίνες παίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της νεφρικής αιματικής ροής και της απέκκρισης νερού και Na . Οι αναστολείς του μετατροπικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης περιορίζουν τη διάσπαση της βραδυκινίνης σε μη ενεργά πεπτίδια.^[80]

5) Ενδοθήλιο.

Το NO (οξείδιο του αζώτου) έχει μεσολαβητικό ρόλο στην αγγειοδιαστολή που προκαλείται από την ακετυλοχολίνη, τη βραδυκίνη, το νιτροπρωσικό νάτριο και τα νιτρώδη. Η χάλαση που προκαλείται, αναστέλλεται σε υπερτασικούς ασθενείς. Το ενδοθήλιο συνθέτει ενδοθηλίνες, οι οποίες αποτελούν τις πιο ισχυρές αγγειοσυσπαστικές ουσίες. Στους υπερτασικούς ασθενείς η παραγωγή ενδοθηλίνης ή η ευαισθησία σ' αυτήν, δεν είναι μεγαλύτερη απ' ότι στους νορμοτασικούς, παρόλα αυτά οι επιδράσεις της ενδογενούς ενδοθηλίνης I στα αγγεία μπορούν να ενισχυθούν από την ελαττωμένη παραγωγή NO που οφείλεται στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των υπερτασικών.^[80]

6) Στεροειδή.

Τα αλατοκορτικοειδή και τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την πίεση του αίματος. Αυτό οφείλεται στην κατακράτηση Na και ύδατος (αλατοκορτικοειδή) ή στην αυξημένη αντιδραστικότητα των αγγείων (γλυκοκορτικοειδή). Επιπλέον, τα στεροειδή αυξάνουν τον αγγειακό τόνο με προς τα πάνω ρύθμιση των ορμονικών υποδοχέων όπως για παράδειγμα της αγγειοτενσίνης II.^[80]



7) Η μυελώδης μοίρα του νεφρού.

Τα διάμεσα κύτταρα της μυελώδους μοίρας του νεφρού, που εντοπίζονται κυρίως στις νεφρικές θηλές, εκκρίνουν μια ανενεργή ουσία την μυελολιπίνη - I. Αυτό το λιπίδιο μετατρέπεται σε μυελολιπίνη -II στο ήπαρ. Η μυελολιπίνη-II έχει μακρά υποτασική δράση, πιθανόν λόγω άμεσης αγγειοδιαστολής, αναστολής της απάντησης του συμπαθητικού στην υπόταση και διουρητικής δράσης. Πιστεύεται ότι η συμμετοχή της μυελώδους μοίρας του νεφρού στη ρύθμιση της ΑΠ, εξαρτάται από την αιματική της ροή.^[80]

8) Απέκκριση Na και ύδατος.

Η κατακράτηση Na και ύδατος σχετίζεται με την αύξηση της ΑΠ. Το Na, μέσω του μηχανισμού ανταλλαγής Na-Ca, προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάρου Ca στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων με αποτέλεσμα την αύξηση του αγγειακού τόνου. Η κύρια αιτία της κατακράτησης Na και ύδατος μπορεί να είναι μια διαταραχή στη σχέση μεταξύ πίεσης και απέκκρισης Na που οφείλεται σε ελαττωμένη νεφρική αιματική ροή, ελαττωμένο αριθμό νεφρώνων, και αυξημένα επίπεδα αγγειοτενσίνης ή αλατοκορτικοειδών. Οι ασθενείς με αρτηριακή υπέρταση μπορεί να έχουν αυξημένη καρδιακή παροχή, αυξημένες συστηματικές αγγειακές αντιστάσεις ή και τα δύο. Σε νεαρότερες ηλικίες η καρδιακή παροχή είναι συχνά αυξημένη ενώ στις μεγαλύτερες ηλικίες κυρίαρχο ρόλο παίζουν οι αυξημένες συστηματικές αγγειακές αντιστάσεις και η ανελαστικότητα του αγγειακού δικτύου. Ο τόνος των αγγείων μπορεί να είναι αυξημένος λόγω αυξημένης διέγερσης των αδρενεργικών υποδοχέων ή απελευθέρωσης πεπτιδίων όπως η αγγειοτενσίνη και οι ενδοθηλίνες. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση του ενδοκυττάρου Ca στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων που οδηγεί σε αγγειοσύσπασση. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της αγγειοτενσίνης και των ενδοθηλινών, προκαλούν αύξηση της μάζας των λείων

μυϊκών ινών των αγγείων που ονομάζεται αγγειακή διόρθωση (remodeling) . Τόσο η αύξηση των συστηματικών αγγειακών αντιστάσεων όσο και η αυξημένη ανελαστικότητα του αγγειακού δικτύου αυξάνουν το φορτίο της αριστερής κοιλίας. Αυτό προκαλεί υπερτροφία και διαστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας.^[80] Σε νεαρές ηλικίες η πίεση παλμού που γεννάται από την αριστερή κοιλία είναι σχετικά χαμηλή και τα κύματα που προκαλούνται από το περιφερικό αγγειακό δίκτυο εμφανίζονται κυρίως μετά το τέλος της συστολής και επομένως αυξάνουν την πίεση κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης της διαστολής και βελτιώνουν την αιμάτωση στα στεφανιαία. Με την πάροδο της ηλικίας η μείωση της ελαστικότητας της αορτής και των περιφερικών αρτηριών αυξάνει την πίεση παλμού. Τα ανακλώμενα κύματα μεταφέρονται από την πρώιμη διαστολική φάση στην όψιμη συστολική. Αυτό οδηγεί σε αύξηση του μεταφορτίου της αριστερής κοιλίας και συμβάλλει στη δημιουργία υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας. Η άμβλυνση της πίεσης παλμού με την πάροδο της ηλικίας αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα στεφανιαίας νόσου. Το αυτόνομο νευρικό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ΑΠ. Σε υπερτασικούς ασθενείς μπορεί να συνυπάρχουν τόσο αυξημένη έκκριση όσο και έντονη ευαισθησία της περιφέρειας στην νοραδρεναλίνη. Επιπλέον παρατηρείται αυξημένη απάντηση στο stress. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της αρτηριακής υπέρτασης είναι η εκ νέου ρύθμιση των αντανακλαστικών της υπέρτασης και η ελαττωμένη ευαισθησία των τασεοϋποδοχέων. Το σύστημα ρενίνης -αγγειοτενσίνης συμμετέχει τουλάχιστον σε κάποιες μορφές υπέρτασης (νεφραγγειακή υπέρταση) και καταστέλλεται στον πρωτοπαθή υπεραλδοστερονισμό. Οι μεγάλης ηλικίας και οι ασθενείς της μαύρης φυλής παρουσιάζουν υπέρταση με χαμηλά επίπεδα ρενίνης. Άλλοι ασθενείς εμφανίζουν υπέρταση με υψηλά επίπεδα ρενίνης κι αυτοί είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν έμφραγμα του μυοκαρδίου ή άλλες καρδιαγγειακές επιπλοκές. Τόσο στην κλινική πράξη όσο και σε υπέρταση που προκαλείται σε πειραματικά μοντέλα, παρατηρείται διαταραχή στη ρύθμιση του όγκου και στη σχέση μεταξύ ΑΠ και απέκκρισης Na (υπερτασική νατριούρηση). Υπάρχει τεκμηρίωση ότι η εκ νέου ρύθμιση της υπερτασικής νατριούρησης παίζει καθοριστικό ρόλο στην αιτιολογία της υπέρτασης.^[80]

Υψηλά επίπεδα ρενίνης		Χαμηλά επίπεδα ρενίνης
	Παθοφυσιολογικές διαφορές Αρτηριόλια	
Υψηλότερα Υψηλά Χαμηλά Χαμηλά Υψηλά Υψηλά Υψηλά Χαμηλά Ναι	Περιφερικές αντιστάσεις Αλδοστερόνη Ενδαγγειακός όγκος Καρδιακή παροχή Αιματοκρίτης Ουρία Ιξώδες Ιστική άρδευση Ορθοστατική υπόταση	Υψηλά Υψηλά - Χαμηλά Υψηλά Υψηλά Χαμηλά Χαμηλά Χαμηλά Υψηλά Όχι
Νεφραγγειακή υπέρταση Κακοήθης υπέρταση	Κλινικά παραδείγματα	Πρωτοπαθής υπεραλδοστερονισμός
	Αγγειακή έκβαση	
(+)	Εγκεφαλικό επεισόδιο	(-)
(+)	Καρδιακό επεισόδιο	(-)
(+)	Νεφρική βλάβη	(-)
(+)	Αμφιβληστροειδοπάθεια	(-)
(+)	Εγκεφαλοπάθεια	(-)
	Αντιμετώπιση	
(+)	A-MEA	(-)
(+)	β- αποκλειστές	(-)
(-)	Αναστολείς διαύλων Ca ⁺⁺	(+)
(-)	Διουρητικά	(+)
(-)	α- αποκλειστές	(+)

Εικόνα 1.8: Μηχανισμοί υπέρτασης. [80]

1.7. Αλληλεπίδραση Candesartan-cilexetil και άλλων σαρτανών σε διπλοστοιβάδα DPPC

Γενικά τα φάρμακα δρουν τόσο σε επίπεδο διαφορετικών λιπιδικών μεμβρανών όσο και στο εσωτερικό των κυττάρων που περιβάλλεται από λιπιδικές μεμβράνες.

Ακόμα και στην πιο ακραία περίπτωση, τα φάρμακα πρέπει να αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες έτσι ώστε να τις διαπερνούν και να φτάνουν στο στόχο τους. Για το λόγο αυτό η αποδοτικότητα των φαρμάκων στο να αλληλεπιδρούν με τα συστατικά μεμβρανών είναι από τα πιο βαρυσήμαντα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη βιολογική τους δραστηριότητα. Οι μεμβράνες είναι η περιοχή συγκέντρωσης πολλών πρωτεϊνών και λιπιδίων και είναι οι βασικές δομές όπου πραγματοποιούνται κυτταρικές δραστηριότητες. Ακόμα κι αν τα φάρμακα προσδένονται σε πρωτεΐνες και κανονικοποιούν τη δραστηριότητά τους, η λιπιδική φάση των μεμβρανών δεν καθίσταται λιγότερο σημαντική.

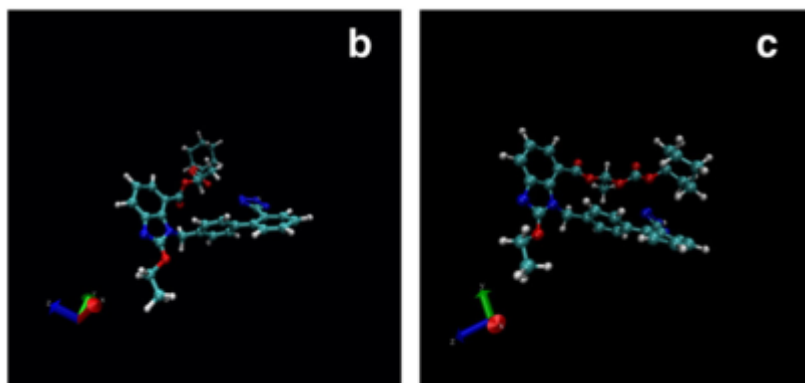
Σημαντικό κομμάτι των ενώσεων που μελετήθηκαν επάγει δομικές μεταβολές στη λιπιδική φάση που έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση δομικών ατελειών, που εμποδίζουν τη λειτουργία της μεμβράνης και έμμεσα μετασχηματίζουν τις πρωτεϊνικές μεμβράνες. [89]

Το πεδίο αλληλεπίδρασης φαρμάκου - μεμβράνης εμπλέκει ένα μεγάλο εύρος επιστημονικών θεωριών, από συνθετική χημεία, μέσω βιοφυσικής στη φαρμακολογία. Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι περίπλοκα δυναμικά συστήματα των οποίων οι δομές μπορούν να επηρεαστούν από τα μόρια φαρμάκων και με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν τις φαρμακολογικές ιδιότητες των φαρμάκων που χορηγούνται.

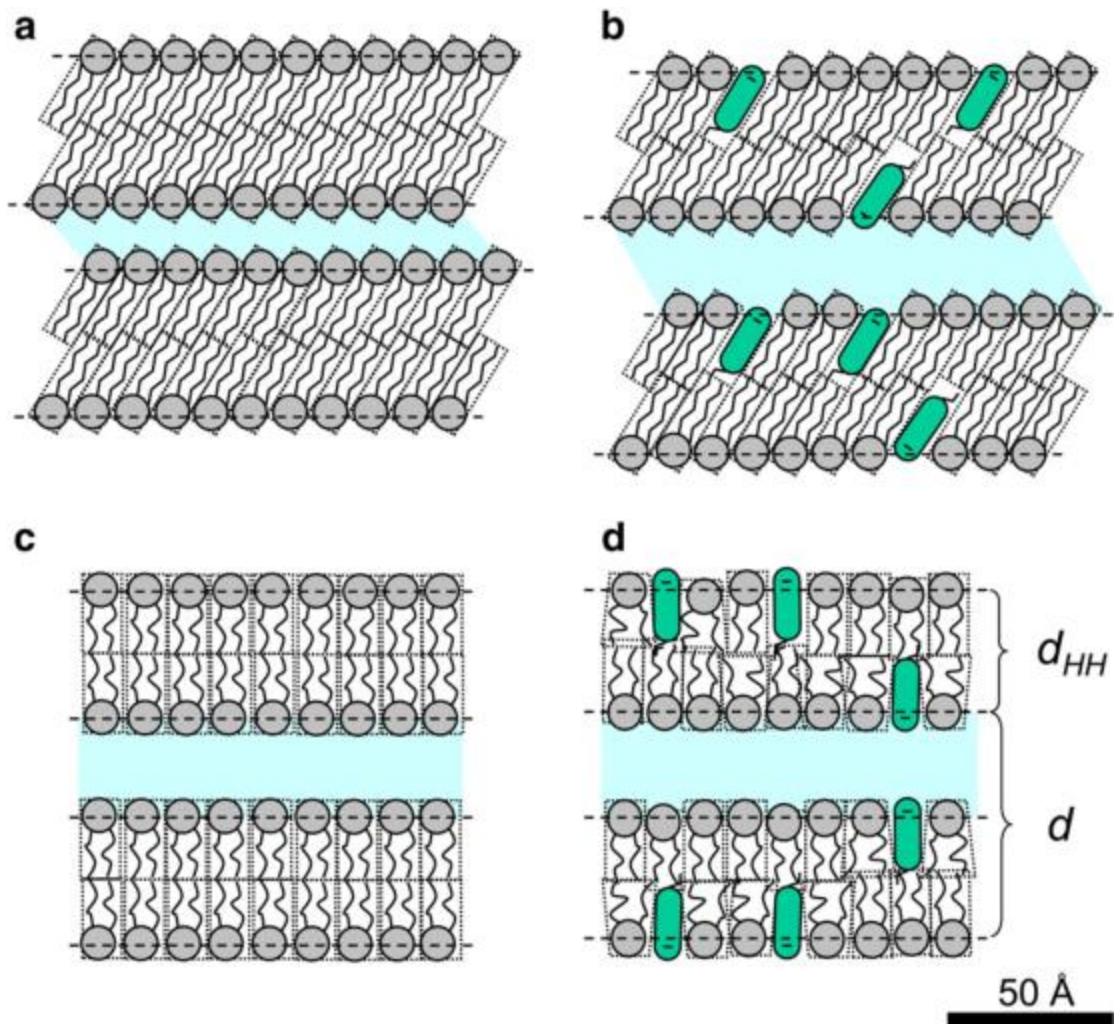
Μέχρι στιγμής, ένας συνδυασμός βιοχημικών, περιθλαστικών και φασματοσκοπικών τεχνικών χρησιμοποιούνται ευρέως για να μελετήσουν τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες όσον αφορά τη σύνθεση, τη συσσωμάτωση, τον κυτταρικό εντοπισμό και την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες. Αυτές οι μέθοδοι παρέχουν έναν “πλούτο” πληροφοριών για τις μακροσκοπικές ιδιότητες των φωσφολιπιδικών μεμβρανών. Οι υπολογιστικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ερευνήσουν τη μικροσκοπική συμπεριφορά των φωσφολιπιδικών μεμβρανών.^[55]

Στην παρούσα διπλωματική παρουσιάζουμε αποτελέσματα ατομικής ανάλυσης από μοριακές προσομοιώσεις φωσφολιπιδικών μεμβρανών σε λιπιδική διπλοστοιβάδα. Επειδή τα δεδομένα είναι αρκετά κοντά στα πειραματικά, η μοριακή προσομοίωση είναι ένα καλό εργαλείο για να μελετήσουμε τις διαφορετικές εκφάνσεις της λιπιδικής συμπεριφοράς που είναι σχεδόν αδύνατον να μελετηθούν με πειραματικές μεθόδους.

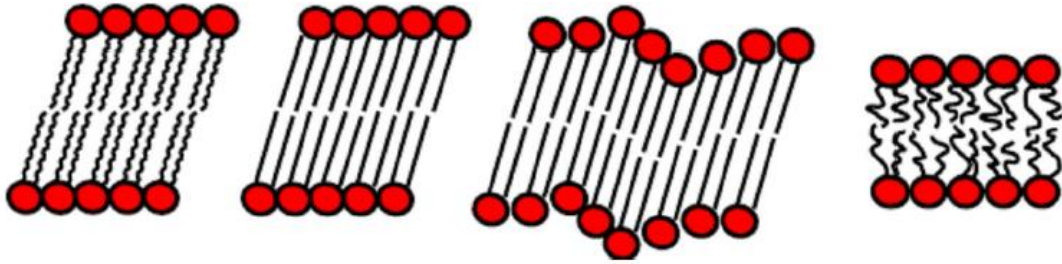
Είναι όλο και περισσότερο εμφανές ότι τα φάρμακα έχουν επιπτώσεις στη μεμβράνη λιπιδίων του πυρήνα και μπορεί να προκαλέσουν το σχηματισμό “μικροεπικρατειών” που διαμορφώνουν τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών, και κατά συνέπεια προσφέρουν μια νέα δίοδο στη λιπιδική μεμβράνη.^{[27][30][31]} Τα αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι το φάρμακο: μεμβράνη στην οποία ενεργούν το β_2 indacaterol και του salmeterol αγωνιστές, οι οποίες είναι προσροφητικός άνθρακας από διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες. Προτάθηκε ότι η σύμπραξη μεταξύ του υψηλότερου χωρισμού των μικροεπικρατειών του indacaterol και η γρηγορότερη διείσδυση του indacaterol στις μεμβράνες θα μπορούσε να εξηγήσει τη γρηγορότερη αρχή και την πιό μακροχρόνια διάρκεια της θεραπευτικής του επίδρασης όσον αφορά το salmeterol. Η υψηλότερη μεμβράνη που ρευστοποιεί την επίδραση του salmeterol μπορεί να συμβάλει στη χαμηλότερη αποτελεσματικότητα^[25]. Άλλες μελέτες έθεσαν ως αίτημα ότι ενεργά φάρμακα αλλάζουν το πλευρικό σχεδιάγραμμα πίεσης στις διπλοστοιβάδες και ως εκ τούτου, μπορεί να έχει επιπτώσεις στη συμπεριφορά των πρωτεϊνών μεμβρανών.^{[37][49]} Κάθε βιοενεργό μόριο μπορεί να χαρακτηριστεί από το δικό του δακτυλικό αποτύπωμα, όταν αλληλεπιδρά με τις διπλοστοιβάδες μεμβρανών^[28] Σε αυτό το πλαίσιο, έχουν πραγματοποιηθεί αρχίσει ερευνητικές δραστηριότητες για τη μελέτη των αποτελέσματα του ARBs losartan, valsartan, olmesartan και candesartan στις διπλοστοιβάδες μεμβρανών [3.7.29-31 από τα αμφίφυλα φάρμακα στη μεμβράνη κυττάρων. Σε αυτήν την μελέτη, τα αποτελέσματα Tcn-116 που παρεμβλήθηκαν στις μεμβράνες DPPC ερευνήθηκαν, και κατόπιν συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα του ενεργού μεταβολίτη. Είναι σημαντική διερεύνηση για το πώς τα αποτελέσματα μεμβρανών των προφαρμάκων συσχετίζονται με τους ενεργούς μεταβολίτες τους.



Εικόνα 1.9: Μοριακή προσομοίωση δυναμικής στην αλληλεπίδραση του candesartan cilexetil με διπλοστιβάδες DPPC. Στο αντιπροσωπευτικό λιπίδιο τα δύο τα μόρια της διπλοστιβάδας απεικονίζονται σχηματικά. Οι περισσότερες αντιπροσωπευτικές δομές του candesartan cilexetil στη μεμβράνη DPPC παρουσιάζεται στις εικόνες Β και Γ. Η μεμβράνη είναι παράλληλη στο X,Y επίπεδο και κάθετη στον Z-άξονα.^[81]



Εικόνα 1.10: Η σχηματική απεικόνιση DPPC διπλοστιβάδας κτίζει τις αλλαγές που προκαλούνται από tocandesartan cilexetil (tcv-116). Χωρίς το φάρμακο η φάση Λ_β είναι παρούσα σε 20 °C (α). Το 20 mol% tcv-116 προκαλεί μια σημαντική διόγκωση της φάσης (β) Λ_β . Η περίπτωση γ καταδεικνύει τις καθαρά διπλοστοιβάδες DPPC στη φάση Λ_α σε 50 °C. [81]



Εικόνα 1.11: φαίνεται το διάγραμμα φάσεων για το σύστημα νερό-DPPC, ενώ οι επιμέρους φάσεις της λιπιδικής διπλοστοιβάδας απεικονίζονται σχηματικά στην Εικόνα 1.8. Συγκεκριμένα, από αριστερά προς τα δεξιά διακρίνονται οι εξής φάσεις: *L_c* (sub-gel phase), *L* (gel-state phase), *P* (ripple phase) και *L* (liquidcrystalline phase). Οι μαύρες ουρές απεικονίζουν τις αλκυλικές αλυσίδες ενώ οι κόκκινοι κύκλοι τις κεφαλές των μορίων. Από αριστερά προς τα δεξιά η τάξη (ordering) των αλυσίδων μειώνεται μέχρι να φθάσουμε σε μια διαμόρφωση τυχαίας περιέλιξης. Στις άλλες περιπτώσεις παρατηρείται η διαμόρφωση trans.

Κεφάλαιο 2: Ατομιστικές Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

2.1. Εισαγωγή

Η Μοριακή Δυναμική (Molecular Dynamics) ως μέθοδος προσομοίωσης χωρίζεται σε δύο είδη στη Μοριακή Δυναμική Ισορροπίας και στη Μοριακή Δυναμική εκτός Ισορροπίας. Η Μοριακή Δυναμική εκτός Ισορροπίας οφείλεται σε μία θερμοδυναμική κινούσα δύναμη (thermodynamic driving force) που οδηγεί σε απομάκρυνση από την κατάσταση ισορροπίας. Η παρούσα διπλωματική επικεντρώνεται στη Μοριακή Δυναμική Ισορροπίας που περιγράφει πώς αναπτύσσεται το μικροσκοπικό σύστημα χρονικά χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις κίνησης στα πλαίσια φορμαλισμού της Κλασσικής Μηχανικής. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι δυνατός ο υπολογισμός δομικών και θερμοδυναμικών ιδιοτήτων ως μέσες τιμές ως προς το χρόνο μέσα σε ένα στατιστικό σύνολο (ensemble) δεδομένου ότι το σύστημα έχει υποστεί εξισορροπημένες προσομοιώσεις.

2.1.1. Στατιστικό σύνολο (ensemble)

Μια ταξινόμηση στη Στατιστική Μηχανική είναι η Στατιστική Μηχανική ισορροπίας και η Στατιστική Μηχανική εκτός ισορροπίας. Κύρια ένδειξη διαχωρισμού είναι η ύπαρξη ή μη θερμοδυναμικής ισορροπίας. Η παρούσα διπλωματική επικεντρώνεται στη θερμοδυναμική ισορροπίας και ένα από τα βασικότερα κριτήρια στη Στατιστική Μηχανική ισορροπίας αποτελεί το στατιστικό σύνολο (ensemble). Πριν προβούμε στον ορισμό για το στατιστικό σύνολο θα γίνει μια σύντομη και περιεκτική αναφορά σε κάποια μείζονα θέματα της Στατιστικής Μηχανικής. Σε μια κλασσική (δηλαδή όχι κβαντομηχανική) μικροσκοπική θεώρηση, ο χώρος φάσεων (phase space) ενός συστήματος N μορίων είναι ένας χώρος των $6N$ διαστάσεων από τον οποίο λαμβάνονται τιμές για τις θέσεις (configurations) και τις ορμές (momentum) όλων των σωματιδίων του συστήματος. Επιπροσθέτως, είναι εφικτό να διακριθούν δύο ακόμα χώροι, μικρότερης διαστατικότητας από το χώρο φάσεων. Ο χώρος των $3N$ διαστάσεων από τον οποίο παίρνουν τιμές οι γενικευμένες συντεταγμένες του συστήματος των N μορίων, ο χώρος απεικονίσεων ή χώρος θέσεων (configuration space). Παρόμοια μπορεί να οριστεί ο χώρος ορμών (momentum space) από τον οποίο λαμβάνουν τιμές οι γενικευμένες ορμές. Κάθε σημείο του χώρου φάσεων συνιστά μία μοναδική μικροκατάσταση. Με την πάροδο του χρόνου η μικροκατάσταση του συστήματος μεταβάλλεται, διαγράφοντας έτσι μια τροχιά που περιγράφει πλήρως την χρονική εξέλιξη του συστήματος. Πλέον μπορούμε να προχωρήσουμε στο τι είναι ένα στατιστικό σύνολο. Ο Josiah Willard Gibbs εισήγαγε την ιδέα ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων του συστήματος, που υπόκεινται στους ίδιους μακροσκοπικούς περιορισμούς, το οποίο ονόμασε στατιστικό σύνολο (ensemble). Από γεωμετρική άποψη, ένα στατιστικό σύνολο αντιστοιχεί σε ένα πολύ μεγάλο σύνολο σημείων στο χώρο φάσεων. Σε μια δεδομένη χρονική στιγμή t , αυτό το σύνολο σημείων κατανέμεται

με ένα συγκεκριμένο τρόπο. Αυτή η κατανομή μπορεί να χαρακτηριστεί ποσοτικά από τη συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας του συνόλου.

2.2. Εξισώσεις κίνησης

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η Μοριακή Δυναμική είναι μια μέθοδος προσομοίωσης που βασίζεται στη Κλασική Μηχανική. Συνεπώς, θα πρέπει να δούμε τους διάφορους φορμαλισμούς που μας παρέχει η Κλασική Δυναμική για τη διατύπωση των εξισώσεων κίνησης.

1. Νευτώνειος φορμαλισμός: Η βασική εξίσωση σε αυτή την περίπτωση είναι ο δεύτερος νόμος του Νεύτωνα.

$$\mathbf{F}_i = m_i \cdot \ddot{\mathbf{r}}_i \quad (2.1)$$

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} V \quad (2.2)$$

όπου m_i , \mathbf{r}_i και \mathbf{F}_i είναι η μάζα, το διάνυσμα συντεταγμένων και η δύναμη που δρα πάνω στο σωματίδιο i και η $\mathcal{U}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$ είναι η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας του συστήματος. Το μειονέκτημα στην περίπτωση αυτού του φορμαλισμού είναι η αποκλειστική χρήση καρτεσιανών συντεταγμένων. Στην περίπτωση που υπάρχουν επιπλέον περιορισμοί στο σύστημα (π.χ ο περιορισμός ενός χημικού δεσμού στο μήκος ισορροπίας) η δύναμη που δρα πάνω στο σωματίδιο i παίρνει την κάτωθι μορφή:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} V + \mathbf{g}_i \quad (2.3)$$

όπου \mathbf{g}_i είναι η δύναμη περιορισμού (constraint force) επί του σωματιδίου i . Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής γίνεται λόγος μόνο για ολονομικούς περιορισμούς (holonomic constraints). Οι ολονομικοί περιορισμοί εκφράζονται μέσω εξισώσεων που περιλαμβάνουν μόνο τις γενικευμένες συντεταγμένες \mathbf{q} και το χρόνο t . Έτσι λοιπόν η γενική τους μορφή εκφράζεται μέσω της εξίσωσης:

$$f(\mathbf{q}, t) = 0 \quad (2.4)$$

2. Λαγκρανζιανός φορμαλισμός: Η Λαγκρανζιανή συνάρτηση γράφεται ως η διαφορά της δυναμικής από την *κινητική* ενέργεια.

$$L = L(\mathbf{q}, \dot{\mathbf{q}}, t) \equiv K(\mathbf{q}, \dot{\mathbf{q}}, t) - V(\mathbf{q}, \dot{\mathbf{q}}, t) \quad (2.5)$$

Το διάνυσμα \mathbf{q} είναι το διάνυσμα γενικευμένων συντεταγμένων και ορίζει την απεικόνιση του συνολικού συστήματος. Ο αριθμός των συνιστωσών του \mathbf{q} μπορεί να είναι μικρότερος του αριθμού $3N$ των ατομικών συντεταγμένων, σε περίπτωση που το σύστημα υπόκειται σε ολονομικούς περιορισμούς. Η τροχιά $\mathbf{q}(t)$ θα πρέπει να ικανοποιεί το παρακάτω σύνολο διαφορικών εξισώσεων:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{q}_k} \right) - \left(\frac{\partial L}{\partial q_k} \right) = 0 \quad (2.6)$$

Η παραπάνω εξίσωση αποτελεί τη διαφορική έκφραση της αρχής ελάχιστης δράσεως του Hamilton. Η διατύπωση αυτής της εκφράσεως έχει ως εξής: Αν για ένα μηχανικό σύστημα στο οποίο όλες οι δυνάμεις, εκτός από τις δυνάμεις που εκφράζουν επιπλέον περιορισμούς (π.χ επιβολή ακαμψίας των δεσμών στο μήκος ισορροπίας τους), μπορούν να εξαχθούν από ένα γενικευμένο βαθμωτό δυναμικό \mathcal{V} το οποίο μπορεί να είναι συνάρτηση των συντεταγμένων, ταχυτήτων και του χρόνου, τότε η κίνηση του συστήματος από μια χρονική στιγμή t_1 σε μια άλλη χρονική στιγμή t_2 είναι τέτοια ώστε το επικαμπύλιο ολοκλήρωμα α' είδους:

$$S = \int_{t_1}^{t_2} (\mathbf{q}, \dot{\mathbf{q}}, t) dt \quad (2.7)$$

να έχει ένα στάσιμο σημείο πάνω στη καμπύλη (τροχιά) S που περιγράφει την κίνηση.

3. Χαμιλτονιανός φορμαλισμός: Στα πλαίσια αυτού του φορμαλισμού, κεντρικής σημασίας είναι η Χαμιλτονιανή συνάρτηση

$$H(\mathbf{q}, \mathbf{p}, t) \equiv \sum_k \dot{q}_k p_k - L(\mathbf{q}, \dot{\mathbf{q}}, t) \quad (2.8)$$

όπου η γενικευμένη ορμή p_k η συζυγής προς τη γενικευμένη συντεταγμένη q_k ορίζεται ως

$$p_k = \frac{\partial L}{\partial \dot{q}_k} \quad (2.9)$$

Είναι σαφές από την παραπάνω εξίσωση ότι η Χαμιλτονιανή και η Λαγκρανζιανή συνδέονται μέσω ενός μετασχηματισμού Legendre. Μια διαφορετική περιγραφή της τροχιάς δίνεται από τις κανονικές εξισώσεις

$$\dot{q}_k = \frac{\theta H}{\theta p_k} \quad (2.10)$$

$$\dot{p}_k = -\frac{\theta H}{\theta q_k} \quad (2.11)$$

Αν η Χαμιλτονιανή δεν εξαρτάται ρητά από τον χρόνο, τότε η συνάρτηση H είναι μια σταθερά της κίνησης, που αντιστοιχεί στη συνολική ενέργεια του συστήματος (συντηρητικά συστήματα).

2.3. Συναρτήσεις συσχέτισης (correlation functions)

Οι Συσχετίσεις μεταξύ δυο τυχαίων και ανεξάρτητων ποσοτήτων ποσοτήτων A και B ποσοτικοποιούνται μέσω του συντελεστή :

$$C_{AB} = \langle \delta A \delta B \rangle_{ens} / [\sigma(A)\sigma(B)] \quad (2.12)$$

$$\sigma^2(A) = \langle A^2 \rangle_{ens} - \langle A \rangle_{ens}^2 \quad (2.13)$$

$$\delta A = A - \langle A \rangle_{ens} \quad (2.14)$$

Παρόμοιες εξισώσεις ισχύουν για την ποσότητα B . Οι μέσοι όροι λαμβάνονται ως προς την κατανομή πιθανοτήτων ενός στατιστικού συνόλου ισορροπίας. Ο συντελεστής c_{AB} έχει εύρος τιμών μεταξύ 0 και 1, με τις τιμές πλησίον του 1 να υποδεικνύουν σημαντικό βαθμό συσχέτισης. Η ιδέα του συντελεστή συσχέτισης είναι δυνατόν να διευρυνθεί θεωρώντας ότι οι ποσότητες A και B μπορούν να εκτιμηθούν σε δυο διαφορετικές χρονικές στιγμές. Η ποσότητα που προκύπτει υπό συνθήκες ισορροπίας είναι μια συνάρτηση της διαφοράς χρόνου t και λέγεται χρονική συνάρτηση συσχέτισης $c_{AB}(t)$. Όταν οι φυσικές συναρτήσεις A και B συμπίπτουν, η ποσότητα $c_{AA}(t)$ λέγεται συνάρτηση αυτοσυσχέτισης ως προς χρόνο (time autocorrelation function) και το ολοκλήρωμά της ως προς το χρόνο (από $t=0$ έως $t=+\infty$) είναι ο χρόνος συσχέτισης t_A . Οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης είναι εξαιρετικής σημασίας στις μοριακές προσομοιώσεις, επειδή:

- δίνουν μια ξεκάθαρη εικόνα της δυναμικής σε ένα ρευστό
- τα ολοκληρώματά τους ως προς το χρόνο t_A μπορούν συχνά να συνδεθούν με μακροσκοπικούς συντελεστές μεταφοράς.

- οι μετασχηματισμοί τους κατά Fourier $c_{AA}(\omega)$ μπορούν να συνδεθούν με πειραματικά φάσματα.
- Η μη κανονικοποιημένη συνάρτηση συσχέτισης ορίζεται από τη σχέση

$$C_{AB}(t) = \langle \delta(A(t))\delta(B(t)) \rangle_{ens} = \langle \delta(A(\Gamma(t)))\delta(B(\Gamma(t))) \rangle_{ens} \quad (2.15)$$

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι αμφότερες οι ποσότητες c_{AB} και C_{AB} εξαρτώνται από το ποιο στατιστικό σύνολο προσομοιώνεται. Η σύνδεση μεταξύ συναρτήσεων συσχέτισης και συντελεστών μεταφοράς επιτυγχάνεται μέσω της θεωρίας γραμμικής απόκρισης (linear response theory), η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε στατιστικό σύνολο. Οι συντελεστές μεταφοράς μπορούν να οριστούν από την απόκριση ενός συστήματος σε μια διαταραχή. ^[79]

2.4. Υπολογισμός αλληλεπιδράσεων μικρής και μεγάλης εμβέλειας

Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στις ατομιστικές προσομοιώσεις είναι άλλοτε δεσμικές και άλλοτε μη δεσμικές. Οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις είναι οι ηλεκτροστατικής φύσεως και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Οι πρώτες ποσοτικοποιούνται μέσω δυναμικού Coulomb ενώ οι δεύτερες μέσω δυναμικού Lennard-Jones. Επίσης, αυτές οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται σε μικρής και μεγάλης εμβέλειας. Κριτήριο για το διαχωρισμό τους αποτελεί μία κρίσιμη τιμή μίας απόστασης που ονομάζεται ακτίνα αποκοπής r_{cutoff} . Αν οι αποστάσεις είναι μικρότερες της r_{cutoff} τότε οι αλληλεπιδράσεις είναι μικρής εμβέλειας, στην αντίθετη περίπτωση είναι μεγάλης.

Για τη μελέτη του πεδίου δυνάμεων μικρής εμβέλειας (forcefield) χρησιμοποιείται η κλασική μεθοδολογία που αντιστοιχεί στο δυναμικό ως συνάρτηση της ακτίνας αποκοπής. Για αποστάσεις μεγαλύτερες της κρίσιμης ακτίνας, κάνουμε την παραδοχή ότι το σύστημα δεν αισθάνεται την παρουσία αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται προκειμένου να εξοικονομηθεί υπολογιστικός χώρος και χρόνος και ονομάζεται μέθοδος σωματιδίου-σωματιδίου (Particle-Particle, PP). Η παρακάτω μαθηματική σχέση εκφράζει τις αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας.

$$\{E_{\text{συστήματος}} = E_{\text{short-range}} \quad r < r_{\text{cutoff}} \quad \} \quad (2.16)$$

$$0 \quad r > r_{\text{cutoff}}$$

Παρόλα αυτά αν η θεώρηση της μηδενικής δύναμης δεν μπορεί να εφαρμοστεί πάντοτε καθώς τα δυναμικά σε μεγάλες αποστάσεις τείνουν να λάβουν σταθερές μη αμελητέες τιμές, για αυτό το λόγο υπάρχει ένας διορθωτικός παράγοντας (tail factor).

Έτσι ισχύει το ακόλουθο:

$$\{E_{\text{συστήματος}} = E_{\text{short-range}} + E_{\text{tail}} \quad r < r_{\text{cutoff}} \quad \} \quad (2.17)$$

$$r > r_{\text{cutoff}}$$

Σε περίπτωση υπολογισμού αλληλεπιδράσεων μεγάλης εμβέλειας, προκειμένου να επιταχυνθούν οι υπολογισμοί χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι σωματιδίου-πλέγματος

(Particle-Mesh,PM) . Αρχικά οι διαστάσεις της κυψελίδας διακριτοποιούνται σε κανονικό πλέγμα και η κατανομή του φορτίου του συστήματος κατανέμεται σε διακριτά σημεία του πλέγματος. Εν συνεχεία η κατανομή του φορτίου μετατοπίζεται στο χώρο Fourier και μέσω των μετασχηματισμών Fourier επιλύονται οι εξισώσεις Poisson για το ηλεκτροστατικό δυναμικό.

Έτσι προκύπτει το δυναμικό σε κάθε ένα σημείο του πλέγματος. Γίνεται η παραδοχή ότι παίρνουμε τις τιμές των δυναμικών που είναι πιο κοντά στα σημεία του πλέγματος έναντι των πραγματικών δυναμικών που δρουν σε αυτά. Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω μεθόδων οδηγεί στη μέθοδο PPPM (Particle-Particle-Particle-Mesh) για υπολογισμό δυνάμεων τόσο μικρής όσο και μεγάλης εμβέλειας μόνο που στη δεύτερη περίπτωση οι αλληλεπιδράσεις υπολογίζονται μέσω της μεθόδου Fourier για ακτίνα μεγαλύτερη της ακτίνας αποκοπής.^{[22][23]}

2.4.1. Πεδίο δυνάμεων (ForceField)⁷⁹

Το σύνολο των παραμέτρων που περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων ενός συστήματος λέγεται *πεδίο δυνάμεων (force field)*. Για την προσομοίωση του συστήματος που μελετάται στην παρούσα Διπλωματική Εργασία χρησιμοποιούνται επιμέρους *πεδία δυνάμεων*.

Τονίζεται ότι στις δεσμικές αλληλεπιδράσεις (bond interactions) περιλαμβάνονται δεσμοί (bonds), γωνίες κάμψης (bending angles) και διεδρες γωνίες (dihedral angles). Οι διεδρες γωνίες, κατά γενική ομολογία, που εκφράζουν την περιστροφικότητα γύρω από ένα χημικό δεσμό ονομάζονται γνήσιες διεδρες γωνίες (proper dihedrals). Παρόλα αυτά, συχνά επιλέγονται διεδρες γωνίες ώστε οι επίπεδες ομάδες να διατηρούν τη συγκεκριμένη δομή, όπως οι αρωματικοί δακτύλιοι ή για να εμποδιστεί η πιθανή μετατροπή των εναντιομερών μορίων από τη μια στερεοχημική απεικόνιση στην άλλη (L σε D και αντιστρόφως). Σε αυτή την περίπτωση οι διεδρες ονομάζονται καταχρηστικές διεδρες (improper dihedrals). Τα δυναμικά δεσμών, γωνιών κάμψης και διεδρων γωνιών σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρώτων, δεύτερων και τρίτων γειτόνων, αντίστοιχα.

Αναφορικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τρίτων γειτόνων εκτός των διεδρων γωνιών υπάρχουν και μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις (non-bonded interactions). Οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις αναφέρονται σε αλληλεπιδράσεις πέραν των τρίτων γειτόνων όπως εύστοχα αντιλαμβάνεται κανείς από το την προηγούμενη παράγραφο 2.3. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων που διαφορετικών μορίων (διαμοριακές αλληλεπιδράσεις). Το δυναμικό που χρησιμοποιείται για να εκφράσει τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις είναι το δυναμικό Lennard-Jones, το οποίο διατυπώνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$V_{LJ}(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2.18)$$

Ἡ ἰσοδύναμα

$$V_{LJ}(r) = 4\varepsilon \frac{C_{12}}{r^{12}} - \frac{C_6}{r^6} \quad (2.19)$$

με ε , σ , C_{12} , C_6 τις παραμέτρους του προαναφερθέντος δυναμικού.

Όπου

$$C_{12} = 4\varepsilon\sigma^{12}, \quad C_6 = 4\varepsilon\sigma^6 \quad (2.20)$$

Εδώ πρέπει να διασαφηνιστεί τί γίνεται στην περίπτωση που απαιτείται η περιγραφή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο ατόμων διαφορετικού τύπου.

Αν οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις περιγράφονται από ένα δυναμικό τύπου Lennard-Jones, τότε τα δύο άτομα έχουν διαφορετικές παραμέτρους ε και σ , που διέπουν τις αλληλεπιδράσεις με όμοιά τους άτομα. Επομένως, για την περιγραφή της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο ατόμων διαφορετικού τύπου πρέπει να βρεθεί ένας τρόπος να συνδυαστούν οι παράμετροι που τα προσδιορίζουν.

Οι εξισώσεις που εκφράζουν τις νέες παραμέτρους ως συνάρτηση των παλαιών ονομάζονται κανόνες συνδυασμού (*mixing rules*). Κλασσικό παράδειγμα τέτοιων κανόνων είναι οι κανόνες Lorentz-Berthelot, οι οποίοι περιγράφονται από τις εξισώσεις:

$$\sigma_{AB} = \frac{1}{2}(\sigma_A + \sigma_B), \quad \varepsilon_{AB} = \sqrt{\varepsilon_A \varepsilon_B} \quad (2.21)$$

Όπου σ_A , ε_A και σ_B , ε_B οι παράμετροι για αλληλεπιδράσεις ζευγών $A-A$ και $B-B$, αντίστοιχα. Οι παράμετροι σ_{AB} και ε_{AB} περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων A και B .

Προφανώς, στην κατηγορία μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων εμπίπτουν και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που περιγράφονται από το δυναμικό Coulomb.

Η ταξινόμηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων σε ένα σύστημα ήταν αναγκαία ώστε να κατανοηθεί πλήρως το ατομιστικό μοντέλο που χρησιμοποιείται για τη μοριακή προσομοίωση της διπλοστοιβάδας της λιπιδικής με τα μόρια του νερού.

2.4.2. Συνθήκες διεξαγωγής των ατομιστικών προσομοιώσεων⁷⁹

Όλες οι προσομοιώσεις του υπό εξέταση συστήματος διεξάγονται στο στατιστικό σύνολο NPT. Αυτό σημαίνει ότι ο αριθμός των μορίων παραμένει σταθερός, ενώ η πίεση και η θερμοκρασία διακυμαίνονται γύρω από μια σταθερή τιμή. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία του συστήματος διατηρείται σταθερή στους 323 K κάνοντας χρήση του *θερμοστάτη Berendsen77 (Berendsen thermostat)*. Η πίεση του συστήματος διατηρείται επίσης σταθερή και ίση με 1 bar χρησιμοποιώντας το *ρυθμιστή πίεσης Berendsen77 (Berendsen barostat)*. Τονίζεται ξανά ότι τόσο η θερμοκρασία όσο και η πίεση παραμένουν σταθερές κατά το μέσο όρο και μόνο και όχι με βάση τη χρονική εξέλιξη της προσομοίωσης .

Οι σταθερές συζεύξεως των ρυθμιστών για την πίεση και την θερμοκρασία είναι 1 ps και 0.1 ps αντίστοιχα. Ακόμη, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η πίεση ισούται με 1 bar και στις τρεις διευθύνσεις x , y , z . Το είδος αυτό της συζεύξεως για την πίεση είναι γνωστό στη βιβλιογραφία ως ισότροπο (isotropic pressure coupling).

Τονίζεται ότι η θερμοκρασία του συστήματος διατηρείται σταθερή, η θερμοκρασία συζεύξεως εφαρμόζεται ξεχωριστά τόσο στο λιπίδιο όσο και στο νερό, όμως η σταθερά συζεύξεως για το λιπίδιο και το νερό παραμένει η ίδια.

Το χρονικό βήμα ολοκλήρωσης των εξισώσεων κίνησης ισούται με $2fs$. Η προαναφερθείσα τιμή θεωρείται εύλογη για μοριακές προσομοιώσεις σε ατομιστικό επίπεδο.

Η μέθοδος της Μοριακής Δυναμικής εφαρμόζεται για συνολικό χρόνο της προσομοίωσης 400 ns. Όσον αφορά τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις, διακρίνονται δυο περιπτώσεις: τις αλληλεπιδράσεις Lennard-Jones καθώς και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να εισαχθούν δυο ακτίνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποκοπή των δυναμικών. r_{cutoff} είναι η ακτίνα αποκοπής, ενώ r_l η ακτίνα πέρα από την οποία η δύναμη αντικαθίσταται από ένα πολυώνυμο τρίτου βαθμού ώστε η δύναμη να είναι ίση με μηδέν στην ακτίνα r_{cutoff} . Είναι προφανές ότι πάντοτε η ακτίνα r_l είναι μικρότερη από την ακτίνα αποκοπής. Η δύναμη που ασκείται μεταξύ δυο ατόμων περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση της μορφής:

$$F_{ij} = F(r_{ij}) \frac{r_{ij}}{r_1} \quad (2.22)$$

Η εξίσωση (2.22) περιγράφει τη δύναμη που δέχεται το σωματίδιο i από το σωματίδιο j . Η δύναμη αποτελεί διανυσματικό μέγεθος, έτσι το δεύτερο σκέλος της εξίσωσης συνίσταται από το μοναδιαίο διάνυσμα που συνδέει τα σωματίδια i, j και ένα βαθμωτό μέγεθος. Αυτό το βαθμωτό μέγεθος είναι η παράγωγος του μή δεσμικού δυναμικού ως προς την απόσταση r_{ij} για $r_{ij} < r_1$, αλλ' αντικαθίσταται από ένα πολυώνυμο τρίτου βαθμού στο διάστημα $[r_1, r_{\text{cutoff}}]$.

Για τις αλληλεπιδράσεις Lennard-Jones οι τιμές είναι οι εξής: $r_1 = 1,0 \text{ nm}$ και $r_{\text{cutoff}} = 1.2 \text{ nm}$. Όπως ήδη έχει τονιστεί, όλοι οι δεσμοί είναι άκαμπτοι κι έχει επέλθει ισορροπία αναφορικά με το μήκος τους. Μέσω αλγορίθμου, επίσης προσδιορίζεται και το όριο ανοχής TOL (*tolerance*), σχετικό σφάλμα, που είναι της τάξης του 10^{-5} . Εν'ολίγοις ο αλγόριθμος τρέχει έως ότου όλοι οι περιοριστικοί παράμετροι να ικανοποιούν την παραπάνω συνθήκη.

2.5. Μέθοδος Ανάλυσης Σταθμισμένου Ιστογράμματος (WHAM) και Υπολογισμός της Δυναμικού Μέσης Δύναμης (PMF)^{57,83}

Η μέθοδος του σταθμισμένου Ιστογράμματος Ανάλυσης (WHAM) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την υπολογισμό του δυναμικού της μέσης δύναμης (PMF) από ένα σύνολο προσομοιώσεων δειγματοληψίας κάλυψης (*umbrella sampling*). Εδώ, Παρουσιάζεται η εντολή WHAM, που ονομάζεται `g_wham` και είναι ενσωματωμένη στο πακέτο GROMACS. Η `g_wham` υπολογίζει στατιστικά σφάλματα χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανάλυσης *bootstrap*. Οι τρεις μέθοδοι *bootstrap* που υποστηρίζονται είναι:

- (i) εκκίνηση νέων τροχιών με βάση τα ιστογράμματα *umbrella sampling*,
- (ii) πλήρη ιστογράμματα *bootstrapping*
- (iii) Πλήρη ιστογράμματα *Bayesian bootstrapping*, δηλαδή αυτά που εκκινούνται μέσω της εκχώρησης των τυχαίων σταθμισμένων ιστογραμμάτων. Η *Bayesian bootstrapping* παρουσιάζει τη στατιστική εκτίμηση προσομοίωσης της κατανομής δειγματοληψίας μιας παραμέτρου, η *Bayesian bootstrap* προσομοιώνει την αντίστροφη κατανομή της παραμέτρου ακόμα κι αν λειτουργικά και συμπερασματικά οι μέθοδοι είναι αρκετά παρόμοιες. Επειδή οι μέθοδοι II και III εξετάζουν μόνο πλήρη ιστογράμματα ως ανεξάρτητα σημεία δεδομένων, αυτές οι μέθοδοι δεν απαιτούν τον ακριβή υπολογισμό των αυτοσυσχετίσεων πολλές φορές. Έχει αποδειχθεί ότι, με επαρκή δειγματοληψία, διεάγουν εκκίνηση νέων τροχιών που επιτρέπει μια ακριβή εκτίμηση σφάλματος. Με την παρουσία της αυτοσυσχετίσης σε μεγαλύτερη εμβέλεια, ωστόσο, τα πλήρη ιστογράμματα (*Bayesian*) *bootstrapping* δίνουν μια πιο αξιόπιστη εκτίμηση σφάλματος.

Την έννοια του δυναμικού της μέσης δύναμης (PMF) που ισοδυναμεί με το δυναμικό από τη μέση δύναμη που ασκείται στο σύνολο των απεικονίσεων των $n+1, \dots, N$ μορίων πάνω σε ένα σωματίδιο j (2.23), αρχικά εισήγαγε ο Kirkwood, 1^[83] συχνά χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει τη δυναμική κι ενεργητικότητα των μεταβάσεων σε στερεά, ρευστά, και βιομοριακά συστήματα. Μια συνήθως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον υπολογισμό του δυναμικού μέσης δύναμης δεδομένης της έκβασης της συντεταγμένης της αντίδρασης (ζ) είναι η δειγματοληψία κάλυψης. Η τεχνική αυτή έχει ως στόχο να ξεπεράσει περιορισμένη δειγματοληψία σε ενεργειακά δυσμενείς απεικονίσεις με τον περιορισμό του συστήματος προσομοίωσης με ένα πρόσθετο (συνήθως αρμονικό) δυναμικό.

$$-\nabla_j w^{(n)} = \frac{\int e^{-\beta V} (-\nabla_j V) d\mathbf{q}_{n+1} \cdots d\mathbf{q}_N}{\int e^{-\beta V} d\mathbf{q}_{n+1} \cdots d\mathbf{q}_N} \quad j = 1, 2, \dots, n \quad (2.23)$$

Όπου, $w^{(n)}$ είναι το δυναμικό μέσης δύναμης και $\beta=1/k_b T$.

Ως ειδική περίπτωση του υπολογισμού ελεύθερης ενέργειας, συζητήθηκε η εξαγωγή δυναμικών της μέσης δύναμης από ατομιστικές προσομοιώσεις. Αυτό είναι στρατηγικής σημασίας για τη διευθέτηση μεγάλου χρόνου και μήκους κλίμακας ιδιοτήτων. Γενικά, αν έχουμε διαχωρίσει το χώρο διαμόρφωση ενός συστήματος σε ένα υποσύνολο (αργά εξελισσόμενων) βαθμών ελευθερίας (\mathbf{R}), πάνω στους οποίους επιθυμούμε να επικεντρωθούμε, και σε ένα συμπληρωματικό υποσύνολο (γρήγορα εξελισσόμενων) βαθμών ελευθερίας (\mathbf{r}), ορίζουμε το δυναμικό της μέσης δύναμης σε σχέση με τη μεταβλητή \mathbf{R} , $U(\mathbf{R})$, όπου:

$$U(\mathbf{R}) = -k_b T \ln \int \exp[-\beta u(\mathbf{R}, \mathbf{r})] d\mathbf{r} + constant \quad (2.24)$$

Όπου $\beta = 1/(k_b T)$ και $U(\mathbf{R})$, είναι η διαμορφωμένη ελεύθερη ενέργεια που περιγράφει την αποτελεσματική αλληλεπίδραση μεταξύ των βαθμών ελευθερίας \mathbf{R} , υποθέτοντας ότι οι βαθμοί ελευθερίας \mathbf{r} έχουν υποβληθεί σε εξισορρόπηση με τις τρέχουσες τιμές του \mathbf{R} ; Αυτή θα είναι και η περίπτωση αν οι χρόνοι χαλάρωσης για την κίνηση των βαθμών ελευθερίας \mathbf{r} είναι πολύ μικρότεροι από τους χαρακτηριστικούς χρόνους που διέπουν την εξέλιξη των βαθμών ελευθερίας \mathbf{R} . Το δυναμικό της μέσης δύναμης παρέχει μια σωστή και συνεπή θερμοδυναμική περιγραφή των βαθμών ελευθερίας \mathbf{R} , προβλέποντας τους βαθμούς ελευθερίας \mathbf{r} .

2.6. Μία ενδελεχής επισκόπηση των μηχανημάτων του Υπερυπολογιστή ARIS⁸⁴

Αναπόσπαστο στοιχείο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας είναι και η αναφορά στο σύστημα που έλαβαν χώρα οι προσομοιώσεις μας, ο υπερυπολογιστής ARIS.

Ο ΑΡΗΣ είναι το όνομα του ελληνικού υπερυπολογιστή, που αναπτύχθηκε και λειτουργεί από το ΕΔΕΤ (Ελληνικό Δίκτυο Έρευνας και Τεχνολογίας) στην Αθήνα. Ο ΑΡΗΣ αποτελείται από 532 υπολογιστικούς κόμβους χωρισμένους σε τέσσερις «νησίδες», όπως αναφέρονται παρακάτω:

- 426 λεπτά κόμβους: Κανονικοί υπολογιστικοί κόμβοι χωρίς επιταχυντή.
- 44 κόμβοι GPU: «2 x NVIDIA Tesla k40m" επιτάχυνόμενοι κόμβοι.
- 18 phi κόμβοι: "2 x Intel Xeon Phi 7120p" επιταχυνόμενοι κόμβοι.
- 44 κόμβοι μεγαλύτερης χωρητικότητας: Οι κόμβοι αυτοί παρουσιάζουν να έχουν μεγαλύτερο αριθμό πυρήνων και μνήμης ανά πυρήνα από ένα λεπτό κόμβο.

Όλοι οι κόμβοι συνδέονται μέσω δικτύου Infiniband και ο χώρος αποθήκευσης είναι 2PB GPFS (General Parallel File System). Η πρόσβαση στο σύστημα παρέχεται από δύο κόμβους σύνδεσης.

Παρακάτω παρατίθενται εικόνες από τις προδιαγραφές των διαφόρων κόμβων (nodes) όπως αυτές παρουσιάζονται στην αυθεντική ιστοσελίδα του υπερυπολογιστή ARIS:

THIN nodes technical information	
Architecture	x86-64
System	IBM NeXtScale nx360 M4
Total number of nodes	426
Total number of cores	8520
Total amount of RAM [TByte]	27
Total Linpack Performance [TFlop/s]	180
Components	
Processor Type	Ivy Bridge - Intel Xeon E5-2680v2
Nominal Frequency [GHz]	2.8
Processors per Node	2
Cores per Processor	10
Cores per Node	20
Hyperthreading	OFF
Memory	
Memory per Node [GByte]	64

Εικόνα 2.1 : Γενικές πληροφορίες για τον Υπερυπολογιστή ARIS.

GPU nodes technical information	
Architecture	x86-64
System	DELL PowerEdge R730
Total number of nodes	44
Total number of cores	880
Total number of gpus	88
Total amount of RAM [TByte]	2,8
Total Linpack Performance [TFlop/s]	83,65
Components	
Processor Type	Haswell - Intel(R) Xeon(R) E5-2660v3
Nominal Frequency [GHz]	2.6
Processors per Node	2
Cores per Processor	10
Cores per Node	20
Hyperthreading	OFF
Accelerators	
Accelerator type	GPU - NVIDIA Tesla K40
Accelerators per node	2
Accelerator memory [GByte]	12
Memory	
Memory per Node [GByte]	64

Εικόνα 2.2 : Τεχνικές πληροφορίες για τους κόμβους GPU (Graphics Possessing Unit) :44 κόμβοι GPU προσφέρουν ένα συνδυασμένο σύνολο θεωρητικῶν μέγιστων απόδοσης των 162,45 TFLOPS/Teraflop-τρόπος μέτρησης της δύναμης ενός υπολογιστή με μαθηματική έκφραση αντί για GHz- (36,61 TFLOPS από CPUs και 125,84 TFLOPS από GPUs). Κάθε NVidia K40 GPU ενσωματώνει 2880 CUDA(ένα παράλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα και προγραμματιστικό μοντέλο, που έχει εφευρεθεί από την NVIDIA) πυρήνες.

FAT nodes technical information	
Architecture	x86-64
System	DELL PowerEdge R820
Total number of nodes	44
Total number of cores	1760
Total amount of RAM [TByte]	22,5
Total Linpack Performance [TFlop/s]	32,01
Components	
Processor Type	SandyBridge - Intel(R) Xeon(R) CPU E5-4650v2
Nominal Frequency [GHz]	2.4
Processors per Node	4
Cores per Processor	10
Cores per Node	40
Hyperthreading	OFF
Memory	
Memory per Node [CByte]	512

Εικόνα 2.3: Τεχνικές πληροφορίες για τους κόμβους ευρύτερης χωρητικότητας. Οι κόμβοι ευρύτερης χωρητικότητας παρέχουν περισσότερους πυρήνες και περισσότερη μνήμη ανά εξυπηρετητή σε σύγκριση με τους κανονικούς κόμβους δύο υποδοχών). Η συνολική θεωρητική απόδοση είναι 33,79 TFLOPS. Οι κόμβοι ευρύτερης χωρητικότητας είναι οι πλέον κατάλληλοι για κοινές εφαρμογές μνήμης (π.χ. OpenMP-based) και σε γενικές εφαρμογές που απαιτούν την εκτέλεση επεξεργασίας στη μνήμη των μεγάλων συνόλων δεδομένων.

Login nodes	
Number of Nodes	2
Processor Type	Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2640 v2
Nominal Frequency [GHz]	2.00GHz
Processors per Node	2
Cores per Processor	16
Threads per Processor	32
Hyperthreading	ON
Memory per Node [CByte]	128

Εικόνα 2.4 : Κόμβοι εγγραφής

Phi nodes technical information	
Architecture	x86_64
System	DELL PowerEdge R730
Total number of nodes	18
Total number of phi's	36
Total number of cores	360
Total amount of RAM (TByte)	1,1
Total Linpack Performance (TFlop/s)	39,04
Components	
Processor Type	Haswell - Intel(R) Xeon(R) E5-2660v3
Nominal Frequency (GHz)	2.6
Processors per Node	2
Cores per Processor	10
Cores per Node	20
Hyperthreading	OFF
Accelerators	
Accelerator type	MIC - Intel Xeon Phi Coprocessor 7120P
Accelerators per node	2
Accelerator memory (CByte)	16
Memory	
Memory per Node (CByte)	64

Εικόνα 2.5: Τεχνικές πληροφορίες των κόμβων phi. Οι κόμβοι Phi ονομάζονται έτσι επειδή περιλαμβάνουν διπλούς επιταχυντές Intel Xeon Phi 7120P. Προσφέρουν μια συνδυασμένη θεωρητική μέγιστη απόδοση του 58,46 TFLOPS (14,98 TFLOPS από CPUs και 43,49 από τους επιταχυντές).

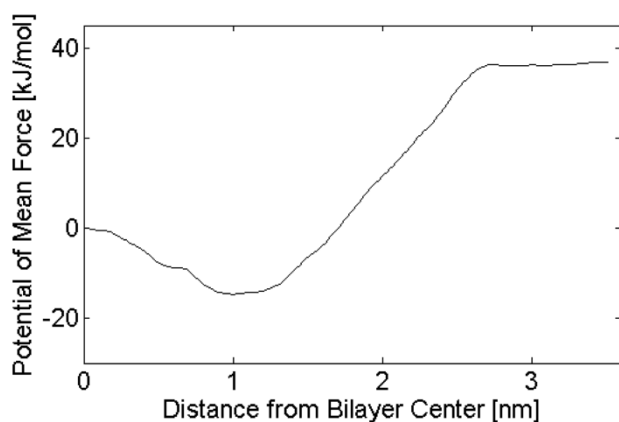
Κεφάλαιο 3: Υπολογιστικό μέρος

3.1. Περιγραφή των προσομοιώσεων

Καθ'ολη τη διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν τρεις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής διάρκειας 400ns η κάθε μία. Η κάθε προσομοίωση αντιστοιχούσε σε διαφορετική συγκέντρωση φαρμάκου στη διπλοστιβάδα της λιπιδικής μεμβράνης DPPC. Τα πρώτα 200ns αποτελούν το στάδιο εξισορρόπησης (ελάχιστη κατάσταση) ενώ τα υπόλοιπα 200 ns χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των ιδιοτήτων και αποτελούν το παραγωγικό στάδιο (productive stage). Όλες οι προσομοιώσεις εκτελέστηκαν στον υπερυπολογιστή ARIS σε $10 \text{ nodes} \cdot \frac{20 \text{ cores}}{\text{node}} = 200 \text{ cores}$, ενώ ο συνολικός υπολογιστικός χρόνος που δαπανήθηκε ανήλθε σε 60.000 *core hours*. Παραδείγματος χάριν αν μια προσομοίωση τρέξει σε 200 *cores* για 48 ώρες ο αριθμός των *core hours* ισούται με 9.600.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα που προέκυψαν μετά από μετεπεξεργασία (post-processing).

των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από τις προσομοιώσεις. Ακολουθεί εκτενής ανάλυση και σύγκριση των αποτελεσμάτων με πειραματικά αποτελέσματα σχετικών δημοσιεύσεων που αναφέρονται ενδελεχώς στη βιβλιογραφία.



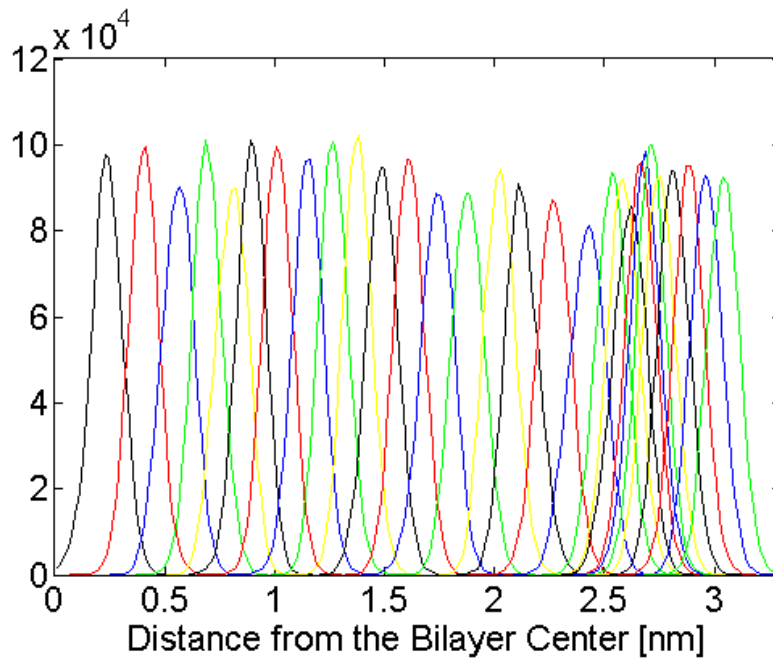
Γράφημα Γ.1: Απεικονίζεται το δυναμικό μέσης δύναμης (PMF-Potential Mean Force) του φαρμάκου candesartan-cilexetil από το κέντρο της διπλοστιβάδας έως την υδατική περιοχή (>2,5nm).

Το PMF του candesartan-cilexetil από την υδατική έως τη λιπιδική φάση υπολογίστηκε από μία σειρά προσομοιώσεων δειγματοληψίας κάλυψης (umbrella sampling) με τη συνταταγμένη της αντίδρασης, Z , να είναι ο άξονας Z , ($\zeta=0$ για το κέντρο της διπλοστιβάδας). Επίσης ένα αρμονικό δυναμικό ($k = \frac{500kJ}{mol\ nm^2}$) εφαρμόστηκε στο κέντρο μάζας του υπό μελέτη φαρμάκου.

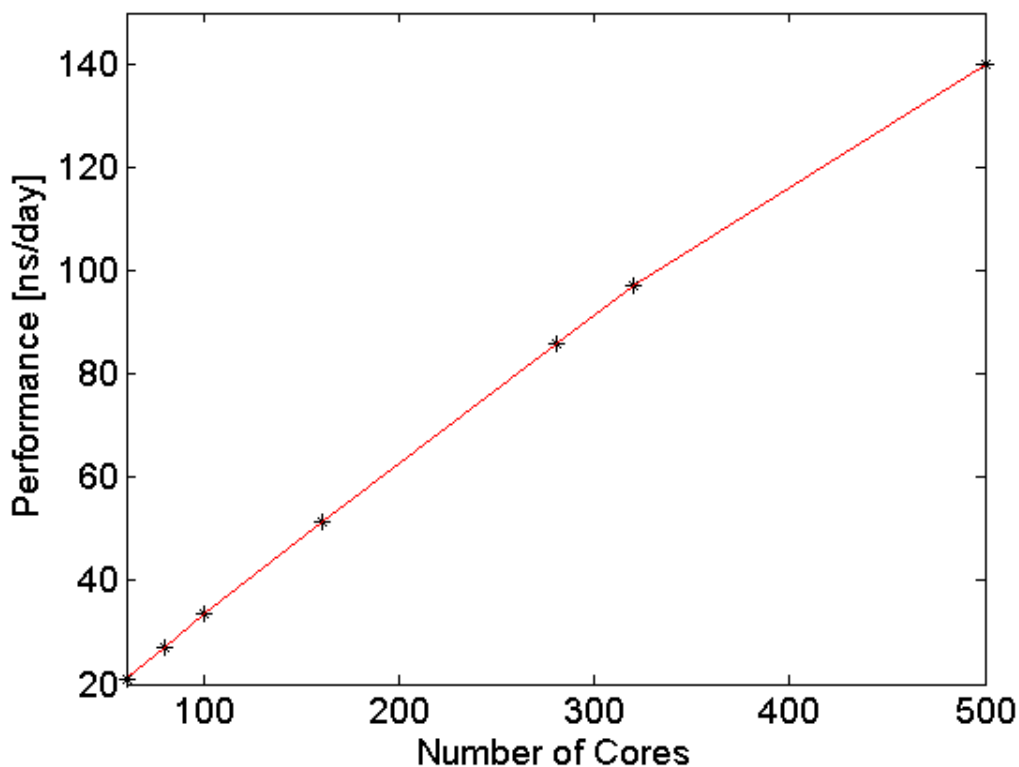
Η απόσταση για κάθε παράθυρο ορίστηκε μεταξύ των κέντρων μάζας της διπλοστιβάδας και του φαρμάκου. Συγκεκριμένα, η PMF υπολογίστηκε από τη μέθοδο σταθμισμένου ιστογράμματος ανάλυσης (WHAM-Weighted Histogram Analysis Method), που είναι διαθέσιμη στο GROMACS.

Το ολικό ελάχιστο βρίσκεται σε απόσταση κατά μήκος του άξονα Z περίπου 1nm από το κέντρο μάζας της διπλοστιβάδας..

Διεξάχθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ισορροπίας, στις οποίες το φάρμακο τοποθετήθηκε αρχικά στην υδατική φάση. Κατά τη διάρκεια μίας τέτοιας προσομοίωσης το φάρμακο αυθόρμητα. Εισήλθε στη μεμβράνη και σταθεροποιήθηκε σε μια θέση (1nm) η οποία είναι σε απόλυτη συμφωνία με την θέση ελαχίστου του PMF. Μία ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι το ενεργειακό φράγμα ($+\frac{14,7kJ}{mol}$) γύρω από τη μέση της διπλοστιβάδας που πρέπει να ξεπεραστεί από το candesartan cilexetil για να φτάσει στο απέναντι στρώμα. Επιπροσθέτως η ελεύθερη ενέργεια διείσδυσης του φαρμάκου στην λιπιδική φάση υπολογίστηκε από τη διαφορά του PMF σε μεγάλες αποστάσεις και στη θέση ελαχίστου. Αυτή η τιμή είναι περίπου ίση με ($-\frac{50,7kJ}{mol}$).



Γράφημα Γ.2: Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής ελέγχθηκαν τα ιστογράμματα των θέσεων των κέντρων μάζας για κάθε παράθυρο που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του δυναμικού μέσου δυνάμεως (PMF) μέσω των προσομοιώσεων δειγματοληψίας κάλυψης (umbrella sampling). Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι υπάρχει ικανοποιητική αλληλεπικάλυψη των ιστογραμμάτων. Συγκεκριμένα, στο προαναφερθέν διάγραμμα χρησιμοποιήθηκαν πέντε χρώματα (μαύρο, κόκκινο, μπλε, πράσινο και κίτρινο) τα οποία επαναλαμβάνονται κατ' αυτήν τη σειρά μέχρι εξαντλήσεως των χρησιμοποιούμενων παραθύρων. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες υπολογιστικές μελέτες και επιβεβαιώνουν τη σωστή επιλογή των παραθύρων.^[37] και Κεφάλαιο 2.



Γράφημα Γ.3: Διάγραμμα συγκριτικής αξιολόγησης (benchmarking) της κλιμάκωσης παραλληλίας προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής για μια μεμβράνη που περιέχει 288 μόρια DPPC και περιβάλλεται από 8756 μόρια νερού. Ο συνολικός αριθμός των ατόμων σε αυτό το σύστημα ανέρχεται σε 63708. Η καταγραφόμενη ποσότητα είναι η απόδοση της προσομοίωσης, μετρούμενη σε ns/day, η οποία απεικονίζεται ως συνάρτηση του συνολικού αριθμού πυρήνων (cores). Είναι εμφανές ότι υπάρχει μια γραμμική κι ανάλογη εξάρτηση της απόδοσης των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής συναρτήσει του αριθμού των πυρήνων, παρόλα αυτά γύρω στους 320 πυρήνες η γραμμή τεθλάται και η εξάρτηση είναι γραμμική αλλά όχι πλέον ανάλογη. Το διάγραμμα αυτό δημιουργήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος MultiCLC (ID pr001042, υπερυπολογιστής ARIS). Το βήμα ολοκλήρωσης των εξισώσεων κίνησης ήταν 2fs.

3.2 Υπολογισμός Δυναμικών Ιδιοτήτων του συστήματος

Ακολουθεί ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων για τις διαφορετικές ποσότητες μορίων φαρμάκου (2 μόρια, 4 μόρια και 6 μόρια). Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό τους είναι ο εξής:

$$n_2 = \frac{n_c}{n_c + n_{DPPC}} = \frac{2}{2 + 72} \% = 2,7\%$$

$$n_4 = \frac{n_c}{n_c + n_{DPPC}} = \frac{4}{4 + 72} \% = 5,3\%$$

$$n_6 = \frac{n_c}{n_c + n_{DPPC}} = \frac{6}{6 + 72} = 7,7\%$$

Για τα 2,4 και 6 μόρια αντιστοίχως.

Παρακάτω καταγράφονται οι εξισώσεις που περιγράφουν το μαθηματικό μοντέλο των ιδιοτήτων που εξετάστηκαν.

Προκειμένου να αναλυθούν μερικές ή όλες οι ενέργειες και άλλες ιδιότητες, όπως η ολική πίεση, ο ταυιστής πίεσης, η πυκνότητα, ο όγκος κουτιού και τα μεγέθη κουτιού, χρησιμοποιείται η εντολή υπολογισμού ενέργειας του συστήματος. Ο χρήστης καλείται να επιλέξει από μία ποικιλία ενεργειών, όπως η δυνητική, η κινητική ή η ολική ενέργεια, ή επί μέρους συνεισφορές όπως αυτές των Lennard Jones και δίδρων γωνιών.

Η ταχύτητα κέντρου μάζας προσδιορίζεται ως :

$$v_{com} = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i v_i \quad (3.1)$$

$$M = \sum_{i=1}^N m_i \quad (3.2)$$

Κι η εξίσωση (3.2) δίνει την ολική μάζα του συστήματος^[82]

Καθώς προσομοιώνουμε μόρια με μεγάλες ανθρακικές αλυσίδες, είναι ενδιαφέρον να υπολογιστεί ο μέσος προσανατολισμός των αλυσίδων. Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις παραμέτρων τάξης, εκ των οποίων οι περισσότερες σχετίζονται μεταξύ τους.

Όσον αφορά το υδρόφοβο τμήμα των μορίων DPPC, η παράμετρος τάξης δευτερίου ($-S_{CD}$) υπολογίστηκε για τις γραμμικές αλκυλικές αλυσίδες τους ($sn-1$ και $sn-2$) από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η αξία του συγκεκριμένου μεγέθους έγκειται στο ότι μετρείται μέσω πειραμάτων φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) σε δευτεριωμένα μόρια DPPC. Οι σχετικές εξισώσεις υπολογισμού των χρησιμοποιούμενων παραμέτρων τάξης είναι οι ακόλουθες:

$$-S_{CD} = \frac{2}{3} S_{xx} + \frac{1}{3} S_{yy} \quad (3.3)$$

$$S_{ij} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos \theta_i \cos \theta_j - \delta_{ij} \rangle \quad (3.4)$$

θ_i είναι η γωνία μεταξύ του i -οστού μοριακού άξονα και του άξονα Z ενώ δ_{ij} είναι το δέλτα του Kronecker.^[18] Οι αγκύλες $\langle \dots \rangle$ της εξίσωσης (2) συμβολίζουν τον χρονικό μέσο όρο επί όλων των μορίων DPPC και επί των δύο αλκυλικών αλυσίδων του, $sn-1$ και $sn-2$. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση στην τιμή της $-S_{CD}$ καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των υπό μελέτη φαρμάκων και ειδικότερα η αυξητική αυτή τάση είναι εντονότερη στα ενδιάμεσα άτομα άνθρακα των αλκυλικών αλυσίδων των μορίων DPPC. Επιπροσθέτως, πρέπει να αναφερθεί ότι δεν έχει μελετηθεί ακόμα πιθανή εξάρτηση των τιμών των $-S_{CD}$ από το χρησιμοποιούμενο στατιστικό σύνολο (λ.χ. NPT ή $N\gamma T$, όπου γ είναι η επιφανειακή τάση της διπλοστιβάδας).

Εύκολα υπολογίζεται και η πυκνότητα των ομάδων, όμως βασίζεται στις μάζες και δίνει γράφημα της πυκνότητας ή μερικής πυκνότητας προς τον άξονα κουτιού. Είναι χρήσιμο να επικεντρωθούμε στην κατανομή των ομάδων κατά μήκος της διεπιφάνειας της διπλοστιβάδας.^[82]

Για να προσδιοριστεί η σταθερά του συντελεστή διάχυσης D_A των σωματιδίων τύπου A , χρησιμοποιείται η σχέση Einstein:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \left(\frac{1}{i \in A} \left(\|\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0)\|^2 \right) \right) = 6D_A t \quad (3.5)$$

Η μέση τετραγωνική μετατόπιση και το D_A υπολογίζονται από την εντολή `g_msd`. Ένα index αρχείο που περιέχει τον αριθμό των ατόμων που χρησιμοποιείται και τη μέση τετραγωνική μετατόπιση MSD που έχει κατά μέσο όρο υπολογιστεί πάνω στα άτομα. Για μόρια που αποτελούνται από περισσότερα από ένα άτομα, το \mathbf{r}_i αποτελεί το κέντρο όλων των θέσεων μαζών των μορίων. Σε αυτή την περίπτωση, ο χρήστης χρησιμοποιεί ένα index αρχείο με αριθμούς μορίων. Τα αποτελέσματα θα είναι σχεδόν πανομοιότυπα με τον κατά μέσο όρο υπολογισμό πάνω στα άτομα. Παρόλα αυτά η εντολή `g_msd` μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό διάχυσης σε μία ή δύο διαστάσεις. Αυτό έχει εξέχον ενδιαφέρον για τη μελέτη οριζόντιας διάχυσης πάνω σε διεπιφάνειες. Ένα παράδειγμα μέσης τετραγωνικής μετατόπισης φαίνεται στο παρακάτω γράφημα SPC νερού. ^[82]

Επίσης αναλύονται οι δεσμοί Υδρογόνου (H-bonds) μεταξύ όλων των πιθανών δοτών D (donor) και αποδεκτών A (Acceptors). Για να προσδιοριστεί αν ένας δεσμός Υδρογόνου υπάρχει, χρησιμοποιείται ένα γεωμετρικό κριτήριο:

$$r \leq r_{HB} = 0,35 \text{ nm}$$

$$a \leq a_{HB} = 30^\circ$$

Αναλύονται όλοι οι δεσμοί Υδρογόνου που υπάρχουν μεταξύ δύο ομάδων ατόμων (που πρέπει να είναι είτε πανομοιότυπα ή να μη συμπίπτουν) ή σε ειδικές τριάδες δότη-αποδέκτη με τους παρακάτω τρόπους:

- Απόσταση δότη και αποδέκτη (r)
- Κατανομή όλων των δεσμών Υδρογόνου (H-bonds)
- Το συνολικό αριθμό των δεσμών Υδρογόνου σε κάθε χρονικό πλαίσιο
- Ο αριθμός των δεσμών Υδρογόνου χρονικά μεταξύ των υποκαταστατών, χωρισμένο σε ομάδες $n - n+i$, όπου n και $n+i$ είναι οι αριθμοί υπολείμματος και το i κυμαίνεται από 0-6. Η ομάδα για $i=6$ συμπεριλαμβάνει όλους τους δεσμούς Υδρογόνου για $i>6$. Αυτές οι ομάδες συμπεριλαμβάνουν τους $n - n+3$, $n - n+4$ και $n - n+5$ δεσμούς Υδρογόνου, που παρέχουν μία βάση για το σχηματισμό των α -ελικών ή των β -στροφών ή κλώνων.
- Ο χρόνος ζωής των δεσμών Υδρογόνου υπολογίζεται από το μέσο όρο πάνω σε όλες τις αυτοσυσχετισμένες συναρτήσεις των υπαρχόντων συναρτήσεων (είτε 0 ή 1) όλων των δεσμών Υδρογόνου:

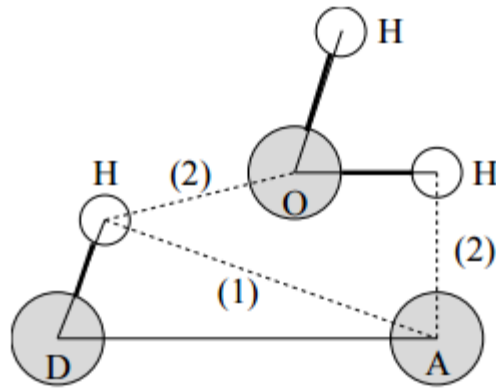
$$C(\tau) = [s_i(t)s_i(t + \tau)] \quad (3.6)$$

με $s_i(t) = \{0, 1\}$ για δεσμούς Υδρογόνου σε χρόνο t . Η καμπύλη του $C(\tau)$ δίνει μία ακριβή εκτίμηση του μέσου όρου του χρόνου ζωής του δεσμού Υδρογόνου τ_{HB} :

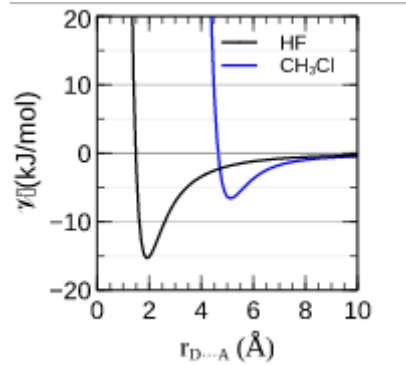
$$\tau_{HB} = \int_0^{\infty} C(\tau) d(\tau) \quad (3.7)$$

Τόσο η καμπύλη όσο και η πλήρης συνάρτηση αυτοσυσχέτισης $C(\tau)$ θα είναι αρχεία εξόδου, έτσι ώστε πιο εξελιγμένη ανάλυση (με πολυ-εκθετική παλινδρόμηση) μπορεί να γίνει για καλύτερη εκτίμηση του χρόνου ζωής τ_{HB} .

- Οι index ομάδες είναι αρχεία εξόδου που περιέχουν τις αναλυμένες ομάδες, όλα τα ζευγάρια ατόμων δότη-υδρογόνου και ατόμων δέκτη σε αυτές τις ομάδες, τριάδες δότη-δέκτη-υδρογόνου που εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αναλυμένων ομάδων και όλων των ατόμων διαλύτη που εμπλέκονται στην εισαγωγή.^[82]



Εικόνα 4.1: Απεικόνιση δεσμών Υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ γειτονικών ατόμων μορίων.



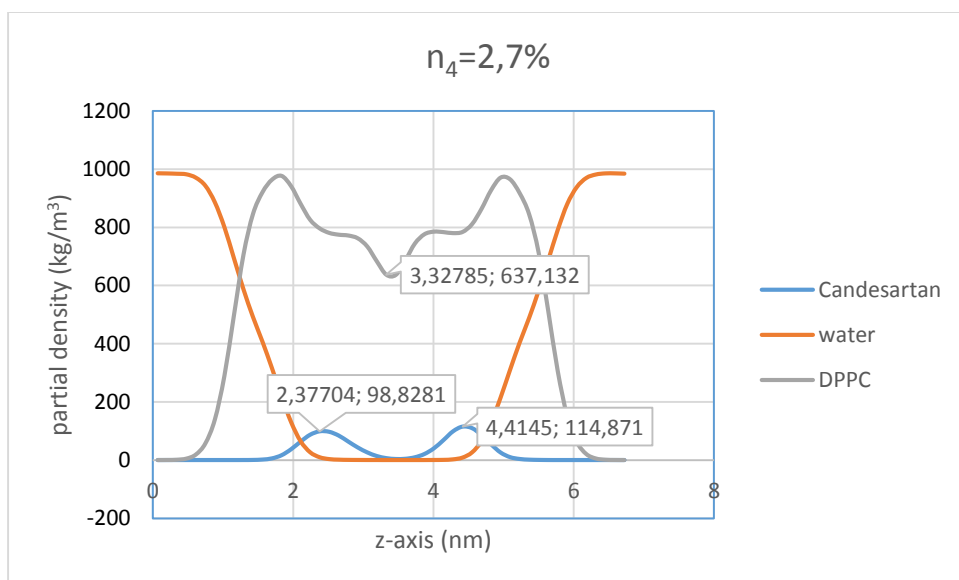
Εικόνα 4.2: Απεικονίζονται τα ενεργειακά φράγματα και οι κρίσιμες ακτίνες πέραν των οποίων οι διαμοριακές δυνάμεις καθίστανται απωστικές. Όπου $r_D=r_{HB}<0,35\text{nm}$

Τέλος, στα πλαίσια αυτής της εργασίας, υπολογίστηκαν οι πλευρικές μέσες τετραγωνικές μετατοπίσεις (mean square displacement (MSD)) των μορίων DPPC καθώς και του φαρμάκου Candesartan-cilexetil. Η εξίσωση υπολογισμού των MSD, η οποία συνδέεται άμεσα με τον συντελεστή αυτοδιάχυσης D , είναι η κάτωθι.^[54]

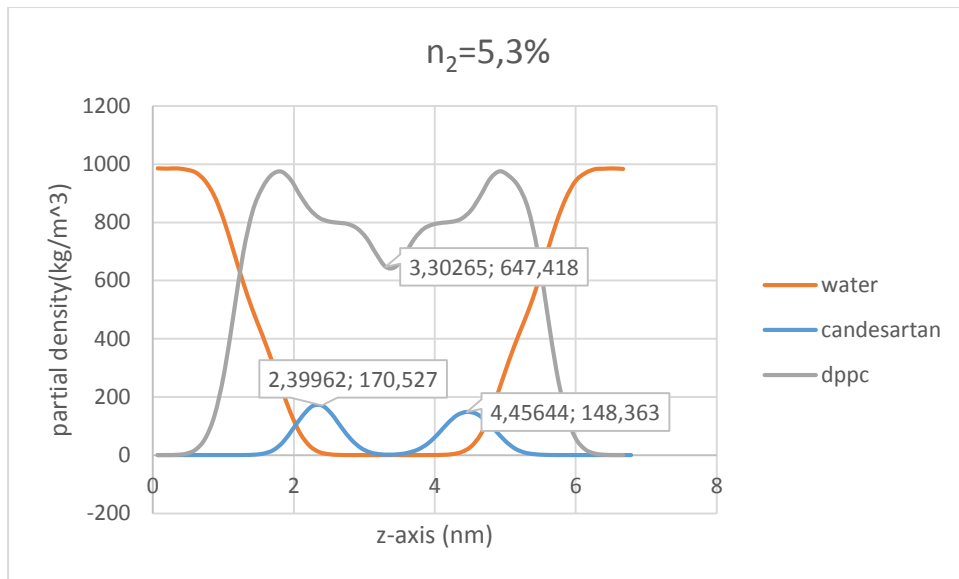
$$\text{MSD} = \left\langle \left\| r(t+t_0) - r(t_0) \right\|^2 \right\rangle = 4Dt \quad (3.8)$$

όπου r είναι το δισδιάστατο διάνυσμα (επίπεδο XY) του κέντρου μάζας των υπό εξέταση μορίων ενώ ο παράγοντας 4 εισέρχεται στην εξίσωση (3.8) λόγω του ότι αναφέρεται στις δύο διαστάσεις. Οι αγκύλες συμβολίζουν μέσο όρο επί όλων των δυνατών αρχικών χρονικών στιγμών t_0 και επί όλων των μορίων του ίδιου τύπου. Σημειώνεται ότι οι μετρήσεις που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία είναι προκαταρκτικές αφού απαιτούνται μεγαλύτερες διπλοστιβάδες για να εξαλειφθεί η εξάρτηση των υπολογιζόμενων ιδιοτήτων από το μέγεθος του συστήματος.

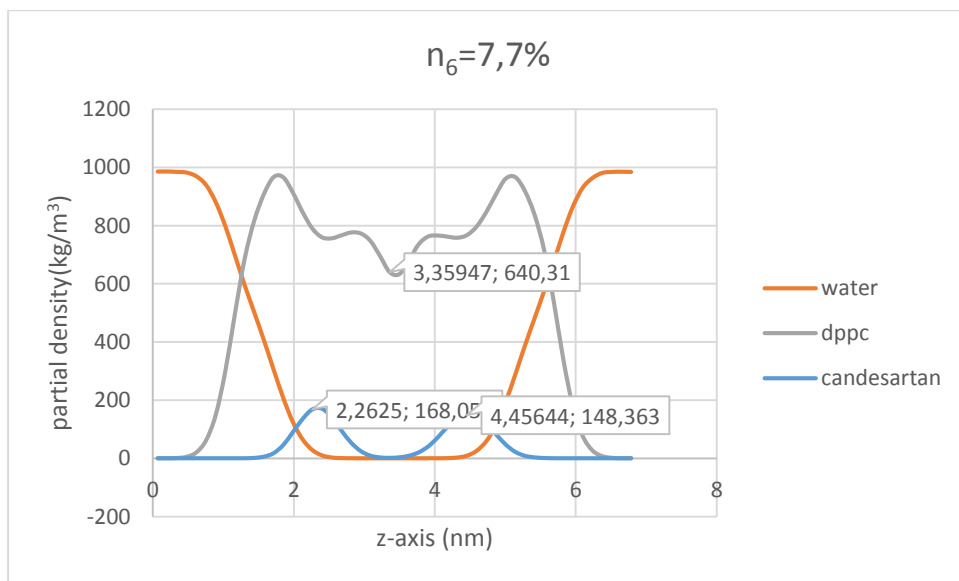
Ακολουθούν τα διαγράμματα προφίλ μερικής πυκνότητας κατά μήκος του άξονα Z για τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις.



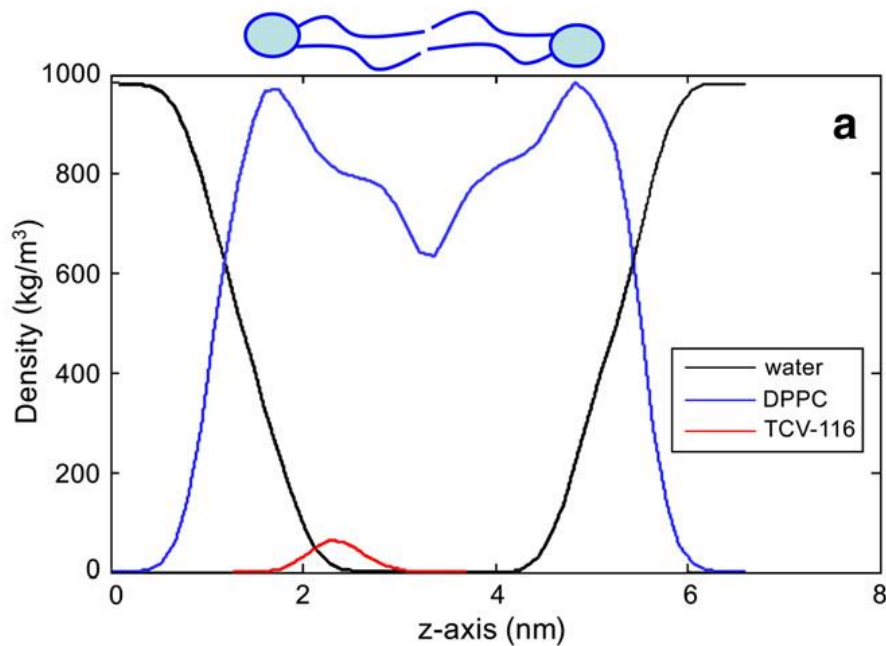
Γράφημα Γ.3: Προφίλ μερικής πυκνότητας του νερού, DPPC και 2 μορίων candesartan-cilexetil (συγκέντρωσης 2,7% mol) ως προς τον άξονα Z που είναι κάθετος στις δύο μονοστιβάδες της μεμβράνης.



Γράφημα Γ.4: Προφίλ μερικής πυκνότητας του νερού, DPPC και 4 μορίων candesartan-cilexetil (συγκέντρωσης 5,3% mol) ως προς τον άξονα Z που είναι κάθετος στις δύο μονοστιβάδες της μεμβράνης.



Γράφημα Γ.5: Προφίλ μερικής πυκνότητας του νερού, DPPC και 6 μορίων candesartan-cilexetil (συγκέντρωσης 7,7% mol) ως προς τον άξονα Z που είναι κάθετος στις δύο μονοστιβάδες της μεμβράνης.



Γράφημα Γ.6: Προφίλ μερικής πυκνότητας του νερού, DPPC και 1 μορίου candesartan-cilexetil (συγκέντρωσης 1,4% mol) ως προς τον άξονα z που είναι κάθετος στις δύο μονοστιβάδες της μεμβράνης.^[81]

Προκειμένου να ελέγξουμε τη συμβατότητα των γραφημάτων που αναπαριστούν τα προφίλ πυκνότητας κατά μήκος του άξονα Z με τη δυνητική μέση δύναμη (PMF) του γραφήματος 1, προχωρούμε στον προσδιορισμό της απόστασης του candesartan cilexetil από τη διπλοστοιβάδα της λιπιδικής μεμβράνης DPPC και για τις τρεις συγκεντρώσεις.

Για συγκέντρωση 2,7%

Υπολογίζονται τα ευθύγραμμα τμήματα που ορίζονται από το ελάχιστο της καμπύλης που αντιστοιχεί στο DPPC και τα μέγιστα της καμπύλης που αντιστοιχεί στο candesartan-cilexetil. Η μέση τιμή των δύο θα πρέπει να συμπίπτει με το ελάχιστο της PMF που περιγράφεται στο γράφημα 1. Το ελάχιστο κυμαίνεται από το 0,9-1nm καθώς στο γράφημα 1 παρατηρείται η εμφάνιση πλατώ ελαχίστου.

Τονίζεται ότι όπου $r_{cDPPC}|i$ είναι η απόσταση του μεγίστου της καμπύλης candesartan-cilexetil και DPPC σε nm.

Επειδή η μονάδα μέτρησης της μερικής πυκνότητας είναι kg/m^3 τη μετατρέπουμε σε kg/nm^3 για να είναι σε συμφωνία με τα μεγέθη της προσομοίωσης. Από τη διαστατική ανάλυση λαμβάνεται ότι: $1\text{kg/nm}^3=10^{-27}\text{kg/nm}^3$

$$r_{CCDPPC}|1 = \sqrt{(3,328 - 2,377)^2}nm = 0,951nm$$

Καθώς $(637,132 - 98,828)^2 \cdot (10^{-27})^2 \rightarrow 0$ για τους επόμενους υπολογισμούς ο συγκεκριμένος όρος θεωρείται αμελητέος λόγω της τάξης μεγέθους.

$$r_{CCDPPC}|2 = \sqrt{|(3,328 - 4,415)|^2}nm = 1,087nm$$

$$r_{CCDPPC}|mean = \sum_{i=1}^2 d_{CCDPPC}|i = 1,019nm$$

Ομοίως για συγκέντρωση 5,3%

$$r_{CCDPPC}|1 = \sqrt{|(3,303 - 2,399)|^2}nm = 0,904nm$$

$$r_{CCDPPC}|2 = \sqrt{|(3,303 - 4,456)|^2}nm = 1,153nm$$

$$r_{CCDPPC}|mean = \sum_{i=1}^2 d_{CCDPPC}|i = 1,029nm$$

Ομοίως για συγκέντρωση 7,7%

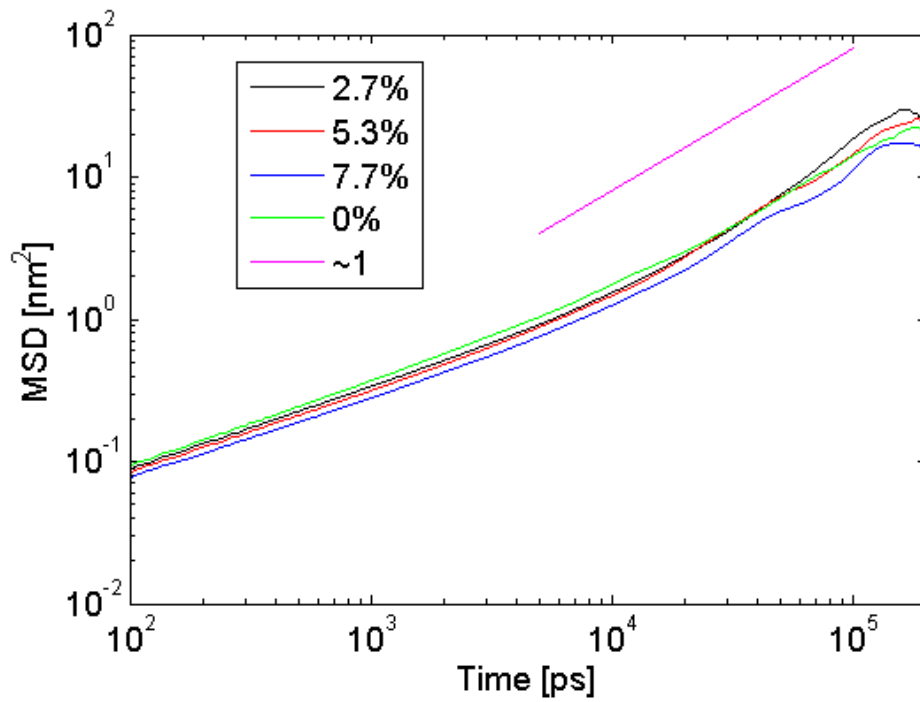
$$r_{CCDPPC}|1 = \sqrt{|(3,359 - 2,263)|^2}nm = 1,096nm$$

$$r_{CCDPPC}|2 = \sqrt{|(3,359 - 4,456)|^2}nm = 1,097nm$$

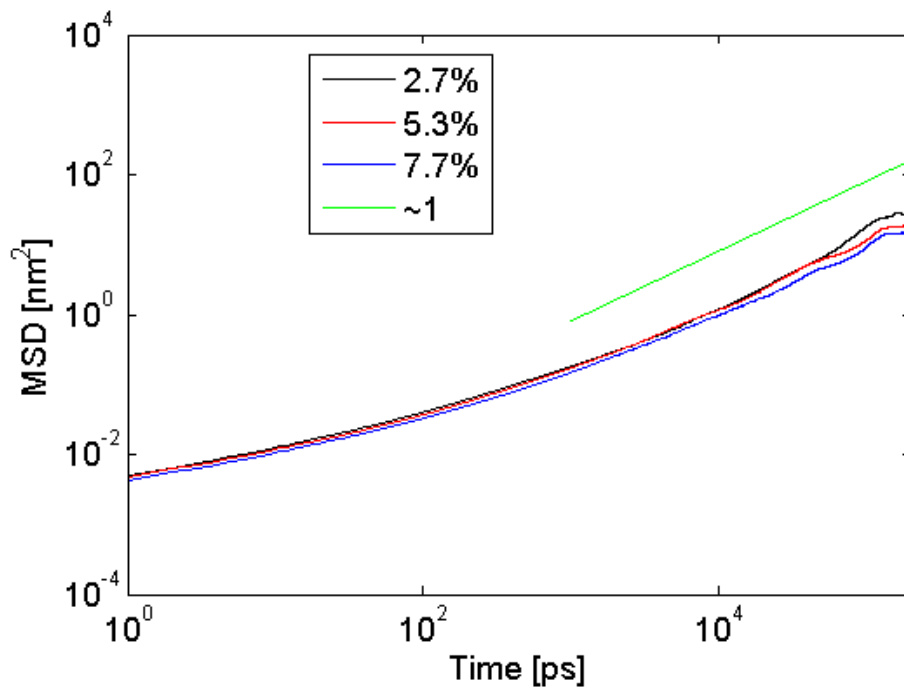
$$r_{CCDPPC}|mean = \sum_{i=1}^2 d_{CCDPPC}|i = 1,0965\text{nm}$$

Πράγματι και για τις τρεις συγκεντρώσεις οι τιμές ανήκουν στο διάστημα 0,9-1,1nm της θέσης του ελαχίστου του PMF κι έχουμε την αναμενόμενη συμβατότητα.

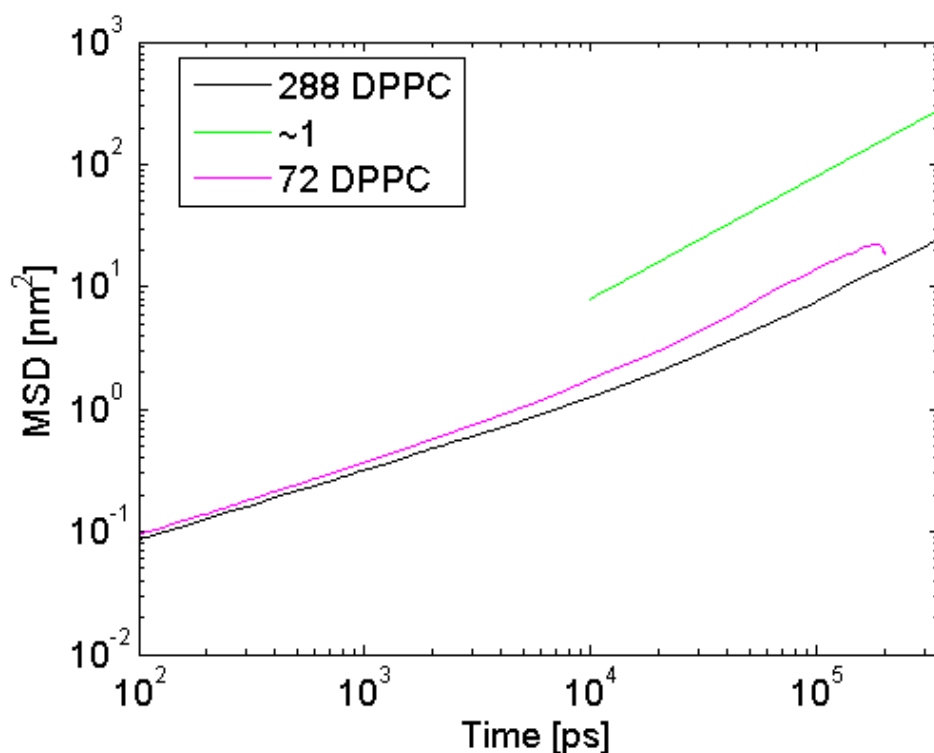
Ακολουθούν τα διαγράμματα μέσης τετραγωνικής μετατόπισης συναρτήσει χρόνου για τις τρεις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις φαρμάκου αλλά και απουσίας φαρμάκου.



Γράφημα Γ.7: Μέσες τετραγωνικές μετατοπίσεις των μορίων DPPC στο επίπεδο xy για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου candesartan-cilexetil. Επίσης συμπεριλαμβάνεται και η μέση τετραγωνική μετατόπιση της καθαρής μεμβράνης.

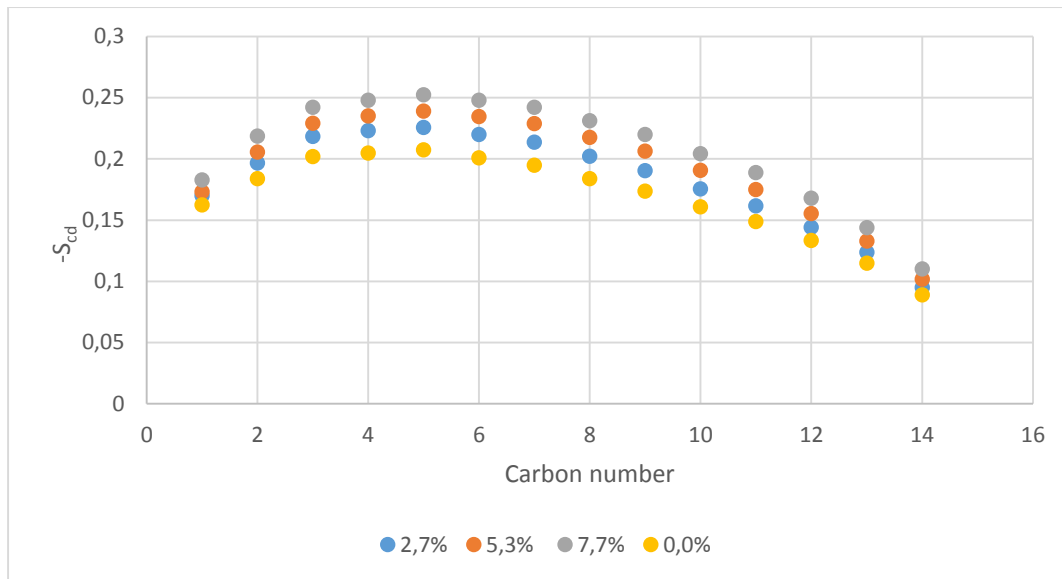


Γράφημα Γ.8: Μέσες τετραγωνικές μετατοπίσεις στο επίπεδο xy των μορίων candesartan-cilexetil για τις τρεις υπό εξέταση συγκεντρώσεις σε μεμβράνη που περιέχει 72 μόρια DPPC .

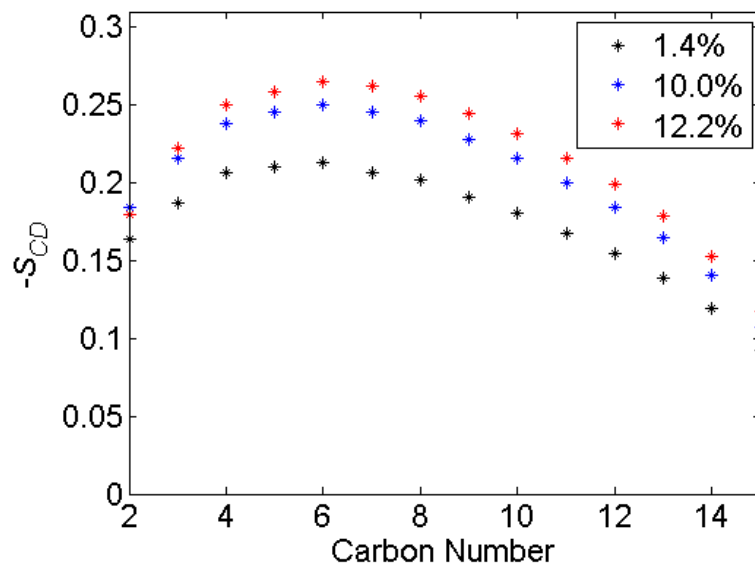


Γράφημα Γ.9: Σύγκριση των μέσων τετραγωνικών μετατοπίσεων δύο λιπιδικών μεμβρανών διαφορετικού μεγέθους χωρίς την παρουσία μορίου candesartan-cilexetil. (για 72 και 288 μόρια αντιστοίχως). Η προσομοίωση της μεμβράνης των 288 μορίων DPPC έγινε στα πλαίσια μίας δημοσίευσης υπό προετοιμασία των Μεγαριώτη και Θεοδώρου. Η διαφορά στις δύο καμπύλες αποδίδεται στην εξάρτηση των υπολογιζόμενων ιδιοτήτων από το μέγεθος του συστήματος [63]

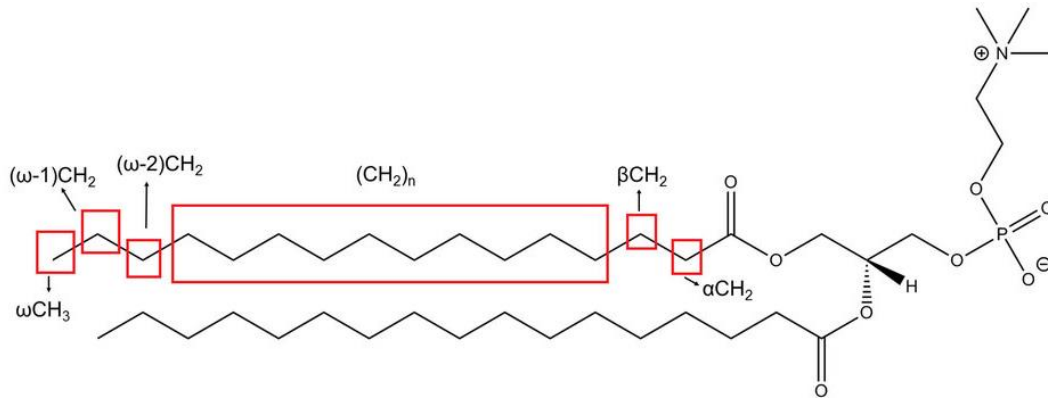
Ακολουθούν τα διαγράμματα παραμέτρου δευτέρας τάξης για το candesartan-cilexetil (deuterium order parameter) συναρτήσει της θέσης κατά μήκος του μορίου.



Γράφημα Γ.10: Παράμετρος δευτέρας τάξης των λιπιδικών μορίων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του candesartan-cilexetil.



Γράφημα Γ.11: Παράμετρος δευτέρας τάξης των λιπιδικών μορίων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του irbesartan.

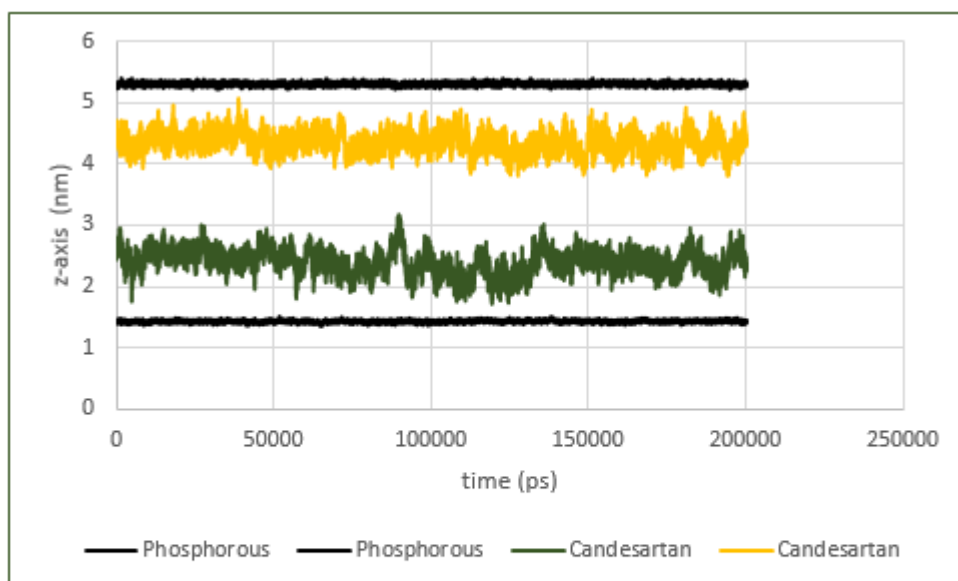


Εικόνα 4.3: Η φωσφολιπιδική δομή του DPPC δείχνει τις θέσεις των διαφόρων ομάδων μεθυλενίου (CH_2) n , ($\omega-1$) CH_2 , ($\omega-2$) CH_2 , αCH_2 και βCH_2 και μεθύλιο ωCH_3 . Όπου $N=14$ ο αριθμός των ανθράκων. Στην εικόνα αυτή φαίνεται πως αριθμούνται και συμβολίζονται οι άνθρακες στην ανθρακική αλυσίδα του DPPC.

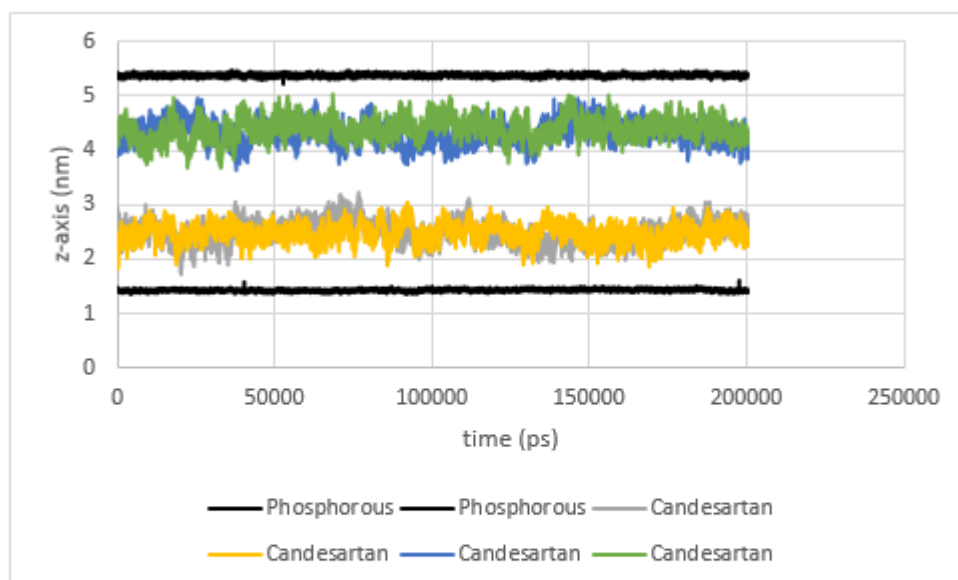
Δεσμοί H/συγκέντρω- ση	Candesarta n-cilexetil- νερό	Candesarta n-cilexetil- DPPC	Candesartan- cilexetil-νερό γραμμομορια- κή	Candesartan- cilexetil-DPPC γραμμομορια- κή
0,0%	0,0	0,0	0,0	0,0
2,7%	4.145	1.053	2.073	0.527
5,3%	8.139	2.274	2.035	0.569
7,7%	10.866	3.685	1.811	0.6142

Πίνακας Π.1: Απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου ανά mol, των ομάδων candesartan-cilexetil με νερό και DPPC που σχηματίζονται για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαρμάκου.

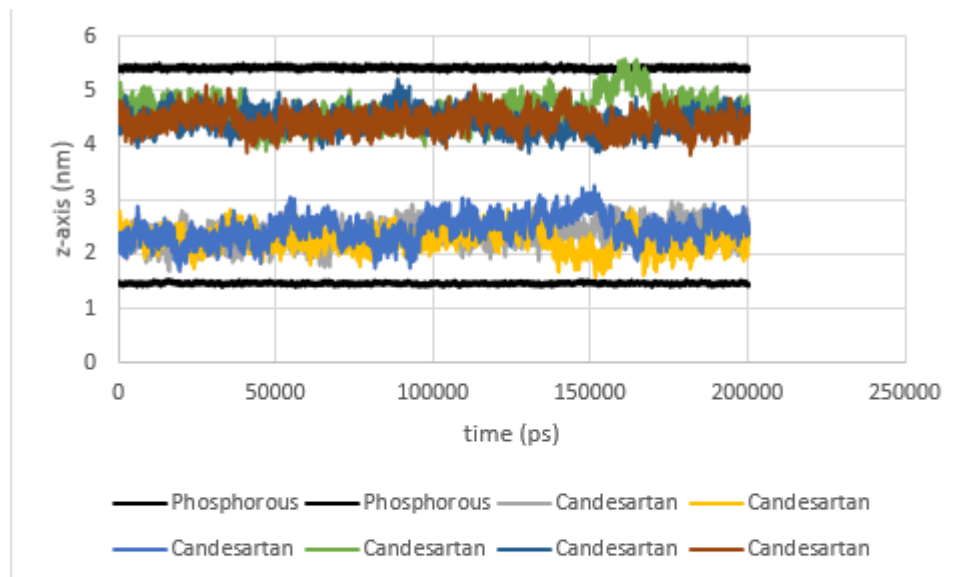
Ακολουθούν τα διαγράμματα κέντρου μάζας κατά τη συνιστώσα Z συναρτήσεως του χρόνου για τα τελευταία 200ns της προσομοίωσης.



Γράφημα Γ.12: Χρονική εξέλιξη της συνιστώσας z των κέντρων μάζας των μορίων candesartan-cilexetil στην πορεία της προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής για συγκέντρωση 2,7% .



Γράφημα Γ.13: Χρονική εξέλιξη της συνιστώσας z των κέντρων μάζας των μορίων candesartan-cilexetil στην πορεία της προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής για συγκέντρωση 5,3% .



Γράφημα Γ.14: Χρονική εξέλιξη της συνιστώσας z των κέντρων μάζας των μορίων candesartan-cilexetil στην πορεία της προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής για συγκέντρωση 7,7% .

Ακολουθεί ο πίνακας υπολογισμού της μέσης απόστασης των μονοστοιβάδων φωσφόρου συμπεριλαμβανομένων και των σχετικών σφαλμάτων των αποστάσεων για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαρμάκου.

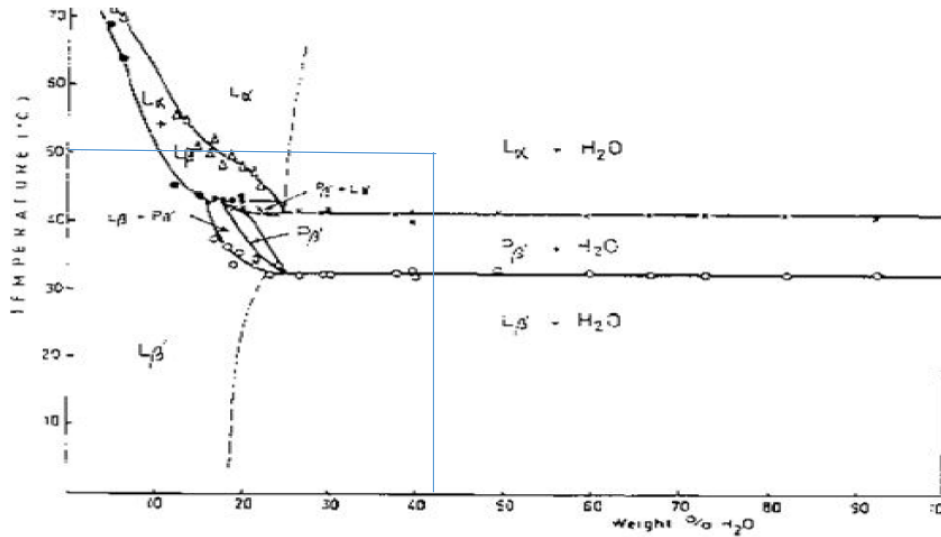
Ακολουθεί ο πίνακας υπολογισμού της μέσης απόστασης των μονοστοιβάδων φωσφόρου συμπεριλαμβανομένων και των σχετικών σφαλμάτων των αποστάσεων για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαρμάκου.

Γραμμομοριακές Συγκεντρώσεις φαρμάκου(%)	2,7	5,3	7,7
Μέση τιμή (nm) ± Μέσο σφάλμα	3.883±4,102E-04	3.944±3,231E-03	3.986±1,343E-03

Πίνακας Π.2: Οι μέσες αποστάσεις άνω μονοστιβάδας και κάτω μονοστιβάδας φωσφόρου μαζί με τα αντίστοιχα σφάλματα για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαρμάκων.

(i) $2,7\% - 3,88\text{nm} \pm 4,102\text{E-}04$, (ii) $5,3\% - 3,94\text{nm} \pm 3,23\text{E-}03$, (iii) $7,7\% - 3,99\text{nm} \pm 1,34\text{E-}03$.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου αυξάνεται και η μέση απόσταση των φύλων φωσφόρου, η μεταβολή αυτή γίνεται αισθητή στο τρίτο σημαντικό ψηφίων των προαναφερθέντων μέσων τιμών. Παράλληλα το μέσο σφάλμα για τον υπολογισμό της μέσης απόστασης κυμαίνεται μεταξύ των τάξεων 10^{-4} και 10^{-3} .



Γράφημα Γ.15: Διάγραμμα φάσεων για το σύστημα νερό-DPPC. [57]

Ακολουθεί ο υπολογισμός κλάσματος μάζας νερού στη λιπιδική μεμβράνη DPPC, καθώς και ο προσδιορισμός φάσεως στην οποία βρίσκεται λαμβάνοντας σαν δεδομένα την θερμοκρασία του συστήματος 323K αλλά και ότι η διπλοστοιβάδα είναι πλήρως ενυδατωμένη.

$$m_{water} = \frac{\text{μάζα νερού}}{\text{μάζα νερού} + \text{μάζα DPPC}}, n = \frac{m}{M_{mol}} = \frac{N}{N_{Avo}}$$

Όπου N_{Avo} , ο αριθμός Avogadro, N ο αριθμός των γραμμομορίων και M_{mol} το μοριακό βάρος.

$$\begin{aligned} m_{water} &= \frac{\frac{M_{mol_{water}} N_{water}}{N_{Avo}}}{\frac{M_{mol_{water}} N_{water}}{N_{Avo}} + \frac{M_{mol_{DPPC}} N_{DPPC}}{N_{Avo}}} = \\ &= \frac{M_{mol_{water}} N_{water}}{M_{mol_{water}} N_{water} + M_{mol_{DPPC}} N_{DPPC}} = 0,4271 \end{aligned}$$

Όπου $M_{mol_{water}}$ η μοριακή μάζα του νερού ίση με 18g/mol, N ο αριθμός των μορίων νερού στο σύστημα νερό-DPPC ίσος με 2189, $M_{mol_{DPPC}}$ η μοριακή μάζα DPPC ίση με 734,09 g/mol και N ο αριθμός των μορίων DPPC ίσος με 72.

Από γράφημα Γ.11 είναι εμφανές ότι το νερό βρίσκεται στην υγροκρυσταλλική περιοχή του διαγράμματος φάσεων όπως φαίνεται και από το σημείο τομής των καθέτων για θερμοκρασία 50°C και ποσοστό μάζας νερού πλησίον του 42%.

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα από τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων και μελλοντικές μελέτες

4.1: Συμπεράσματα από αποτελέσματα προσομοιώσεων κι έλεγχος συμβατότητας με αντίστοιχες δημοσιεύσεις πειραματικών μελετών.

Από το προφίλ μερικών πυκνοτήτων κατά μήκος του άξονα Z συμπεραίνεται ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του candesartan-cilexetil στη λιπιδική μεμβράνη, αυξάνεται και η μερική πυκνότητα κατά μήκος του άξονα Z του candesartan-cilexetil. Αυτό γίνεται εμφανές από τα γραφήματα Γ.2 , Γ.3 και Γ.4, όπου λόγω αύξησης των μορίων του candesartan-cilexetil που προστίθενται στο σύστημα, συσσωρεύεται περισσότερη μάζα άρα και μεγαλύτερη πυκνότητα, καθώς ο όγκος του κουτιού προσομοίωσης παραμένει σταθερός κατά το επίπεδο xy από την επιλογή του

στατιστικού συνόλου (ensemble) που έχει γίνει. Επίσης, παρατηρείται πιο ασθενής εξάρτηση της πυκνότητας κατά άξονα Z με αύξηση της συγκέντρωσης του candesartan-cilexetil από τα τέσσερα στα έξι μόρια έναντι των δύο στα τέσσερα. Συγκρίνοντας τα προαναφερθέντα διαγράμματα με το διάγραμμα Γ.4 (από δημοσίευση) που έχει προκύψει από πειραματική επεξεργασία με προσθήκη ενός μορίου candesartan-cilexetil στη διπολοστοιβάδα της λιπιδικής μεμβράνης του DPPC, είναι εμφανές ότι τα προφίλ μερικής πυκνότητας παρουσιάζουν την αναμενόμενη συμπεριφορά. Η διαφορά που παρατηρείται έγκειται στην εμφάνιση ενός παραπάνω ακρότατου λόγω αύξησης της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Συμπερασματικά υπάρχει συμβατότητα στα αποτελέσματα των προσομοιώσεων από το post-processing και των πειραματικών αποτελεσμάτων.

Αναφορικά με τις μέσες τετραγωνικές μετατοπίσεις (mean square displacements), παρατηρείται ότι η συμπεριφορά τόσο του DPPC όσο και του candesartan-cilexetil είναι παρόμοια κι ειδικά για το DPPC είναι συμβατή με τα αναμενόμενα πειραματικά αποτελέσματα για τα οποία διαθέτουμε σχετικές αναφορές. Μάλιστα, παρουσιάζουν παρόμοια διαχυτική ικανότητα όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από την αναπαράσταση των συναρτήσεων μέσης τετραγωνικής μετατόπισης συναρτήσεως του χρόνου για τις διάφορες συγκεντρώσεις του candesartan-cilexetil στο σύστημα. Ο συντελεστής διάχυσης υπολογίζεται ως η κλίση της γραμμικής περιοχής των καμπυλών μέσης τετραγωνικής μετατόπισης τόσο του DPPC και του candesartan-cilexetil. Εξαιτίας της υδροφοβικής συμπεριφοράς της λιπιδικής μεμβράνης DPPC λόγω των αλκυλικών αλυσίδων, δεν παρατηρείται διάχυση του DPPC στο νερό. Επιπλέον, παρατηρείται από τα διαγράμματα Γ.7 και Γ.8 ότι η εισαγωγή του φαρμάκου δεν επηρεάζει σημαντικά τη διαχυτική συμπεριφορά των μορίων DPPC ενώ τα φάρμακα candesartan-cilexetil διαχέονται πλευρικώς, εμφανίζοντας διαχυτική συμπεριφορά παρόμοια με αυτή των μορίων DPPC. Υπενθυμίζεται ότι σύμφωνα με τον μηχανισμό δυο σταδίων, τα φάρμακα εισέρχονται στη μεμβράνη σε κατάλληλο βάθος και μετά διαχέονται πλευρικώς για να προσδεθούν στο ενεργό κέντρο. Το διάγραμμα Γ.8 δείχνει ότι πράγματι τα φάρμακα διαχέονται πλευρικώς.

Σχετικά με την παράμετρο δευτέρας τάξης (deuterium order parameter), αυξάνοντας τη συγκέντρωση του candesartan cilexetil, αυξάνεται και η παράμετρος δευτέρας τάξης, καθώς με προσθήκη περισσότερων μορίων candesartan-cilexetil, η γωνία θ_z που σχηματίζεται μεταξύ του άξονα Z του κουτιού και του νοητού μολαρικού άξονα αποκτά τιμές με τέτοια περιοδικότητα ώστε το S_{cd} να παρουσιάζει αισθητή αύξηση με αύξηση της συγκέντρωσης οπότε κι αύξηση των μεθυλενίων.

Η παράμετρος δευτέρας τάξης εν ολίγοις προσδιορίζει το βαθμό οργάνωσης των αλκυλικών αλυσίδων στα λιπιδικά μόρια. Από το διάγραμμα Γ.8 παρατηρείται ότι η παράμετρος δευτέρας τάξης των λιπιδικών μορίων για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του candesartan-cilexetil παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά. Ειδικότερα χαρακτηριστικό είναι και το overlapping στην αρχή και το πέρας των καμπυλών για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Στο διάγραμμα Γ.9 απεικονίζεται η παράμετρος δευτέρας τάξης λιπιδικών μορίων για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του irbesartan, στις προσομοιώσεις που έγιναν εφαρμόστηκαν μεγαλύτερες

συγκεντρώσεις, παρόλα αυτά συγκρίνοντας τα δύο διαγράμματα παρατηρείται η αναμενόμενη παρόμοια συμπεριφορά. Αυτό οφείλεται και στο γεγονός ότι τόσο το irbesartan όσο και το candesartan-cilexetil ανήκουν στην ομάδα των sartans).

Ακολούθησε ο προσδιορισμός του αριθμού των δεσμών Υδρογόνου μεταξύ των μορίων candesartan-cilexetil και DPPC και candesartan-cilexetil και νερό. Από τον πίνακα Π.1 συμπεραίνεται ότι υπάρχει ασθενής εξάρτηση των δεσμών Υδρογόνου μεταξύ DPPC και candesartan-cilexetil, μικρότερη του 1 για όλες τις συγκεντρώσεις του candesartan-cilexetil. Μεγαλύτερη εξάρτηση παρουσιάζεται για δεσμούς Υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ νερού και candesartan-cilexetil.

Όσον αφορά στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του φαρμάκου και της μεμβράνης είναι ισχυρότεροι στα πρωτονιομένα μόρια και αυτό οφείλεται κυρίως στα υδρογόνα της φορτισμένης αμινομάδας και στα άτομα φωσφόρου των λιπιδίων, όπως εύκολα παρατηρούμε από τους συντακτικούς τύπους του candesartan-cilexetil και του DPPC (Εικόνες 1.4 , 1.5) .

Επιπροσθέτως, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου στη λιπιδική μεμβράνη, οι δεσμοί Υδρογόνου candesartan-cilexetil με DPPC ανά mol μορίου candesartan αυξάνονται, ενώ οι αντίστοιχες candesartan-cilexetil με νερό μειώνονται. Όπως αναμένεται και αποδεικνύεται πειραματικά δε σχηματίζονται δεσμοί Υδρογόνου candesartan-cilexetil και candesartan-cilexetil και για τις τρεις συγκεντρώσεις φαρμάκου.

Αξιοσημείωτη είναι και η ανταγωνιστική δράση μεταξύ των δεσμών Υδρογόνου candesartan-cilexetil με DPPC και candesartan-cilexetil με νερό.

Επιπλέον, αναπαρίστανται τα διαγράμματα κέντρου μάζας (mass centre) της συνιστώσας Z συναρτήσεως του χρόνου για τα τελευταία 200ns της προσομοίωσης. Τα διαγράμματα αυτά είναι συμπληρωματικά των διαγραμμάτων του δυναμικού μέσης δύναμης (PMF) και των προφίλ των μερικών πυκνοτήτων καθώς το σύνολό τους δείχνει την ευρύτερη εικόνα της συμπεριφοράς του candesartan-cilexetil στη διπλοστιβάδα της λιπιδικής μεμβράνης.

Ειδικότερα, στα διαγράμματα Γ.10 , Γ.11 και Γ.12 η διπλοστιβάδα του DPPC ορίζεται από τις μονοστιβάδες (monolayers) φωσφόρου στην άνω και κάτω περιοχή του διαγράμματος. Τα μόρια του candesartan-cilexetil κινούνται εντός της διπλοστιβάδας για τις συγκεντρώσεις 2,7% και 5,3%.

Εναντιθέσει στην περίπτωση της συγκέντρωσης 7,7% candesartan-cilexetil, παρατηρείται μία απόπειρα μορίου candesartan-cilexetil να διαφύγει από τα όρια της διπλοστιβάδας της μεμβράνης στη χρονική στιγμή των 160ns. Σύντομα όμως επανέρχεται στην αναμενόμενη πορεία του εντός της λιπιδικής μεμβράνης.

Τέλος, υπολογίζονται οι αποστάσεις μεταξύ των δύο μονοστιβάδων για τα διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης καθώς και το σφάλμα που εμπίπτει κάθε φορά

στην τιμή της απόστασης. Τα τελικά αποτελέσματα απεικονίζονται στον πίνακα Π.2. Παρατηρείται μία μικρή αύξηση της απόστασης με αύξηση της συγκέντρωσης του candesartan-cilexetil, που εκφράζεται άλλοτε στο πρώτο ή στο δεύτερο δεκαδικό ψηφίο. Όλες οι τιμές των αποστάσεων αλλά και τα αντίστοιχα σφάλματά τους είναι της ίδιας τάξεως ανεξαρτήτως συγκεντρώσεως.

4.2 Μελλοντικές προοπτικές έρευνας

Κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας προέκυψαν διάφορα ερωτήματα που αποτελούν πεδίο ενδιαφέροντος στη μοριακή δυναμική βιομορίων και μπορούν να συναποτελέσουν αντικείμενο για περαιτέρω μελέτη. Αναφέρονται κάτωθι οι ακόλουθες προτάσεις.

- Ατομιστικές προσομοιώσεις μορίων χοληστερόλης σε λιπιδική μεμβράνη DPPC σε πλήρως υδατικό περιβάλλον για διάφορες συγκεντρώσεις χοληστερόλης, μελέτη διαχυτότητας (diffusion coefficients), προφίλ πυκνότητας (density profiles), υπολογισμός δυναμικών μέσης δύναμης (PMF), δεσμών Υδρογόνου, αλληλεπιδράσεων μεμβράνης-πρωτεΐνης, προσδιορισμός πρόσδεσης σε θέση ενεργού κέντρου.
- Ατομιστικές προσομοιώσεις μορίων candesartan-cilexetil σε λιπιδική μεμβράνη DPPC για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις candesartan-cilexetil από αυτές που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική με σκοπό τη σύγκριση συμβατότητας των ιδιοτήτων με αυτές των χαμηλότερων συγκεντρώσεων και τη συμπεριφορά του candesartan-cilexetil σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.
- Μελέτες μεταφοράς φαρμάκων στο σημείο στόχο (drug-delivery) χρησιμοποιώντας παράγωγα κυκλοδεξτρίνης.
- Προσομοιώσεις σε μεμβράνες διαφορετικών μεγεθών ώστε να ελεγχθούν πιθανές επιδράσεις στις ιδιότητες του συστήματος λόγω μεταβολής μεγέθους, σύγκριση εξαρτώμενων ιδιοτήτων.

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έγινε δεκτή στο 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημικής Μηχανικής στη Θεσσαλονίκη όπου και θα γίνει ΖΦΦ η ανάλογη παρουσίαση.

Βιβλιογραφία

- [1] T. Mavromoustakos, A. Kolocouris, M. Zervou, P. Roumelioti, J.M. Matsoukas, R. Weisemann, An effort to understand the molecular basis of hypertension through the study of conformational analysis of losartan and sarmesin using ^{13}C . Fotakis et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1818 (2012) 3107–3120 combination of Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and theoretical calculations, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 1714–1722.
- [2] M. De Gasparo, K.J. Catt, T. Inagami, J.W. Wright, Th. Unger, International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors, *Pharmacol. Rev.* 52 (2000) 415–472.
- [3] P. Zoumpoulakis, I. Daliani, M. Zervou, I. Kyrikou, E. Siapi, G. Lamprinidis, E. Mikros, T. Mavromoustakos, Losartan's molecular basis of interaction with membranes and AT1 receptor, *Chem. Phys. Lipids* 125 (2003) 13–25.

- [4] M. Lucio, J.L.F.C. Lima, S. Reis, Drug–membrane interactions: significance for medicinal chemistry, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 1795–1809.
- [5] A.M. Seddon, D. Casey, R.V. Law, A. Gee, R.H. Templer, O. Ces, Drug interactions with lipid membranes, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 2509–2519.
- [6] L.J. Wagenaar, A.A. Voors, H. Buikema, A. Van Buiten, R.H. Lübeck, P.W. Boonstra, D.J. Van Veldhuisen, W.H. Van Gilst, Functional antagonism of different angiotensin II type I receptor blockers in human arteries, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 16 (2002) 311–316.
- [7] C. Fotakis, D. Christodouleas, P. Zoumpoulakis, E. Kritsi, N.P. Benetis, T. Mavromoustakos, H. Reis, A. Gili, M.G. Papadopoulos, M. Zervou, Comparative biophysical studies of sartan class drug molecules losartan and candesartan (CV-11974) with membrane bilayers, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 6180–6192.
- [8] T.R. Oliveira, M.T. Lamy, U.M. De Paula, L.L. Guimarães, M.S. Toledo, H.K. Takahashi, A.H. Straus, C.J. Lindsey, T.B. Paiva, Structural properties of lipid reconstructs and lipid composition of normotensive and hypertensive rat vascular smooth muscle cell membranes, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42 (2009) 844–853.
- [9] T.J. Netticadan, T.F. Ashavaid, K.G. Nair, Characterisation of the canine cardiac sarcolemma in experimental myocardial ischemia, *Indian J. Clin. Biochem.* 12 (1997) 49–54.
- [10] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochim. Biophys. Acta* 1376 (1998) 91–145.
- [11] S. Tristram-Nagle, M.C. Wiener, C.P. Yang, J.F. Nagle, Kinetics of the subtransition in dipalmitoylphosphatidylcholine, *Biochemistry* 26 (1987) 4288–4294.
- [12] M.D. Housley, K.K. Stanley, *Dynamics of Biological Membranes*, John Wiley and Sons, New York, 1982.
- [13] R.P. Rand, D. Chapman, K. Larsson, Tilted hydrocarbon chains of dipalmitoyl leci-thin become perpendicular to the bilayer before melting, *Biophys. J.* 15 (1975) 1117–1124.
- [14] J. Stamatoff, B. Feuer, H.J. Guggenheim, G. Tellez, T. Yamane, Amplitude of rippling in the P beta phase of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers, *Biophys. J.* 38 (1982) 217–226.
- [15] T.J. McIntosh, Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayer. A molecular packing Model, *Biophys. J.* 29 (1980) 237–245.
- [16] N.B. Colthup, L.H. Daly, S.E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, Academic Press, 1990.
- [17] C.H. Huang, J.R. Lapidus, I.W. Levin, Phase-transition behaviour of saturated, symmetric chain phospholipid bilayers dispersions determined by Raman

spectroscopy: correlation between spectral and thermodynamic parameters, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 5926–5930.

[18] Tieleman DP, Berendsen HJC. (1996). *J. Chem. Phys.*, 105(22):4871-4881.

[19] G. Pabst, M. Rappolt, H. Amenitsch, P. Laggner, Structural information from multilamellar liposomes at full hydration: full q-range fitting with high quality X-ray data, *Phys. Rev. E* 62 (2000) 4000–4009.

[20] P. Tosco, B. Rolando, R. Fruttero, Y. Henchoz, S. Martel, P.A. Carrupt, A. Gasco, Physicochemical profiling of sartans: a detailed study of ionization constants and distribution coefficients, *Helv. Chim. Acta* 91 (2008) 468–482.

[21] A. Ramamoorthy, Beyond NMR spectra of antimicrobial peptides: dynamical images at atomic resolution and functional insights, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 35 (2009) 201–207.

[22] K. Ohno, K. Esfarjani and Y. Kawazoe, *Computational Materials Science From Ab Initio to Monte Carlo Methods* (Springer, 1999).

[23] M. J. Buehler and H. Gao, *Handbook of Theoretical and Computational Nanotechnology*, (American Scientific Publishers, Stuttgart, 2005)..

[24] C. Xing, O.H.S. Ollila, I. Vattulainen, R. Faller, Asymmetric nature of lateral pressure profiles in supported lipid membranes and its implications for membrane protein functions, *Soft Matter* 5 (2009) 3258–3261.

[25] C. Potamitis, P. Chatzigeorgiou, E. Siapi, K. Viras, T. Mavromoustakos, A. Hodzic, G. Pabst, F. Cacho-Nerin, P. Laggner, M. Rappolt, Interactions of the AT1 antagonist valsartan with dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 1753–1763.

[26] C. Fotakis, D. Christodouleas, P. Chatzigeorgiou, M. Zervou, N.-P. Benetis, K. Viras, T. Mavromoustakos, Development of a CP 31P NMR broadband simulation methodology for studying the interactions of antihypertensive AT1 antagonist losartan with phospholipid bilayers, *Biophys. J.* 96 (2009) 2227–2236.

[27] D. Ntountaniotis, G. Mali, S.G. Grdadolnik, M. Halabalaki, A.-L. Skaltsounis, C. Potamitis, E. Siapi, P. Chatzigeorgiou, M. Rappolt, T. Mavromoustakos, Thermal, dynamic and structural properties of drug AT1 antagonist olmesartan in lipid bi-layers, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 2995–3006.

[28] I. Kyrikou, N.P. Benetis, P. Chatzigeorgiou, M. Zervou, K. Viras, C. Poulos, T. Mavromoustakos, Interactions of the dipeptide paralyisin β -Ala-Tyr and the inoacid Glu with phospholipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 113–124.

[29] T.M. Mavromoustakos, The use of differential scanning calorimetry to study drug–membrane interactions, *Meth. Mol. Biol.* 400 (2007) 587–600.

[30] A. Hodzic, M. Rappolt, H. Amenitsch, G. Pabst, Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol, *Biophys. J.* 94 (2008) 3935–3944.

- [31] T. Mavromoustakos, P. Chatzigeorgiou, C. Koukoulitsa, S. Durdagi, Partial interdigitation of lipid bilayers, *Int. J. Quantum Chem.* 111 (2011) 1172–1183.
- [32] U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2008.
- [33] C. Song, H. Holmsen, W. Nerdal, Existence of lipid microdomains in bilayer of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and 1-stearoyl-2-docosahexenoyl phosphatidylserine (SDPS) and their perturbation by chlorpromazine: a ¹³C and ³¹P solid-state NMR study, *Biophys. Chem.* 120 (2006) 178–187.
- [34] T. Mavromoustakos, I. Daliani, Effects of cannabinoids in membrane bilayers containing cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta* 1420 (1999) 252–265.
- [35] T. Mavromoustakos, E. Theodoropoulou, A combined use of ¹³C-cross polarization/magic angle spinning, ¹³C-magic angle spinning and ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy with differential scanning calorimetry to study cannabinoid–membrane interactions, *Chem. Phys. Lipids* 92 (1998) 37–52.
- [36] C. Fotakis, S. Gega, E. Siapi, C. Potamitis, K. Viras, P. Moutevelis-Minakakis, C.G.Kokotos, S. Durdagi, S. Golic Grdadolnik, B. Sartori, M. Rappolt, T.Mavromoustakos, Interactions at the bilayer interface and receptor site induced by the novel synthetic pyrrolidinone analog MMK3, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2010) 422–432.
- [37] J. A. Lemkul, D. R. Bevan, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 1652–1660
- [38] A. Caillé, Remarques sur la diffusion des rayons X dans les smectiques A, C. R.Acad. Sci. Paris B 274 (1972) 891–893.
- [39] R. Zhang, S. Tristram-Nagle, W. Sun, R.L. Headrick, T.C. Irving, R.M. Suter, J.F. Nagle, Small-angle X-ray scattering from lipid bilayers is well described by modified Caillé theory but not by paracrystalline theory, *Biophys. J.* 70 (1996) 349–357.
- [40] M. Rappolt, Bilayer thickness estimations with “poor” diffraction data, *J. Appl.Phys.* 107 (2010) 084701-1–084701-7.
- [41] J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle, Structure and interactions of lipid bilayer: role of fluctuations, in: J. Katsaras, T. Gutberlet (Eds.), *Lipid Bilayers. Structure and Inter-Actions*, Springer, Berlin, 2000, pp. 1–23.
- [42] J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle, Structure of lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 159–195.
- [43] S.W. Chiu, E. Jakobsson, R.J. Mashl, H.L. Scott, Cholesterol-induced modifications in lipid bilayers: a simulation study, *Biophys. J.* 83 (2002) 1842–1853.
- [44] J.J.P. Stewart, Application of the PM6 method to modeling the solid state, *J. Mol.Model.* 14 (2008) 499–535.

- [45] J.J.P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements, *J. Mol. Model.* 13 (2007) 1173–1213.
- [46] G. Melagraki, A. Afantitis, H. Sarimveis, P.A. Koutentis, G. Kollias, O.Igglessi-Markopoulou, Predictive QSAR workflow for the in silico identification and screening of novel HDAC inhibitors, *Mol. Divers.* 13 (2009) 301–311.
- [47] T. Puzyn, N. Suzuki, M. Haranczyk, J. Rak, Calculation of quantum-mechanical descriptors for QSPR at the DFT level: is it necessary? *J. Chem. Inf. Model.* 48 (2008) 1174–1180.
- [48] A. Klamt, G. Schüürmann, COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient, *J. Chem.Soc., Perkin Trans. 2* (1993) 799–805.
- [49] J.S. Puranen, M.J. Vainio, M.S. Johnson, Accurate conformation-dependent molecular electrostatic potentials for high-throughput in silico drug discovery, *J.Comput. Chem.* 31 (2010) 1722–1732.
- [50] J.B. Klauda, R.M. Venable, J.A. Freites, J.W. O'Connor, D.J. Tobias, C.Mondragon-Ramirez, I. Vorobyov, J. MacKerell, R.W. Pastor, Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types, *J.Phys. Chem. B* 114 (2010) 7830–7843.
- [51] R.W. Pastor, A.D. MacKerell, Development of the CHARMM force field for lipids, *J.Phys. Chem. Lett.* 2 (2011) 1526–1532.
- [52] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926–935.
- [53] V. Zoete, M.A. Cuendet, A. Grosdidier, O. Michielin, SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules, *J. Comput. Chem.* 32 (2011) 2359–2368.
- [54] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008) 435–447.
- [55] Lupyan D, Mezei M, Logothetis D, Osman R, A molecular Dynamics Investigation of lipid bilayer Perturbation by PIP₂, January 2010: 240–247
- [56] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. Van Gunsteren, A. Dinola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690.
- [57] G. G. Chernik, *Advances in Colloid and Interface Science*, 61: 65-129 (1995). (end of lipids literature).

- [58] S. Kumar, J.M. Rosenberg, D. Bouzida, R.H. Swendsen, P.A. Kollman, The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method, *J. Comput. Chem.* 13 (1992) 1011–1021.
- [59] J.S. Hub, B.L. De Groot, D. van der Spoel, G-whams—a free Weighted Histogram Analysis implementation including robust error and autocorrelation estimates, *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010) 3713–3720.
- [60] E.B. Kim, N. Lockwood, M. Chopra, O. Guzmán, N.L. Abbott, J.J. De Pablo, Interactions of liquid crystal-forming molecules with phospholipid bilayers studied by molecular dynamics simulations, *Biophys. J.* 89 (2005) 3141–3158.
- [61] J.A. Lemkul, D.R. Bevan, Assessing the stability of Alzheimer's amyloid protofibrils using molecular dynamics, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 1652–1660.
- [62] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [63] Klauda, J. B.; Brooks, B. R.; Pastor, R. W. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 144710
- [64] J.R. Silvius, M. Lyons, P.L. Yeagle, T.J. O'Leary, Thermotropic properties of bilayers containing blanché-chain phospholipids, calorimetric, Raman and ³¹P NMR studies, *Biochemistry* 24 (1985) 5388–5395.
- [65] T.J. O'Leary, P.D. Ross, I.W. Levin, Effects of anesthetic and nonanesthetic steroids on dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: a calorimetric and Raman spectroscopic investigation, *Biochemistry* 23 (1984) 4636–4641.
- [66] T.J. O'Leary, I.W. Levin, Raman spectroscopic study of an interdigitated lipid bilayer dipalmitoylphosphatidylcholine dispersed in glycerol, *Biochim. Biophys. Acta* 776 (1984) 185–189.
- [67] R. Hosemann, S.N. Bagchi, *Direct Analysis of Diffraction by Matter*, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1962.
- [68] H.I. Petrache, N. Gouliarov, S. Tristram-Nagle, R.T. Zhang, R.M. Suter, J.F. Nagle, Interbilayer interactions from high-resolution X-ray scattering, *Phys. Rev. E* 57 (1998) 7014–7024.
- [69] W.J. Sun, R.M. Suter, M.A. Knewton, C.R. Worthington, S. Tristram-Nagle, R.Zhang, J.F. Nagle, Order and disorder in fully hydrated unoriented bilayers of gel phase dipalmitoylphosphatidylcholine, *Phys. Rev. E* 49 (1994) 4665–4676.
- [70] K.P. Soteriadou, A.K. Tzinia, E. Panou-Pamoni, V. Tsikaris, M. Sakarellos-Daitsiotis, C.Sakarellos, Y. Papapoulou, R. Matsas, Antigenicity and conformational analysis of the Zn²⁺-binding sites of two Zn²⁺-metalloproteases: *Leishmania* gp63 and mammalian endopeptidase-24.11, *Biochem. J.* 313 (1996) 455–466.

- [71] P. Zoumpoulakis, S.G. Grdadolnik, J.M. Matsoukas, T. Mavromoustakos, Structure elucidation and conformational properties of eprosartan a non peptide Angiotensin II AT1 antagonist, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 125–135.
- [72] P. Zoumpoulakis, A. Zoga, P. Roumelioti, N. Giatas, S.G. Grdadolnik, E. Iliodromitis, D. Vlahakos, D. Kremastinos, J.M. Matsoukas, T. Mavromoustakos, Conformational and biological studies for a pair of novel synthetic AT1 antagonists. Stereoelectronic requirements for antihypertensive efficacy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 833–844.
- [73] P. Zoumpoulakis, A. Politi, S.G. Grdadolnik, J.M. Matsoukas, T. Mavromoustakos, Structure elucidation and conformational study of V8. A novel synthetic non peptide AT1 antagonist, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 1097–1104.
- [74] C. Neale, W.F.D. Bennett, D.P. Tieleman, R. Pomes, Statistical convergence of equilibrium properties in simulations of molecular solutes embedded in lipid bilayers, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 4175–4188.
- [75] Kellici T, Ntountaniotis D, Kristi E, Zervou M, Zoumpoulakis P, Potamitis C, Durdagi S, Salmas RE, Ergün G, Gokdemir E, Halabalaki M, Gerothanassis IP, Liapakis G, Tzakos A, Mavromoustakos T. (2016). *Curr. Med. Chem.*, 23(1):36-59.
- [76] Fotakis C, Megariotis G, Christodouleas D, Kristi E, Zoumpoulakis P, Ntountaniotis D, Zervou M, Potamitis C, Hodzic A, Pabst G, Rappolt M, Mali G, Baldus J, Glaubitz C, Papadopoulos MG, Afantitis A, Melegraki G, Mavromoustakos, T. (2012). *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1818(12):3107-3120.
- [77] Agelis G, Resvani A, Koukoulitsa C, Tumova T, Slaninova J, Kalavrizioti D, Spyridaki K, Afantitis A, Melagraki G, Siafaka A, Gkini E, Megariotis G, Grdadolnik SG, Papadopoulos MG, Vlahakos D, Maragoudakis M, Liapakis G, Mavromoustakos T, Matsoukas J. (2013). *Eur. J. Med. Chem.*, 62:352-370.
- [78] Sadeghpour A, Rappolt M, Ntountaniotis D, Chatzigeorgiou P, Viras K, Megariotis G, Papadopoulos MG, Siapi E, Mali G, Mavromoustakos T. (2015). *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1848(4):984-994.
- [79] Μεγαριώτης Γ, Ατομιστικές και Μεσοσκοπικές προσομοιώσεις υγρών κρυστάλλων και λιπιδικών μεμβρανών , Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα 2009: 5-53
- [80] Κατσιλέρου Α., Θέματα αναισθησιολογίας κι εντατικής Ιατρικής, Astra Zeneca: 2011 : 55-83
- [81] Fotakis C, Megariotis G, Christodouleas D, Kritsi E, Zoumpoulakis P, Ntountaniotis D, Zervou M, Potamitis C, Hodzic A, Pabst G, Rappolt M, Mali G, Baldus J, Glaubitz C, Papadopoulos M, Afantitis A, Melagraki G, Mavromoustakos T, *Biochimica et Biophysica Acta* 1818 (2012) 3107-3120
- [82] GROMACS manual-4.5.6, 4.6.7, 5.0.7
- [83] Hub J, de Groot B, van der Spoel D, *J. Chem. Theory Comput.* 2010, 6, 3713–3720

[84] <http://doc.aris.grnet.gr/hardware/overview>

[85] John McMurry, Οργανική Χημεία, Μετάφραση Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000.

[86] E. Fahy, S. Subramanian, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyamma, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. Van Meer, M. S. Van Nieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum and E. A. Dennis, *Journal of Lipid Research*, 46: 839-861 (2005).

[87] R. M. Epand, *Methods in Molecular Biology*, 400: 15-26 (2005).

[88] J. M. Seddon and R. H. Templer, *Handbook-Biological-Physics*, Κεφάλαιο 3.

[89] M. Lucio, J.L.F.C. Lima, S. Reis, Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 1795–1809.