

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη διείσδυσης της ιμπουπροφένης
σε βιολογικές μεμβράνες με χρήση
μεθόδων μοριακής δυναμικής

ΦΙΛΙΠΠΟΣ Ε. ΜΠΟΡΜΠΑΝΤΩΝΑΚΗΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. ΦΡΟΥΔΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2019

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GENERAL POSTGRADUATE PROGRAM
LABORATORY OF THEORETICAL AND COMPUTATIONAL
CHEMISTRY



MASTER THESIS

**Study of ibuprofen penetration in
biological membranes with use of
molecular dynamics methods**

PHILIP E. BORBADONAKIS

THESIS SUPERVISOR: G. FROUDAKIS

HERAKLION, 2019

Στην οικογένεια μου ...

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο "Περιβαλλοντικών Ερευνών" του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σε συνεργασία με το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Εξεταστική Επιτροπή:

Γ. Φρουδάκης, Καθηγητής ΠΚ (Επιβλέπων)

Μ. Καινουργιάκης, Ερευνητής Α', ΕΚΕΦΕ (Δ)

Γ. Χαραλαμποπούλου, Ερευνήτρια Α', ΕΚΕΦΕ (Δ)

Η Υποστήριξη του παρόντος Μεταπτυχιακό Διπλώματος Ειδίκευσης έγινε στις 6 Μαΐου 2019, στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Ευχαριστίες

Η ανάθεση και η επίβλεψη της συγκεκριμένης εργασίας έγινε από τον Ερευνητή Α' του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» Δρ. Καιουργιάκη Μιχαήλ. Κατά τη συνεργασία μας ο Δρ. Καιουργιάκης από τη πρακτική μου το 2014 έως και σήμερα με τις συμβουλές του και τις γνώσεις που μου μετέδωσε με έκανε καλύτερο επιστήμονα αλλά και άνθρωπο και τον ευχαριστώ πολύ για όλα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Γ. Χαραλαμποπούλου για την πολύτιμη βοήθεια της και στήριξη της κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ετών. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του τμήματος Χημείας Δρ. Γ. Φρουδάκη για την επίβλεψη της συγκεκριμένης εργασίας καθώς και για την βοήθεια και την υπομονή του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνεργάστηκα στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» αλλά κυρίως το Δρ. Σ. Καρόζη για τη πολύτιμη βοήθεια του και τη καθοδήγηση από τη πρακτική μου ως σήμερα καθώς και για τις φιλικές συμβουλές όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης τον υποψήφιο Διδάκτορα Θ. Κατωπόδη και το Δρ. Ε. Μαυρουδάκη για τις δημιουργικές συζητήσεις που είχαμε.

Ακόμη ευχαριστώ τους φίλους μου που είναι δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια αλλά ιδιαίτερα την Ηλιάνα για τη φιλολογική της ματιά.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Μανώλη και Βαρβάρα για την αμέριστη συμπαράσταση σε όποια απόφαση και αν έχω πάρει έως τώρα, καθώς και την αδερφή μου Φαίη για τη διαφορετική οπτική της γωνία σε πολλά θέματα.

Περίληψη

Για την παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με χρήση προχωρημένων τεχνικών για τη μελέτη της διείδυσης μίας πρότυπης φαρμακευτικής ουσίας. Πιο συγκεκριμένα το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στις προσομοιώσεις αποτελείτο από κεραμίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, χοληστερόλη και νερό.

Το συγκεκριμένο σύστημα προσομοιάζει τις λιπιδιακές στοιβάδες οι οποίες βρίσκονται στην κεράτινη στοιβάδα του δέρματος. Η κεράτινη στοιβάδα αποτελείται από κερατινοσώματα τα οποία πλέουν σε μία θάλασσα από διπλοστοιβάδες λιπιδίων δημιουργώντας έτσι μία δομή που μπορεί να παρομοιασθεί με πλίνθους και κονίαμα. Με πλίνθους να είναι τα άκαμπτα κερατινοσώματα και κονίαμα οι λιπιδιακές διπλοστοιβάδες. Η λειτουργία του φραγμού που επιτελεί η κεράτινη στοιβάδα και πιο συγκεκριμένα οι λιπιδιακές διπλοστοιβάδες που περιέχει αποτελεί μία πολύ σημαντική λειτουργία του δέρματος αποτρέποντας τις ξένες ουσίες αλλά και μικροοργανισμούς από το να εισέλθουν στο ανθρώπινο σώμα.

Η λειτουργία αυτή στην παρούσα εργασία μελετήθηκε χρησιμοποιώντας μια φαρμακευτική ουσία, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την αναλγητική της δράση και έχει προταθεί για διαδερμική χορήγηση, την ιμπουπροφένη. Η μελέτη ενός τέτοιου συστήματος, με μεγάλο αριθμό μορίων, και ενός φαινομένου, το οποίο λαμβάνει χώρα εκτός ισορ-

ροπίας, με μεθόδους κλασσικής μοριακής δυναμικής είναι πολύ δύσκολη έως αδύνατη με τη διαθέσιμη υπολογιστική δύναμη. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε μία προχωρημένη τεχνική μοριακής δυναμικής η οποία έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Η τεχνική αυτή ονομάζεται δειγματοληψία κάλυψης και χρησιμοποιείται για να γίνει εφικτή η δειγματοληψία της ενεργειακής υπερεπιφάνειας κατά μήκος μίας τροχιάς μεταξύ δύο διαφορετικών θερμοδυναμικών καταστάσεων. Συγκεκριμένα για την παρούσα εργασία στη πρώτη κατάσταση το μόριο της ιμπουπροφένης βρίσκεται στην υδάτινη στοιβάδα, η οποία βρίσκεται εκατέρωθεν της διπλοστοιβάδας λιπιδίων, και στη δεύτερη κατάσταση βρίσκεται στο κέντρο της διπλοστοιβάδας.

Η προς μελέτη τροχιά η οποία παράγεται από μία σειρά προσομοιώσεων αναλύεται με χρήση ενός στατιστικού εργαλείου, της σταθμισμένης ανάλυσης ιστογραμμάτων, ώστε να υπολογισθεί το δυναμικό μέσης δύναμης για τη διείδυση της ιμπουπροφένης στη διπλοστοιβάδα. Για τη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν τρεις προσομοιώσεις όπου το μόριο της ιμπουπροφένης διείδυε στη διπλοστοιβάδα από συγκεκριμένο σημείο. Η επιλογή των σημείων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε το κάθε σημείο να είναι πλούσιο σε ένα από τα τρία λιπίδια της διπλοστοιβάδας. Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε μία επιπλέον προσομοίωση κατά την οποία το μόριο της ιμπουπροφένης εισήχθη σε τυχαία θέση στην υδάτινη στοιβάδα και το σύστημα προσομοιώθηκε έως ότου ισορροπήσει. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε προσομοίωση με χρήση της μεθοδολογίας της δειγματοληψίας κάλυψης από εκείνο το σημείο που ισορρόπησε η ιμπουπροφίνη.

Οι προσομοιώσεις για την εκτέλεση των οποίων χρησιμοποιήθηκε το ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο, πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες πίεσης 1 atm και θερμοκρασίας 300 K. Το σύστημα αποτελείτο από 10500 μόρια νερού και 260 λιπίδια σε αναλογία περίπου 1:1:1 με το δυναμικό που επιλέχθηκε για τη περιγραφή τους να είναι το CHARMM. Για τα υπολογισθέντα δυναμικά μέσης δύναμης έγινε προσπάθεια μελέτης και ανάλυ-

σής τους χρησιμοποιώντας τις δομικές ιδιότητες της διπλοστοιβάδας για να καθοριστεί η συμβολή κάθε συστατικού στη λειτουργία φραγμού της διπλοστοιβάδας.

Λέξεις Κλειδιά: Μοριακή Δυναμική, Δειγματοληψία Κάλυψης, Δυναμικό Μέσης Δύναμης, Κεράτινη Στοιβάδα, Κεραμίδιο, Ελεύθερο Λιπαρό Οξύ, Χοληστερόλη, Ιμπουπροφένη

Abstract

For the current study, molecular dynamics simulations were performed using advanced techniques to study the penetration of a standard drug molecule. More specifically, the system used in the simulations consisted of ceramides, free fatty acids, cholesterol and water.

This system simulates the lipid layers found in the stratum corneum of the skin in where the keratinocytes form a brick and mortar like structure with the lipid bilayers that are present. With bricks the rigid keratinocytes and mortar the lipid bilayers. The barrier function of the stratum corneum, and in particular the lipid bilayers it contains, is a very important function of the skin, preventing foreign substances and microorganisms from entering the human body.

This function in the present study was studied using a drug substance widely used for its analgesic action and proposed for transdermal administration, ibuprofen. The study of such a system, with a large number of molecules, and a phenomenon that takes place out of equilibrium, with methods of classical molecular dynamics is very difficult to nearly impossible with the available computational power. For this reason an advanced technique of molecular dynamics has been used which has been developed in the recent years. This technique is called umbrella sampling and is used to make it possible to sample the energy hypersurface along a reaction coordinate between two different thermodynamic states. In particular, for

the first state, the ibuprofen molecule is located in the water layer, which is located on either side of the lipid bilayer, and in the second state is located at the center of the bilayer

The reaction coordinate which is produced by a series of simulations is analyzed using a statistical tool, the weighted histogram analysis method (WHAM) to calculate the potential mean force for the penetration of ibuprofen into the bilayer. For this work three simulations were performed in which the ibuprofen molecule penetrated the bilayer from a specific site. The site selection was made so that each point has an abundance in one of the three lipids of the bilayer. In addition, another simulation was carried out in which the ibuprofen molecule was randomly placed in the water layer and the system was simulated until it was equilibrated and then simulated using the umbrella sampling method from that point.

For the simulations, the isothermal-isobaric statistical set was used under consistent conditions of pressure 1 atm and temperature 300 K. The system consisted of 10500 water molecules and 260 lipids in a ratio of about 1:1:1 with use of the CHARMM forcefield. For the calculated mean force potentials, an attempt was made to study and analyze them using the structural properties of the bilayer to determine the contribution of each component of the bilayer to the barrier function. For the current study, molecular dynamics simulations were performed using advanced techniques to study the penetration of a standard drug molecule. More specifically, the system used in the simulations consisted of ceramides, free fatty acids, cholesterol and water.

This system simulates the lipid layers found in the stratum corneum of the skin in where the keratinocytes form a brick and mortar like structure with the lipid bilayers that are present. With bricks the rigid keratinocytes and mortar the lipid bilayers. The barrier function of the stratum corneum, and in particular the lipid bilayers it contains, is a very important

function of the skin, preventing foreign substances and microorganisms from entering the human body.

This function in the present study was studied using a drug substance widely used for its analgesic action and proposed for transdermal administration, ibuprofen. The study of such a system, with a large number of molecules, and a phenomenon that takes place out of equilibrium, with methods of classical molecular dynamics is very difficult to nearly impossible with the available computational power. For this reason an advanced technique of molecular dynamics has been used which has been developed in the recent years. This technique is called umbrella sampling and is used to make it possible to sample the energy hypersurface along a reaction coordinate between two different thermodynamic states. In particular, for the first state, the ibuprofen molecule is located in the water layer, which is located on either side of the lipid bilayer, and in the second state is located at the center of the bilayer

The reaction coordinate which is produced by a series of simulations is analyzed using a statistical tool, the weighted histogram analysis method (WHAM) to calculate the potential mean force for the penetration of ibuprofen into the bilayer. For this work three simulations were performed in which the ibuprofen molecule penetrated the bilayer from a specific site. The site selection was made so that each point has an abundance in one of the three lipids of the bilayer. In addition, another simulation was carried out in which the ibuprofen molecule was randomly placed in the water layer and the system was simulated until it was equilibrated and then simulated using the umbrella sampling method from that point.

For the simulations, the isothermal-isobaric statistical set was used under consistent conditions of pressure 1 atm and temperature 300 K. The system consisted of 10500 water molecules and 260 lipids in a ratio of about 1:1:1 with use of the CHARMM forcefield. For

the calculated mean force potentials, an attempt was made to study and analyze them using the structural properties of the bilayer to determine the contribution of each component of the bilayer to the barrier function.

Keywords: Molecular Dynamics, Umbrella Sampling, Potential Mean Force, Stratum Corneum, Ceramide, Free Fatty Acid, Cholesterol, Ibuprofen

Περιεχόμενα

Κατάλογος σχημάτων	xxiii
1 Εισαγωγή	1
2 Θεωρητικό Μέρος	5
2.1 Λιπίδια	5
2.1.1 Διπλοστοιβάδες λιπιδίων	7
2.1.2 Κεράτινη στοιβάδα	8
2.2 Στατιστική Μηχανική	11
2.2.1 Εξίσωση Hamilton	12
2.2.2 Στατιστικά Σύνολα	14
2.2.3 Συνάρτηση Πυκνότητας Πιθανότητας	15

Περιεχόμενα

2.2.4	Θεώρημα <i>Liouville</i>	16
2.2.5	Εργοδική Ροή και ανάμειξη	17
2.2.6	Μικροκανονικό Στατιστικό Σύνολο, <i>NVE</i>	18
2.2.7	Κανονικό στατιστικό σύνολο <i>NVT</i>	20
2.2.8	Μέγα-Κανονικό σύστημα, <i>μVT</i>	21
2.2.9	Ισόθερμο-Ισοβαρές στατιστικό σύνολο, <i>NpT</i>	22
2.3	Μοριακή Προσομοίωση	23
2.3.1	<i>Monte Carlo</i>	26
2.3.2	Μοριακή Δυναμική	28
2.3.3	Υπολογισμός Μεγεθών	34
2.3.4	Δυναμικά αλληλεπίδρασης	36
2.3.5	Θερμοστάτης	40
2.3.6	Βαροστάτης	42
2.4	Προχωρημένες Τεχνικές Μοριακής Δυναμικής	43
2.4.1	Δειγματοληψία Κάλυψης - <i>Umbrella Sampling</i>	43

2.4.2	Αρμονικό Δυναμικό Εξαναγκασμένης Τροχιάς - Harmonic Bias Potential	48
2.4.3	Μέθοδος Σταθμισμένης Ανάλυσης Ιστογραμμάτων (Weighted Histogram Analysis Method, WHAM)	49
3	Υπολογιστικό Μέρος	51
3.1	Σκοπός της εργασίας	51
3.2	Δημιουργία αρχικής διπλοστοιβάδας λιπιδίων	52
3.2.1	Χαρακτηρισμός και δομή της αρχικής διπλοστοιβάδας	55
3.3	Δημιουργία τελικής δομής διπλοστοιβάδας	59
3.4	Διαδικασία προσομοίωσης με τη χρήση της μεθοδολογίας Umbrella Sampling	61
3.5	Δυναμικό Μέσης Δύναμης (Βάσης)	63
3.6	Επιλογή θέσεων διπλοστοιβάδας για προσομοιώσεις Umbrella Sampling .	65
3.7	Δυναμικά Μέσης Δύναμης των τριών θέσεων εισόδου	68
4	Επίλογος	75
4.1	Συζήτηση αποτελεσμάτων - Συμπεράσματα	75
4.2	Μελλοντικές Επεκτάσεις	80

Περιεχόμενα

Βιβλιογραφία

81

Κατάλογος σχημάτων

2.1	Παραδείγματα κοινών λιπιδίων	6
2.2	Δομή Κεράτινης στοιβάδας	9
2.3	Δομή του κεραμιδίου Ceramide NS 24:0	11
2.4	Αριθμός δημοσιεύσεων που αφορούν υπολογιστικές προσομοιώσεις ανά δεκαετία	24
2.5	Σύνδεση μεταξύ θεωρίας, πειράματος, υπολογιστικής προσομοίωσης	26
2.6	Γενικό αλγοριθμικό διάγραμμα ροής μοριακής προσομοίωσης	31
2.7	Σχηματική αναπαράσταση του αλγόριθμου Leap-Frog	34
2.8	Διάγραμμα δυναμικού Lennard-Jones με αναπράσταση των συνεισφορών των όρων r^{-12} και r^{-6}	38

Κατάλογος σχημάτων

2.9	Σχηματική αναπαράσταση μίας αλυσίδας ενός μορίου, όπου απεικονίζει τον ορισμό της διατομομικής απόστασης b_{23} , της γωνίας κάμψης θ_{234} και της γωνίας στρέψης ϕ_{1234}	39
2.10	Δημιουργία "παραθύρων" κατά μήκους της τροχιάς ξ μεταξύ δύο θερμοδυναμικών καταστάσεων στη μεθοδολογία Umbrella Sampling	45
3.1	Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας δημιουργίας αυτοοργανωμένης διπλοστοιβάδας	53
3.2	Κατανομή πυκνότητας κεραμιδίων στη διπλοστοιβάδα	56
3.3	Κατανομή πυκνότητας ελεύθερων λιπαρών οξέων στη διπλοστοιβάδα	57
3.4	Κατανομή πυκνότητας χοληστερόλης στη διπλοστοιβάδα	58
3.5	Μέση επιφανειακή πυκνότητα λιπιδίων της διπλοστοιβάδας	59
3.6	Ακτινική συνάρτηση κατανομής της αυτοοργανωμένης διπλοστοιβάδας	60
3.7	Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τυχαία θέση Ιμπουπροφένης	64
3.8	Ακτινική συνάρτηση κατανομής της ιμπουπροφένης προς τα λιπίδια για τη θέση εισόδου από κεραμίδιο	66
3.9	Ακτινική συνάρτηση κατανομής της ιμπουπροφένης προς τα λιπίδια για τη θέση εισόδου από ελεύθερο λιπαρό οξύ	67

3.10	Ακτινική συνάρτηση κατανομής της ιμπουροφείνης προς τα λιπίδια για τη θέση εισόδου από χοληστερόλη	68
3.11	Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τη θέση εισόδου από κεραμίδιο	69
3.12	Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τη θέση εισόδου από ελεύθερο λιπαρό οξύ	70
3.13	Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τη θέση εισόδου από χοληστερόλη	72
4.1	Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τις τρεις θέσεις εισόδου από κεραμίδια, από ελεύθερα λιπαρά οξέα και από χοληστερόλη	76
4.2	Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τις τρεις θέσεις εισόδου από κεραμίδια, από ελεύθερα λιπαρά οξέα, από χοληστερόλη καθώς και του δυναμικό μέσης δύναμης βάσης	78

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

Τόσο η συνεχόμενη αύξηση της υπολογιστικής ισχύος όσο και η ανάπτυξη του τομέα των μοριακών προσομοιώσεων τα τελευταία χρόνια, έχουν δώσει στην επιστημονική κοινότητα τη δυνατότητα μελέτης όλο και πολυπλοκότερων συστημάτων. Έτσι η μελέτη βιολογικών συστημάτων με μεγάλο αριθμό βιομορίων είναι πλέον εφικτή. Ένα αρκετά πολύπλοκο και πολύ σημαντικό στην ερμηνεία του σύστημα, είναι οι βιολογικές μεμβράνες καθώς επιτελούν κομβικές λειτουργίες στους οργανισμούς και ειδικότερα στον ανθρώπινο οργανισμό.

Πιο συγκεκριμένα η συγκεκριμένη εργασία ασχολείται με βιολογικές μεμβράνες οι οποίες απαντώνται στην επιδερμίδα του ανθρώπινου δέρματος. Στην επιδερμίδα η εξωτερική στοιβάδα ονομάζεται κεράτινη στοιβάδα (Stratum Corneum) και είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια σε ξένες ουσίες και μικροοργανισμούς. Η κατανόηση και η μελέτη αυτής της λειτουργίας φραγμού που επιτελεί, αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην έρευνα της διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων.

Εισαγωγή

Η μοριακή προσομοίωση είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο το οποίο παράλληλα με πειράματα δίνει τη δυνατότητα να ελεγχθεί η λειτουργία φραγμού και να γίνει μια προσπάθεια προσδιορισμού των ενεργειακών φραγμάτων που χρειάζεται να ξεπεράσει μία φαρμακευτική ουσία έτσι ώστε να εισέλθει στο ανθρώπινο σώμα μέσω του δέρματος. Πιο συγκεκριμένα για τη μελέτη ενός τέτοιου φαινομένου πρέπει να χρησιμοποιηθούν προχωρημένες τεχνικές μοριακής προσομοίωσης οι οποίες έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Σκοπός τους είναι να καταστεί δυνατή η μελέτη φαινομένων τα οποία είναι πολύ δύσκολο έως και αδύνατο να παρατηρηθούν με απλές προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Στην παρούσα εργασία κατά τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής χρησιμοποιείται η τεχνική της δειγματοληψίας κάλυψης. Πιο συγκεκριμένα με χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής μελετάται η εισχώρηση του μορίου της ιμπουπροφένης (ibuprofen) στη διπλοστοιβάδα λιπιδίων που υπάρχει στην κεράτινη στοιβάδα. Η ιμπουπροφίνη ανήκει στην κατηγορία των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του πυρετού, φλεγμονών και πόνου γενικότερα σε μια ευρεία κατηγορία περιπτώσεων όπου δεν επαρκούν τα απλά αναλγητικά, όπως αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα), ημικρανίες και προεμμηνορυσιακά άλγη.

Η χορήγηση της ιμπουπροφένης αυτή τη στιγμή γίνεται δια στόματος και ενδομυϊκά. Όμως η χρόνια χορήγηση του σε ασθενείς με τους παραπάνω τρόπους μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες λόγω της υψηλής της δραστηριότητας. Κάποιες από αυτές είναι η αύξηση της αρτηριακής πίεσης, η νεφροτοξικότητα, τα καρδιαγγειακά προβλήματα καθώς και γαστρεντερικά προβλήματα. Για την αποφυγή των προηγούμενων προβλημάτων έχουν γίνει μελέτες τόσο για την αλλαγή της φαρμακευτικής δράσης της ουσίας όσο και για διαφορετικό τρόπο χορήγησης. Η διαδερμική χορήγηση είναι ένας τρόπος που

έχει μελετηθεί τα τελευταία χρόνια και αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο για τη χρόνια χορήγηση της ιμμουπροφένης.

Παρακάτω στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται προσπάθεια μελέτης της διαδικασίας εισχώρησης της ιμμουπροφένης διαμέσου των λιπιδιακών διπλοστοιβάδων της κεράτινης στοιβάδας του δέρματος.

Κεφάλαιο 2

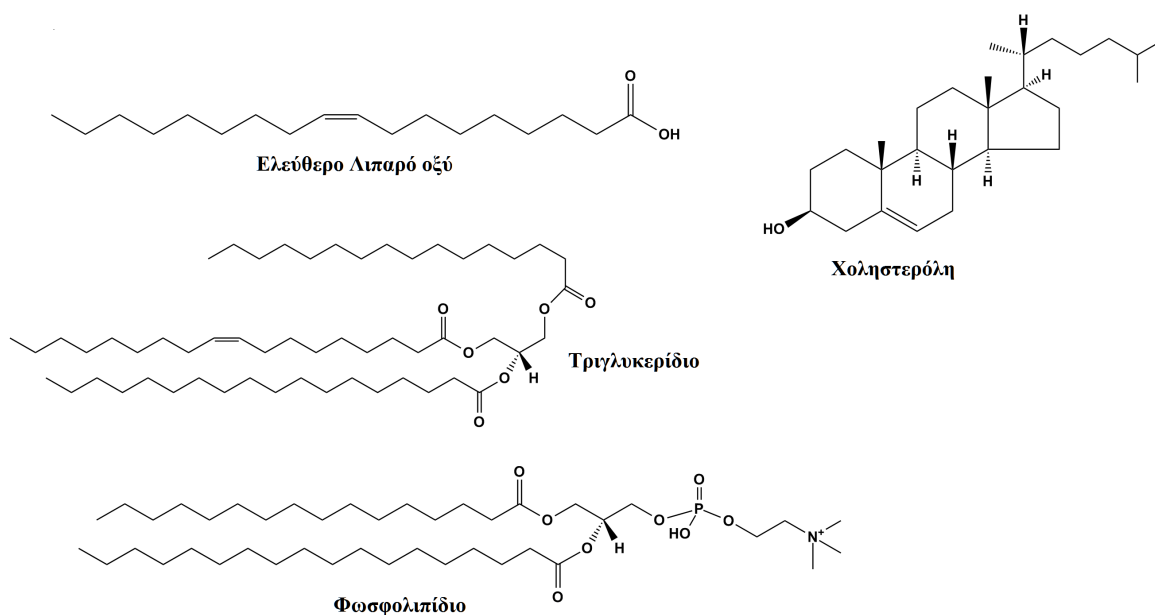
Θεωρητικό Μέρος

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται αναλυτικά αρχές της θεωρίας για την εργασία που εκπονήθηκε. Αρχικά γίνεται μία αναφορά στα λιπίδια. Παρακάτω αναλύονται οι βασικές αρχές της στατιστικής μηχανικής και γίνεται μία αναφορά στα στατιστικά σύνολα. Τέλος παρουσιάζεται η μοριακή προσομοίωση και ο τρόπος υλοποίησής της καθώς και η προχωρημένη τεχνική μοριακής δυναμικής, Umbrella Sampling.

2.1 Λιπίδια

Οι σύγχρονοι οργανισμοί αποτελούνται από κύτταρα. Ένα κύτταρο περιέχει νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και άλλες βιοχημικές ενώσεις που περιβάλλονται από μία λιπιδιακή μεμβράνη. Η μεμβράνη αυτή περιβάλλει πλήρως το περιεχόμενο, και έτσι το κύτταρο έχει έναν οριοθετημένο εσωτερικό και εξωτερικό χώρο.

Θεωρητικό Μέρος



Σχήμα 2.1 Παραδείγματα κοινών λιπιδίων

Τα λιπίδια είναι μία ετερογενής ομάδα χημικών ενώσεων. Είναι βιομόρια αδιάλυτα στο νερό και πολύ διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες. Χρησιμοποιούνται ως μόρια "καύσιμα", αποθήκες ενέργειας υψηλής πυκνότητας, σηματοδοτικά μόρια και επιπλέον, είναι δομικά συστατικά των μεμβρανών και του νευρικού ιστού. Τρία κοινά είδη μεμβρανικών λιπιδίων είναι:

- Τα φωσφολιπίδια (σφιγγολιπίδια και γλυκεροφωσφολιπίδια),
- τα γλυκο-σφιγγο-λιπίδια,
- και η χοληστερόλη.

Μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των λιπιδίων είναι οι υδροφοβικές τους ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται κυρίως στα λιπαρά οξέα (ή λίπη), που αποτελούν μέρος των λιπιδίων [1].

2.1.1 Διπλοστοιβάδες λιπιδίων

Τα λιπίδια είναι **αμφιπαθή** μόρια, δηλαδή περιέχουν και υδρόφιλα και υδρόφοβα συστατικά. Τα μόρια αυτά αποτελούνται από λιπαρά οξέα, των οποίων οι μακριές αλκυλικές ομάδες είναι υδρόφοβες και συνδεόνται με υδρόφιλες ομάδες-κεφαλές. Όταν τα λιπίδια αυτά βρίσκονται σε επαφή με το νερό, συναθροίζονται σχηματίζοντας δομές στις οποίες τα υδρόφοβα τμήματα στοιβάζονται μαζί μακριά από το νερό, ενώ τα υδρόφιλα μέρη εκτίθενται στο υδατικό διάλυμα σχηματίζοντας έτσι **κλειστά διμοριακά λεπτά φύλλα**. Η δομή αυτή, η οποία είναι σημαντική για το σχηματισμό μεμβρανών, καλείται **λιπιδιακή διπλοστοιβάδα**. Ο σχηματισμός διπλοστοιβάδων λιπιδίων είναι μια ταχύτατη και αυθόρμητη διαδικασία. Οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις είναι η κύρια δύναμη που οδηγεί στον σχηματισμό διπλοστοιβάδας λιπιδίων. Τα μόρια νερού απελευθερώνονται από τις υδρογονανθρακικές ουρές των λιπιδίων καθώς αυτές μετακινούνται προς το εσωτερικό της διπλοστοιβάδας. Επιπλέον, μεταξύ τους ασκούνται ελκτικές δυνάμεις Van der Waals. Τέλος, υπάρχουν ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των πολικών κεφαλών και των μορίων ύδατος από το περιβάλλον. Συνεπώς, η σταθεροποίηση των διπλοστοιβάδων στα βιολογικά συστήματα, επιτυγχάνεται από το σύνολο των δυνάμεων μεταξύ μορίων του συστήματος.

Οι πιθανές διαμορφώσεις των διπλοστοιβάδων ποικίλλουν ανάλογα με τον βιολογικό τους ρόλο. Ο υδρόφοβος εσωτερικός χώρος της διπλοστοιβάδας χρησιμεύει ως φραγμός μεταξύ των υδάτινων φάσεων. Εάν τέτοιες δομές σχηματίζονται όταν συνυπάρχουν άλλα μόρια (π.χ. νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες), αυτές εγκλωβίζονται στο εσωτερικό είτε στο εξωτερικό μέρος της διπλοστοιβάδας. Κατ' αυτόν τον τρόπο, οι διπλοστοιβάδες λιπιδίων αποτελούν φραγμούς στη ροή πολικών μορίων και ταυτόχρονα αποτελούν δυναμικές δομές στις οποίες μη πολικά μόρια, όπως πρωτεΐνες, πλέουν σε μία θάλασσα λιπιδίων.

Θεωρητικό Μέρος

Στις δομές αυτές, τα λιπίδια λειτουργούν ως φραγμός διαπερατότητας, ενώ οι πρωτεΐνες λειτουργούν ως σύστημα μεταφοράς αποτελούμενο από αντλίες και διαύλους[1].

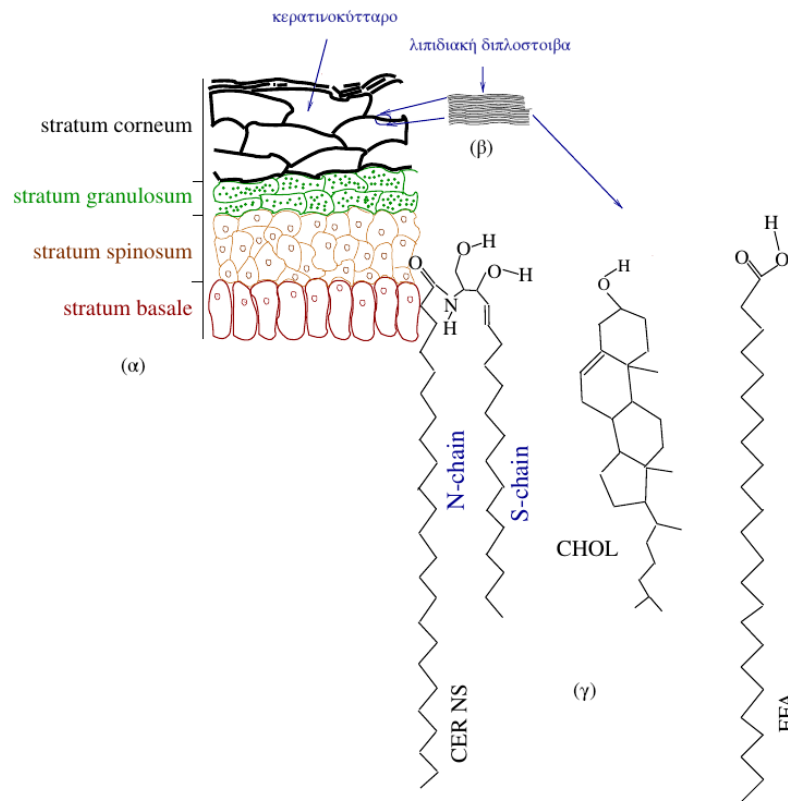
Η ευνοούμενη δομή για τα περισσότερα λιπίδια σε υδάτινο περιβάλλον είναι το διμοριακό λεπτό φύλλο, παρά το μικκύλιο. Ο λόγος είναι ότι συνήθως οι αλυσίδες λιπαρών οξέων καταλαμβάνουν πάρα πολύ μεγάλο όγκο και δεν χωρούν στο εσωτερικό του μικκυλίου.

Οι διπλοστοιβάδες λιπιδίων δεν είναι άκαμπτες και στατικές δομές αλλά **ρευστές δομές**. Βρίσκονται σε διαρκή κίνηση μέσα στο επίπεδο της στοιβάδας, μια διεργασία που ονομάζεται πλευρική διάχυση (lateral diffusion). Κανένα από τα μόρια όμως δεν έχει τη δυνατότητα να περιστραφεί από τη μία όψη της διπλοστοιβάδας στην άλλη (εγκάρσια διάχυση). Η κινητικότητα αυτή εκφράζεται ως συνάρτηση του συντελεστή διάχυσης D . Η μέση απόσταση s που καλύπτεται στο επίπεδο των N διαστάσεων, στην περίπτωση μας $N = 2$, σε χρόνο t εξαρτάται από τον συντελεστή D σύμφωνα με την εξίσωση:

$$s = (2NDt)^{\frac{1}{2}} \quad (2.1)$$

2.1.2 Κεράτινη στοιβάδα

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου οργανισμού κι επιτελεί βασικές βιολογικές λειτουργίες, όπως ότι αποτελεί ότι εξωτερικό όριο του οργανισμού, η λειτουργία συγκράτησης κ.α. Παρέχει προστασία από διάφορες εξωτερικές προσβολές που περιλαμβάνουν: μικροοργανισμούς, χημικές ουσίες, ηλεκτρική ενέργεια, μηχανική πίεση και θερμότητα. Το δέρμα επίσης φιλτράρει περίπου το 70% της UVB ακτινοβολίας και παίζει έναν ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος. Περιέχει αρκε-



Σχήμα 2.2 Δομή δέρματος (α), λιπιδιακής διπλοστοιβάδας της κεράτινης στοιβάδας (β), λιπίδια που απαρτίζουν τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα της κεράτινης στοιβάδας[2]

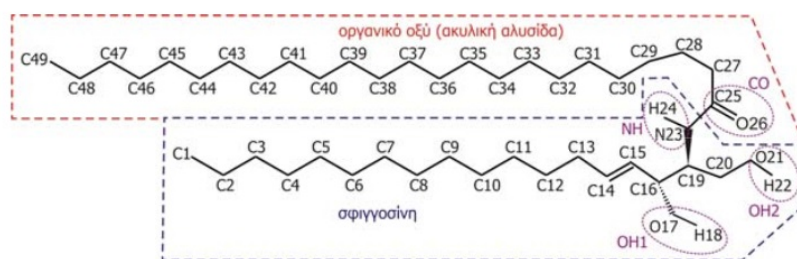
τές υποστοιβάδες που διαφέρουν στη δομή και τη λειτουργία τους. Η κεράτινη στοιβάδα (*Stratum Corneum*) είναι μέρος της επιδερμίδας και είναι το ανώτερο στρώμα του δέρματος. Η κεράτινη στοιβάδα έχει ιδιαίτερη βιολογική σημασία, γιατί ορίζει τη διεπιφάνεια μεταξύ του σώματος και του περιβάλλοντος. Έτσι, παρέχει έναν έλεγχο στις ουσίες που μεταφέρονται από και προς το σώμα διαμέσου του δέρματος. Επίσης, είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των σωστών επιπέδων υγρασίας στο σώμα και με τις κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες που έχει προσδίδει στο δέρμα τη λειτουργικότητά του.

Η κεράτινη στοιβάδα (SC), αποτελείται από μεγάλα άκαμπτα νεκρά κύτταρα (κυρίως κερατινοκύτταρα τα οποία περιέχουν κερατίνη). Τα κύτταρα αυτά περιβάλλονται από μια

Θεωρητικό Μέρος

λιπιδιακή μεμβράνη σχηματίζοντας μια δομή που μπορεί να παρομοιασθεί ποιοτικά με μία δομή «πλίνθων και κονιάματος» όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.2. Οι πλίνθοι στη προκειμένη περίπτωση είναι τα κερατινοκύτταρα και το κονιάμα οι λιπιδιακές διπλοστοιβάδες οι οποίες είναι στοιβαγμένες η μία πάνω στην άλλη ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα. Η συνεχής δομή των διπλοστοιβάδων, η οποία είναι και η μόνη συνεχής λιπιδιακή διαμόρφωση της κεράτινης στοιβάδας, είναι υπεύθυνη για την εξαιρετική ιδιότητα του φραγμού του δέρματος που προαναφέρθηκε και αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας κατά της εισβολής των ξένων παθογόνων. Η ακεραιότητα του πλέγματος λιπιδίων είναι απαραίτητη για την καλή λειτουργία του δέρματος, και η κατανόηση των δομών του θα βοηθήσει στο σχεδιασμό ουσιών για την αναζωογόνηση των κατεστραμμένων στρωμάτων λιπιδίων. Επίσης θα βοηθήσει στην ανάπτυξη ουσιών για την επιλεκτική διαταραχή της δομής των λιπιδίων προσωρινά και αναστρέψιμα, ώστε να αυξάνεται η διαπερατότητα για την δια-δερμική παροχή φαρμάκων.

Τα κύρια συστατικά της κεράτινης στοιβάδας είναι τα κεραμίδια (Ceramides), τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (Free Fatty Acids) και η χοληστερόλη (Cholesterol). Τα κεραμίδια είναι μια κατηγορία λιπιδίων που περιέχουν ως βάση σφινγγοσίνη ή μια παρόμοια αμινο-αλκοόλη. Η αμινομάδα ($-NH_2$) της σφινγγοσίνης είναι ενωμένη με αμιδικό δεσμό με την καρβοξυλομάδα ενός λιπαρού οξέος. Έτσι, το κεραμίδιο αποτελείται από μια πολική ομάδα και δύο υδρόφοβες αλκυλικές αλυσίδες: την αλυσίδα της σφινγγοσίνης και την αλυσίδα του λιπαρού οξέος (όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.3). Τα κεραμίδια, μαζί με όλα τα υπόλοιπα λιπίδια σχηματίζουν διπλοστοιβάδες, οι οποίες τοποθετούνται η μία πάνω στην άλλη σχηματίζοντας έτσι το λιπιδιακό πλέγμα της κεράτινης στοιβάδας. Στην κεράτινη στοιβάδα συναντώνται εννέα είδη κεραμιδίων, εκ των οποίων το πιο συχνό αποτελεί το *NS 24:0* [3–5].



Σχήμα 2.3 Δομή του κεραμιδίου Ceramide NS 24:0

2.2 Στατιστική Μηχανική

Η Στατιστική Μηχανική είναι ένας πολύ καλά εδραιωμένος κλάδος της θεωρητικής φυσικής. Οι βάσεις της εισήχθησαν από τον *J. W. Gibbs* [6] το 1902, αλλά οι ρίζες της ξεκινούν από την κινητική θεωρία των αερίων. Μαζί με την Κβαντομηχανική αποτελούν τη βάση της σύγχρονης φυσικής. Βασίζεται τόσο στη θεωρία πιθανοτήτων και στη στατιστική όσο και στη Χαμιλτονιανή Μηχανική. Το πεδίο εφαρμογής της είναι πολύ ευρύ, δεδομένου ότι εφαρμόζεται καταρχήν σε όλες τις καταστάσεις της ύλης.

Ο στόχος της στατιστικής μηχανικής είναι η εξαγωγή των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων της κατάστασης ενός μακροσκοπικού συστήματος από τους μικροσκοπικούς νόμους (νόμοι κλασσικής ή κβαντικής μηχανικής) που καθορίζουν τη συμπεριφορά των συστατικών του. Ειδικότερα, εξηγεί την προέλευση των θερμοδυναμικών και διαισθητικών εννοιών όπως η πίεση, η θερμοκρασία, η θερμότητα κλπ [7].

2.2.1 Εξίσωση Hamilton

Οι νόμοι της κλασσικής μηχανικής μπορούν να διαμορφωθούν για την περιγραφή ενός συστήματος σε μια δεδομένη στιγμή μέσω ενός συνόλου συντεταγμένων θέσης \vec{q}_i και των συζύγων τους συντεταγμένων της ορμής \vec{p}_i . Για ένα σύστημα με n βαθμούς ελευθερίας, ο δείκτης παίρνει τιμές $i = 1, 2, \dots, n$. Για N σωματίδια, η ορμή και η θέση έχουν $n = 3N$ συντεταγμένες. Έτσι για τις θέσεις έχουμε $\vec{q}_i = \vec{q}_1, \vec{q}_2, \dots, \vec{q}_n$ και για τις ορμές $\vec{p}_i = \vec{p}_1, \vec{p}_2, \dots, \vec{p}_n$. Οι δυναμικές ιδιότητες του συστήματος καθορίζονται από την ενέργεια που εκφράζεται ως συνάρτηση των μεταβλητών \vec{p}_i και \vec{q}_i . Αυτή η συνάρτηση ονομάζεται Χαμιλτονιανή (Hamiltonian) και γράφεται [8]:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}(\vec{q}_1, \vec{p}_1, \vec{q}_2, \vec{p}_2, \dots, \vec{q}_n, \vec{p}_n) \quad (2.2)$$

ή πιο σύντομα

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}(\vec{q}_i, \vec{p}_i) \quad (2.3)$$

Ο $6N$ -διάστατος χώρος που ορίζουν τα $\{\vec{p}_i, \vec{q}_i\}$ καλείται χώρος Γ ή χώρος φάσεων του συστήματος. Κάθε σημείο στον χώρο Γ αντιστοιχεί μια συγκεκριμένη κατάσταση του συστήματος και αντίστροφα. Από την προηγούμενη εξίσωση μπορούμε με γνώση της Χαμιλτονιανής να εξάγουμε τις εξισώσεις κίνησης[8] με τη μορφή Χαμιλτονιανών:

$$\frac{d\vec{p}_i}{dt} = -\frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \vec{q}_i} = \dot{p}_i \quad (2.4)$$

$$\frac{d\vec{q}_i}{dt} = \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \vec{p}_i} = \dot{q}_i \quad (2.5)$$

Όλα τα σημεία του χώρου Γ τα οποία ικανοποιούν την εξίσωση $\mathcal{H}(\vec{q}_i, \vec{p}_i) = E$ ορίζουν μία επιφάνεια, η οποία καλείται υπερεπιφάνεια ενέργειας E . Έτσι, καθώς το σύστημα εξελίσσεται στον χρόνο σύμφωνα με τις εξισώσεις 2.4 διαγράφει μία τροχιά στον χώρο φάσεων και πιο συγκεκριμένα η τροχιά αυτή βρίσκεται πάντα στην επιφάνεια της ενέργειας E , εφόσον ισχύει εξ' ορισμού η αρχή διατήρησης της ενέργειας [9].

Η Χαμιλτονιανή για ένα σύστημα N σωματιδίων είναι το σύνολο της ενέργειας του συστήματος, μπορούμε να τη γράψουμε ως το άθροισμα της κινητικής ενέργειας, ως συνάρτηση των ορμών $K(\vec{p})$, και της δυναμικής ενέργειας, ως συνάρτηση των θέσεων $\mathcal{V}(\vec{q})$, δηλαδή [8]:

$$\mathcal{H} = K(\vec{p}) + \mathcal{V}(\vec{q}) = \sum_{i=1}^N \frac{\vec{p}_i^2}{2m} + \mathcal{V}(\vec{q}) \quad (2.6)$$

Τέλος, θεωρούμε ότι η Χαμιλτονιανή δεν εξαρτάται άμεσα από τον χρόνο, παρά μόνο μέσω της εξάρτησής της από τα \vec{p} και \vec{q} . Επομένως, η τιμή της Χαμιλτονιανής διατηρείται σταθερή και το σύστημα καλείται διατηρητικό ή συντηρητικό. Επιπλέον, τα σημεία πάνω στην υπερεπιφάνεια της Χαμιλτονιανής είναι αντιστρεπτά ως προς τον χρόνο, δηλαδή γνωρίζοντας τις τιμές τους σε χρόνο t_0 , με ολοκλήρωση συλλέγεται η πληροφορία για τις τιμές σε χρόνο t . Επίσης, οι τροχιές δύο τέτοιων σημείων (διαφορετικών, σε χρόνο t), δεν

διασταυρώνονται ποτέ και δεν τέμνουν ούτε τον εαυτό τους. Το τελευταίο ονομάζεται τοπολογία κλειστού βρόχου [8, 10].

2.2.2 Στατιστικά Σύνολα

Το 1902 ο *J. W. Gibbs* θέτοντας τα θεμέλια της στατιστικής μηχανικής εισήγαγε την έννοια του στατιστικού συνόλου[6]. Έτσι, αν λάβουμε υπόψιν μας π.χ. ένα αέριο, ένας πολύ μεγάλος (στην πραγματικότητα άπειρος) αριθμός μικροκαταστάσεων του αερίου αντιστοιχεί σε μια δεδομένη μακροσκοπική κατάσταση του αερίου. Ειδικότερα αν ένα αέριο περιέχεται σε δοχείο όγκου V υπάρχουν άπειροι τρόποι κατανομής των μορίων του αερίου στο δοχείο και και με τη διενέργεια μακροσκοπικών μετρήσεων δεν θα μπορούσαμε ποτέ να διακρίνουμε μεταξύ δύο αερίων που υπάρχουν σε διαφορετικές μικροκαταστάσεις (αντιστοιχώντας έτσι σε δύο διαφορετικά αντιπροσωπευτικά σημεία στο χώρο Γ) τα οποία όμως ικανοποιούν τους ίδιους μακροσκοπικούς περιορισμούς. Έτσι, όταν μιλάμε για ένα σύνολο N σωματιδίων υπό ορισμένες μακροσκοπικές συνθήκες, στην πραγματικότητα δεν αναφερόμαστε σε μία μικροκατάσταση, αλλά σε έναν άπειρο αριθμό μικροκαταστάσεων. Με άλλα λόγια, δεν αναφερόμαστε σε ένα ενιαίο σύστημα, αλλά σε μια συλλογή συστημάτων, πανομοιότυπη σε σύνθεση και μακροσκοπική κατάσταση αλλά σε διαφορετικές μικροκαταστάσεις. Μια τέτοια συλλογή συστημάτων καλείται ένα στατιστικό σύνολο. Γεωμετρικά μπορεί να αναπαρασταθεί με μία κατανομή των αντιπροσωπευτικών σημείων του χώρου Γ , η οποία περιγράφεται από τη χρονικά εξαρτώμενη συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας $\rho(\vec{p}, \vec{q}, t)$, με \vec{p} και \vec{q} το σύνολο των συντεταγμένων ορμών και θέσεων των σωματιδίων του συστήματος αντίστοιχα. Ανάλογα με τους περιορισμούς που τίθενται κάθε φορά ορίζονται τα εξής στατιστικά σύνολα [6, 9, 10]:

- το μικροκανονικό στατιστικό σύνολο (NVE)

- το κανονικό στατιστικό σύνολο (NVT)
- το μέγα-κανονικό στατιστικό σύνολο (μVT)
- και το ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο (NpT)

2.2.3 Συνάρτηση Πυκνότητας Πιθανότητας

Η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ορίζει την πιθανότητα ένα αντιπροσωπευτικό σημείο του συστήματος να βρίσκεται σε μία ορισμένη περιοχή του χώρου Γ σε μία δεδομένη χρονική στιγμή. Έτσι $\rho(\vec{p}, \vec{q}, t)d\Gamma$ είναι η πιθανότητα να βρεθεί ένα αντιπροσωπευτικό σημείο σε μία περιοχή του όγκου $d\Gamma$ γύρω από το σημείο (\vec{q}, \vec{p}) σε χρόνο t γνωρίζοντας την πυκνότητα πιθανότητας της αρχικής κατάστασης $\rho(\vec{p}, \vec{q}, t = 0)$. Οι προϋποθέσεις για είναι πυκνότητα πιθανότητας ρ , είναι:

$$\rho(\vec{p}, \vec{q}, t) \geq 0 \quad \forall(\vec{q}, \vec{p}), t \quad (2.7)$$

και

$$\int_{\Gamma} \rho(\vec{q}, \vec{p}, t)d\Gamma = 1 \quad (2.8)$$

Αντίστοιχα, η πιθανότητα να βρεθεί το σύστημα σε μια μικροκατάσταση, η οποία περιλαμβάνεται σε μία πεπερασμένη περιοχή R του χώρου φάσεων σε χρόνο t , δίνεται από την ολοκλήρωση της συνάρτησης πυκνότητας της πιθανότητας σε αυτή την περιοχή [6, 9].

$$\int_R \rho(\vec{q}, \vec{p}, t)d\Gamma \quad (2.9)$$

2.2.4 Θεώρημα *Liouville*

Για τη συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας ενός στατιστικού συνόλου, ισχύει το θεώρημα *Liouville*, το οποίο ορίζει ότι:

Το θεώρημα του *Liouville* δηλώνει ότι το σύνολο των συστημάτων (όπως αντιπροσωπεύεται από ένα σημείο στον χώρο Γ) στην περιοχή ενός δεδομένου συστήματος παραμένει σταθερό στον χρόνο [11]:

$$\frac{D\rho}{Dt} = 0 \quad (2.10)$$

Δεδομένου ότι οι εξισώσεις κίνησης είναι συναρτήσεις του χρόνου μπορούμε να περιγράψουμε γεωμετρικά το θεώρημα. Ακολουθώντας την κίνηση ενός αντιπροσωπευτικού σημείου του χώρου Γ , η πυκνότητα πιθανότητας των αντιπροσωπευτικών σημείων στην εγγύς περιοχή είναι σταθερή. Οπότε συμπερασματικά η κατανομή των αντιπροσωπευτικών σημείων κινείται στον χώρο Γ ως ένα ασυμπίεστο υγρό. Έτσι το θεώρημα *Liouville* για ένα χαμιλτονιανό σύστημα μπορεί να γραφεί και ως [6, 9]:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \sum_{i=1}^{3N} \left(\frac{\partial \rho}{\partial \vec{q}_i} \dot{q}_i + \frac{\partial \rho}{\partial \vec{p}_i} \dot{p}_i \right) = 0 \quad (2.11)$$

Η παραπάνω εξίσωση παραμένει αμετάβλητη αν αντιστραφεί ο χρόνος.

2.2.5 Εργοδική Ροή και ανάμειξη

Εργοδική ροή ονομάζεται η ροή των σημείων μιας κατάστασης στην υπερεπιφάνεια της ενέργειας εάν σχεδόν όλα τα σημεία $x_i(\vec{p}_i, \vec{q}_i)$ στην επιφάνεια κινούνται έτσι ώστε να περνούν από κάθε μικρή πεπερασμένη περιοχή στην ενεργειακή επιφάνεια. Δηλαδή, κάθε αντιπροσωπευτικό σημείο της κατάστασης, ακολουθεί μια τροχιά που θα περάσει κοντά σε οποιοδήποτε άλλο σημείο στην υπερεπιφάνεια της ενέργειας. Σύμφωνα με την εργοδική ροή πέρα από το παραπάνω ισχύει και ότι για μία παρατηρούμενη μακροσκοπική ιδιότητα A η μέση τιμή της μπορεί να βρεθεί είτε ακολουθώντας την τροχιά ενός αντιπροσωπευτικού σημείου στο χώρο φάσεων είτε παίρνοντας ένα στιγμιότυπο της υπερεπιφάνειας της ενέργειας οποιαδήποτε στιγμή λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα σημεία του στατιστικού συνόλου [7].

$$\langle A \rangle_t = \langle A \rangle_{ens} \quad (2.12)$$

Η εργοδική ροή από μόνη της όμως δεν είναι αρκετή ως συνθήκη για να τείνει η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας για ένα σύνολο $\rho(x_i, t)$ στην πυκνότητα πιθανότητας ισορροπίας $\rho^{eq}(x_i, t)$. Αυτό συμβαίνει καθώς δεν υπάρχει καμία εγγύηση ότι το σύνολο των σωματιδίων ενός εργοδικού συστήματος που το ορίζει η $\rho(x_i, t)$ θα διασκορπιστεί στην υπερεπιφάνεια της ενέργειας E όσο περνάει ο χρόνος. μπορεί να διατηρήσει την ακεραιότητά του και να περιπλανηθεί ως μία οντότητα έτσι ώστε ολόκληρο το σύστημα να επισκεφθεί ολόκληρη την υπερεπιφάνεια. Απαιτείται λοιπόν μια ισχυρότερη συνθήκη από την εργοδικότητα για να εξασφαλιστεί ότι θα οδηγηθεί το σύστημα στην ισορροπία. Αυτή η συνθήκη είναι η ανάμειξη των αντιπροσωπευτικών σημείων της κατάστασης στον χώρο φάσεων. Η ροή ανάμειξης είναι ένα χαοτικό φαινόμενο και προκαλεί την εξάπλωση της αρχικής κατανομής πιθανότητας στον χώρο φάσεων. Τα αντιπροσωπευτικά σημεία της κατάστασης του συστήματος που βρίσκονται αρχικά κοντά το ένα στο άλλο

εξαπλώνονται εκθετικά με τον χρόνο και σύντομα φτάνουν σε τελείως διαφορετικά μέρη της υπερεπιφάνειας της ενέργειας [7].

2.2.6 Μικροκανονικό Στατιστικό Σύνολο, NVE

Για ένα μονωμένο σύστημα η ενέργεια E , ο αριθμός των σωματιδίων N και ο όγκος V είναι σταθερά. Τα στατιστικό σύνολο το οποίο αντιπροσωπεύει ένα τέτοιο σύστημα είναι το μικροκανονικό στατιστικό σύνολο (NVE), το σύνολο στο οποίο όλες οι καταστάσεις έχουν τα N , V και E σταθερά. Η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας του μικροκανονικού στατιστικού συνόλου είναι ανάλογη του:

$$\delta[\mathcal{H}(\Gamma) - E] \quad (2.13)$$

όπου δ είναι το δέλτα του Kronecker το οποίο παίρνει τιμές 0 και 1 και επιλέγει όλες τις μικροκαταστάσεις του συστήματος σε έναν όγκο V που έχουν την επιθυμητή ενέργεια E [11].

Η συνάρτηση μερισμού για το μικροκανονικό στατιστικό σύνολο μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$Q_{NVE} = \sum_{\Gamma} \delta[\mathcal{H}(\Gamma) - E] \quad (2.14)$$

Η quasi-classical έκφραση της συνάρτησης μερισμού είναι:

$$Q_{NVE} = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \int \delta(\mathcal{H}[\vec{q}, \vec{p}] - E) d^{3N}q d^{3N}p \quad (2.15)$$

Εδώ η χρησιμοποίηση του $d^{3N}q d^{3N}p$ σημαίνει ότι ολοκληρώνεται για όλες τις $6N$ διαστάσεις του χώρου φάσεων. Στο μικροκανονικό στατιστικό σύνολο η χαρακτηριστική θερμοδυναμική ιδιότητα που συνδέεται με αυτό είναι η εντροπία:

$$-\frac{S}{k_B} = -\ln Q_{NVE} \quad (2.16)$$

όπου k_B η σταθερά *Boltzmann*.

Η θερμοκρασία του συστήματος είναι δυνατό να εξαχθεί από τη σχέση 2.18:

$$\beta = \frac{k_B T}{=} \left(\frac{\partial \ln(Q_{NVE})}{\partial E} \right)_{N,V} \quad (2.17)$$

$$U = \langle K \rangle + \langle V \rangle \quad (2.18)$$

$$\langle K \rangle = \left\langle \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m \vec{u}^2 \right\rangle = \frac{f}{2} N k_B T \quad (2.19)$$

όπου f ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας ανά μόριο [12, 13]

Για ένα κλασσικό σύστημα, οι εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα διατηρούν την ενέργεια και έτσι παρέχουν μια κατάλληλη μέθοδο (αλλά όχι και τη μοναδική) για τη δη-

μιουργία μιας αλληλουχίας αντιπροσωπευτικών σημείων του χώρου φάσεων τα οποία δειγματολειτουργούνται από αυτό το στατιστικό σύνολο.

2.2.7 Κανονικό στατιστικό σύνολο NVT

Το κανονικό στατιστικό σύνολο (NVT) είναι αντίστοιχο με ένα κλειστό σύστημα όγκου V σε ένα λουτρό θερμότητας. Ο αριθμός των σωματιδίων N , ο όγκος V και η θερμοκρασία T είναι σταθερά, αλλά η ενέργεια δεν είναι. Η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας του κανονικού στατιστικού συνόλου είναι ανάλογη του [11, 14].:

$$\exp[-(\mathcal{H}(\Gamma)/k_B T)] \quad (2.20)$$

Η συνάρτηση μερισμού για το κανονικό στατιστικό σύνολο μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$Q_{NVT} = \sum_{\Gamma} \exp[-(\mathcal{H}(\Gamma)/k_B T)] \quad (2.21)$$

$$Q_{NVT} = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \int \exp\left(-\frac{\mathcal{H}(\Gamma)}{k_B T}\right) d^{3N}q d^{3N}p \quad (2.22)$$

Στο κανονικό στατιστικό σύνολο η χαρακτηριστική θερμοδυναμική ιδιότητα που συνδέεται με αυτό είναι η ελεύθερη ενέργεια *Helmholtz* μέσω της εξίσωσης:

$$\frac{A}{k_B T} = -\ln Q_{NVT} \quad (2.23)$$

Στο κανονικό στατιστικό σύνολο, επιτρέπονται όλες οι τιμές της ενέργειας και οι διακυμάνσεις της ενέργειας δεν είναι μηδενικές όπως στο μικροκανονικό στατιστικό σύνολο. Έτσι, ακόμα και αν η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας $\rho_{NVT}(\Gamma)$ είναι πράγματι μια λύση της εξίσωσης *Liouville*, οι αντίστοιχες μηχανικές εξισώσεις κίνησης δεν είναι μια ικανοποιητική μέθοδος δειγματοληψίας σε αυτό το σύνολο, αφού διατηρούν την ενέργεια: η κανονική χρονική εξέλιξη λαμβάνει χώρα σε ένα σύνολο ανεξάρτητων επιφανειών σταθερής ενέργειας, κάθε μία από τις οποίες θα πρέπει να είναι κατάλληλα σταθμισμένες από τον συντελεστή $\exp[-(\mathcal{H}(\Gamma)/k_B T)]$ [11].

2.2.8 Μέγα-Κανονικό σύστημα μVT

Το μέγα-κανονικό στατιστικό σύνολο (μVT) είναι αντίστοιχο με ένα ανοικτό σύστημα όγκου V σε ένα λουτρό θερμότητας. Συνεπώς, ο αριθμός των σωματιδίων N έχει διακυμάνσεις, διότι σωματίδια αφήνονται να εξέρχονται και να εισέρχονται στο σύστημα, αλλά όπως και στο κανονικό στατιστικό σύνολο και η ενέργεια έχει διακυμάνσεις. Σε ένα τέτοιο σύστημα η θερμοκρασία T και το χημικό δυναμικό μ είναι σταθερά. Η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας του μέγα-κανονικού στατιστικού συνόλου είναι ανάλογη του [11, 14].:

$$\exp [-(\mathcal{H}(\Gamma) - \mu N)/k_B T] \quad (2.24)$$

Η συνάρτηση μερισμού για το μέγα-κανονικό στατιστικό σύνολο μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$Q_{\mu VT} = \sum_{\Gamma} \sum_N \exp\left(-\frac{\mathcal{H}(\Gamma) - \mu N}{k_B T}\right) = \sum_N \left(\frac{\mu N}{k_B T}\right) Q_{NVT} \quad (2.25)$$

$$Q_{\mu VT} = \sum_N \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \int \exp\left(-\frac{\mathcal{H}(\Gamma) - \mu N}{k_B T}\right) d^{3N} q d^{3N} p \quad (2.26)$$

Στο κανονικό στατιστικό σύνολο η χαρακτηριστική θερμοδυναμική ιδιότητα που συνδέεται με αυτό είναι το $-PV/k_B T$:

$$-\frac{PV}{k_B T} = -\ln Q_{\mu VT} \quad (2.27)$$

2.2.9 Ισόθερμο-Ισοβαρές στατιστικό σύνολο, NpT

Το ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο (NpT) είναι αντίστοιχο με ένα κλειστό σύστημα όγκου V σε ένα λουτρό θερμότητας. Συνεπώς ο αριθμός των σωματιδίων N παραμένει σταθερός, παράλληλα με τα άλλα δύο μεγέθη που μένουν σταθερά τα οποία είναι η πίεση p και η θερμοκρασία T . Η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας του ισόθερμο-ισοβαρούς στατιστικού συνόλου είναι ανάλογη του [11, 14].:

$$\exp[-(\mathcal{H}(\Gamma) + PV)/k_B T] \quad (2.28)$$

Η συνάρτηση μερισμού για το ισόθερμο-ισοβαρές κανονικό στατιστικό σύνολο μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$Q_{NPT} = \sum_{\Gamma} \sum_V \exp\left(-\frac{\mathcal{H}(\Gamma) + PV}{k_B T}\right) = \sum_V \exp\left(-\frac{PV}{k_B T}\right) Q_{NVT} \quad (2.29)$$

$$Q_{NPT} = \sum_N \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \frac{1}{V_0} \int \exp\left(-\frac{\mathcal{H}(\Gamma) + PV}{k_B T}\right) d^{3N} q d^{3N} p dV \quad (2.30)$$

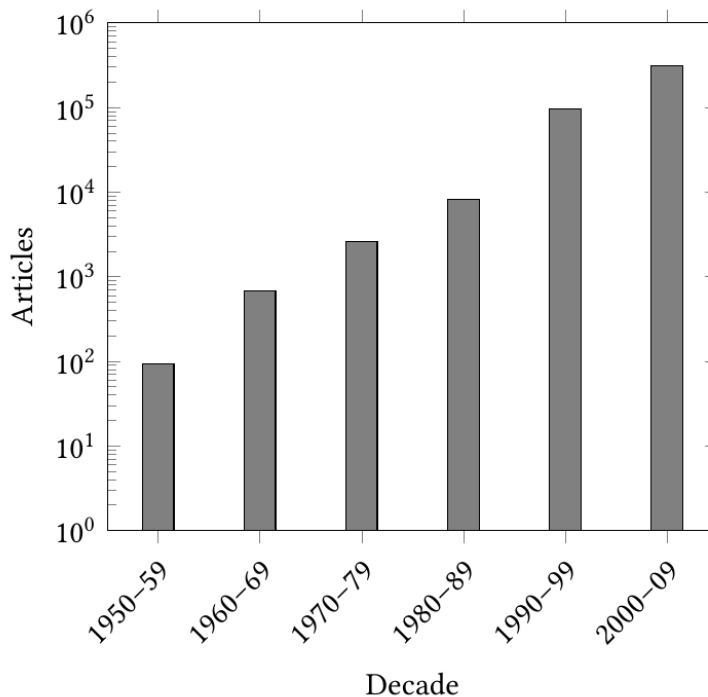
Στο ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο η χαρακτηριστική θερμοδυναμική ιδιότητα που συνδέεται με αυτό είναι η ελεύθερη ενέργεια *Gibbs* μέσω :

$$\frac{G}{k_B T} = -\ln Q_{NPT} \quad (2.31)$$

Το ισόθερμο-ισοβαρές σύνολο έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη χημεία, καθώς οι χημικές αντιδράσεις συνήθως εκτελούνται υπό συνθήκες σταθερής πίεσης [11].

2.3 Μοριακή Προσομοίωση

Τα τελευταία χρόνια η ταχύτατη αύξηση της διαθέσιμης υπολογιστικής δύναμης, αλλά και η μείωση του κόστους για την απόκτησή της έχουν συντελέσει σε μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη ενός νέου τομέα στον κλάδο της χημείας και πιο συγκεκριμένα αυτόν της υπολογιστικής χημείας. Από άποψη ταχύτητας των επεξεργαστών, ο νόμος του Moore υποδηλώνει ότι η υπολογιστική ισχύς θα πρέπει να διπλασιάζεται κάθε ένα με δύο χρόνια, κάτι το οποίο αναμένεται να συνεχιστεί για τουλάχιστον 10 χρόνια ακόμα. Τη δεδομένη χρονική στιγμή τουλάχιστον ένα υπολογιστικό σύστημα υψηλής απόδοσης (High Performace Computer) είναι ικανό να κάνει υπολογισμούς με ταχύτητα του ενός exaFLOPS



Σχήμα 2.4 Αριθμός δημοσιεύσεων που αφορούν υπολογιστικές προσομοιώσεις ανά δεκαετία [11]

(δηλαδή 10^{18} floating point υπολογισμούς το δευτερόλεπτο). Έτσι τα τελευταία χρόνια η άνοδος στην έρευνα με μεθόδους υπολογιστικών προσομοιώσεων, όπως φαίνεται και από το σχήμα 2.4, είναι εμφανής. Το παραπάνω οφείλεται τόσο στην αύξηση της υπολογιστικής ισχύος όσο και στην εφαρμογή των μεθόδων υπολογιστικών προσομοιώσεων σε ένα ευρύ φάσμα προηγουμένως ανυπόστατων προβλημάτων στα υλικά και τις επιστήμες της ζωής. Όμως σημαντικό ρόλο έχει διαδραματίσει και η ανάπτυξη νέων μεθόδων τα τελευταία χρόνια, όπως η επέκταση των πρώτων μεθόδων που αναπτύχθηκαν σε τομείς όπως ο υπολογισμός των ελεύθερων ενεργειών και των διαγραμμάτων φάσεων, η προσομοίωση σπάνιων συμβάντων, η ανάπτυξη μεθόδων μη-ισορροπίας για τον υπολογισμό των συντελεστών μεταφοράς αλλά και η ανάπτυξη μεθόδων με περιγραφή αδρών κόκκων (coarse-grained) για την αύξηση του μεγέθους μήκους και του χρόνου των συστημάτων προς προσομοίωση.

Οι μοριακές προσομοιώσεις, ένα είδος προσομοιώσεων στην οικογένεια των υπολογιστικών προσομοιώσεων, μας δίνουν τη δυνατότητα να υπολογίσουμε μακροσκοπικά μεγέθη και ιδιότητες από τις μικροσκοπικές αλληλεπιδράσεις των ατόμων και των μορίων ενός συστήματος. Αυτό καθίσταται εφικτό χρησιμοποιώντας ένα σύνολο μαθηματικών εργαλείων, τα οποία προέρχονται από τον τομέα της φυσικής ο οποίος είναι ικανός να συνδέσει τις μακροσκοπικές ιδιότητες με τον μικρόκοσμο των ατόμων της στατιστικής μηχανικής. Ορισμένα προβλήματα στη στατιστική μηχανική, αν και δεν είναι ακριβώς επιλύσιμα, υπόκεινται άμεσα σε μια ανάλυση που βασίζεται σε απλές προσεγγίσεις. Οι υπολογιστές μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην επίλυση ενός τέτοιου προβλήματος.

Οι μοριακές προσομοιώσεις έχουν ένα πολύτιμο ρόλο στην παροχή ουσιαστικών και ακριβών αποτελεσμάτων για προβλήματα στη στατιστική μηχανική, τα οποία διαφορετικά θα ήταν επιλύσιμα μόνο με προσεγγιστικές μεθόδους ή θα μπορούσαν να είναι αρκετά δύσκολα. Υπό αυτή την έννοια, η υπολογιστική προσομοίωση είναι μια δοκιμή των θεωριών και, ιστορικά, οι προσομοιώσεις έχουν διακριθεί ανάμεσα σε βάσιμες προσεγγίσεις και ιδέες που είναι εύλογες αλλά λιγότερο επιτυχείς. Τα αποτελέσματα των υπολογιστικών προσομοιώσεων μπορούν επίσης να συγκριθούν με αυτά των πραγματικών πειραμάτων. Πρώτον, δοκιμάζεται το υποκείμενο μοντέλο που χρησιμοποιείται σε μια προσομοίωση. Τελικά, αν το μοντέλο είναι καλό, ο "προσομοιωτής" μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για τον "πειραματιστή" και να βοηθήσει στην ερμηνεία νέων αποτελεσμάτων. Αυτός ο διπλός ρόλος της προσομοίωσης, ως γέφυρα μεταξύ μοντέλων και θεωρητικών προβλέψεων αφενός, και μεταξύ μοντέλων και πειραματικών αποτελεσμάτων αφετέρου, απεικονίζεται στο σχήμα 2.5 [8, 11, 15].

τικό μαθηματικό πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπιστεί με την εύρεση ενός πιθανολογικού αναλόγου που στη συνέχεια επιλύεται με ένα στοχαστικό δειγματοληπτικό πείραμα [11].

Κατά τη μέθοδο Monte Carlo, δημιουργείται ένα νέο σημείο στο χώρο φάσεων υποβάλλοντας ένα ή περισσότερα άτομα του συστήματος σε μία τυχαία κίνηση. Οι συνεταγμένες τροποποιούνται προσθέτοντας ένα τυχαίο βήμα με ένα δεδομένο μέσο μέγεθος βήματος και μια ίση πιθανότητα βημάτων προς τα εμπρός και προς τα πίσω. Η νέα διαμόρφωση είναι αποδεκτή εάν η πιθανή ενέργεια E μειωθεί σε αυτό το βήμα, π.χ., αν $E(i + 1) < E(i)$. Ειδικότερα, το βήμα είναι αποδεκτό εάν ο συντελεστής Boltzmann, $\exp -\beta[E(i + 1) - E(i)]$, είναι μεγαλύτερος από έναν τυχαίο αριθμό μεταξύ 0 και 1, διαφορετικά απορρίπτεται. Το κριτήριο Metropolis [17], το οποίο δημιουργεί ένα σύνολο με κατανομή Boltzmann, συνοπτικά αναφέρεται ως:

$$P = \min(1, \exp -\beta[E(i + 1) - E(i)]) \quad (2.32)$$

όπου P είναι η πιθανότητα να είναι αποδεκτό ένα βήμα και το β ισούται με $\beta = 1/k_B T$.

Οι μέθοδοι Monte Carlo είναι λιγότερο υπολογιστικές δαπανηρές από τις μεθόδους μοριακής δυναμικής, δεδομένης της ίδιας συνάρτησης δυναμικής ενέργειας για ένα συγκεκριμένο σύστημα, δεδομένου ότι οι δυνάμεις δεν χρειάζεται να υπολογισθούν. Ο μεγάλος αριθμός διαστάσεων του χώρου φάσεων των βιομορίων, ωστόσο, καθιστά δύσκολη την εφαρμογή των μεθόδων Monte Carlo στην προσομοίωση βιολογικών συστημάτων, καθώς η δημιουργία νέων διαμορφώσεων με ένα επαρκώς υψηλό ποσοστό αποδοχής και το μέσο μέγεθος βήματος είναι κάτι το μη τετριμμένο. Παρ' όλα αυτά, οι προσομοιώσεις Monte Carlo έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμες για συστήματα με λιγότερους βαθμούς ελευθερίας.

2.3.2 Μοριακή Δυναμική

Η διαδικασία προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής, σε αντίθεση με τις Monte Carlo προσομοιώσεις, μπορεί να παραλληλισθεί με τη διαδικασία ενός πειράματος. Όπως στα πειράματα, προετοιμάζεται το δείγμα προς εξέταση, και τέλος συνδέεται με κάποιο όργανο (π.χ. θερμόμετρο, μανόμετρο, μετρητή ιξώδους), κατόπιν γίνονται οι απαραίτητες μετρήσεις των μεγεθών ενδιαφέροντος ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Εάν οι προηγούμενες μετρήσεις υπόκεινται σε στατιστικό θόρυβο, όσες περισσότερες μετρήσεις πραγματοποιηθούν και υπολογισθεί ο μέσος όρος τους τόσο πιο ακριβής γίνεται η μέτρηση. Έτσι, στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής επιλέγεται το σύστημα προς μελέτη το οποίο αποτελείται από N σωματίδια και λύνονται οι εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα για το σύστημα έως ότου οι ιδιότητες του συστήματος δεν αλλάζουν στο χρόνο (προσομοίωση επίτευξης σημείου ισορροπίας). Κατόπιν, γίνεται η πραγματική μέτρηση του συστήματος μέσω μίας νέας προσομοίωσης (προσομοίωση εξαγωγής αποτελεσμάτων). Όπως και στα πειράματα, τα λάθη τα οποία μπορεί να γίνουν στις μετρήσεις είναι κοινά με εκείνα που είναι πιθανόν να γίνουν και στις προσομοιώσεις. Επί παραδείγματι το δείγμα μπορεί να μην είναι σωστά προετοιμασμένο, οι μετρήσεις να είναι πολύ λίγες ή το σύστημα να υποβληθεί σε μία μη αντιστρεπτή διαδικασία [18].

Κατά τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής επιλύονται οι εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα για ένα σύστημα N ατόμων ή σωματιδίων τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η συνολική δύναμη που ασκείται στο κάθε σωματίδιο i είναι ίση με την αρνητική παράγωγο του δυναμικού $\mathcal{V}(r)$:

$$\vec{F}_i = -\frac{\partial \mathcal{V}}{\partial \vec{r}_i} = -\nabla_{r_i} \mathcal{V} \quad (2.33)$$

και οι εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα μπορούν να γραφούν ως εξής:

$$\vec{F}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i(t)}{\partial t^2}, \quad i = 1 \dots N \quad (2.34)$$

όπου F_i η συνολική δύναμη που ασκείται σε σωματίδιο i , με r_i το διάνυσμα θέσης $r_i(t) = x_i(t), y_i(t), z_i(t)$ και μάζα m_i .

Οι εξισώσεις λύνονται ταυτόχρονα σε μικρά χρονικά βήματα. Το σύστημα παρακολουθείται για κάποιο χρονικό διάστημα, φροντίζοντας ώστε η θερμοκρασία και η πίεση να παραμένουν στις απαιτούμενες τιμές και οι νέες συντεταγμένες που υπολογίζονται κάθε φορά καταγράφονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Οι συντεταγμένες ως συνάρτηση του χρόνου αντιπροσωπεύουν μια τροχιά του συστήματος. Μετά τις αρχικές αλλαγές, το σύστημα θα φτάσει συνήθως σε μία κατάσταση ισορροπίας. Κατόπιν αυτού, συνεχίζεται η παρακολούθηση του συστήματος για ικανό χρονικό διάστημα, ώστε να υπολογιστούν από τον μέσο όρο όλων των χρονικών βημάτων που έχουν παρέλθει οι μακροσκοπικές ιδιότητες που μας ενδιαφέρουν.

Στον φυσικό κόσμο των συστημάτων πολλών σωμάτων, οι δυνάμεις (εξ. 2.33) εξαρτώνται από τη θέση του σωματιδίου, η οποία αλλάζει κάθε φορά που το σωματίδιο κινείται ή αλληλεπιδρά. Αυτό απαιτεί μια συνεχή ακολουθία καταστάσεων οι οποίες ενημερώνονται με την πάροδο του χρόνου, π.χ. από την τρέχουσα κατάσταση του ατόμου ($r(t), v(t)$) στην επόμενη κατάσταση ($r(t + \delta t), v(t + \delta t)$). Ο πιο απλός τρόπος για να υπολογισθούν αυτές οι θέσεις και οι ταχύτητες είναι χρησιμοποιώντας τη μέθοδο πεπερασμένων διαφορών, η οποία υποθέτει ότι οι θέσεις και οι δυναμικές ιδιότητες του ατόμου μπορούν να προσεγγιστούν ως ανάπτυγμα σειράς Taylor:

$$\vec{r}^{new}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\delta t^2 \quad (2.35)$$

$$\vec{v}^{new}(t + \delta t) = \vec{v}(t) + \vec{a}(t)\delta t \quad (2.36)$$

$$\vec{a}^{new}(t + \delta t) = \vec{a}t \quad (2.37)$$

Οι παραπάνω εξισώσεις, μετά από κάποια χρονικά βήματα, δεν θα υπολογίζουν σωστά τις τροχιές, διότι δεν είναι πλήρως συνεπείς με τις εξισώσεις κίνησης. Το παραπάνω διορθώνεται με τον υπολογισμό της δύναμης \vec{F} από τις θέσεις \vec{r}^{new} στο χρόνο $t + \delta t$, κι έπειτα τον υπολογισμό της επιτάχυνσης διορθωμένης, \vec{a}^{cor} (εξισώσεις κίνησης). Η τιμή αυτή συγκρίνεται με την υπολογιζόμενη από την εξίσωση 2.37.

$$\Delta\vec{a}(t + \delta t) = \vec{a}^{cor}(t + \delta t) - \vec{a}^{new}(t + \delta t) \quad (2.38)$$

Η παραπάνω τιμή υπολογισμού του λάθους χρησιμοποιείται για τη διόρθωση θέσεων, ταχυτήτων και επιταχύνσεων.

$$\vec{r}^{cor}(t + \delta t) = \vec{r}^{new} + c_0\Delta\vec{a}(t + \delta t) \quad (2.39)$$

$$\vec{v}^{cor}(t + \delta t) = \vec{v}^{new} + c_1\Delta\vec{a}(t + \delta t) \quad (2.40)$$

THE GLOBAL MD ALGORITHM

1. Input initial conditions

Potential interaction V as a function of atom positions

Positions \mathbf{r} of all atoms in the system

Velocities \mathbf{v} of all atoms in the system

↓

repeat 2,3,4 for the required number of steps:

2. Compute forces

The force on any atom

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i}$$

is computed by calculating the force between non-bonded atom pairs:

$$\mathbf{F}_i = \sum_j \mathbf{F}_{ij}$$

plus the forces due to bonded interactions (which may depend on 1, 2, 3, or 4 atoms), plus restraining and/or external forces.

The potential and kinetic energies and the pressure tensor may be computed.

↓

3. Update configuration

The movement of the atoms is simulated by numerically solving Newton's equations of motion

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

or

$$\frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \mathbf{v}_i; \quad \frac{d\mathbf{v}_i}{dt} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}$$

↓

4. if required: Output step

write positions, velocities, energies, temperature, pressure, etc.

Σχήμα 2.6 Γενικό αλγοριθμικό διάγραμμα ροής μοριακής προσομοίωσης [15]

$$\vec{a}^{cor}(t + \delta t) = \vec{a}^{new} + c_2 \Delta \vec{a}(t + \delta t) \quad (2.41)$$

Ο τρόπος επιλογής των τιμών c_0 , c_1 , c_2 , δίνεται από τον Gear [1966, 1971].

Υπάρχουν αρκετοί αλγόριθμοι για τον υπολογισμό των εξισώσεων κίνησης που ακολουθούν την επίλυση μίας σειράς Taylor. Ένας από τους απλούστερους αλγορίθμους για την επίλυση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα είναι ο αλγόριθμος Verlet. Αυτός ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί τις θέσεις και τις επιταχύνσεις στο χρόνο t και τις θέσεις από το προηγούμενο βήμα, $\vec{r}(t - \delta t)$, για να υπολογίσει τις νέες θέσεις στον χρόνο $(t + \delta t)$, $\vec{r}(t + \delta t)$.

Θεωρητικό Μέρος

Έτσι οι εξισώσεις υπολογισμού των θέσεων είναι:

$$\begin{aligned}\vec{r}(t + \delta t) &= \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\delta t^2 \\ \vec{r}(t - \delta t) &= \vec{r}(t) - \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\delta t^2\end{aligned}\tag{2.42}$$

οπότε σύμφωνα με τον αλγόριθμο Verlet $r(t + \delta t) = r(t + \delta t) - r(t - \delta t)$ δηλαδή:

$$\vec{r}(t + \delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \delta t) + \vec{a}(t)\delta t^2\tag{2.43}$$

Για τον υπολογισμό των ταχυτήτων αρκεί να διαιρέσουμε τη διαφορά μεταξύ των θέσεων $t + \delta t$ και $t - \delta t$ με $2\delta t$:

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t + \delta t) - \vec{r}(t - \delta t)}{2\delta t}\tag{2.44}$$

Συνοψίζοντας στον αλγόριθμο Verlet με δεδομένα $\vec{r}(t - \delta t)$ και $\vec{r}(t)$:

1. Η επιτάχυνση $\vec{a}(t)$ υπολογίζεται ως συνάρτηση του $\vec{r}(t)$
2. Οι νέες θέσεις δίνονται από $\vec{r}(t + \delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \delta t) + \vec{a}(t)\delta t^2$
3. και η ταχύτητα $\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t + \delta t) - \vec{r}(t - \delta t)}{2\delta t}$

Η ταχύτητα για χρόνο t δεν μπορεί να υπολογισθεί έως ότου υπολογισθούν οι θέσεις για $t + \delta t$, οπότε οι ταχύτητες πρέπει να εκτιμηθούν, πράγμα που δείχνει ότι η μέθοδος δεν αρχίζει αυτόματα. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός, υπάρχουν διάφορες

παραλλαγές και αλγόριθμοι που έχουν βελτιώσει τη μέθοδο Verlet. Μία από αυτές τις παραλλαγές είναι ο αλγόριθμος leap-frog ο οποίος και χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη εργασία. Σύμφωνα με αυτόν:

$$\vec{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) = \vec{v}(t - \frac{1}{2}\delta t) + \vec{a}(t)\delta t \quad (2.45)$$

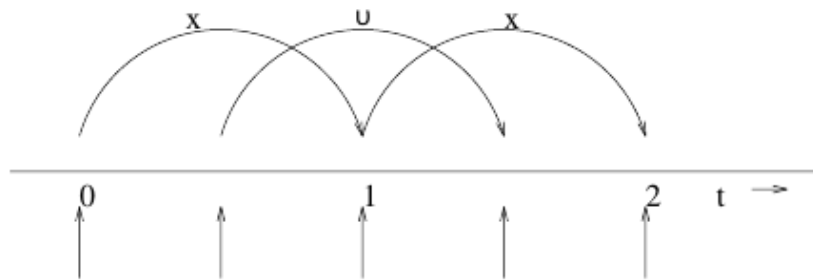
$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t + \frac{1}{2}\delta t)\delta t \quad (2.46)$$

Με γνώση των θέσεων, των ταχυτήτων και των επιταχύνσεων για κάθε χρονικό βήμα, μπορούν να υπολογιστούν βασικά μεγέθη του συστήματος, όπως η δυναμική ενέργεια, η κινητική ενέργεια και η πίεση.

Τα μεγέθη τα οποία αποθηκεύονται για κάθε βήμα είναι οι τρέχουσες θέσεις $\vec{r}(t)$ και οι επιταχύνσεις $\vec{a}(t)$ μαζί με τις ταχύτητες στο μισό βήματα $\vec{v}(t - \frac{1}{2}\delta t)$. Η εξίσωση ταχύτητας (2.45) εφαρμόζεται πρώτα και οι ταχύτητες κάνουν έτσι ένα άλμα πάνω από τις συντεταγμένες όπως φαίνεται στο σχήμα 2.7 για να δώσουν τις τιμές στο επόμενο μισό του βήματος $\vec{v}(t + \frac{1}{2}\delta t)$. Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος, μπορούν να υπολογιστούν οι ταχύτητες από :

$$\vec{v}(t) = \frac{1}{2} \left[\vec{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) + \vec{v}(t - \frac{1}{2}\delta t) \right] \quad (2.47)$$

Η παραπάνω εξίσωση είναι απαραίτητη για να μπορεί να υπολογισθεί η ενέργεια σε χρόνο t καθώς και για υπολογισθεί οποιοδήποτε άλλο μέγεθος προϋποθέτει τη γνώση θέσεων και ταχυτήτων την ίδια στιγμή. Κατόπιν, με τη χρήση της εξίσωσης 2.46 οι θέσεις



Σχήμα 2.7 Σχηματική αναπαράσταση του αλγόριθμου Leap-Frog. Ο αλγόριθμος ονομάζεται έτσι λόγω ότι το \vec{r} (εν προκειμένω το x) και το \vec{v} πηδάνε το ένα πάνω από τη πλάτη του άλλου σαν βάτραχοι [15].

που υπολογίζονται υπερπηδούν για ακόμη μία φορά τις ταχύτητες και ύστερα υπολογίζονται οι νέες επιταχύνσεις για το επόμενο βήμα.

Συνοψίζοντας στον αλγόριθμο leap-frog με δεδομένα $\vec{r}(t - \delta t)$ και $\vec{r}(t)$:

1. Η επιτάχυνση $\vec{a}(t)$ υπολογίζεται ως συνάρτηση του $\vec{r}(t)$
2. Υπολογίζονται οι ταχύτητες για το μισό του βήματος $\vec{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) = \vec{v}(t - \frac{1}{2}\delta t) + \vec{a}(t)\delta t$
3. Οι θέσεις για το επόμενο βήμα δίνονται από $\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t + \frac{1}{2}\delta t)\delta t$
4. και η ταχύτητα για το συγκεκριμένο βήμα $\vec{v}(t) = \frac{1}{2} \left[\vec{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) + \vec{v}(t - \frac{1}{2}\delta t) \right]$

2.3.3 Υπολογισμός Μεγεθών

Όπως προαναφέρθηκε, η γνώση θέσεων, ταχυτήτων κι επιταχύνσεων σε κάθε χρονικό βήμα, επιτρέπει τον υπολογισμό της **δυναμικής ενέργειας**, της **κινητικής ενέργειας** και της **πίεσης**. Με τη γνώση των μεγεθών αυτών, παίρνουμε και πληροφορία για την συνολική ενέργεια του συστήματος, την θερμοκρασία, τον όγκο και όλα τα υπόλοιπα

2.3 Μοριακή Προσομοίωση

θερμοδυναμικά μεγέθη. Η μέση τιμή των τιμών σε κάθε χρονικό βήμα αντιστοιχεί στον υπολογισμό της τιμής της αντίστοιχης μακροσκοπικής ιδιότητας [11, 15, 19].

Όταν υπολογίζονται οι δυνάμεις, υπολογίζεται επίσης και η δυναμική ενέργεια για κάθε όρο αλληλεπίδρασης. Για τη συνολική δυναμική ενέργεια αθροίζονται διάφορες αλληλεπιδράσεις, όπως οι Lennard-Jones, οι Coulomb, και οι δεσμικές αλληλεπιδράσεις. [11, 15, 19]

Η κινητική ενέργεια υπολογίζεται από τις ταχύτητες v_i των N σωματιδίων:

$$K = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \quad (2.48)$$

Με γνωστή την κινητική ενέργεια του συστήματος μπορεί να υπολογιστεί άμεσα η θερμοκρασία συστήματος:

$$K = \frac{n_{df}}{2} k_B T \quad (2.49)$$

όπου N_{df} ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας του συστήματος και k_B η σταθερά Boltzmann [11, 15, 19].

Ο τανυστής της πίεσης \mathbf{P} ορίζεται ως η διαφορά της κινητικής ενέργεια K και του συντελεστή Virial, Ξ , δηλαδή:

$$\mathbf{P} = \frac{2}{V} (K - \Xi) \quad (2.50)$$

Θεωρητικό Μέρος

όπου V είναι ο όγκος του κουτιού προσομοίωσης. Το μέτρο της πίεσης P υπολογίζεται μέσω του ίχνους το τανυστή της πίεσης ως:

$$P = \frac{\text{tr}(\mathbf{P})}{3} \quad (2.51)$$

και ο τανυστής του συντελεστή *Virial* ορίζεται ως:

$$\Xi = -\frac{1}{2} \sum_{i < j} \vec{r}_{ij} \otimes \vec{F}_{ij} \quad (2.52)$$

όπου \vec{r}_{ij} είναι η απόσταση του σωματιδίου i από το σωματίδιο j και αντιστοίχως και η δύναμη \vec{F}_{ij} [11, 15, 19].

2.3.4 Δυναμικά αλληλεπίδρασης

Στις μεθόδους μοριακής δυναμικής, η δυναμική ενέργεια αλληλεπίδρασης \mathcal{V} μεταξύ των σωματιδίων καθορίζεται από το δυναμικό αλληλεπίδρασης στο οποίο περιγράφονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων μέσω συναρτήσεων και παραμέτρων. Το \mathcal{V} αποτελείται από όρους που χαρακτηρίζουν τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος. Οι συναρτήσεις αυτές αντισταθμίζουν την ακρίβεια στην περιγραφή των δυνάμεων που ασκούνται στα άτομα με το χαμηλό υπολογιστικό κόστος ή την ευκολία παραμετροποίησης για διαφορετικά άτομα. Σε ένα δυναμικό αλληλεπιδράσεων ορίζονται έτσι όροι τόσο για τις δεσμικές όσο και για τις μη-δεσμικές αλληλεπιδράσεις. Οι όροι για τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν όρους για την έκταση, την κάμψη και την στρέψη των δεσμών, ενώ για τις μη δεσμικές περιλαμβάνουν όρους για τις Van der Waals

2.3 Μοριακή Προσομοίωση

(vdW) και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η πιο απλή περιγραφή της δυναμικής ενέργειας σε μία προσομοίωση μοριακής δυναμικής έχει την ακόλουθη μορφή [11, 19, 15]:

$$\mathcal{V} = \mathcal{V}_{non-bonded} + \mathcal{V}_{intramolecular} \quad (2.53)$$

όπου \mathcal{V} η συνολική δυναμική ενέργεια, $\mathcal{V}_{non-bonded}$ η δυναμική ενέργεια λόγω των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων και $\mathcal{V}_{intramolecular}$ η δυναμική ενέργεια λόγω των δεσμικών αλληλεπιδράσεων. Ειδικότερα ο όρος των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων, που περιγράφει αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων διαφορετικών μορίων ή ατόμων στο ίδιο μόριο που απέχουν παραπάνω από 4 δεσμούς μεταξύ τους, μπορεί να γραφεί ως εξής [11, 19, 15]:

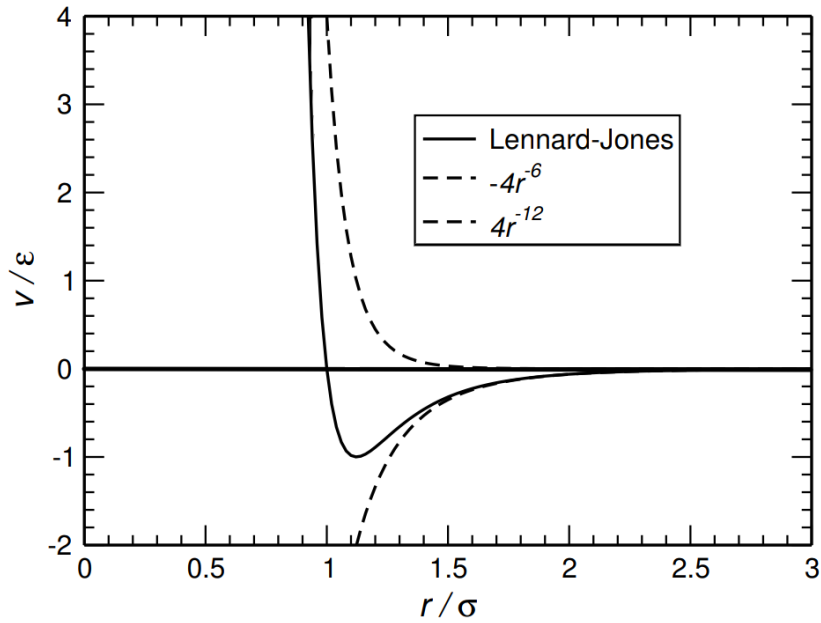
$$\mathcal{V}_{non-bonded} = \mathcal{V}_{LJ}(r) + \mathcal{V}_{Coulomb}(r) \quad (2.54)$$

όπου \mathcal{V}_{LJ} το δυναμικό *Lennard-Jones* και \mathcal{V}_C ο όρος *Coulomb* των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και έχουν τη μορφή:

$$\mathcal{V}_{L,J}(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2.55)$$

$$\mathcal{V}_C(r) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_i Q_j}{r} \quad (2.56)$$

όπου για το $\mathcal{V}_{L,J}(r)$ ϵ και σ εξαρτώνται από το εκάστοτε σύστημα και καθορίζονται από το πεδίο δυνάμεων και για το $\mathcal{V}_C(r)$, Q_i, Q_j είναι τα φορτία των σωματιδίων i και j και ϵ_0 η διηλεκτρική σταθερά του κενού. Τα συγκεκριμένα δυναμικά είναι τα πιο ευρέως διαδεδομένα και χρησιμοποιούνται και στη συγκεκριμένη εργασία.



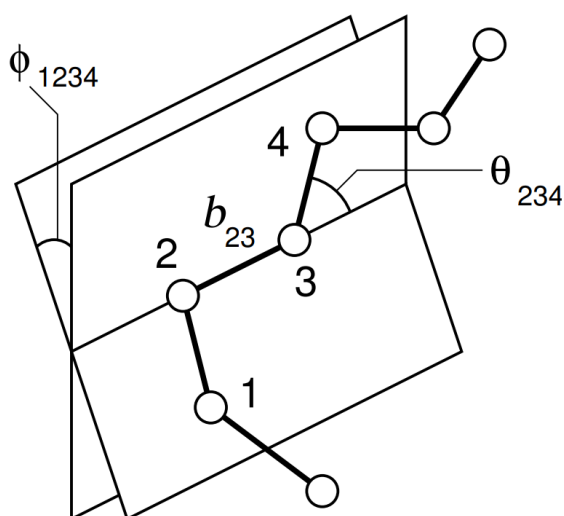
Σχήμα 2.8 Διάγραμμα δυναμικού Lennard-Jones με αναπράστασει των συνεισφορών των όρων r^{-12} και r^{-6} [11].

Για τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις $\mathcal{V}_{intramolecular}$ ο όρος γράφεται αναλυτικότερα ως:

$$\mathcal{V}_{intramolecular} = \mathcal{V}_b + \mathcal{V}_\theta + \mathcal{V}_\phi + \mathcal{V}_\xi \quad (2.57)$$

όπου \mathcal{V}_b το δυναμικό έκτασης του δεσμού, \mathcal{V}_θ , το δυναμικό έκτασης του δεσμού το δυναμικό κάμψης του δεσμού και \mathcal{V}_ϕ και \mathcal{V}_ξ τα δυναμικά στρέψης των διεδρων γωνιών και των μη-κανονικών διεδρων γωνιών αντίστοιχα. Για την περιγραφή των δυναμικών αυτών στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιούνται [11, 19, 15]:

- για την έκταση δεσμών ένα αρμονικό δυναμικό: $\mathcal{V}_b = \frac{1}{2}K_b(b - b_0)^2$
- για την κάμψη δεσμών ένα δυναμικό *Urey-Brandley*: $\mathcal{V}_\theta = \frac{1}{2}K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2}K_s(s - s_0)^2$



Σχήμα 2.9 Σχηματική αναπαράσταση μίας αλυσίδας ενός μορίου, όπου απεικονίζει τον ορισμό της διατομομικής απόστασης b_{23} , της γωνίας κάμψης θ_{234} και της γωνίας στρέψης ϕ_{1234} [15].

- για τη στρέψη των διεδρων γωνιών ένα
περιοδικό δυναμικό: $\mathcal{V}_\phi = K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)]$
- και για τη στρέψη των μη-κανονικών διεδρων γωνιών ένα
αρμονικό δυναμικό: $\mathcal{V}_\xi = \frac{1}{2} K_\xi (\xi - \xi_0)^2$

Για τα παραπάνω περισσότερες πληροφορίες μπορεί να δώσει το σχήμα 2.9 όπου φαίνεται πώς ορίζονται η διατομική απόσταση b της έκτασης του δεσμού και οι γωνίες θ και ϕ . Οι παραπάνω εξισώσεις χρησιμοποιούνται από το δυναμικό CHARMM του οποίου έγινε χρήση στη συγκεκριμένη εργασία.

Τα δυναμικά αλληλεπίδρασης τα παλαιότερα χρόνια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες στα δυναμικά εκπεφρασμένων ατόμων (*explicit* ή *all-atom* δυναμικά) και στα δυναμικά ενοποιημένων ατόμων (*united atom* δυναμικά). Στα πρώτα το κάθε άτομο του μορίου περιγράφεται με λεπτομέρεια, ενώ στα δεύτερα τα μη πολικά άτομα υδρογόνου για τις ορ-

γαικές ενώσεις ενοποιούνται σε ένα σωματίδιο με τον άνθρακα με τον οποίο έχουν δεσμό. Ο λόγος της δημιουργίας αυτής της κατηγορίας των δυναμικών είναι η ανάγκη που παρουσιάστηκε για προσομοίωση πολυπλοκότερων μορίων με μικρότερο υπολογιστικό κόστος. Τα τελευταία χρόνια έχει εμφανιστεί ένας νέος τρόπος περιγραφής των ατόμων με τα δυναμικά «αδρών-κόκων» (*coarse-grained*) ο οποίος ομαδοποιεί τέσσερα μεγάλα άτομα σε μία «χάντρα» (*bead*) στην οποία αποδίδονται όλες οι ιδιότητες της ομάδας των τεσσάρων ατόμων. Αυτή η ομαδοποίηση ονομάζεται *coarse-graining* και συνήθως χρησιμοποιείται για τη μελέτη μεγάλων βιομορίων όπου η μελέτη τους με τεχνικές *all-atom* ή ακόμα και *united-atom* ήταν πολύ χρονοβόρα και τα παραγόμενα αποτελέσματα ήταν της τάξης των *picosecond* και για συστήματα λίγων μορίων. Με τα *coarse-grained* μοντέλα έχουμε τη δυνατότητα να μελετήσουμε μεγάλα συστήματα και να παρατηρήσουμε διεργασίες όπως ο σχηματισμός λιπιδιακής διπλοστοιβάδας, η αναδίπλωση πρωτεϊνών, η δέσμευση πεπτιδίων σε μεμβράνες κ.α. [11, 19, 15]

2.3.5 Θερμοστάτης

Για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αρχικά γίνεται η επιλογή του στατιστικού συνόλου, στο οποίο θα πραγματοποιηθούν οι προσομοιώσεις. Έτσι, σύμφωνα με τη στατιστική μηχανική, μπορούν να εξαχθούν τα μακροσκοπικά μεγέθη. Από τα τέσσερα στατιστικά σύνολα εκτός του μικροκανονικού (N, V, E) τα υπόλοιπα τρία έχουν ως περιορισμό τη σταθερή θερμοκρασία. Έτσι, στο σύστημα που προσομοιώνεται πρέπει να καταστεί εφικτό να διατηρηθεί η θερμοκρασία σε μία επιθυμητή τιμή. Η διαδικασία με την οποία γίνεται αυτό ονομάζεται θερμοστάτιση.

Στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής οι πιο συνηθισμένοι θερμοστάτες είναι οι *Berendsen*, *Velocity Rescaling* και *Nosé-Hoover*. Οι διαφορές των συγκεκριμένων αλγορίθμων έγκει-

2.3 Μοριακή Προσομοίωση

νται στον τρόπο με τον οποίο προσαρμόζουν τη θερμοκρασία του συστήματος στην επιθυμητή τιμή. Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται χρήση του θερμοστάτη *Berendsen*.

Σύμφωνα με τη μέθοδο θερμοστάτισης *Berendsen*, το σύστημα είναι συνδεδεμένο με εξωτερικό «λουτρό» θερμότητας, με θερμοκρασία T_0 , και ανά τακτά χρονικά διαστήματα η θερμοκρασία T του συστήματος διορθώνεται ώστε να αντικατοπτρίζει την επιθυμητή. Η διόρθωση αυτή γίνεται μέσω [15]:

$$\frac{dT}{dT} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (2.58)$$

και μέσω προσαρμογής της κινητικής ενέργειας του συστήματος σε κάθε χρονικό βήμα μέσω της εξίσωσης [15]:

$$\Delta K = (\lambda - 1)^2 K \quad (2.59)$$

όπου K η κινητική ενέργεια του συστήματος και λ ένας χρονικά εξαρτώμενος παράγοντας που ισούται [15]:

$$\lambda = \left[1 + \frac{n_{TC}\Delta t}{\tau_T} \left\{ \frac{T_0}{T(t - \frac{1}{2}\Delta t)} - 1 \right\} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.60)$$

Στην παραπάνω εξίσωση το n_{TC} είναι ο αριθμός των βημάτων ανάμεσα σε κάθε διαδικασία θερμοστάτισης, T_0 η θερμοκρασία του εξωτερικού λουτρού, τ μια χρονική σταθερά που επιλέγεται στην αρχή της προσομοίωσης και η παράμετρος τ_T έχει σχέση με τη παράμετρο τ μέσω της εξίσωσης $\tau = 2C_V\tau_T/N_{df}k_B$, για την οποία C_V η θερμοχωρητι-

κότητα του συστήματος, N_{df} οι βαθμοί ελευθερίας του συστήματος και k_B η σταθερά Boltzmann [15].

2.3.6 Βαροστάτης

Παραπάνω έγινε αναφορά στον τρόπο με τον οποίο γίνεται η θερμοστάτιση ενός συστήματος, αλλά για τη συγκεκριμένη εργασία στην οποία χρησιμοποιείται το ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο (N, p, T) είναι απαραίτητο να υπάρχει μια παρόμοια διαδικασία με την προηγούμενη ώστε η πίεση του συστήματος να είναι σταθερή. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται βαροστάτιση. Οι πιο γνωστοί βαροστάτες στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής είναι οι *Berendsenn*, *Surface Tension* και *Parinello-Rahman*.

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση του βαροστάτη *Berendsen*. Στη μέθοδο βαροστάτισης *Berendsen* [20], το σύστημα είναι ασθενώς συνδεδεμένο με ένα εξωτερικό λουτρό χρησιμοποιώντας την αρχή της ελάχιστης τοπικής διαταραχής. Ένας επιπλέον όρος προστίθεται στις εξισώσεις κίνησης που επηρεάζει τη μεταβολή της πίεσης.

$$\left(\frac{dp}{dt}\right)_{bath} = \frac{p_0 - p}{\tau_p} \quad (2.61)$$

όπου τ_p είναι η σταθερά χρόνου για τη σύζευξη. Μια απλή αναλογική κλιμάκωση των συντεταγμένων, ταυτόχρονα με την κλιμάκωση του όγκου, ελαχιστοποιεί τις τοπικές διαταραχές. Ένας επιπλέον όρος προστίθεται στις εξισώσεις κίνησης:

$$\dot{x} = v + ax \quad (2.62)$$

2.4 Προχωρημένες Τεχνικές Μοριακής Δυναμικής

ενώ ο όγκος αλλάζει ανάλογα:

$$\dot{V} = 3aV \quad (2.63)$$

Η μεταβολή της πίεσης είναι συνδεδεμένη με τον ισόθερμο συντελεστή συμπίεσ-
τητας β :

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{1}{\beta V} \frac{dV}{dt} = -\frac{3a}{\beta} \quad (2.64)$$

Σύμφωνα με την εξ. 2.61 το a ισούται με:

$$a = -\frac{\beta(p_0 - p)}{3\tau_p} \quad (2.65)$$

και η τροποποιημένη εξίσωση κίνησης είναι:

$$\dot{x} = v - \frac{\beta(p_0 - p)}{3\tau_p} x \quad (2.66)$$

2.4 Προχωρημένες Τεχνικές Μοριακής Δυναμικής

2.4.1 Δειγματοληψία Κάλυψης - Umbrella Sampling [21]

Η μέθοδος της δειγματοληψίας κάλυψης (Umbrella Sampling) αναπτύχθηκε από τους Torrie και Valleau το 1974 [22] και 1977 [23]. Κατά τη μέθοδο αυτή μια εξωτερική δύναμη

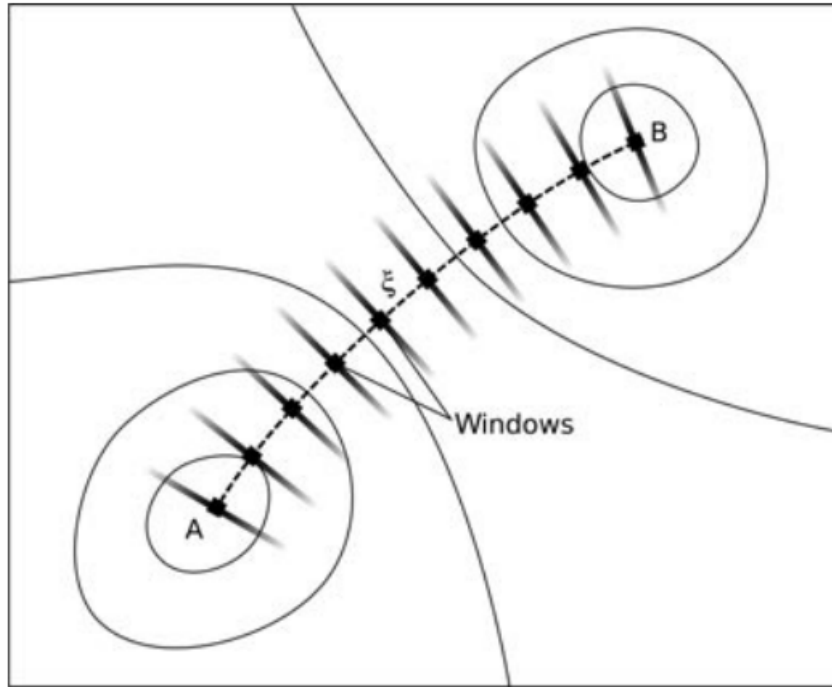
Θεωρητικό Μέρος

επιβάλλεται στο σύστημα, έτσι ώστε να εξασφαλισθεί επαρκής δειγματοληψία καθ' όλη τη διαδρομή (whole reaction coordinate).

Στη μοριακή δυναμική η μελέτη ενός συστήματος προϋποθέτει τη δειγματοληπτικά επαρκή εξερεύνηση του χώρου φάσεων Γ και κατόπιν τη σύνδεση αυτής της τροχιάς που δημιουργείται με τη δυναμική ενεργειακή επιφάνεια του συστήματος. Μέσω της διαδικασίας της προσομοίωσης τα συστήματα καταλήγουν σε μία κατάσταση ελάχιστης ενέργειας από την οποία εξάγονται τα προς μελέτη μεγέθη που μας ενδιαφέρουν.

Πολλές φορές είναι αναγκαία η μελέτη συστημάτων σε κατάσταση εκτός της θερμοδυναμικής ισορροπίας. Συνεπώς για να έχουμε όσο γίνεται καλύτερο δείγμα πρέπει το σύστημα να "περάσει" από περιοχές της ενεργειακής επιφάνειας στις οποίες πολύ δύσκολα θα βρεθεί ένα σύστημα σε θερμοδυναμική ισορροπία και εδώ είναι που συνεισφέρει η συγκεκριμένη μεθοδολογία (Umbrella Sampling). Έτσι μέσω μιας εξωτερικά επιβεβλημένης δύναμης δημιουργούνται «παράθυρα» κατά μήκος της τροχιάς, οι κατανομές των οποίων αλληλεπικαλύπτονται. Η επίδραση αυτή της εξωτερικής δύναμης (λεγόμενη και bias) στη σύνδεση δύο διαφορετικών θερμοδυναμικών καταστάσεων στην υπερεπιφάνεια ενέργειας έδωσε το όνομά της στη συγκεκριμένη μεθοδολογία. Η επίδραση αυτής της εξωτερικής δύναμης που επιβάλλεται δημιουργεί μία τροχιά ξ μεταξύ δύο διαφορετικών θερμοδυναμικών καταστάσεων A και B όπου κατά μήκος της υπολογίζεται το Δυναμικό Μέσης Δύναμης (Potential Mean Force, PMF). Στη περίπτωση της συγκεκριμένης εργασίας αυτές οι δύο θερμοδυναμικές καταστάσεις είναι η αρχική θέση της ιμπροφένης εκτός της διπλοστοιβάδας (A) και κατόπιν της διείσδυση της μέσα στη διπλοστοιβάδα η θέση της στο κέντρο της (B).

Κατά τη συγκεκριμένη μεθοδολογία επιβάλλεται μια εξωτερική δύναμη και η τροχιά που δημιουργείται χωρίζεται σε παράθυρα όπως στο σχήμα 2.10 στα οποία γίνονται προ-



Σχήμα 2.10 Δημιουργία "παράθυρων" κατά μήκος της τροχιάς ξ μεταξύ δύο θερμοδυναμικών καταστάσεων στη μεθοδολογία Umbrella Sampling [21]

σομοιώσεις στο καθένα ξεχωριστά με την επιβολή εξωτερικής δύναμης ώστε το μόριο να μένει σταθερό στη θέση του σε κάθε παράθυρο i . Κατόπιν, με τη χρήση μαθηματικών εργαλείων, υπολογίζεται το PMF του υπό μελέτη συστήματος κατά μήκος της τροχιάς έχοντας απαλλαχθεί από την εξωτερική δύναμη.

Το δυναμικό της εξωτερικά επιβεβλημένης δύναμης (δυναμικό εξαναγκασμένης τροχιάς, bias) ω_i για κάθε παράθυρο i είναι ένας επιπλέον όρος στην εξίσωση ενέργειας του συστήματος ο οποίος εξαρτάται μόνο από τη τροχιά ξ μεταξύ των δύο σημείων στην υπερεπιφάνεια της ενέργειας. Έτσι, η σχέση για την ενέργεια του συστήματος σε κάθε παράθυρο i γίνεται:

$$\mathcal{V}_i^b(\vec{q}) = \mathcal{V}_i^U(\vec{q}) + \omega_i(\xi) \quad (2.67)$$

Θεωρητικό Μέρος

όπου ω_i το δυναμικό εξαναγκασμένης τροχιάς για το παράθυρο i , ο εκθέτης b υποδηλώνει μεγέθη τα οποία εμπεριέχουν το δυναμικό εξαναγκασμένης τροχιάς, ενώ ο εκθέτης u , υποδηλώνει μεγέθη χωρίς το δυναμικό εξαναγκασμένης τροχιάς.

Για να υπολογίσουμε το δυναμικό μέσης δύναμης (Potential Mean Force) οι συναρτήσεις μερισμού γίνονται:

$$P_i^u(\xi) = \frac{Q(\xi)}{Q_{ens}} = \frac{\int \exp[-\beta\mathcal{V}'(\vec{q})] \delta[\xi'(\vec{q}) - \xi] d^N \vec{q}}{\int \exp[-\beta\mathcal{V}'(\vec{q})] d^N \vec{q}} \quad (2.68)$$

$$P_i^b(\xi) = \frac{\int \exp\{-\beta[\mathcal{V}'(\vec{q}) + \omega_i(\xi'(\vec{q}))]\} \delta[\xi'(\vec{q}) - \xi] d^N \vec{q}}{\int \exp\{-\beta[\mathcal{V}'(\vec{q}) + \omega_i(\xi'(\vec{q}))]\} d^N \vec{q}} \quad (2.69)$$

όπου το β είναι σταθερά και είναι ίση με $1/(K_B T)$. Επειδή το δυναμικό εξαναγκασμένης τροχιάς εξαρτάται μόνο από το ξ και η ολοκλήρωση στον αριθμητή γίνεται σε όλους τους βαθμούς ελευθερίας εκτός του ξ , έχουμε:

$$P_i^b(\xi) = \exp[-\beta\omega_i(\xi)] \frac{\int \exp[-\beta\mathcal{V}'(\vec{q})] \delta[\xi'(\vec{q}) - \xi] d^N \vec{q}}{\int \exp\{-\beta[\mathcal{V}'(\vec{q}) + \omega_i(\xi'(\vec{q}))]\} d^N \vec{q}} \quad (2.70)$$

οπότε χρησιμοποιώντας την εξίσωση 2.68:

$$P_i^u(\xi) = P_i^b(\xi) \exp[\beta\omega_i(\xi)] \langle \exp[-\beta\omega_i(\xi)] \rangle \quad (2.71)$$

2.4 Προχωρημένες Τεχνικές Μοριακής Δυναμικής

Από την παραπάνω εξίσωση μπορεί να υπολογισθεί το PMF_i , εφόσον η κατανομή πιθανότητας $P_i^b(\xi)$ για το παράθυρο i εξάγεται από την προσομοίωση, το $\omega_i(\xi)$ επιλέγεται στην αρχή της προσομοίωσης και ο όρος F_i είναι ανεξάρτητος του ξ και ισούται με:

$$F_i = -\left(\frac{1}{\beta}\right) \ln \langle \exp [-\beta\omega_i(\xi)] \rangle \quad (2.72)$$

οπότε το δυναμικό μέσης δύναμης PMF_i για το εκάστοτε παράθυρο i ορίζεται ως εξής:

$$PMF_i(\xi) = -\left(\frac{1}{\beta}\right) \ln P_i^b(\xi) - \omega_i(\xi) + F_i \quad (2.73)$$

Ο παραπάνω υπολογισμός του δυναμικού μέσης δύναμης είναι ακριβής και καμία παραδοχή δε γίνεται πέραν από την επαρκή δειγματοληψία κάθε παραθύρου i .

Για να υπολογισθεί το συνολικό $PMF(\xi)$ στη περίπτωση που υπάρχει μόνο ένα παράθυρο κατά μήκος της τροχιάς ξ η εξίσωση 2.73 αρκεί. Στη περίπτωση αυτή το $PMF(\xi)$ ορίζεται ως σταθέρα και μπορούμε να επιλέξουμε το F_i αυθαίρετα. Εάν όμως πρέπει να συνδυαστούν τα $PMF_i(\xi)$ πολλών παραθύρων σε ένα συνολικό $PMF(\xi)$ πρέπει να υπολογισθούν τα F_i . Τα F_i υπολογίζονται από:

$$\begin{aligned} \exp(-\beta F_j) &= \langle \exp [-\beta\omega_j(\xi)] \rangle \\ &= \int P^u(\xi) \exp [-\beta\omega_j(\xi)] d\xi \\ &= \int \exp \{-\beta[PMF_\xi + \omega_j(\xi)]\} d\xi \end{aligned} \quad (2.74)$$

2.4.2 Αρμονικό Δυναμικό Εξαναγκασμένης Τροχιάς - Harmonic Bias Potential [21]

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα κατά τη μεθοδολογία Umbrella Sampling για τη δημιουργία της τροχιάς ξ μεταξύ δύο διαφορετικών θερμοδυναμικών καταστάσεων A και B επιβάλλεται μια εξωτερική δύναμη. Αυτή η δύναμη πρέπει να εισαχθεί στο σύστημα μέσω μιας συνάρτησης δυναμικού. Ιδανικά το δυναμικό αυτό επιλέγεται ώστε όλη η δειγματοληψία κατά μήκος του ξ να είναι ομοιόμορφη. Οπότε το δυναμικό ιδανικά είναι της μορφής $w_{opt} = -PMF(\xi)$. Όμως κάτι τέτοιο είναι πρακτικά αδύνατο γιατί το $PMF(\xi)$ είναι άγνωστο όταν ξεκινούν οι προσομοιώσεις και ο υπολογισμός του στη πράξη είναι ο στόχος της μεθοδολογίας Umbrella Sampling. Συνήθως χρησιμοποιούνται δύο οικογένειες δυναμικών, τα αρμονικά και τα προσαρμόσιμα (adaptive) τα οποία κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης προσαρμόζονται ώστε να ταιριάζουν με το $-PMF(\xi)$. Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται χρήση ενός αρμονικού δυναμικού.

$$\omega_i(\xi) = \frac{K_i}{2} \left(\xi - \xi_i^{ref} \right)^2 \quad (2.75)$$

Η παραπάνω εξίσωση περιγράφει το δυναμικό της δύναμης που επιβάλλεται σε κάθε παράθυρο i όπου ξ_i^{ref} είναι το σημείο αναφοράς και το K είναι σταθερά. Το K πρέπει να επιλεγθεί από την αρχή των προσομοιώσεων και πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο ώστε να οδηγήσει το σύστημα να ξεπεράσει το ενεργειακό φράγμα. Η επιλογή όμως μίας πολύ μεγάλης σταθεράς K θα οδηγήσει σε πολύ στενές κατανομές $P_i^b(\xi)$, κάτι το οποίο όπως θα δούμε παρακάτω, δεν βοηθάει στον υπολογισμό του $PMF(\xi)$ μέσω της μεθόδου σταθμισμένης ανάλυσης ιστογραμμάτων (Weighted Histogram Analysis Method, WHAM)

2.4.3 Μέθοδος Σταθμισμένης Ανάλυσης Ιστογραμμάτων (Weighted Histogram Analysis Method, WHAM)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως σκοπός της διαδικασίας του Umbrella Sampling είναι η εξαγωγή μεγεθών μεταξύ δύο διαφορετικών θερμοδυναμικών καταστάσεων. Συγκεκριμένα μας ενδιαφέρει ο υπολογισμός του συνολικού $PMF(\xi)$ για την τροχιά ξ που δημιουργείται μεταξύ των δύο καταστάσεων. Το $PMF(\xi)$ όπως αναφέρεται παραπάνω υπολογίζεται από την εξίσωση 2.73. Συγκεκριμένα το $P_i^b(\xi)$ υπολογίζεται από τις προσομοιώσεις, το $\omega_i(\xi)$ δίνεται από την εξίσωση 2.75 και το F_i δεν μπορεί να υπολογισθεί εξ' αρχής. Έτσι επιλέγεται αρχικά μία τυχαία τιμή για το F_i και μέσω επαναληπτικής επίλυσης της εξισώσεων 2.72 και 2.73 κάθε φορά υπολογίζονται τα F_i και PMF_i και αντικαθίστανται στις εξισώσεις μέχρι να υπάρξει σύγκλιση.

Έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι για τον υπολογισμό του F_i , [24, 25]. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σταθμισμένης ανάλυσης ιστογραμμάτων (Weighted Histogram Analysis Method, WHAM) [26, 27]. Στόχος της συγκεκριμένης μεθόδου είναι να ελαχιστοποιήσει το στατιστικό σφάλμα του $P^u(\xi)$. Η συνολική κατανομή υπολογίζεται μέσω του σταθμισμένου μέσου όρου των κατανομών των επιμέρους παραθύρων. Η εξίσωση για τον υπολογισμό είναι:

$$P^u(\xi) = \sum_{i=1}^{N_w} \rho_i(\xi) P_i^u(\xi) \quad (2.76)$$

όπου ρ_i είναι τα βάρη του κάθε παραθύρου τα οποία επιλέγονται έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί το στατιστικό σφάλμα του P^u .

Κεφάλαιο 3

Υπολογιστικό Μέρος

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται παρουσίαση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων καθώς και τα αποτελέσματα τα οποία παρήχθησαν.

3.1 Σκοπός της εργασίας

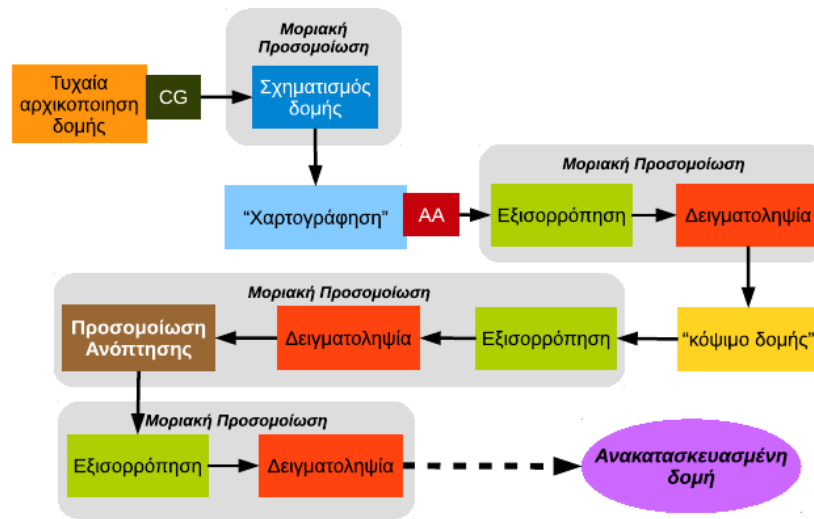
Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η διερεύνηση της λειτουργίας φραγμού του δέρματος και το πώς μια φαρμακευτική ένωση εισχωρεί διαμέσου του Stratum Corneum στον ανθρώπινο οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, στο σύστημα ιμπουπροφένης και διπλοστοιβάδας λιπιδίων πραγματοποιούνται μια σειρά από προσομοιώσεις χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Umbrella Sampling ώστε να υπολογισθεί το δυναμικό μέσης δύναμης κατά την είσοδο της ιμπουπροφένης στη διπλοστοιβάδα. Η διπλοστοιβάδα η οποία χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τρία είδη λιπιδίων: κεραμίδια (CER NS 24:0), ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA C24) και χοληστερόλες (CHOL) σε ισομοριακό μείγμα. Κατά τις προσομοιώσεις

ένα μόριο ιμπουπροφένης διαπερνούσε τη διπλοστοιβάδα με τη βοήθεια μίας εξωτερικής δύναμης από διαφορετικά σημεία της διπλοστοιβάδας. Το μόριο ιμπουπροφένης εισήχθη σε τυχαία θέση στο υδάτινο στρώμα που βρίσκεται εκατέρωθεν της διπλοστοιβάδας και αφού το σύστημα αφέθηκε να ισορροπήσει, κατέληξε στη διεπιφάνεια διπλοστοιβάδας νερού. Ακολούθως από εκείνο το σημείο πραγματοποιήθηκε προσομοίωση χρησιμοποιώντας δειγματοληψία Umbrella Sampling. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν άλλες τρεις προσομοιώσεις από τρία διαφορετικά σημεία εισόδου όπου το καθένα από αυτά ήταν πλούσιο σε ένα από τα λιπίδια τα οποία συνιστούν τη διπλοστοιβάδα.

3.2 Δημιουργία αρχικής διπλοστοιβάδας λιπιδίων

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα αυτοοργανωμένης διπλοστοιβάδας. Αυτό το σύστημα είχε δημιουργηθεί σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου [28] κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν μία σειρά από προσομοιώσεις από μια αρχικά τυχαία θέση των λιπιδίων και των μορίων νερού μέχρι τη δημιουργία της διπλοστοιβάδας. Αρχικά για να επιτευχθεί αυτό λόγω της μεγάλης κλίμακας χρόνου και αριθμού μορίων, που χρειάζεται ώστε να παρατηρηθούν τέτοια φαινόμενα χρησιμοποιήθηκε ένα coarse-grained πεδίο αλληλεπιδράσεων για την περιγραφή του συστήματος, το MARTINI. Τα λιπίδια μοντελοποιήθηκαν με βάση τη σύγχρονη βιβλιογραφία [29–34] και για το νερό επιλέχθηκε το απλό μοντέλο από το MARTINI [30]. Συνεπώς έγινε εφικτή η προσομοίωση του συστήματος μεγέθους $20 \text{ nm} \times 20 \text{ nm} \times 20 \text{ nm}$ για $5 \mu\text{s}$. Κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία τα λιπίδια, χρησιμοποιώντας μια coarse-grained περιγραφή, τοποθετούνται σε τυχαία θέση στο υπολογιστικό χωρίο μαζί με τα κέντρα αλληλεπίδρασης του νερού. Η επιλογή του συγκεκριμένου πεδίου αλληλεπιδράσεων καταφέρνει να δημιουργήσει μια πιο «ομαλή» υπερεπιφάνεια ενέργειας καθιστώντας έτσι ταχύτερη την διαδικασία εξε-

3.2 Δημιουργία αρχικής διπλοστοιβάδας λιπιδίων



Σχήμα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας δημιουργίας αυτοοργανωμένης διπλοστοιβάδας

ρεύνησης της υπερεπιφάνειας και τη διαδικασία επίτευξης μίας κατάστασης ισορροπίας. Στην περίπτωση αυτή όμως, ο χρόνος ο οποίος χρειάζεται το σύστημα για να φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας δεν είναι ο πραγματικός και έτσι το σύστημα αυτό δεν προσφέρεται για μελέτη δυναμικών ιδιοτήτων παρά μόνο ιδιοτήτων δομής.

Αρχικά λοιπόν πραγματοποιείται μια διαδικασία ελαχιστοποίησης ενέργειας του συστήματος για 5000 κύκλους χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο steepest decent. Με τη διαδικασία αυτή εξασφαλίζεται ότι στην αρχική δομή με τις τυχαίες θέσεις των λιπιδίων και των κέντρων νερού δεν υπάρχουν περιοχές όπου η απόσταση μεταξύ των μορίων προκαλεί τεράστιες ενέργειες, τα λεγόμενα bad contacts. Κατά τη διαδικασία αυτή τα άτομα των μορίων με τη μεγαλύτερη ενέργεια μετακινούνται κατά dr , λαμβάνοντας υπόψιν μήκη δεσμών, γωνίες και τη δομή του μορίου όπως καθορίζεται από το πεδίο αλληλεπιδράσεων. Στόχος αυτής της διεργασίας είναι η συνολική ενέργεια του συστήματος να μειωθεί μέχρι να επιτευχθεί σύγκλιση.

Υπολογιστικό Μέρος

Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια προσομοίωση, χρησιμοποιώντας το ισόθερμο - ισοβαρές στατιστικό σύνολο NpT , για 100 μs με τις διαστάσεις του υπολογιστικού χωρίου ελεύθερες να μεταβληθούν ανεξάρτητα μεταξύ τους.

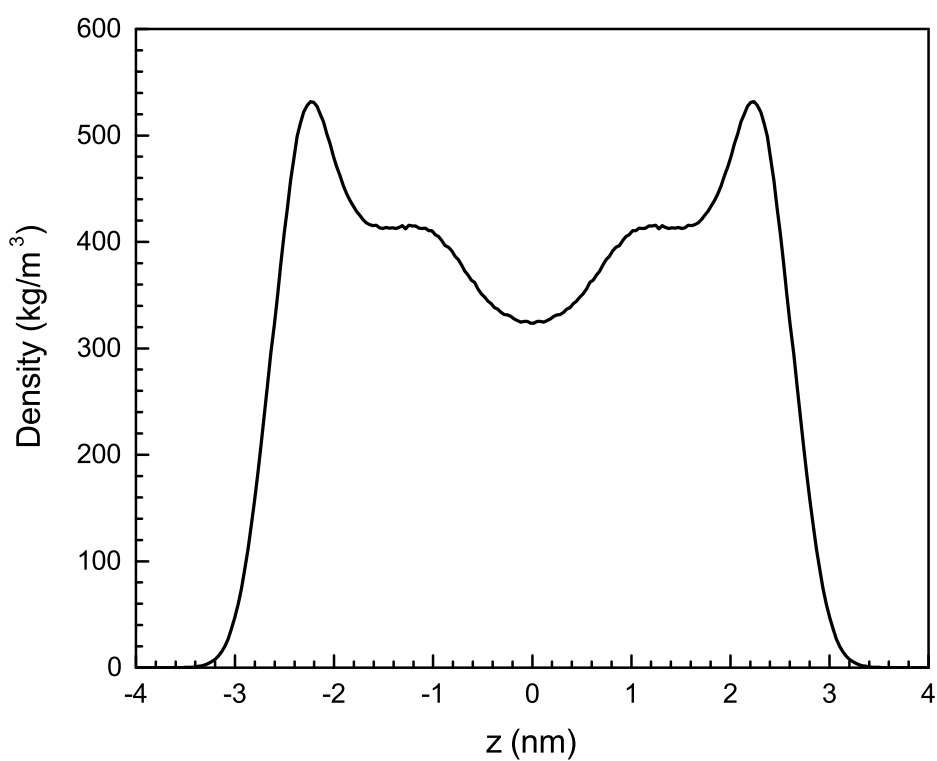
Εν συνεχεία, η τελική CG δομή που λαμβάνεται υπόκειται σε μια διαδικασία χαρτογράφησης ώστε να μεταβούμε από την CG περιγραφή σε ατομιστική περιγραφή των μορίων η οποία θα μας επιτρέψει να ανακτήσουμε μια λεπτομερέστερη περιγραφή του συστήματος. Η διαδικασία αυτή γίνεται με τη χρήση του κώδικα *backward.py* [35]. Το σύστημα που δημιουργείται με τη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιεί το δυναμικό αλληλεπιδράσεων CHARMM [36–44] για τη περιγραφή των λιπιδίων και το μοντέλο TIP3P για το νερό [45, 46]. Το συγκεκριμένο δυναμικό ανήκει στη κατηγορία των δυναμικών εκπεφρασμένων ατόμων (all-atom) και έχει αναπτυχθεί ώστε να μοντελοποιεί ένα μεγάλο αριθμό βιομορίων όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, υδρογονάνθρακες καθώς και λιπίδια. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στο σύστημα πρέπει να πραγματοποιηθούν δύο κύκλοι ελαχιστοποίησης της ενέργειας και τέσσερις κύκλοι εξισορρόπησης της δομής. Κατά την πρώτη διαδικασία ελαχιστοποίησης της ενέργειας δεν λαμβάνονται υπόψη οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος, εν αντιθέση με τη δεύτερη όπου και λαμβάνονται. Με την πρώτη διαδικασία επιτυγχάνεται η συμβατότητα της δομής του κάθε μορίου με το AA πεδίο αλληλεπιδράσεων. Συνεχίζοντας το σύστημα υποβάλλεται σε τέσσερις μοριακές προσομοιώσεις εξισορρόπησης της δομής 500 βημάτων με αυξανόμενο χρονικό βήμα σε κάθε προσομοίωση 0.2, 0.5, 1.0 και 2.0 fs αντίστοιχα.

Τέλος πραγματοποιείται μια τελευταία προσομοίωση μοριακής δυναμικής παράλληλα με ένα πρόγραμμα προσομοίωσης ανόπτησης. Ειδικότερα το σύστημα υποβάλλεται κατά αυτή διαδικασία σε θέρμανση και ψύξη της δομής. Ειδικότερα το σύστημά θερμάνθηκε βαθμιαία από τους 300 K στους 360 K και στη συνέχεια ψύχθηκε πάλι στους 300 K σε μια διαδικασία που διήρκεσε 6 ns [28].

3.2.1 Χαρακτηρισμός και δομή της αρχικής διπλοστοιβάδας

Πριν εξετασθεί η λειτουργία φραγμού της λιπιδιακής μεμβράνης της κεράτινης στοιβάδας έχει ενδιαφέρον να παρουσιαστούν τα δομικά χαρακτηριστικά της. Στο διάγραμμα σχημ. 3.2 αποτυπώνεται η κατανομή της πυκνότητας των μορίων κεραμιδίου κατά μήκος του κάθετου άξονα, ζ , στη διπλοστοιβάδα. Αρχικά παρατηρούνται 2 κορυφές στα εκατέρωθεν του κέντρου της διπλοστοιβάδας, το οποίο βρίσκεται στο σημείο 0 του άξονα χ . Οι κορυφές αυτές βρίσκονται στα -2.3 nm και στα 2.3 nm αντίστοιχα. τα σημεία αυτά στα οποία παρουσιάζεται υψηλή συγκέντρωση κεραμιδίων οφείλονται στις πολικές κεφαλές των κεραμιδίων. Κατόπιν παρατηρείται μια περιοχή με σταθερή πυκνότητα μικρότερη από εκείνη των πολικών κεφαλών η οποία εκτείνεται για 1 nm περίπου και πιο συγκεκριμένα από τα -1.9 nm ως τα 0.9 nm και αντίστοιχα από την άλλη μεριά του κέντρου της διπλοστοιβάδας. Η συγκεκριμένη περιοχή οφείλεται στην τακτική δομή που έχουν οι αλειφατικές αλυσίδες του κεραμιδίου μεταξύ τους. Τέλος η τρίτη περιοχή που παρατηρείται και βρίσκεται εκατέρωθεν του σημείου 0 του άξονα χ είναι εκείνη η οποία ανταποκρίνεται στη δομή των κεραμιδίων στο κέντρο της διπλοστοιβάδας. Έτσι η πτώση της πυκνότητας που παρατηρείται οφείλεται στο μη οργανωμένο μέρος των αλυσίδων του κεραμιδίου.

Στο διάγραμμα σχημ. 3.3 παρουσιάζεται η κατανομή πυκνότητας για τα μόρια των ελεύθερων λιπαρών οξέων κατά μήκος της διπλοστοιβάδας. Παρατηρώντας το διάγραμμα αρχικά βλέπουμε δύο περιοχές εκατέρωθεν του κέντρου στις οποίες η πυκνότητα διατηρεί περίπου σταθερή τιμή και απουσιάζουν οι διακριτές κορυφές που παρουσιάζονται στο προηγούμενο διάγραμμα των κεραμιδίων 3.2. Αυτή η απουσία λοιπόν της κορυφής υψηλής συγκέντρωσης, η οποία θα οφειλόταν στις πολικές κεφαλές των ελεύθερων λιπαρών οξέων, φανερώνει ότι η κατανομή των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο επίπεδο δεν είναι όμοια. Ειδικότερα τα μόρια του ελευθέρου λιπαρού οξέως δημιουργούν συστάδες στο

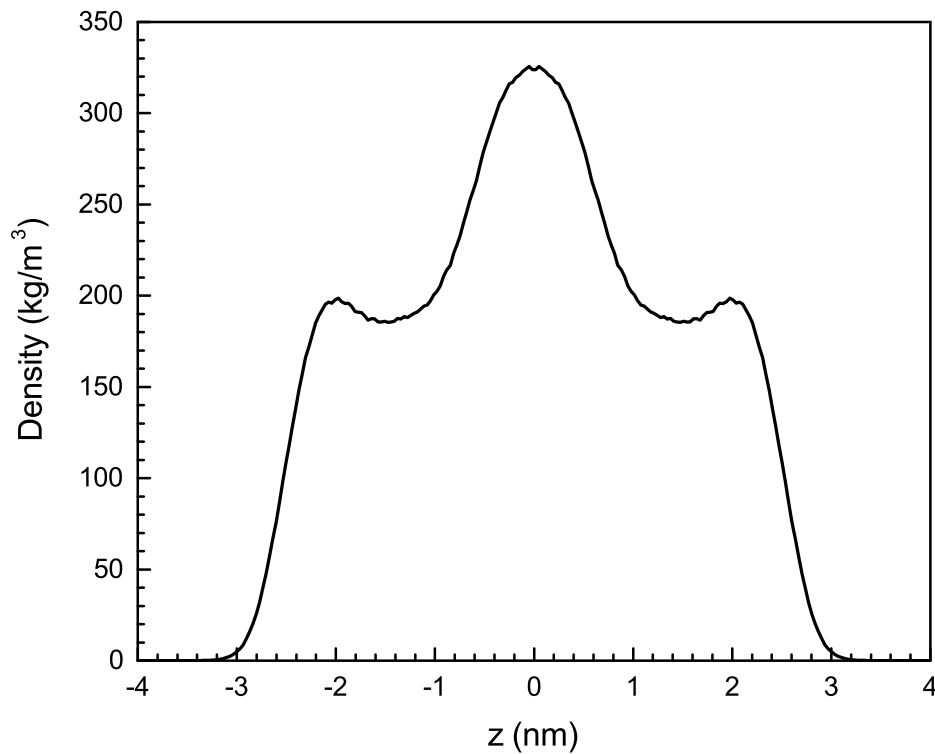


Σχήμα 3.2 Κατανομή πυκνότητας κεραμιδιών στη διπλοστοιβάδα

επίπεδο των ομοιόμορφα οργανωμένων πολικών κεφαλών των κεραμιδιών ευρισκόμενα είτε πιο ψηλά είτε πιο χαμηλά από αυτό. Η διαμόρφωση αυτή των ελεύθερων λιπαρών οξέων έχει επίδραση στο δυναμικό μέσης δύναμης όπως θα φανεί παρακάτω.

Για το διάγραμμα σχημ. 3.4, όπου αποτυπώνεται η κατανομή πυκνότητας των μορίων χοληστερόλης παρατηρούμε με μία πρώτη ματιά δύο εμφανείς περιοχές. Αυτές είναι οι δύο κορυφές εκατέρωθεν του κέντρου της διπλοστοιβάδας και ένα ελάχιστο στο κέντρο. Οι δύο κορυφές οφείλονται στη συγκέντρωση των μορίων χοληστερόλης στις δύο στοιβάδες. Όμως σημαντικότερο είναι το ελάχιστο στο κέντρο και αυτό διότι ο μη μηδενισμός της πυκνότητας στο κέντρο της διπλοστοιβάδας υποδηλώνει την ύπαρξη μορίων χοληστερόλης εκεί. Σε *in vitro* πειράματα που έχουν γίνει παλαιότερα [47–52] φαίνεται να

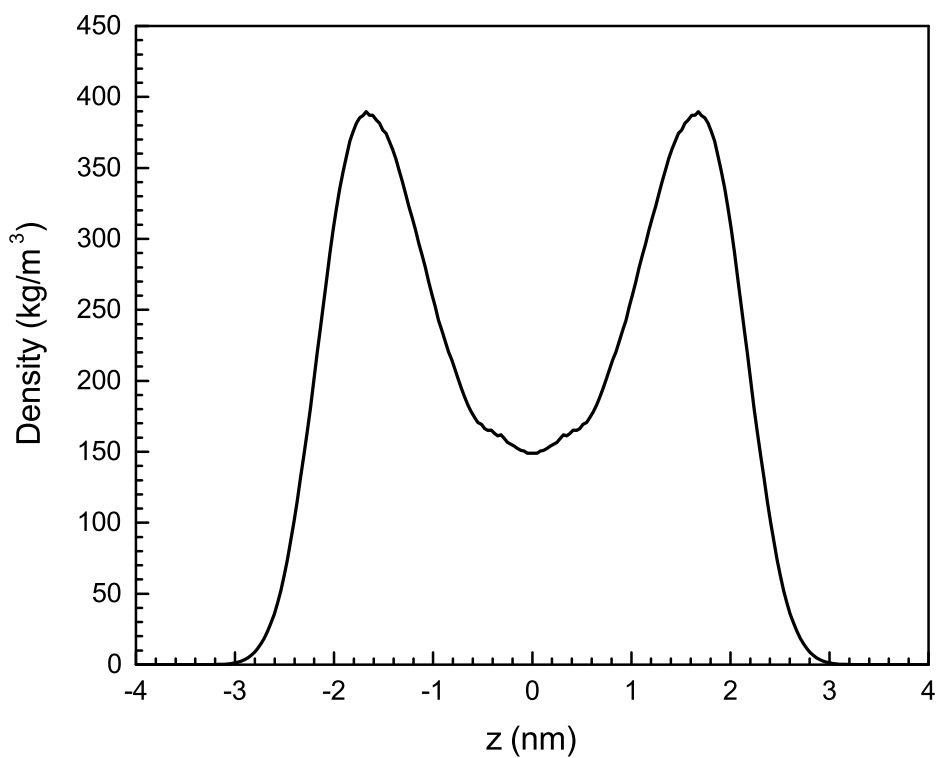
3.2 Δημιουργία αρχικής διπλοστοιβάδας λιπιδίων



Σχήμα 3.3 Κατανομή πυκνότητας ελεύθερων λιπαρών οξέων στη διπλοστοιβάδα

υπάρχουν μόρια χοληστερόλης ανάμεσα στις δύο στοιβάδες, τα οποία μάλιστα έχουν διαμόρφωση παράλληλη ως προς το επίπεδο το οποίο δημιουργούν οι πολικές κεφαλές των κεραμιδίων και των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Η παρουσία αυτή της χοληστερόλης ανάμεσα στις δύο στοιβάδες είναι μέρος της διαδικασίας ανταλλαγής μορίων χοληστερόλης μεταξύ των δύο στοιβάδων η οποία είναι γνωστή και ως *flip-flop*.

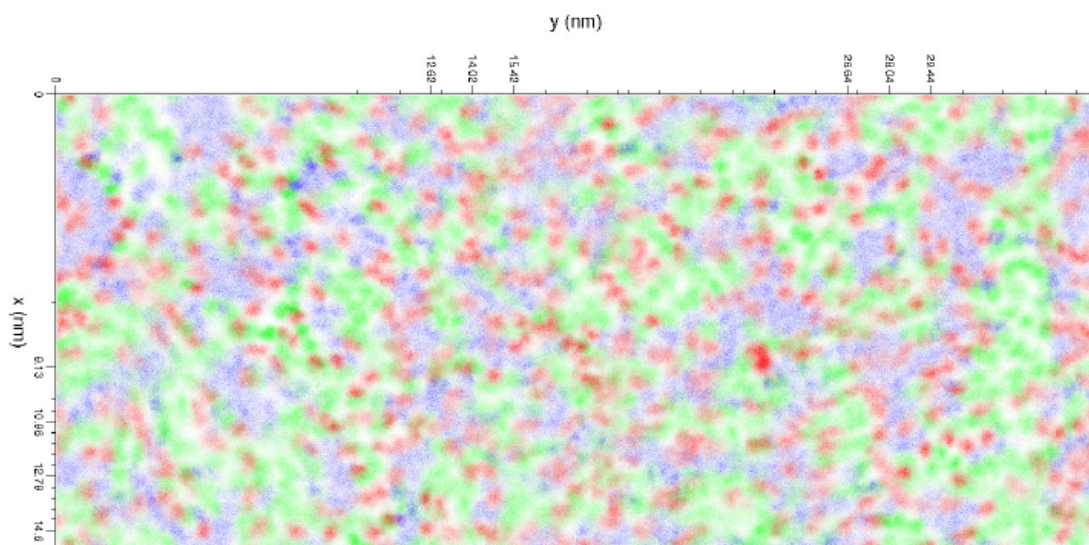
Εν συνεχεία μπορούμε να λάβουμε σημαντικές ενδείξεις για τη διαμόρφωση των λιπιδίων στη διπλοστοιβάδα μελετώντας τη μέση επιφανειακή πυκνότητα της. Παρατηρώντας την εικόνα σχημ. 3.5 φαίνεται τα κεραμίδια (αναπαριστώνται με πράσινο) και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (αναπαριστώνται με μπλε) να σχηματίζουν ομάδες με λιπίδια του ίδιου είδους. Έτσι στη διπλοστοιβάδα έχουμε διακριτές μεγάλες συστάδες κεραμι-



Σχήμα 3.4 Κατανομή πυκνότητας χοληστερόλης στη διπλοστοιβάδα

δίων, μικρότερες συστάδες ελεύθερων λιπαρών οξέων και διάσπαρτα σε όλη την έκταση της διπλοστοιβάδας μόρια χοληστερόλης. Η μεγαλύτερη επιφάνεια η οποία φαίνεται να καταλαμβάνουν τα κεραμίδια μπορεί να αποδοθεί στη δομή τους και ειδικότερα στον αριθμό των αλυσίδων που απαρτίζουν το μόριο (δύο για τα κεραμίδια). Έτσι τα όμοια λιπίδια έχουν ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομοίων μορίων τους εκτός από τα μόρια της χοληστερόλης τα οποία είναι περισσότερο ομοιόμορφα κατανεμημένα στη διπλοστοιβάδα παίζοντας τον ρόλο του συνδετικού κρίκου μεταξύ των συστάδων.

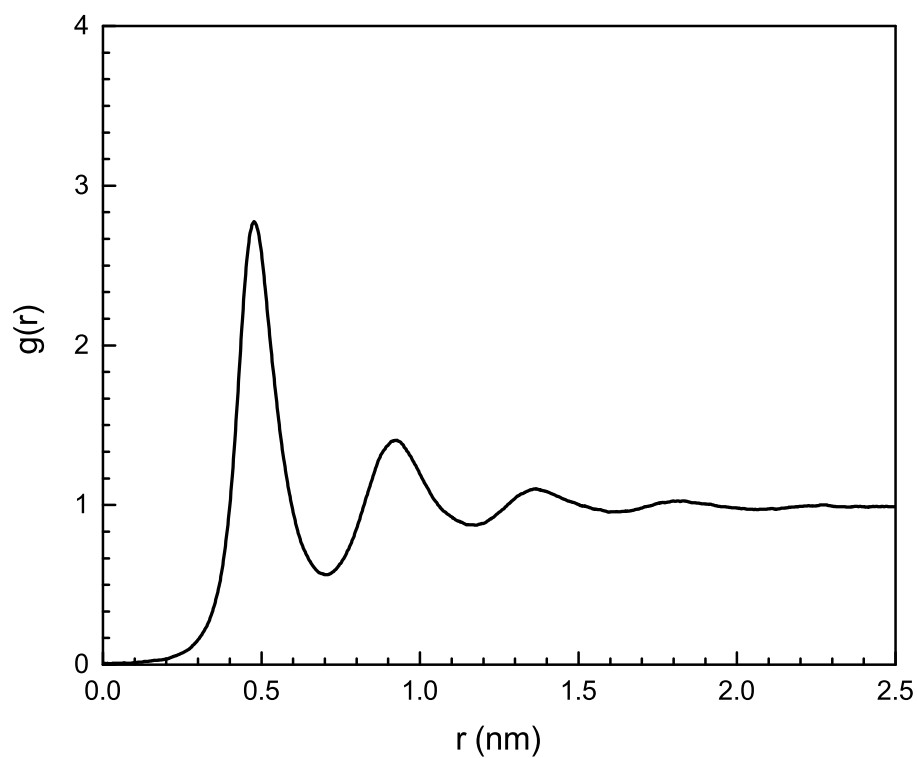
3.3 Δημιουργία τελικής δομής διπλοστοιβάδας



Σχήμα 3.5 Μέση επιφανειακή πυκνότητα λιπιδίων της διπλοστοιβάδας

3.3 Δημιουργία τελικής δομής διπλοστοιβάδας

Η δομή που λήφθηκε από την προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου δεν ήταν δυνατό να μελετηθεί σε λογικούς υπολογιστικούς χρόνους με τη μεθοδολογία του Umbrella Sampling λόγω του μεγέθους της. Κατά τη διαδικασία της μεθόδου αυτής όπως έχει αναφερθεί πραγματοποιείται μία προσομοίωση ώστε να δημιουργηθεί η τροχιά ξ του μορίου της ιμπουπροφένης διαμέσου της διπλοστοιβάδας λιπιδίων και πάνω στη τροχιά αυτή δημιουργούνται «παράθυρα», ανά 0.2 nm, στα οποία πραγματοποιούνται μία σειρά από προσομοιώσεις εξισορρόπησης και παραγωγής αποτελεσμάτων. Έτσι προσπαθήσαμε να μειώσουμε τη δομή σε ένα διαχειρίσιμο μέγεθος χωρίς όμως η νέα δομή να χάσει τις ιδιότητες της μεγαλύτερης. Για να επιτευχθεί αυτό έγινε υπολογισμός της ακτινικής συνάρτησης κατανομής (Radial Distribution Function, RDF) για την αρχική διαμόρφωση της διπλοστοιβάδας όπως αυτή αποτυπώνεται στο διάγραμμα σχημ. 3.6 με σκοπό την παρατήρηση της απόστασης στην οποία αρχίζει η δομή να χάνει τη περιοδικότητάς της (περίπου στα 2.5 nm). Κατόπιν αυτού έγινε προσπάθεια να δημιουργηθεί η νέα διπλοστοιβάδα με



Σχήμα 3.6 Ακτινική συνάρτηση κατανομής της αυτοοργανωμένης διπλοστοιβάδας

διαστάσεις $2.5 \text{ nm} \times 2.5 \text{ nm}$ διατηρώντας παράλληλα τον αρχικό λόγο του αριθμού των λιπιδίων. Η «κομμένη» διπλοστοιβάδα έτσι αποτελείται από 91 κεραμίδια CER NS 24:0, 83 ελεύθερα λιπαρά οξέα FFA και 87 χοληστερόλες διατηρώντας έτσι έναν λόγο περίπου 1:1:1. Τελικά η διπλοστοιβάδα αποτελείται συνολικά από 261 λιπίδια και περίπου 10500 μόρια νερού διατηρώντας έτσι και τον λόγο 40 μορίων νερού για κάθε ένα λιπίδιο.

3.4 Διαδικασία προσομοίωσης με τη χρήση της μεθοδολογίας Umbrella Sampling

Το λογισμικό με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι προσομοιώσεις και παρήχθησαν τα αποτελέσματα είναι το GROMACS έκδοση 5.1.1, ένα δωρεάν, ανοιχτού κώδικα, παραλληλοποιημένο για συστήματα με πολλαπλούς πυρήνες και για κάρτες γραφικών, λογισμικό μοριακής προσομοίωσης για συστήματα Linux. Ο κώδικας έχει αναπτυχθεί μέσω του προγράμματος Scalalife, που συγχρηματοδοτείται από τους παρακάτω οργανισμούς: European Research Council, the Swedish Research Council, the Swedish Foundation for Strategic Research, the Swedish National Infrastructure for Computing, and the Swedish Foundation for International Cooperation in Research and Higher Education [53].

Αρχικά η νέα μικρότερη δομή «κόβεται» από τη μεγαλύτερή μέσω της χρήσης του λογισμικού VMD (Visual Molecular Dynamics) [54], το οποίο αφαιρεί από το αρχείο θέσεων της προσομοίωσης τα άτομα τα οποία βρίσκονται εκτός των προκαθορισμένων διαστάσεων x, y, z του υπολογιστικού χωρίου. Έτσι απομένουν μόρια στα οποία λείπουν άτομα τα οποία πιθανώς να βρίσκονται εκτός του νέου υπολογιστικού χωρίου. Για να διορθωθεί αυτό χρησιμοποιείται ένας κώδικας αναπτυγμένος στο εργαστήριο ο οποίος διαβάζοντας το παραγόμενο αρχείο θέσεων ψάχνει και διορθώνει μόρια τα οποία έχουν λανθασμένο αριθμό ατόμων βασιζόμενα σε ένα αρχείο τοπολογίας των μορίων που χρησιμοποιούνται. Λαμβάνοντας υπόψιν μήκη και γωνίες δεσμών τοποθετεί τα άτομα που απουσιάζουν στις σωστές θέσεις.

Στη συνέχεια, στη συγκεκριμένη δομή γίνεται μία προσομοίωση ελαχιστοποίησης ενέργειας ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν υπάρχουν περιοχές υψηλής ενέργειας οι οποίες προκαλούνται από την απόσταση των νέων ατόμων τα οποία προστέθηκαν (bad contacts).

Υπολογιστικό Μέρος

Όπως και στην αρχική δομή (βλέπε παρ. 3.2), η διαδικασία ελαχιστοποίησης της ενέργειας διαρκεί 5000 κύκλους κάνοντας χρήση του αλγόριθμου steepest decent.

Στη συνέχεια στη νέα δομή πραγματοποιείται μία προσομοίωση εξισορρόπησης η οποία διαρκεί για 10 ns με χρονικό βήμα 0.02 ps. Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται στατιστικό σύνολο NpT , όπως και στις υπόλοιπες προσομοιώσεις οι οποίες αναφέρονται παρακάτω. Η θερμοκρασία ορίζεται στους 300 K και η πίεση στη 1 atm με χρήση του θερμοστάτη και του βαροστάτη του Berendsen.

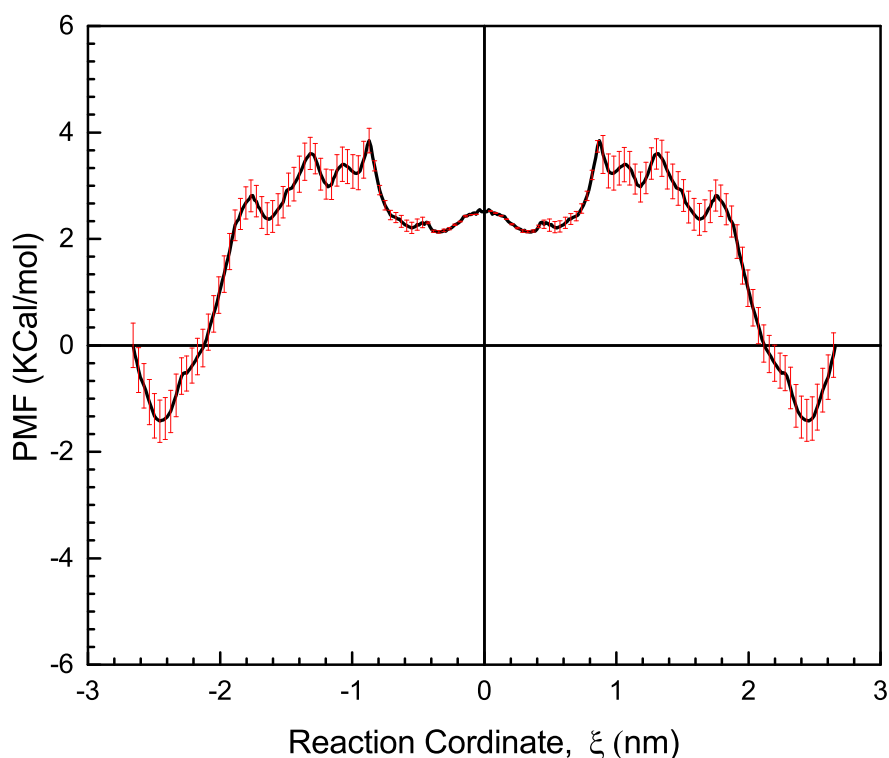
Επειτα, προστίθεται στο υπολογιστικό χωρίο ένα μόριο ιμπουπροφένης αρχικά σε τυχαία θέση εντός της υδάτινης μάζας και εν συνεχεία σε συγκεκριμένες θέσεις στη διεπιφάνεια διπλοστοιβάδας και νερού. Στην πρώτη περίπτωση στο σύστημα πραγματοποιείται μια διαδικασία προσομοίωσης εξισορρόπησης. Μετά το τέλος της διαδικασίας αυτής το μόριο ιμπουπροφένης είχε εναποτεθεί στη διεπιφάνεια μεταξύ διπλοστοιβάδας και νερού. Συγκεκριμένα αυτό οφείλεται στη χαμηλή διαλυτότητα της ιμπουπροφένης στο νερό. Η ιμπουπροφίνη, παρά την παρουσία της καρβοξυλικής ομάδας στο μόριό της, είναι ένα σχετικά μη πολικό μόριο, λόγω του βενζοϊκού δακτυλίου και της αλκυλικής αλυσίδας, το οποίο τη καθιστά ελάχιστα διαλυτή στο νερό και περισσότερο διαλυτή σε αλκοόλες. Εν συνεχεία γίνεται χρήση της μεθοδολογίας Umbrella Sampling κατά την οποία μία εξωτερική αρμονική δύναμη ασκείται στο μόριο της ιμπουπροφένης η οποία την εισχωρεί προς το κέντρο της διπλοστοιβάδας. Με τη διαδικασία αυτή δημιουργείται η τροχιά ξ προς μελέτη της διείδυσης στη διπλοστοιβάδα από το μόριο της ιμπουπροφένης. Κατά το μήκος αυτής της τροχιάς λοιπόν λαμβάνονται «φωτογραφίες» του συστήματος κάθε 0.2 nm περίπου και πραγματοποιούνται προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για τον υπολογισμό του Δυναμικού Μέσης Δύναμης. Για κάθε «φωτογραφία» πραγματοποιείται μία προσομοίωση εξισορρόπησης και μία προσομοίωση παραγωγής αποτελεσμάτων οι οποίες διαρκούν 10 ns και 50 ns αντίστοιχα.

Για τις υπόλοιπες τρεις περιπτώσεις ένα μόριο ιμμουπροφένης προστίθεται στο υπολογιστικό χωρίο σε συγκεκριμένη θέση στη διεπιφάνεια της διπλοστοιβάδας λιπιδίων και των μορίων νερού. Κατά τη διαδικασία αυτή έγινε προσπάθεια η ιμμουπροφένη να τοποθετηθεί σε σημεία της διπλοστοιβάδας στα οποία υπάρχουν συστάδες ίδιων λιπιδίων. Έτσι η ιμμουπροφένη προστέθηκε σε σημεία τα οποία ήταν πλούσια σε κεραμίδια, σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και σε χοληστερόλη. Κατόπιν, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο για τη δημιουργία των παραθύρων κατά μήκος της τροχιάς ενδιαφέροντος.

3.5 Δυναμικό Μέσης Δύναμης (Βάσης)

Αφού ολοκληρωθούν οι προσομοιώσεις στο σύστημα ιμμουπροφένης - διπλοστοιβάδας πρέπει να γίνει η απαραίτητη ανάλυση για την εξαγωγή του Δυναμικού Μέσης Δύναμης (Potential Mean Force, PMF) το οποίο πρακτικά στη περίπτωση μας εφόσον το στατιστικό σύνολο, το οποίο χρησιμοποιείται είναι το ισόθερμο-ισοβαρές NPT , η διαφορά μεταξύ των σημείων της καμπύλης είναι η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, ΔG . Η ανάλυση η οποία αναφέρεται πραγματοποιείται με τη χρήση της σταθμισμένης ανάλυσης ιστογραμμάτων (Weighted Histogram Analysis Method, WHAM) η οποία περιλαμβάνεται στο λογισμικό GROMACS και είναι διαθέσιμη μέσω της εντολής *gmx wham* [55].

Στο διάγραμμα 3.7 απεικονίζεται το PMF για την πρώτη προσομοίωση που αναφέρθηκε στη προηγούμενη ενότητα, δηλαδή τη προσομοίωση όπου η ιμμουπροφένη τοποθετείται σε τυχαίο σημείο στο υπολογιστικό χωρίο και στη συνέχεια το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει προτού πραγματοποιηθεί η προσομοίωση για τη παραγωγή της τροχιάς. Στο διάγραμμα η αρχή (περίπου στα -2.7 nm) δηλώνει το σημείο το οποίο εισέρχεται το



Σχήμα 3.7 Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τυχαία θέση Ιμπουπροφένης

μόριο της ιμπουπροφένης στη διπλοστοιβάδα ενώ το 0 του άξονα χ δηλώνει το κέντρο της διπλοστοιβάδας. Η καμπύλη αυτή αντικατοπτρίζεται για να προσομοιάσει το άλλο μισό της διπλοστοιβάδας. Παρατηρώντας κανείς το διάγραμμα μπορεί εύκολα να εντοπίσει τρεις διαφορετικές περιοχές αντίστοιχες με εκείνες που εμφανίζονται στο διάγραμμα κατανομής της πυκνότητας (σχημ. 3.2, 3.3, 3.4). Η πρώτη από την αρχή έως περίπου τα -2.4 nm στην οποία υπάρχει πτώση του PMF είναι η περιοχή η οποία ανταποκρίνεται στην είσοδο της ιμπουπροφένης στη διπλοστοιβάδα διαμέσου των πολικών κεφαλών των λιπιδίων. Η δεύτερη εμφανής περιοχή εκτείνεται από τα -2.4 nm έως και τα -1.9 nm στην οποία το PMF αυξάνει και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι στην πτώση στη προηγούμενη περιοχή. Αυτή η περιοχή ανταποκρίνεται στη περιοχή της διπλοστοιβάδας στην οποία οι αλυσίδες των έχουν περισσότερο τακτική δομή. Κατά συνέπεια λόγω της

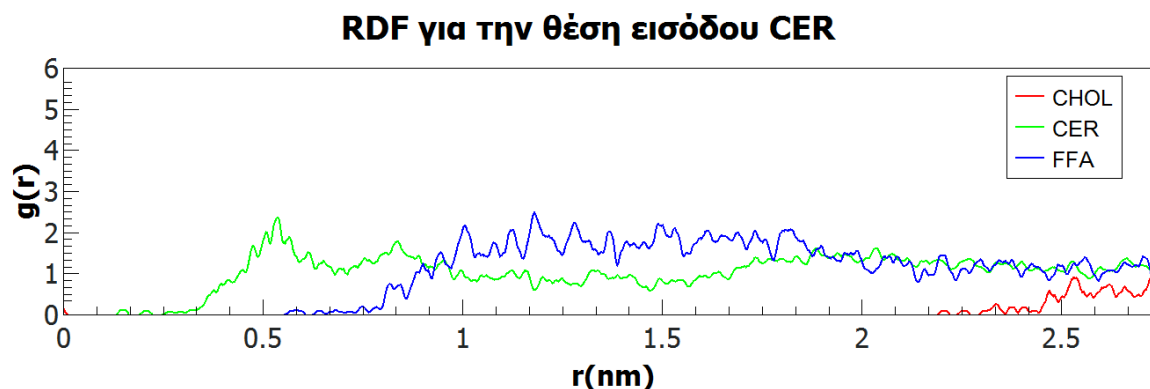
3.6 Επιλογή θέσεων διπλοστοιβάδας για προσομοιώσεις Umbrella Sampling

υψηλής τακτικότητας της περιοχής καθίσταται δύσκολο για το μόριο της ιμπουπροφένης να την διασχίσει και έτσι παρατηρείται η αύξηση στο PMF. Η τρίτη περιοχή η οποία εκτείνεται από τα -1.9 nm έως και τα 0 , ανταποκρίνεται στο κέντρο της διπλοστοιβάδας στην οποία σταματάει να υπάρχει η υψηλή τακτικότητα της προηγούμενης περιοχής και έχουμε μια χαμηλότερη πυκνότητα λιπιδίων καθώς και παρουσία χοληστερόλης έτσι όλα αυτά συμβάλουν στις χαμηλότερες τιμές του PMF οι οποίες παρατηρούνται.

3.6 Επιλογή θέσεων διπλοστοιβάδας για προσομοιώσεις Umbrella Sampling

Για τις τελευταίες τρεις προσομοιώσεις έγινε προσπάθεια να τοποθετηθεί το μόριο της ιμπουπροφένης κάθε φορά σε διαφορετικό σημείο μεταξύ διπλοστοιβάδας και υδάτινης στοιβάδας. Τα σημεία αυτά επιλέχθηκαν ώστε να είναι πλούσια το καθένα σε κεραμίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και χοληστερόλες ώστε να έχουμε μία εικόνα για τη συνεισφορά της κάθε ομάδας λιπιδίων στο δυναμικό μέσης δύναμης της ιμπουπροφένης κατά τη διάρκεια της διεύθυνσης της στη διπλοστοιβάδα.

Για την επαλήθευση, πέραν της οπτικής παρατήρησης του σημείου μέσω του λογισμικού VMD, χρησιμοποιήθηκε ο υπολογισμός της ακτινικής συνάρτησης κατανομής στην προκειμένη περίπτωση με μόριο αναφοράς το μόριο της ιμπουπροφένης. Έτσι μέσω μιας διαδικασίας κατά την οποία στο υπολογιστικό χωρίο αφαιρούνται όλα τα άτομα εκτός από εκείνα που βρίσκονται περιμετρικά της ιμπουπροφένης τη στιγμή που εισέρχεται στη διπλοστοιβάδα. Στην συνέχεια γίνεται ο υπολογισμός του RDF χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα που κρατήσαμε. Έτσι μπορούμε να έχουμε μια εικόνα της ακτινικής συνάρτησης κατανομής για το τι περιστοιχίζει την ιμπουπροφένη τη στιγμή που εισέρχεται στη δι-



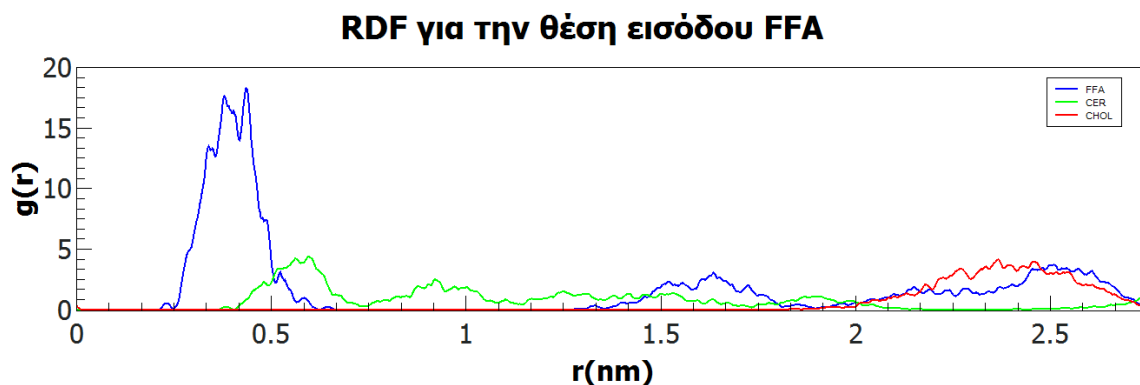
Σχήμα 3.8 Ακτινική συνάρτηση κατανομής της ιμπουπροφένης προς τα λιπίδια για τη θέση εισόδου από κεραμίδιο

πλοστοιβάδα ώστε να επαληθευθεί η αρχική τοποθέτηση σε θέση πλούσια με ένα λιπίδιο. Έτσι στο σχήμα 3.8 επαληθεύεται η αρχική επιλογή του σημείου μελέτης το οποίο επιλέχτηκε ως ένα σημείο πλούσιο σε κεραμίδια. Η επαλήθευση αυτή προκύπτει από την τιμή του $g(r)$ για το κεραμίδιο στα 0.5 nm στην οποία απόσταση η τιμή για τα άλλα λιπίδια είναι 0.

Για τη θέση εισόδου από ελεύθερα λιπαρά οξέα υπολογίστηκε και πάλι η ακτινική συνάρτηση κατανομής η οποία αποτυπώνεται στο διάγραμμα σχημ. 3.9. Παρατηρείται λοιπόν απουσία κορυφών για τα κεραμίδια και τις χοληστερόλες σε κοντινή απόσταση και μία κορυφή στα 0.4 nm για τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Το γεγονός αυτό συνηγορεί στην αρχική επιλογή του σημείου ως ένα σημείο της διπλοστοιβάδας πλούσιο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα για τη μελέτη της διεϊσδυσης της ιμπουπροφένης στη διπλοστοιβάδα από τέτοια θέση.

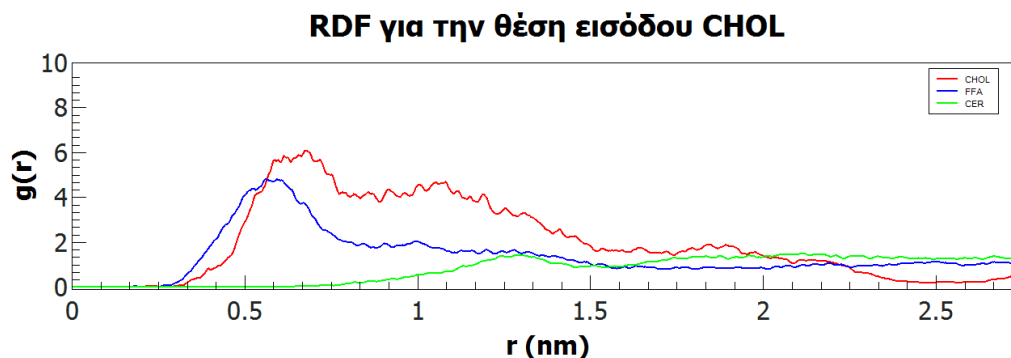
Τέλος το διάγραμμα σχημ. 3.10 αναπαριστά τη συνάρτηση ακτινικής κατανομής για θέση εισόδου από χοληστερόλες. Μελετώντας το διάγραμμα παρατηρούνται δύο κορυφές κοντά στα 0.6 nm. Η πρώτη οφείλεται στη παρουσία χοληστερόλης σε κοντινή απόσταση στο μόριο της ιμπουπροφένης, κάτι το οποίο ήταν και το επιθυμητό, και η δεύτερη που οφείλεται στα μόρια ελεύθερων λιπαρών οξέων. Όπως έχει αναφερθεί και στην

3.6 Επιλογή θέσεων διπλοστοιβάδας για προσομοιώσεις Umbrella Sampling



Σχήμα 3.9 Ακτινική συνάρτηση κατανομής της ιμπουπροφένης προς τα λιπίδια για τη θέση εισόδου από ελεύθερο λιπαρό οξύ

ενότητα 3.2.1 σύμφωνα με τη μέση επιφανειακή κατανομή των λιπιδίων έχουμε μεγάλες συστάδες κεραμιδίων, μικρότερες συστάδες ελεύθερων λιπαρών οξέων και τη χοληστερόλη σχεδόν ομοιόμορφα κατανεμημένη στη διπλοστοιβάδα. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την εύρεση ενός σημείου όπου η χοληστερόλη θα κυριαρχεί. Ένα άλλο γεγονός που συμβάλει στη δυσκολία εύρεσης ενός τέτοιου σημείου είναι η μεγάλη κινητικότητα της χοληστερόλης στη διπλοστοιβάδα τόσο μέσω της διαδικασίας *flip-flop* αλλά και μέσω της πλευρικής διάχυσης (*Lateral diffusion*). Έτσι η επιλογή των δύο προηγούμενων σημείων ήταν αντικειμενικά πιο εύκολη διαδικασία σε σχέση με εκείνη ενός σημείου πλούσιου σε χοληστερόλη. Το συγκεκριμένο σημείο που επιλέχθηκε έγινε μετά από εξέταση διαφορετικών άλλων σημείων με πιθανή μεγάλη παρουσία χοληστερόλης και είναι το καλύτερο δυνατό.



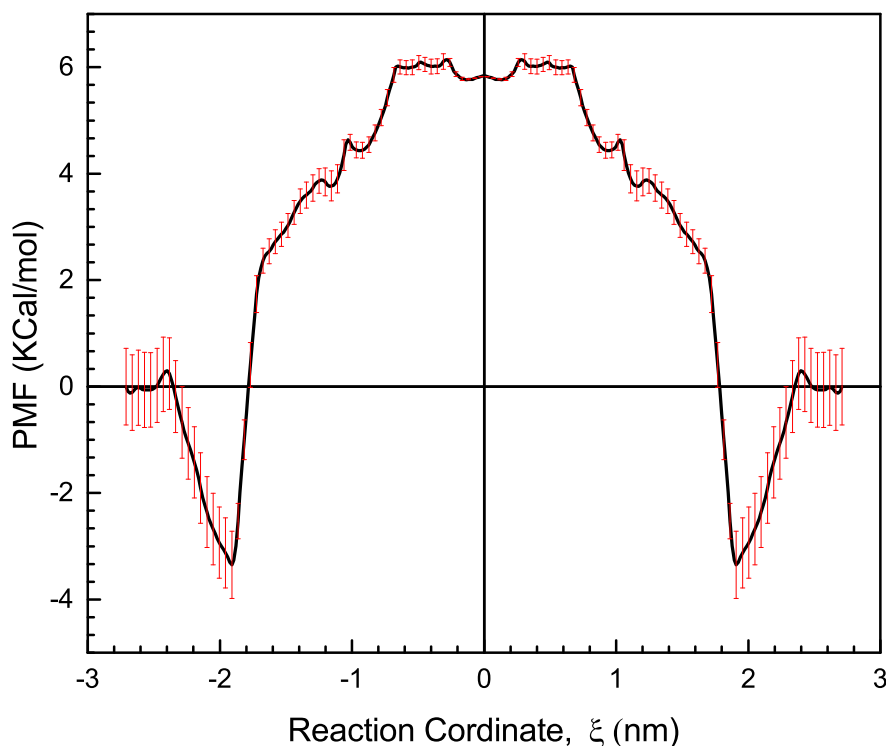
Σχήμα 3.10 Ακτινική συνάρτηση κατανομής της ιμπουπροφένης προς τα λιπίδια για τη θέση εισόδου από χοληστερόλη

3.7 Δυναμικά Μέσης Δύναμης των τριών θέσεων εισόδου

Όπως και προηγουμένως μετά το πέρας των προσομοιώσεων της μεθοδολογίας Umbrella Sampling για να γίνει η ανάλυση από την οποία θα προκύψει το Δυναμικό Μέσης Δύναμης (Potential Mean Force, PMF) γίνεται χρήση της σταθμισμένης ανάλυσης ιστογραμμάτων (Weighted Histogram Analysis Method, WHAM). Έχει σημασία να σημειωθεί ότι στη περίπτωση των προσομοιώσεων μας το στατιστικό σύνολο το οποίο χρησιμοποιείται είναι το *NPT* συνεπώς η διαφορά μεταξύ των σημείων της καμπύλης του PMF είναι η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, ΔG .

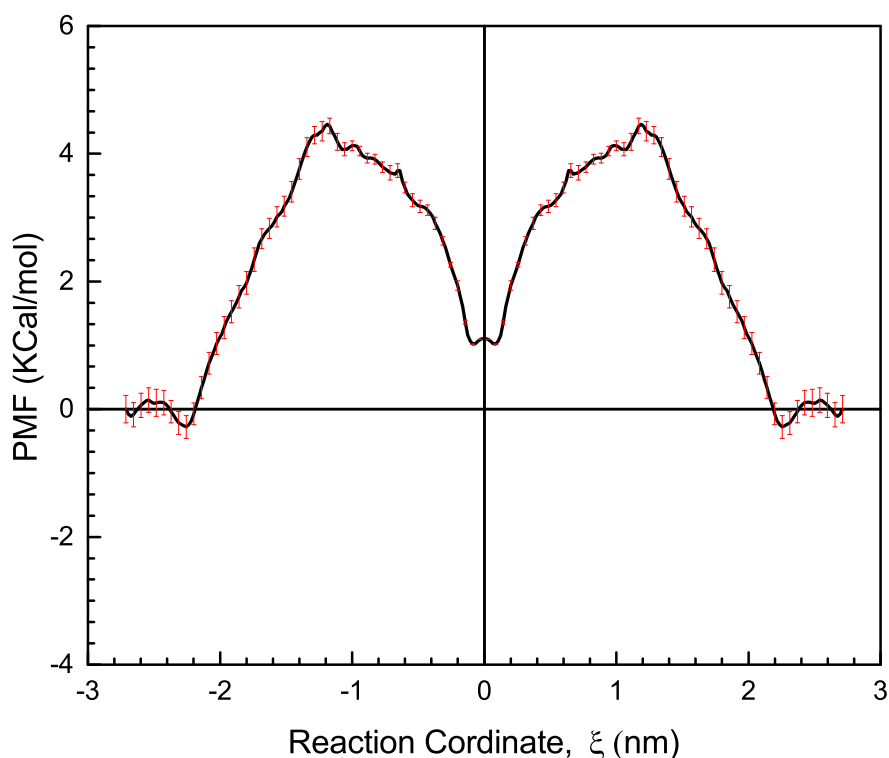
Στο διάγραμμα 3.11 απεικονίζεται το PMF για την προσομοίωση που πραγματοποιήθηκε με τη μεθοδολογία Umbrella Sampling "τραβώντας" το μόριο της ιμπουπροφένης από σημείο της διπλοστοιβάδας πλούσιο σε κεραμίδια. Όπως και στο προηγούμενο διάγραμμα δυναμικού μέσης δύναμης που παρουσιάστηκε έτσι σε αυτό καθώς και στα επόμενα το 0 του άξονα χ απεικονίζει το κέντρο της διπλοστοιβάδας. Εξετάζοντας το διάγραμμα παρατηρείται μία μεγάλη πτώση του δυναμικού μέσης δύναμης στην περιοχή

3.7 Δυναμικά Μέσης Δύναμης των τριών θέσεων εισόδου



Σχήμα 3.11 Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τη θέση εισόδου από κεραμίδιο

από -2.7 nm έως τα -1.9 nm της τάξεως των 3.5 kCal/mol. Η συγκεκριμένη περιοχή είναι δυνατό να αποδοθεί στη περιοχή των πολικών κεφαλών των κεραμιδίων της διπλοστοιβάδας βάση του διαγράμματος κατανομής πυκνότητας των κεραμιδίων (3.2). Συνεπώς η παραπάνω πτώση της τιμής του δυναμικού μέσης δύναμης υποδεικνύει ότι το μόριο της ιμπουπροφένης διασπά σχετικά εύκολα το πλέγμα των πολικών κεφαλών των λιπιδίων που συναντά κατά την είσοδο της στη διπλοστοιβάδα. Στη συνέχεια για τη περιοχή από -1.9 nm έως -0.8 nm παρατηρείται μία άνοδος της τάξεως των 7.2 kCal/mol. Η περιοχή αυτή λαμβάνοντας υπόψιν το διάγραμμα κατανομής της πυκνότητας όπως και προηγουμένως μπορεί να αποδοθεί στη τακτική περιοχή που σχηματίζουν οι αλυσίδες. Η συγκεκριμένη περιοχή φαίνεται να προβάλλει μεγάλη αντίσταση στο μόριο της ιμπουπροφένης λόγω της δομής των αλυσίδων στο συγκεκριμένο σημείο. Τέλος η τρίτη περιοχή -0.8 nm



Σχήμα 3.12 Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τη θέση εισόδου από ελεύθερο λιπαρό οξύ

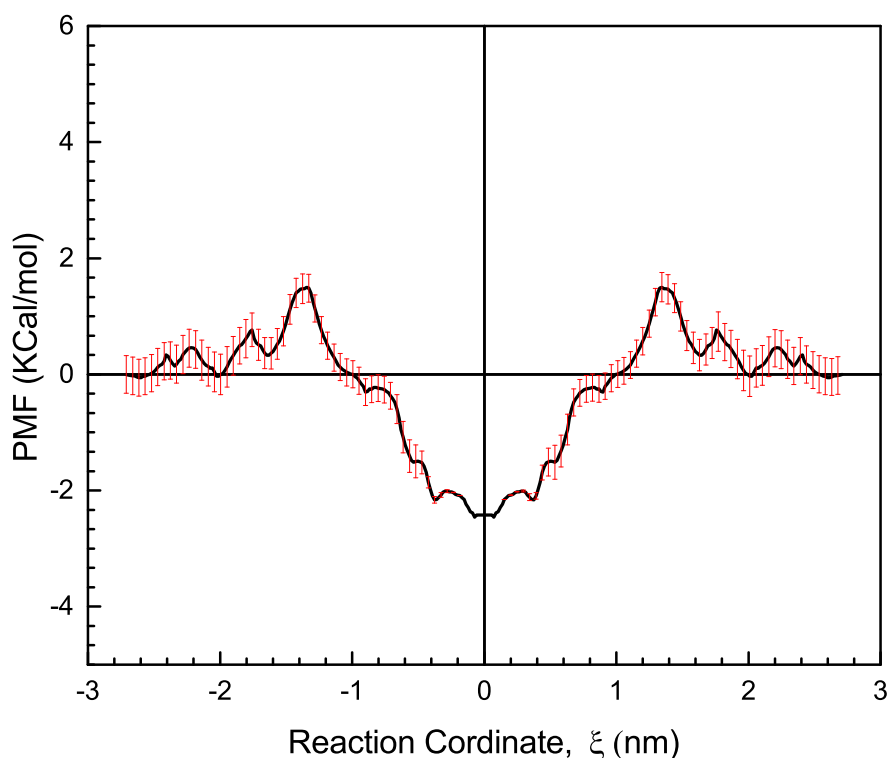
έως και τα 0 nm παρουσιάζει μία σχεδόν σταθερή τιμή δυναμικού μέσης δύναμης για το μόριο της ιμπουπροφένης. Η συγκεκριμένη περιοχή αντιπροσωπεύει τη περιοχή στο κέντρο της διπλοστοιβάδας.

Η δεύτερη θέση εισόδου που μελετήθηκε ήταν εκείνη από σημείο της διπλοστοιβάδας πλούσιο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Έτσι με χρήση της μεθοδολογίας Umbrella Sampling κατά τις μοριακές προσομοιώσεις αλλά και της μεθοδολογίας της σταθμισμένης ανάλυσης με βάρη (WHAM) έγινε ο υπολογισμός του δυναμικού μέσης δύναμης το οποίο παρουσιάζεται στο διάγραμμα 3.12. Παρατηρώντας το διάγραμμα είναι εύκολα διακριτές, όπως και στα προηγούμενα, τρεις περιοχές. Η πρώτη περιοχή από -2.7 nm έως τα

3.7 Δυναμικά Μέσης Δύναμης των τριών θέσεων εισόδου

-2.1 nm στην οποία υπάρχει μία σχετικά μικρή πτώση της τιμής του δυναμικού μέσης δύναμης της τάξεως των 0.25 kcal/mol. Η συγκεκριμένη περιοχή είναι δυνατό να αποδοθεί στην περιοχή που σχηματίζουν οι πολικές κεφαλές των λιπιδίων με χρήση του διαγράμματος κατανομής πυκνότητας για τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (σχημ. 3.3). Η διαφορά της συγκεκριμένης τιμής σε σχέση με εκείνη για το σημείο εισόδου από κεραμίδια είναι μεγάλη και είναι ανοικτή προς ερμηνεία. Ένα σημαντικό όμως δεδομένο που μπορεί να συσχετισθεί με αυτή τη διαφορά στη τιμή είναι η διαφορετικές πολικές κεφαλές των δύο λιπιδίων, κάτι το οποίο έχει επίδραση στη πολικότητα της, καθώς και η απουσία κορυφών στο διάγραμμα κατανομής πυκνότητας των ελεύθερων λιπαρών οξέων εν αντιθέσει με εκείνο του κεραμιδιού. Στη συνέχεια η δεύτερη περιοχή που παρατηρείται από τα -2.1 nm έως και τα -1.2 nm η τιμή του δυναμικού μέσης δύναμης παρουσιάζει άνοδο της τάξεως των 4.75 kcal/mol. Τη συγκεκριμένη περιοχή παρατηρώντας το διάγραμμα κατανομής πυκνότητας για τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι δυνατό να αποδοθεί στη τακτική περιοχή που δημιουργούν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα η οποία φαίνεται να προβάλλει σημαντική αντίσταση στην είσοδο της μπουπροφένης στη διπλοστοιβάδα. Στη τρίτη περιοχή η οποία εκτείνεται από τα -1.2 nm έως και τα 0 nm παρατηρείται μία πτώση της τιμής του δυναμικού μέσης δύναμης της τάξεως των 3.5 kcal/mol. Η συγκεκριμένη περιοχή αποδίδεται στο κέντρο της διπλοστοιβάδας και υπάρχει και εδώ διαφορά με τη τιμή του δυναμικού μέσης δύναμης σε σχέση με εκείνη του σημείου εισόδου από κεραμίδιο. Αν εξετάσουμε το διάγραμμα κατανομής πυκνότητας για τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι εύκολο να διακριθεί η κορυφή που παρουσιάζεται για τη συγκεκριμένη περιοχή. Πιθανώς αυτή η άνοδος της συγκέντρωσης των αλυσίδων των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο κέντρο της διπλοστοιβάδας να παίζει ρόλο στη μείωση της τιμής του δυναμικού μέσης δύναμης.

Το τελευταίο σημείο εισόδου που μελετήθηκε ήταν εκείνο που ήταν πλούσιο σε χοληστερόλη. Το διάγραμμα του δυναμικού μέσης δύναμης για το συγκεκριμένο σημείο



Σχήμα 3.13 Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τη θέση εισόδου από χοληστερόλη

σημείο παρουσιάζεται στο σχήμα 3.13. Στα προηγούμενα είχαμε τρεις ευδιάκριτες περιοχές οι οποίες και θα αναλυθούν και για το συγκεκριμένο διάγραμμα. Πιο συγκεκριμένα η πρώτη περιοχή από τα -2.7 nm έως τα -2 nm παρουσιάζει διακυμάνσεις στη τιμή του δυναμικού μέσης δύναμης αλλά ουσιαστικά δεν υπάρχει κάποια μεταβολή της. Στη δεύτερη περιοχή από τα -2 nm έως και τα -1.3 nm υπάρχει μία άνοδος της τιμής του δυναμικού μέσης δύναμης της τάξης των 1.75 kcal/mol. Στη τελευταία περιοχή η οποία εκτείνεται από τα -1.3 nm έως και τα 0 nm παρατηρείται μία πτώση της τιμής του δυναμικού μέσης δύναμης της τάξης των 4 kcal/mol. Το συγκεκριμένο διάγραμμα εκ πρώτης όψεως δεν παρουσιάζει ομοιότητες με τα προηγούμενα διαγράμματα, κάτι το οποίο πιθανώς οφείλεται στο φύση των μορίων της χοληστερόλης. Πιο συγκεκριμένα η πτώση της τιμής του δυναμικού μέσης δύναμης στη πρώτη περιοχή των προηγούμενων διαγραμμάτων απουσιάζει.

3.7 Δυναμικά Μέσης Δύναμης των τριών θέσεων εισόδου

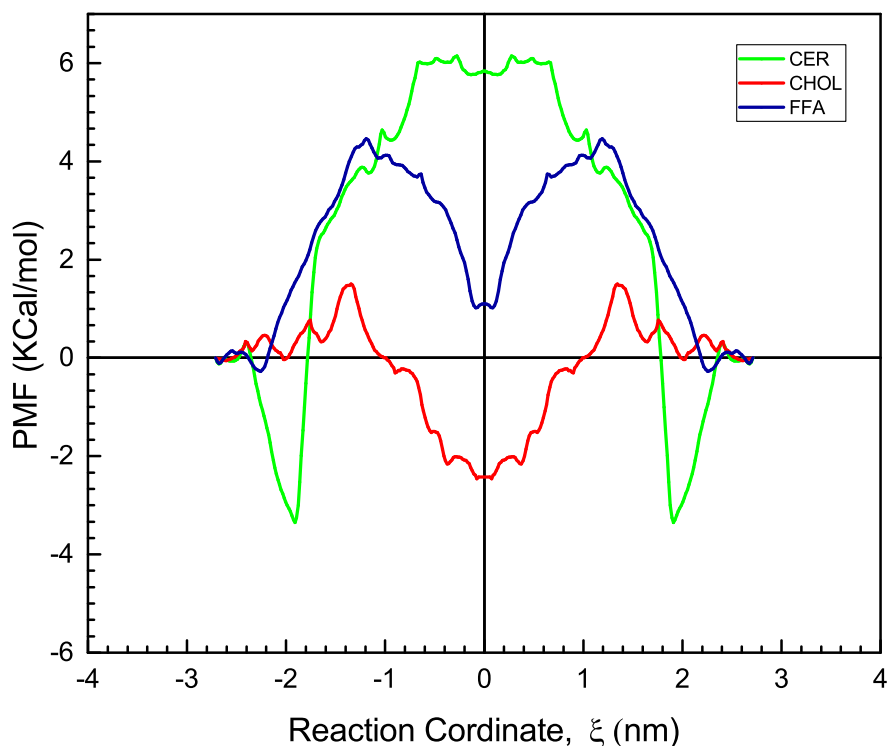
Αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό καθώς εξετάζοντας τη δομή της χοληστερόλης καθώς είναι ένα μικρό μόριο με σχετικά μικρή πολικότητα από το οποίο απουσιάζει κάποια πολική κεφαλή εν αντιθέσει με τα άλλα δύο λιπίδια. Στη δεύτερη περιοχή παρατηρείται άνοδος της τιμής του δυναμικού μέσης δύναμης, όπως και στα δύο προηγούμενα διαγράμματα, η οποία όμως συγκριτικά είναι πολύ μικρότερη. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η αντίσταση αυτή προβάλλεται από το τακτικό κομμάτι των των υδρόφοβων αλυσίδων των λιπιδίων της διπλοστοιβάδας αλλά λόγω της διαδικασίας *flip-flop* της χοληστερόλης είναι πολύ πιθανό να συνεχίζει βρίσκεται κάποιο μόριο χοληστερόλης περιμετρικά του μορίου της ιμπουπροφένης. Τέλος όπως και στο διάγραμμα του δυναμικού μέσης δύναμης για τη θέση εισόδου από σημείο πλούσιο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα παρατηρείται πτώση της τιμής για το κέντρο της διπλοστοιβάδας κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί σε παρουσία μορίων χοληστερόλης στο κέντρο της διπλοστοιβάδας.

Κεφάλαιο 4

Επίλογος

4.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων - Συμπεράσματα

Στη συγκεκριμένη εργασία παρουσιάστηκε μία προσπάθεια μελέτης της εισχώρησης μίας φαρμακευτικής ουσίας στον ανθρώπινο οργανισμό δια μέσου του δέρματος. Πιο συγκεκριμένα μέσω προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας της κεράτινης στοιβάδας του δέρματος έγινε υπολογισμός του δυναμικού μέσης δύναμης για τη διαδικασία εισόδου ενός μορίου ιμπουπροφένης στη προαναφερθείσα διπλοστοιβάδα. Αυτό κατέστη εφικτό χρησιμοποιώντας κατά τις μοριακές προσομοιώσεις τη μεθοδολογία της δειγματοληψίας κάλυψης (Umbrella Sampling). Έτσι εξετάστηκε ένα σύστημα το οποίο προσομοίαζε τις διπλοστοιβάδες λιπιδίων που απαντώνται στη κεράτινη στοιβάδα του δέρματος το οποίο αποτελούνται από τριών ειδών λιπίδια. Τα λιπίδια που απαντώνται στη συγκεκριμένη διπλοστοιβάδα είναι κεραμίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και χοληστερόλη. Ειδικότερα τα πιο συχνά απαντώμενα κεραμίδια (CER NS 24:0) και ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA 24:0) προσομοιώθηκαν σχηματίζοντας αυθόρμητα μία διπλο-

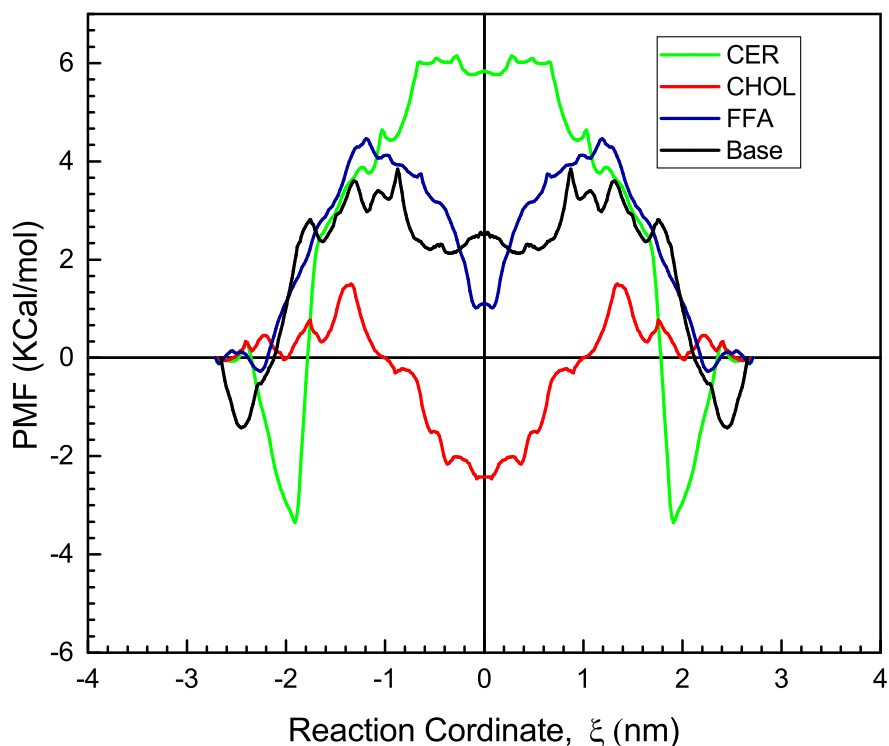


Σχήμα 4.1 Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τις τρεις θέσεις εισόδου από κεραμίδια (CER), από ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και από χοληστερόλη (CHOL)

στοιβάδα με μόρια νερού εκατέρωθεν της με ένα δυναμικό αλληλεπίδρασης αδρών κόκκων (coarse-grained). Στη συνέχεια μέσω μίας διαδικασίας αντίστροφης χαρτογράφησης σε ένα δυναμικό εκπεφρασμένων ατόμων (all-atom), το CHARMM, πραγματοποιήθηκαν οι προσομοιώσεις με χρήση της μεθοδολογίας Umbrella Sampling. Για την εξαγωγή του δυναμικού μέσης δύναμης έγινε χρήση της μεθοδολογίας σταθμισμένης ανάλυσης ιστογραμμάτων. Όλες οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο (NpT) με σταθερή πίεση 1 atm και σταθερή θερμοκρασία 300 K.

4.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων - Συμπεράσματα

Ειδικότερα επιλέχθηκαν τρία διαφορετικά σημεία στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας το κάθε ένα πλούσιο σε ένα είδος λιπιδίου της διπλοστοιβάδας. Σε αυτά τα σημεία κατόπιν εισήχθη ένα μόριο ιμπουπροφένης, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις με τη μεθοδολογία Umbrella Sampling και έγινε υπολογισμός του δυναμικού μέσης δύναμης για κάθε προσομοίωση. Στο διάγραμμα σχημ. 4.1 παρουσιάζονται τα τρία δυναμικά μέσης δύναμης για τις τρεις διαφορετικές θέσεις εισόδου. Για τις θέσεις από κεραμίδια (CER) και ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) παρατηρείται αρχικά μια πτώση της τιμής η οποία οφείλεται στις πολικές κεφαλές των δύο λιπιδίων με τη θέση από κεραμίδιο να παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη πτώση. Κατόπιν μία αύξηση η οποία οφείλεται στη τακτική περιοχή των αλυσίδων των δύο λιπιδίων και τέλος ενώ στα ελεύθερα λιπαρά οξέα παρατηρείται πτώση της τιμής για το κέντρο της διπλοστοιβάδας (0 του άξονα x) στη θέση από κεραμίδια παρατηρείται μία σταθερή περιοχή. Για τη θέση εισόδου από χοληστερόλη (CHOL) έχουμε ένα διαφορετικό διάγραμμα σε σχέση με τα δύο προηγούμενα όπου εκεί που παρουσιάζονται πτώση της τιμής για τα προηγούμενα δύο στην αρχή στο συγκεκριμένο η τιμή ουσιαστικά παραμένει σταθερή, κατόπιν παρατηρείται μία μικρή άνοδος για τη δεύτερη περιοχή όπου στα προηγούμενα είχαμε επίσης άνοδο λόγω των τακτικών περιοχών και τέλος μία πτώση για το κέντρο της διπλοστοιβάδας. Για τη συγκεκριμένη περιοχή εισόδου όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο εμφανίστηκαν δυσκολίες στην επιλογή ενός σημείου το οποίο θα ήταν πλούσιο μόνο σε χοληστερόλη. Αυτό οφείλεται τόσο γεγονός ότι η χοληστερόλη είναι ένα μικρό μόριο συγκριτικά με τα άλλα δύο λιπίδια και στη διπλοστοιβάδα παίζει το ρόλο της μοριακής κόλλας μεταξύ των συσσωματωμάτων που δημιουργούν τα άλλα δύο λιπίδια στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας. Επίσης η διαδικασία ανταλλαγής χοληστερολών μεταξύ των δύο στοιβάδων (*flip flop*) καθώς και η παρουσία μορίων χοληστερόλης στο κέντρο της διπλοστοιβάδας επηρεάζουν το δυναμικό μέσης δύναμης για το συγκεκριμένο σημείο εισόδου.



Σχήμα 4.2 Διάγραμμα Δυναμικού Μέσης Δύναμης για τις τρεις θέσεις εισόδου από κεραμίδια (CER), από ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), από χοληστερόλη (CHOL) καθώς και του δυναμικού μέσης δύναμης βάσης

Πέρα από τις προηγούμενες προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκε και άλλη μία κατά την οποία το μόριο ιμπουπροφένης εισήχθη στο στρώμα νερού το οποίο βρίσκεται εκατέρωθεν της διπλοστιβάδας και αφέθηκε να ισορροπήσει. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε προσομοίωση με τη μεθοδολογία από το σημείο στο οποίο είχε ισορροπήσει το μόριο της ιμπουπροφένης, το οποίο βρισκόταν μεταξύ της διεπιφάνειας διπλοστιβάδας και νερού. Στο διάγραμμα σχημ. 4.2 παρουσιάζεται το δυναμικό μέσης δύναμης της συγκεκριμένης προσομοίωσης (BASE) σε αντιπαραβολή με εκείνα των τριών προσομοιώσεων (CER, FFA, CHOL) που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το δυναμικό μέσης δύναμης της συγκεκριμένης προσομοίωσης παρουσιάζει μία πτώση αρχικά στη τιμή που οφείλεται στη περιοχή

4.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων - Συμπεράσματα

των πολικών κεφαλών των λιπιδίων, κατόπιν μία αύξηση η οποία οφείλεται στο τακτικό κομμάτι των αλυσίδων και τέλος για το κέντρο της διπλοστοιβάδας μία πτώση της τιμής.

4.2 Μελλοντικές Επεκτάσεις

Το επόμενο βήμα στη συγκεκριμένη μελέτη είναι η προσομοίωση αρχικά ενός μεγαλύτερου συστήματος. Αυξάνοντας τόσο τον αριθμό των λιπιδίων και των μορίων νερού όσο και του χρόνου της προσομοίωσης αυξάνεται και η ακρίβεια των εξαγόμενων μεγεθών ενδιαφέροντος. Ένα άλλο σημαντικό βήμα για την αύξηση της ακρίβειας θα μπορούσε να είναι ο υπολογισμός του δυναμικού μέσης δύναμης υπολογίζοντας το μέσο όρο από διαφορετικά τμήματα της διπλοστοιβάδας για τη κάθε θέση εισόδου. Με τη διαδικασία αυτή μειώνεται το όποιο σφάλμα κατά την επιλογή των σημείων και λαμβάνεται ένα πιο ακριβές δυναμικό μέσης δύναμης. Επιπρόσθετα, ενδιαφέρον θα είχε επίσης η μελέτη ενός συστήματος της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας της κεράτινης στοιβάδας το οποίο θα περιείχε περισσότερους τύπους κεραμιδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων καθώς στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένας τύπος κεραμιδίου (CER NS 24:0) και ένας τύπος ελεύθερου λιπαρού οξέος (FFA 24:0) καθώς τα συγκεκριμένα είναι τα πιο συχνά απαντώμενα στη κεράτινη στοιβάδα. Τέλος στη συγκεκριμένη εργασία έγινε μελέτη μίας συγκεκριμένης πρότυπης φαρμακευτικής ένωσης, της ιμπουπροφένης. Όμως δεκάδες πιθανές φαρμακευτικές ενώσεις έχουν προταθεί για διαδερμική χορήγηση σε ασθενείς και η μελέτη τους με χρήση υπολογιστικών προσομοιώσεων θα μπορούσε να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο τόσο θεωρητικής πρόβλεψης αλλά και προσφέροντας συμπληρωματικά δεδομένα σε πειράματα για την επεξήγηση των δεδομένων τους. Δεδομένου ότι η λειτουργία φραγμού που επιτελεί η κεράτινη στοιβάδα τους δέρματος δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη ακόμα και σήμερα.

Βιβλιογραφία

- [1] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, and Lubert Stryer. *Biochemistry*, chapter 2, 12, 26. W. H. Freeman, 2002.
- [2] Chinmay Das and Peter D. Olmsted. The physics of stratum corneum lipid membranes. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2072):20150126, jun 2016.
- [3] Bruno M. Castro, Manuel Prieto, and Liana C. Silva. Ceramide: A simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Progress in Lipid Research*, 54:53–67, apr 2014.
- [4] Chinmay Das, Massimo G. Noro, and Peter D. Olmsted. Simulation studies of stratum corneum lipid mixtures. *Biophysical Journal*, 97(7):1941–1951, oct 2009.
- [5] Chinmay Das, Massimo G. Noro, and Peter D. Olmsted. Lamellar and inverse micellar structures of skin lipids: Effect of templating. *Physical Review Letters*, 111(14), oct 2013.
- [6] J. Willard Gibbs. *Elementary Principles in Statistical Mechanics*. Dover Publications Inc, 1902.
- [7] James Wei, Morton M. Denn, John H. Seinfeld, Arup Chakraborty, and Jackie Ying. *Molecular Modeling and Theory in Chemical Engineering*. Elsevier Science, 2001.
- [8] John Dirk Walecka. *Fundamentals of Statistical Mechanics: Manuscript and Notes of Felix Bloch*. World Scientific Publishing Co Inc., 2000.
- [9] Kerson Huang. *Statistical Mechanics, 2nd Edition*. John Wiley & Sons, 1987.
- [10] Doros Theodorou and Arup Chakraborty. *Applied Molecular Theory for Chemical Engineers (Topics in Chemical Engineering)*. Oxford University Press, USA, 2004.
- [11] M. P. Allen and D. J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids (Oxford Science Publications)*. Clarendon Press, 1989.
- [12] Howard DeVoe. *Thermodynamics and Chemistry*. Prentice Hall, 2000.
- [13] Joseph M. Powers. *Lecture notes on thermodynamics*. University of Notre Dame, 2010.

Βιβλιογραφία

- [14] David Chandler. *Intro to modern statistical mechanics*. Oxford University Press, 1987.
- [15] Lindahl, , Abraham, Hess, and Van Der Spoel. *GROMACS 2019 Manual*, 2019.
- [16] Nicholas Metropolis and S. Ulam. The monte carlo method. *Journal of the American Statistical Association*, 44(247):335–341, sep 1949.
- [17] Nicholas Metropolis, Arianna W. Rosenbluth, Marshall N. Rosenbluth, Augusta H. Teller, and Edward Teller. Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6):1087–1092, jun 1953.
- [18] Berend Smit Daan Frenkel. *Understanding Molecular Simulation*. Elsevier LTD, Oxford, 2001.
- [19] Michael P. Allen. Introduction to molecular dynamics simulation. *NIC Series*, 23:1–28, 2004.
- [20] Donadio D. Bussi G. and Parrinello M. Canonical sampling through velocity-rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8):3684 – 3690, 1984.
- [21] Johannes Kästner. Umbrella sampling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(6):932–942, may 2011.
- [22] Glenn M. Torrie and John P. Valleau. Monte carlo free energy estimates using non-boltzmann sampling: Application to the sub-critical lennard-jones fluid. *Chemical Physics Letters*, 28(4):578–581, oct 1974.
- [23] G.M. Torrie and J.P. Valleau. Nonphysical sampling distributions in monte carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics*, 23(2):187–199, feb 1977.
- [24] Alan M. Ferrenberg and Robert H. Swendsen. New monte carlo technique for studying phase transitions. *Physical Review Letters*, 61(23):2635–2638, dec 1988.
- [25] Alan M. Ferrenberg and Robert H. Swendsen. Optimized monte carlo data analysis. *Physical Review Letters*, 63(12):1195–1198, sep 1989.
- [26] Shankar Kumar, John M. Rosenberg, Djamal Bouzida, Robert H. Swendsen, and Peter A. Kollman. THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. i. the method. *Journal of Computational Chemistry*, 13(8):1011–1021, oct 1992.
- [27] Benoît Roux. The calculation of the potential of mean force using computer simulations. *Computer Physics Communications*, 91(1-3):275–282, sep 1995.
- [28] Σ. Ν. Καρόζης. *Μελέτη της δομής και διεργασιών διάχυσης σε ναυοδομημένα υλικά με τεχνικές μοριακής προσομοίωσης*. PhD thesis, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2017.
- [29] Žofie Sovová, Karel Berka, Michal Otyepka, and Petr Jurečka. Coarse-grain simulations of skin ceramide NS with newly derived parameters clarify structure of melted phase. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(10):3988–3998, feb 2015.

- [30] Siewert J. Marrink, Alex H. de Vries, and Alan E. Mark. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(2):750–760, jan 2004.
- [31] Siewert J. Marrink, H. Jelger Risselada, Serge Yefimov, D. Peter Tieleman, and Alex H. de Vries. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *The journal of physical chemistry. B*, 111(27):7812–24, July 2007.
- [32] Siewert J. Marrink, Alex H. de Vries, Thad. A. Harroun, John Katsaras, and Stephen R. Wassall. Cholesterol shows preference for the interior of polyunsaturated lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 130(1):10–11, jan 2008.
- [33] Helgi I. Ingólfsson, Manuel N. Melo, Floris J. van Eerden, Clément Arnarez, Cesar A. Lopez, Tsjerk A. Wassenaar, Xavier Periole, Alex H. de Vries, D. Peter Tieleman, and Siewert J. Marrink. Lipid organization of the plasma membrane. *Journal of the American Chemical Society*, 136(41):14554–14559, oct 2014.
- [34] M. N. Melo, H. I. Ingólfsson, and S. J. Marrink. Parameters for martini sterols and hopanoids based on a virtual-site description. *The Journal of Chemical Physics*, 143(24):243152, dec 2015.
- [35] Tsjerk A. Wassenaar, Kristyna Pluhackova, Rainer A. Böckmann, Siewert J. Marrink, and D. Peter Tieleman. Going backward: A flexible geometric approach to reverse transformation from coarse grained to atomistic models. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(2):676–690, jan 2014.
- [36] Daxu Yin and Alexander D. MacKerell. Combined ab initio/empirical approach for optimization of lennard-jones parameters. *Journal of Computational Chemistry*, 19(3):334–348, feb 1998.
- [37] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins†. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18):3586–3616, apr 1998.
- [38] Jeffery B. Klauda, Bernard R. Brooks, Alexander D. MacKerell, Richard M. Venable, and Richard W. Pastor. An ab initio study on the torsional surface of alkanes and its effect on molecular simulations of alkanes and a DPPC bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(11):5300–5311, mar 2005.
- [39] Jeffery B. Klauda, Richard M. Venable, J. Alfredo Freites, Joseph W. O’Connor, Douglas J. Tobias, Carlos Mondragon-Ramirez, Igor Vorobyov, Alexander D. MacKerell, and Richard W. Pastor. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: Validation on six lipid types. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(23):7830–7843, jun 2010.
- [40] Zoe Cournia, A. C. Vaiana, G. M. Ullmann, and J. C. Smith. Derivation of a molecular mechanics force field for cholesterol. *Pure and Applied Chemistry*, 76(1):189–196, jan 2004.

Βιβλιογραφία

- [41] Sarah Lee, Alan Tran, and Jeffery B. Klauda. Developing CHARMM-compatible lipid parameters for ceramides and united atom chains. *Biophysical Journal*, 104(2):591a, jan 2013.
- [42] Shan Guo, Timothy C. Moore, Christopher R. Iacovella, L. Anderson Strickland, and Clare McCabe. Simulation study of the structure and phase behavior of ceramide bilayers and the role of lipid headgroup chemistry. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(11):5116–5126, oct 2013.
- [43] Richard M. Venable, Alexander J. Sodt, Brent Rogaski, Huan Rui, Elizabeth Hatcher, Alexander D. MacKerell, Richard W. Pastor, and Jeffery B. Klauda. CHARMM all-atom additive force field for sphingomyelin: Elucidation of hydrogen bonding and of positive curvature. *Biophysical Journal*, 107(1):134–145, jul 2014.
- [44] Pär Bjelkmar, Per Larsson, Michel A. Cuendet, Berk Hess, and Erik Lindahl. Implementation of the CHARMM force field in GROMACS: Analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(2):459–466, jan 2010.
- [45] William L. Jorgensen, Jayaraman Chandrasekhar, Jeffry D. Madura, Roger W. Impey, and Michael L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2):926–935, jul 1983.
- [46] William L. Jorgensen and Jeffry D. Madura. Temperature and size dependence for monte carlo simulations of TIP4p water. *Molecular Physics*, 56(6):1381–1392, dec 1985.
- [47] Mark E. Johnson, Daniel Blankschtein, and Robert Langer. Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: Lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(10):1162–1172, oct 1997.
- [48] M. A. Kiselev. Conformation of ceramide 6 molecules and chain-flip transitions in the lipid matrix of the outermost layer of mammalian skin, the stratum corneum. *Crystallography Reports*, 52(3):525–528, may 2007.
- [49] W. F. Drew Bennett, Justin L. MacCallum, Marlon J. Hinner, Siewert J. Marrink, and D. Peter Tieleman. Molecular view of cholesterol flip-flop and chemical potential in different membrane environments. *Journal of the American Chemical Society*, 131(35):12714–12720, sep 2009.
- [50] Theodore L. Steck and Yvonne Lange. How slow is the transbilayer diffusion (flip-flop) of cholesterol? *Biophysical Journal*, 102(4):945–946, feb 2012.
- [51] Chinmay Das, Massimo G. Noro, and Peter D. Olmsted. Fast cholesterol flip-flop and lack of swelling in skin lipid multilayers. *Soft Matter*, 10(37):7346–7352, 2014.
- [52] Peter Olmsted, Chinmay Das, and Massimo Noro. Cholesterol flip-flop and lack of swelling in stratum corneum lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 108(2):413a, jan 2015.

- [53] Mark James Abraham, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, and Erik Lindahl. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2:19–25, sep 2015.
- [54] William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14:33–38, 1996.
- [55] Jochen S. Hub, Bert L. de Groot, and David van der Spoel. g_wham—a free weighted histogram analysis implementation including robust error and autocorrelation estimates. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(12):3713–3720, dec 2010.

Filippos Bormpantonakis

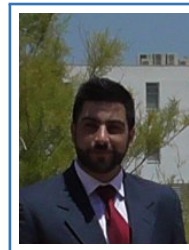
Curriculum Vitae

Ikoniou 6
14235 Nea Ionia Attikis
Athens, Greece

+30 698 117 3120

✉ philip.borbadonakis@gmail.com

in pborbad



Educational Background

2015

M. Sc. in Physical Chemistry, *University of Crete*, Heraklion, Greece.

2010

2015

B.Sc. in Chemistry, *University of Crete*, Heraklion, Greece.

Grade: 6.61/10

Theses

M. Sc. Thesis

TITLE Study of Ibuprofen penetration in biological membranes with Molecular Dynamics methods

ADVISORS Professor George E. Froudakis (University of Crete)
Dr. Michael E. Kainourgiakis (NCSR "Demokritos")

B. Sc. Thesis

TITLE Investigation of the structure and properties of lipid bilayers with Molecular Dynamics.

Grade: 10/10

ADVISORS Professor George E. Froudakis (University of Crete)
Dr. Michael E. Kainourgiakis (NCSR "Demokritos")

Research Experience

Research Assistant

2014
2016

Study of Ibuprofen penetration in biological membranes, with Molecular Dynamics methods, *NCSR "Demokritos"*, Athens, Greece.

SUPERVISOR Dr. Michael E. Kainourgiakis

Undergraduate Research Assistant

2014
2015

Investigation of the structure and properties of lipid bilayers with Molecular Dynamics, *NCSR "Demokritos"*, Athens, Greece.

SUPERVISOR Michael E. Kainourgiakis

Trainee

2014

Simulation of gas sorption in nanoporous materials, *NCSR "Demokritos"*, Athens, Greece.

SUPERVISOR Michael E. Kainourgiakis

Teaching Experience

Laboratory Assistant

2015

Introduction to the computers science, *University of Crete*, Heraklion, Greece.

SUPERVISOR Charalampos Triantafyllakis

Provided teaching assistance in the computer lab during the semester. The course included lectures on computer science basics, using Libre Office Suite and using LabView

Private Teaching

2014

Chemistry.

Sporadic private teaching to school & University students (children and adolescents)

Languages

Greek Native

English Fluent

First Certificate in English
University of Cambridge

Skills

Programming Python, C, Bash, L^AT_EX, HTML/CSS

Operating Systems Windows, Linux/GNU

Office Suites Microsoft Office, Libre Office

Scientific Programms Gromacs, Gaussian, VMD, Avogadro, Molden, LabView

Other Skills Communication, Organization, Leadership

Awards & Prizes

2016

PCCP Poster Prize: Modelling the penetration of ibuprofen through the lipid phase of stratum corneum, *S. Karozis, E. Mavroudakis, Ph. Borbadonakis, N. Papadimitriou, G. Charalambopoulou, M. Kainourgiakis*, Chania, Greece, Sep. 2016.

Seminars

2012

Summer School: "Oxide Materials for Electronic Applications-II", *Satelite to TCM 2012*, Organized by the "ORAMA IP".

Hersonisos, Crete, Greece

Publications

[Karozis S. N.(2015)]

Borbadonakis P. E. Charalambopoulou G. C. Kainourgiakis M. E. Karozis S. N., Papadimitriou N. Comparison of martini and atomistic forcefields for the study of ceramide bilayers. Mykonos, Greece, June 2015.

[S. Karozis(2016)]

Ph. Borbadonakis N. Papadimitriou G. Charalambopoulou M. Kainourgiakis S. Karozis, E. Mavroudakis. Modelling the penetration of ibuprofen through the lipid phase of stratum corneum. Chania, Greece, September 2016.

Additional Information

Licences

Driver's Licence A & B category

Organizations

2012

Vice-President, *Undergraduate Chemistry Students Union*, University of Crete, Heraklion, Greece.

2011

Secretary, *Undergraduate Chemistry Students Union*, University of Crete, Heraklion, Greece.

2011
2012

Undergraduate Students Representative, *General Assembly of Chemistry Department*, University of Crete, Heraklion, Greece.