



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU
I ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



Računarsko modelovanje strukture funkcionalizovanih nanočestica kao nosača antitumorskih lekova u fiziološkoj sredini

Doktorska disertacija

Mentori:
Dr Igor Balaž
Dr Branislav Jović

Kandidat:
Msc Marina Kovačević

Novi Sad, 2022

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ****КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Марина Ковачевић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Доктор Игор Балаж, ванредни професор, Пољопривредни факултет Доктор Бранислав Јовић, редовни професор, Природно-математички факултет
Наслов рада:	Рачунарско моделовање структуре функционализованих наночестица као носача антитуморских лекова у физиолошкој средини
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 161 Поглавља: 5 Референци: 117 Табела: 68 Слика: 76 Графикона (урачунати у слике) Прилога: 0
Научна област:	Хемија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Физичка хемија (Физичка и рачунарска хемија)
Кључне речи / предметна одредница:	Функционализоване наночестице, носачи антитуморских лекова, рачунарско моделовање, рачунарска хемија, моделовање кроз више скала

<p>Резиме на језику рада:</p>	<p>Функционализоване наночестице имају велики потенцијал у области доставе антитуморских лекова до жељеног ткива. Оне могу да мењају фармакокинетички и фармакодинамички профил лекова, чиме се повећава њихов терапеутски индекс. Међутим, упркос оствареном напретку и потенцијално великим предностима над класичном терапијом, само мали број третмана рака заснованих на наночестицама је одобрен. До сада су дизајниране многобројне иновативне, мултифункционалне и комплексне наночестице. Али, то се не одражава у дизајну нити броју клинички одобрених наносистема. Дизајн наносистема мора бити комплексан како би се савладале све препреке у организму које сам лек не може да превазиђе, међутим, то значајно отежава њихову карактеризацију и предвиђање њихове ефикасности. Сам експериментални приступ решавању овог проблема је дуготрајан и скуп. Такође, због неопходне просторне и временске резолуције за испитивање неких аспеката њиховог физиолошког ефекта, експериментални приступ у неким случајевима технички није могућ.</p> <p>Општи циљ ове докторске дисертације је развијање модела одабраних наносистема и рачунарско симулирање њихове структуре и физиолошког ефекта.</p> <p>Два главна, специфична циља овог истраживања била су:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Извођење теоријских прорачуна у циљу добијања корисних структурних и енергетских података о испитиваним функционализованим наночестицама злата; 2. Моделовање и симулирање њиховог физиолошког ефекта. <p>За истраживања су коришћени модели који обухватају више временских и просторних скала (ниво молекула - молекулска динамика, ниво ћелије - стохастичке реакционо-дифузионе реакције, ниво тумора - моделовање засновано на агентима).</p> <p>Општи закључак овог истраживања је да је теоријски приступ комплементаран експериментима, јер се на овај начин могу детаљно испитати аспекти које је немогуће експериментално тестирати. Симулације на више различитих нивоа могу повезати различите временске и просторне резолуције чиме се може дати прелиминарна процена ефикасности наноносача у физиолошким условима. Овај приступ је знатно бржи и захтева много мање ресурса од искључиво експерименталног приступа што може довести до повећања успешности и брзине довођења нових наносистема у клиничку праксу.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p>	<p>27.02.2020.</p>
<p>Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)</p>	

Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Др Силвана Андрић, редовни професор Природно-математичког факултета у Новом Саду. Члан: Др Душан Димић, доцент Факултета за Физичку хемију у Београду. Члан: Др Весна Деспотовић, ванредни професор Природно - математичког факултета у Новом Саду. Члан-ментор: Др Бранислав Јовић, редовни професор Природно - математичког факултета у Новом Саду. Члан-ментор: Др Игор Балаж, ванредни професор Пољопривредног факултета у Новом Саду.
Напомена:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OR CENTER

KEY WORD DOCUMENTATION

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Marina Kovačević
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Doctor Igor Balaž, associate professor at Faculty of Agriculture Doctor Branislav Jović, full professor at Faculty of Sciences
Thesis title:	Computational modelling of structure of functionalized nanoparticles as carriers for anticancer drugs in the physiological environment
Language of text (script):	Serbian (latin script)
Physical description:	Number of: Pages: 161 Chapters: 5 References: 117 Tables: 68 Illustrations: 76 Graphs (counted in illustrations) Appendices: 0
Scientific field:	Chemistry
Scientific subfield (scientific discipline):	Physical chemistry (Physical and Computational Chemistry)
Subject, Key words	Functionalized nanoparticles, anticancer drug carriers, computational modelling, computational chemistry, multiscale modelling
Abstract in English language:	Functionalized nanoparticles hold great potential as antitumor drug delivery carriers. They can change the pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of carried drugs, which increases their therapeutic index. However, despite the advances and potentially great advantages over conventional therapy, only a small number of nanoparticle-based cancer treatments have been approved. The nanosystem design must be complex to overcome all the obstacles in the body. However, this significantly complicates their characterization as well as the prediction of their efficacy. Applying only the experimental approach to solve this problem is time-consuming and expensive. Also, due to the spatial and temporal resolution necessary to investigate some aspects of the physiological effect, an experimental approach, in some cases, is technically not possible.

	<p>The general goal of this thesis is to develop models of selected nanosystems, and simulate their structure and physiological effect.</p> <p>The two main, specific objectives of this research were:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Obtaining useful structural and energetic data of the examined functionalized gold nanoparticles by theoretical calculations; 2. Modeling and simulation of their physiological effect. <p>Models used in this thesis include several temporal and spatial scales (molecule level - molecular dynamics, cell level - stochastic reaction-diffusion reactions, tumor level - agent-based modeling).</p> <p>The general conclusion of this research is that the theoretical approach is complementary to experiments. This way we can obtain detailed information on aspects that are impossible to test experimentally. Simulations of several different levels can link different temporal and spatial resolutions, which can provide a preliminary assessment of the nanosystem's efficacy in physiological conditions. This approach is much faster and requires much less resources than the purely experimental approach, which can increase efficiency and speed of bringing new nanosystems into clinical practice.</p>
Accepted on Scientific Board on:	27.02.2020
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Dr. Silvana Andrić, full professor at Faculty of Sciences, Novi Sad</p> <p>Member: Dr. Dušan Dimić, docent at Faculty of Physical Chemistry, Belgrade</p> <p>Member: Dr. Vesna Despotović, associate professor at Faculty of Sciences, Novi Sad</p> <p>Member: Dr. Branislav Jović, full professor at Faculty of Sciences, Novi Sad</p> <p>Member: Dr. Igor Balaž, associate professor at Faculty of Agriculture, Novi Sad</p>
Note:	

Ova doktorska disertacija je rađena u okviru projekta FET Open pod nazivom "Evolvable platform for programmable nanoparticle-based cancer therapies - EVO-NANO".

Zahvaljujem se mentorima dr Igoru Balažu i dr Branislavu Joviću na savetima, pomoći, podršci i što su mi omogućili da radim ono što najviše volim.

Dr Branislavu Joviću se zahvaljujem što me je uveo u svet fizičke hemije, prvi pružio priliku da se bavim naukom i ohrabrivao da radim na svojim idejama. Zahvalna sam što sam rad u laboratoriji broj 19. doživljavala više kao zabavu, a ne kao posao (iako se ozbiljno radilo). Takođe mu se zahvaljujem na zaraznom naučnom entuzijazmu, na podršci i bodrenju pri ulasku u nove oblasti.

Dr Igoru Balažu se neizmerno zahvaljujem na svim pruženim prilikama i na bezbroj naučenih stvari zbog kojih sam na putu da postanem naučnik kakav želim budem. Biti deo njegove grupe je privilegija i zadovoljstvo. Zahvalna sam na podršci, poverenju i razumevanju kada mi je bilo najpotrebnije, što sam tretirana kao ravnopravni kolega čije se ideje uvek saslušaju i čije se mišljenje uzima u obzir.

Zahvalnost dugujem i dr Silvani Andrić, dr Vesni Despotović i dr Dušanu Dimiću na korisnim savetima prilikom izrade disertacije.

Zahvalna sam i na saradnji sa istraživačkim grupama u okviru EVO-NANO projekta (UB, UWE, VHIR, AAU, IMDEA, i kompaniji ProChimia Surfaces).

Želela bih da se zahvalim Tari Petrić na značajnoj pomoći u toku izrade eksperimentalnog dela.

Takodje želim da se zahvalim i dr Domeniku Marsonu koji me je naučio osnovama molekulske dinamike i tokom mog rada davao niz korisnih saveta.

Zahvaljujem se i svojim kolegama sa katedre na strpljenju i pronalaženju odgovora na sva moja pitanja (kojih je bilo prilično puno).

Zahvalna sam svojoj porodici, posebno Ivani Kovačević i Srđanu Bjedovu koji su uvek bili tu za mene, od pomoći oko spremanja ispita do otvaranja vrata svog doma, više puta, bez pitanja.

Posebnu zahvalnost dugujem Bojanu Eriću, na beskrajnoj, bezuslovnoj podršci, razumevanju i toleranciji, što je svakog dana strpljivo slušao prepričavanje svakog eksperimenta i rezultata, svakog rada i svake ideje. Najviše sam mu zahvalna što je verovao u mene uvek, i kada ja nisam.

Marina Kovačević

Sadržaj

Rezime	1
Summary	2
Lista skraćenica	3
Uvod i definisanje problema istraživanja	4
1. Ciljevi istraživanja	6
2. Pregled literature	8
2.1. Upotreba nanočestica kao nosača lekova	8
2.2. Eksperimentalna karakterizacija nanosistema i njeni nedostaci	9
2.3. Računarski pristup	10
2.3.1. Nivo tkiva - generisanje virtuelnog tumora	12
2.3.1.1. Matične ćelije raka i vaskulatura	12
2.3.1.2. Opšti opis modela rasta tumora	13
2.3.2. Nivo ćelije	15
2.3.3. Molekulska dinamika	16
3. Eksperimentalni deo - Metodologija	21
3.1. Opšta procedura pripreme sistema i simulacija molekulske dinamike	21
3.1.1. Nanočestice zlata	21
3.1.2. Priprema za funkcionalizaciju nanočestice zlata	22
3.1.2.1. Priprema strukture manjih fragmenata	23
3.1.2.2. Priprema strukture celog liganada i početak parametrizacije	25
3.1.2.3. Konačna parametrizacija celog liganada	28
3.1.3. Spajanje elemenata strukture u jedan sistem	29
3.1.4. Priprema celog sistema i njegova parametrizacija	31
3.1.4.1. Model vode	33
3.1.4.2. Joni	33
3.1.5. Procedura simulacije	34
3.1.5.1. Minimizacija	34
3.1.5.2. Zagrevanje i relaksacija gustine	35
3.1.5.3. Ekvilibracija	38
3.1.5.4. Produkcija	40
3.1.5.5. Puštanje simulacija	41
3.2. Analiza podataka	43
3.2.1. Funkcija radijalne distribucije (RDF - Radial distribution function)	45
3.2.2. Veličina funkcionalizovane nanočestice	46
3.2.3. Prosečna debljina monosloja	47
3.2.4. Florijev radijus i konformacija monosloja	47

3.2.5. Površina dostupna rastvaraču (SASA - Solvent Accessible Surface Area)	50
3.2.6. Izloženost leka / Dostupnost leka	50
3.2.7. Intramolekulske interakcije	51
3.2.8. Energija sistema	51
3.3. Procedura pripreme specifičnih sistema i simulacija odabranih funkcionalizovanih nanočestica	52
3.3.1. Priprema sistema za ispitivanje strukture nanočestica zlata funkcionalizovanih homogenim monoslojem u vodenom rastvoru	52
3.3.2. Priprema sistema za ispitivanje uticaja promene koncentracije liganada na strukturu nanočestice funkcionalizovane heterogenim monoslojem u vodenom rastvoru	54
3.3.3. Priprema sistema za ispitivanje stabilnosti funkcionalizovane nanočestice pod različitim uslovima	55
3.3.4. Priprema sistema za ispitivanje uticaja veličine, hidrofobnosti i koncentracije leka u funkcionalizovanom monosloju na strukturu nanočestice u vodenoj sredini	56
3.3.5. Uticaj dužine pozadinskog liganda na strukturu	57
3.3.6. Uticaj različitih konfiguracija monosloja na strukturu funkcionalizovanih nanočestica	59
3.3.7. Uticaj veličine jezgra od zlata na strukturu funkcionalizovanih nanočestica	60
3.3.8. Fluorescentne nanočestice kao model sistemi u in vitro i in vivo ispitivanjima	61
3.4. Ispitivanje fiziološkog efekta stohastičkim reakciono-difuzionim simulacijama	62
3.4.1. Virtuelni tumor i isečci tumora koji predstavljaju realistične histološke scenarije	62
3.4.2. Ispitivanje fiziološkog efekta Kvinolinol nanosistema	62
3.4.3. Najmanja injektovana doza i važnost parametra dostupnosti leka - primer Niklozamid sistema	63
3.4.4. Relativan uticaj parametara nanosistema na krajnji fiziološki efekat	64
3.5. Rezistentnost tumora i optimizacija tretmana korišćenjem veštačke inteligencije	65
3.5.1. Arhitektura modela	66
3.5.2. Podešavanje simulacija	68
3.5.2.1. Homogeni tumor koji ne evoluira	70
3.5.2.2. Rezistencija tumora	70
3.5.2.3. Tumor koji raste	71
4. Rezultati i diskusija	72
4.1. Simulacije molekulske dinamike	72
4.1.1. Ispitivanje uticaja veličine, hidrofobnosti i koncentracije leka u funkcionalizovanom monosloju na strukturu nanočestica u vodenoj sredini	72
4.1.2. Ispitivanje strukture zlatnih nanočestica funkcionalizovanih homogenim monoslojem	80
4.1.3. Ispitivanje uticaja promene koncentracije liganada na strukturu nanočestica funkcionalizovanih heterogenim monoslojem	87
4.1.4. Ispitivanje uticaja dužine pozadinskog liganda na strukturu nanočestica	96
4.1.5. Ispitivanje uticaja različitih konfiguracija monosloja na strukturu funkcionalizovanih nanočestica	101

4.1.6. Ispitivanje uticaja veličine jezgra od zlata na strukturu funkcionalizovanih nanočestica	106
4.1.7. Ispitivanje stabilnosti funkcionalizovanih nanočestica pod različitim uslovima	110
4.1.8. Ispitivanje intramolekulskih interakcija	114
4.1.8.1. Zastupljenost interakcija sa promenom koncentracije liganada u sistemu	114
4.1.8.2. Poređenje interakcija među nanosistemima koji nose različite lekove pri istim koncentracijama	117
4.1.9. Fluorescentne nanočestice kao model sistemi u in vitro i in vivo ispitivanjima	118
4.2. Ispitivanje fiziološkog efekta stohastičkim reakciono-difuzionim simulacijama	123
4.2.1. Ispitivanje fiziološkog efekta Kvinolinol nanosistema	123
4.2.2. Najmanja injektovana doza i važnost parametra dostupnosti leka - primer Niklozamid sistema	130
4.2.2.1. Određivanje minimalne injektovane doze sa apsolutnom koncentracijom leka u sistemu	130
4.2.2.3. Testiranje efikasnosti određene minimalne injektovane doze sa izračunatim procentom dostupnog leka u sistemu	134
4.2.2.4. Određivanje minimalne injektovane doze sa izračunatim procentom dostupnog leka u sistemu	136
4.2.3. Relativan uticaj parametara nanosistema na krajnji fiziološki efekat	139
4.3. Rezistentnost tumora i optimizacija tretmana korišćenjem veštačke inteligencije	140
4.3.1. Homogeni tumor koji ne evoluiru	141
4.3.2. Rezistentnost tumora	142
4.3.3. Tumor koji raste	147
5. Zaključak	149
Reference	152
Biografija	158
Bibliografija	159

Rezime

Funkcionalizovane nanočestice imaju veliki potencijal u oblasti dostave antitumorskih lekova do željenog tkiva. One mogu da menjaju farmakokinetički i farmakodinamički profil lekova, čime se povećava njihov terapijski indeks. Međutim, uprkos ostvarenom napretku i potencijalno velikim prednostima nad klasičnom terapijom, samo mali broj tretmana raka zasnovanih na nanočesticama je odobren. Do sada su dizajnirane mnogobrojne inovativne, multifunkcionalne i kompleksne nanočestice. Ali, to se ne odražava u dizajnu niti broju klinički odobrenih nanosistema. Dizajn nanosistema mora biti kompleksan kako bi se savladale sve prepreke u organizmu koje sam lek ne može da prevaziđe, međutim, to značajno otežava njihovu karakterizaciju i predviđanje njihove efikasnosti. Sam eksperimentalni pristup rešavanju ovog problema je dugotrajan i skup. Takođe, zbog neophodne prostorne i vremenske rezolucije za ispitivanje nekih aspekata njihovog fiziološkog efekta, eksperimentalni pristup u nekim slučajevima tehnički nije moguć.

Opšti cilj ove doktorske disertacije je razvijanje modela odabranih nanosistema i računarsko simuliranje njihove strukture i fiziološkog efekta.

Dva glavna, specifična cilja ovog istraživanja bila su:

1. Izvođenje teorijskih proračuna u cilju dobijanja korisnih strukturnih i energetskih podataka o ispitivanim funkcionalizovanim nanočesticama zlata;
2. Modelovanje i simuliranje njihovog fiziološkog efekta.

Za istraživanja su korišćeni modeli koji obuhvataju više vremenskih i prostornih skala (nivo molekula - molekulska dinamika, nivo ćelije - stohastičke reakciono-difuzione reakcije, nivo tumora - modelovanje zasnovano na agentima).

Opšti zaključak ovog istraživanja je da je teorijski pristup komplementaran eksperimentima, jer se na ovaj način mogu detaljno ispitati aspekti koje je nemoguće eksperimentalno testirati. Simulacije na više različitih nivoa mogu povezati različite vremenske i prostorne rezolucije čime se može dati preliminarna procena efikasnosti nanonosača u fiziološkim uslovima. Ovaj pristup je znatno brži i zahteva mnogo manje resursa od isključivo eksperimentalnog pristupa što može dovesti do povećanja uspešnosti i brzine dovođenja novih nanosistema u kliničku praksu.

Summary

Functionalized nanoparticles hold great potential as antitumor drug delivery carriers. They can change the pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of carried drugs, which increases their therapeutic index. However, despite the advances and potentially great advantages over conventional therapy, only a small number of nanoparticle-based cancer treatments have been approved. The nanosystem design must be complex to overcome all the obstacles in the body. However, this significantly complicates their characterization as well as the prediction of their efficacy. Applying only the experimental approach to solve this problem is time-consuming and expensive. Also, due to the spatial and temporal resolution necessary to investigate some aspects of the physiological effect, an experimental approach, in some cases, is technically not possible.

The general goal of this thesis is to develop models of selected nanosystems, and simulate their structure and physiological effect.

The two main, specific objectives of this research were:

1. Obtaining useful structural and energetic data of the examined functionalized gold nanoparticles by theoretical calculations;
2. Modeling and simulation of their physiological effect.

Models used in this thesis include several temporal and spatial scales (molecule level - molecular dynamics, cell level - stochastic reaction-diffusion reactions, tumor level - agent-based modeling).

The general conclusion of this research is that the theoretical approach is complementary to experiments. This way we can obtain detailed information on aspects that are impossible to test experimentally. Simulations of several different levels can link different temporal and spatial resolutions, which can provide a preliminary assessment of the nanosystem's efficacy in physiological conditions. This approach is much faster and requires much less resources than the purely experimental approach, which can increase efficiency and speed of bringing new nanosystems into clinical practice.

Lista skraćenica

API - ligand koji nosi lek
AuNP - nanočestica zlata
CC - diferencirane ćelije raka
CSC - matične ćelije raka
CT - izmerena debljina monosloja
DLS - dinamičko rasejanje svetlosti
DOX - Doksorubicin
GEM - Gemcitabin
MEP - Molekularni Elektrostatički Potencijal
NCL - Niklozamid
NHQ - Kvinolinol vezan preko azota
OQL - Kvinolinol vezan preko kiseonika
PAN - Panobinostat
PEG - Polietilenglikol
PL - pozadinski ligand koji služi za modifikovanje fizičko-hemijskih parametara nanosistema
RDF - Funkcija radijalne distribucije (Radial Distribution Function)
Rs-n - Teorijska debljina monosloja
SASA - površina dostupna rastvaraču
TL - tip liganda
WYC - Vik-215
ZIL - Zileuton

Uvod i definisanje problema istraživanja

Konvencionalna hemioterapija je jedna od najčešće korišćenih onkoloških terapija. Klasični, odobreni anitumorski lekovi su pokazani kao efikasni i pokazano je da hemioterapija funkcioniše na različitim tipovima tumora. Međutim, onkološki pacijenti koji primaju klasičnu hemioterapiju moraju da prolaze i kroz niz problema koje takva terapija prouzrokuje. Ona, osim ćelija raka, takođe oštećuje i zdrave ćelije i dovodi do velikog broja nuspojava [1]. Nuspojave kao što su mučnina, povraćanje i opadanje kose se javljaju skoro trenutno. Takođe, svi organi tela mogu biti pogođeni, uključujući vitalne organe, kao što su srce, pluća i mozak što može značajno da smanji maksimalnu primenjenu dozu prilikom tretmana. Istovremeno, može doći do rezistencije na korišćeni lek [2]. Takve nuspojave su često opasne po život, a čak i u slučaju blažih nuspojava, simptomi često značajno umanjuju kvalitet života pacijenata [3].

Na rešavanju ovog problema se intenzivno radi. Istražuju se nova antitumorska jedinjenja, dizajniraju se novi, selektivniji lekovi itd. Međutim, poboljšanja su često mala, a dodatno, vreme neophodno da se novi lek dovede od laboratorije do pacijenata je izuzetno dugo, i u proseku je neophodno od 10-12 godina [4]. Iz perspektive pacijenta kome treba terapija taj period je previše dug.

U izveštaju iz 2014. godine, Svetska zdravstvena organizacija je objavila podatke o incidenci raka i smrtnosti [2,5]. Na svetskom nivou, bilo je 12 miliona novih slučajeva i 8.2 miliona smrti dijagnostikovanih pacijenata. Ako se ovi podaci ekstrapoliraju na period razvoja novog leka (10 godina), broj smrtnih slučajeva raste do 80 miliona. Ovi podaci takođe upućuju na to da standardni pristup lečenju raka nije dovoljno efikasan [2,6,7].

Drugi pristup rešavanju ovog problema je poboljšanje dostave lekova korišćenjem posebno dizajniranih nosača [8-10]. S obzirom na to da se na ovaj način koriste već odobreni, anitumorski lekovi, period razvijanja ovakvih sistema u proseku traje 2-4 godine [4]. U ovom polju napravljen je novi napredak razvojem nosača baziranih na nanočesticama čime se postiže efikasniji prenos lekova i smajuju neželjeni efekti. Nekoliko kliničkih ispitivanja je pokazalo da koncept nanosača za antitumorske lekove ima bolje kliničke efekte u tretmanu različitih tipova raka od klasične terapije [11].

Funkcionalizovane nanočestice imaju potencijal da menjaju farmakokinetički i farmakodinamički profil lekova, čime se povećava njihov terapijski indeks [12]. Dakle, nanočestice mogu da promene biodistribuciju lekova omogućavajući im da se akumuliraju na mestu tumora [13]. Međutim, uprkos ostvarenom napretku i potencijalno velikim prednostima nad klasičnom terapijom, samo mali broj tretmana raka zasnovanih na nanočesticama je odobren.

Do sada su dizajnirane mnogobrojne inovativne, multifunkcionalne i kompleksne nanočestice [9, 14-19]. Ali, kao što je pomenuto, to se ne odražava na dizajn niti broj klinički odobrenih nanosistema [20]. Postoji veliki broj mogućih objašnjenja koja pokrivaju različite faze u njihovom razvoju - od početnog pristupa dizajnu do složenih, skupih i dugotrajnih *in vitro* i *in vivo* ispitivanja. *In vivo* sudbina molekula je određena njegovim fizičko-hemijskim i biohemijskim

osobinama. U slučaju nanosistema (nanonoslač + lek), ove osobine zavise od tipa nanočestica, molekula izabranih za funkcionalizaciju (ligandi), i odabranog leka. Detaljno razumevanje strukture svakog elementa je kritično jer direktno utiče na njihove interakcije, a samim tim i na strukturu i stabilnost finalnog nanosistema. Međutim, ovu vrstu informacija je izuzetno teško dobiti eksperimentalnim putem. Većina eksperimentalnih metoda nije dovoljno precizna jer im nedostaju dovoljna vremenska i prostorna rezolucija neophodna za istraživanje dinamičkih promena i ponašanje tako malih i složenih sistema [21].

Ovaj raskorak između nanoskale (vremenske i prostorne) i makroskopskih efekata može biti premošćen korišćenjem računarskih simulacija. Modelovanjem sistema kroz više različitih skala (koje su često nedostižne eksperimentalno) može se doći do informacija o njihovoj efikasnosti, kao i informacija o njihovoj strukturi i osobinama što može dati korisne smernice za poboljšanje njihovog dizajna. Takođe, ubrzavanje procesa ispitivanja nanosistema, u ovom pristupu najviše zavisi od dostupnih računarskih resursa. Pored skraćivanja vremena dovođenja novih tretmana do pacijenata, takođe se smanjuju i troškovi razvijanja.

1. Ciljevi istraživanja

Opšti cilj ove doktorske disertacije je razvijanje modela odabranih nanosistema i računarsko simuliranje njihove strukture i fiziološkog efekta.

Dva glavna, specifična cilja ovog istraživanja bila su:

1. Dobijanje korisnih strukturnih i energetskih podataka i formulisanje smernica za sintezu funkcionalizovanih nanočestica zlata, izvođenjem teorijskih proračuna;
2. Modelovanje i simuliranje fiziološkog efekta ispitivanih funkcionalizovanih nanočestica zlata.

U istraživanju su korišćeni modeli koji obuhvataju više vremenskih i prostornih skala; molekulska dinamika za modelovanje struktura nanosistema na nivou molekula, stohastičke reakciono-difuzione reakcije za modelovanje efekta nanosistema na pojedinačne ćelije, dok je za istraživanje efekta na ceo tumor korišćeno modelovanje zasnovano na agentima.

U okviru prvog cilja korišćena je metoda molekulske dinamike za ispitivanje različitih uticaja na strukturu nanosistema u realnim uslovima. Ova metoda omogućava rezoluciju od jednog atoma i pruža uvid u hemijske detalje koje je teško ili čak nemoguće dobiti eksperimentalno. Dobijeni rezultati treba da pruže korisne smernice za sintezu novih i efikasnijih nanonosača. Kako bi se došlo do njih, u okviru ovog dela postavljeni su manji ciljevi:

- Ispitivanje strukture homogeno funkcionalizovanih nanosistema radi dobijanja referentnih vrednosti koje treba da omoguće kasniju izolaciju specifičnih efekata kao i jasniji uticaj uvođenja novih tipova liganada u sistem;
- Ispitivanje uticaja veličine i hidrofobnosti nošenog leka na strukturu nanosistema;
- Ispitivanje uticaja promene koncentracije liganada u sistemu na strukturu heterogeno funkcionalizovanih nanosistema;
- Ispitivanje uticaja dužine pozadinskog liganda na strukturu heterogeno funkcionalizovanih nanosistema;
- Ispitivanje uticaja različitih početnih konfiguracija na krajnju uravnoteženu strukturu heterogeno funkcionalizovanih nanosistema;
- Ispitivanje uticaja veličine jezgra nanočestice na strukturu heterogeno funkcionalizovanih nanosistema;
- Ispitivanje stabilnosti nanosistema pri različitim uslovima što treba da da uvid u praktičnost njihove sinteze i kasnije, fiziološkog efekta;
- Ispitivanje intramolekulskih interakcija nanosistema radi dobijanja dodatnog uvida uticaja strukture samih liganada na njihovu strukturu;
- Ispitivanje korišćenja fluorescentnih nanočestica kao model sistema u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima.

Visoka rezolucija metoda molekulske dinamike omogućava dobijanje uvida u detalje strukture nanosistema nedostupne eksperimentima, a time i formulisanje korisnih smernica za dizajn novih nanosistema. Međutim, detalji strukture nanosistema sami po sebi nisu dovoljni za realnu procenu njihovog fiziološkog efekta, koji se ne može ispitati korišćenjem ovako visoke rezolucije.

U okviru drugog cilja disertacije, se zbog gore navedenog, fokus prebacuje na veće prostorne i vremenske skale, odnosno, na rezoluciju jedne ćelije i rezoluciju celog tkiva. U okviru drugog cilja izdvojene su **dve tematske celine**:

1. Korišćenje realnih parametara za ispitivanje fiziološkog efekta specifičnih nanosistema;
2. Testiranje novog pristupa dizajnu novih nanosistema.

U okviru prve celine postavljeni su sledeći pojedinačni ciljevi:

- Modelovanje i ispitivanje fiziološkog sistema Kvinolinol sistema koji je takođe i eksperimentalno okarakterisan radi validacije modela;
- Određivanje najmanje injektovane doze na osnovu parametara nanosistema i parametara korišćenog leka;
- Ispitivanje važnosti parametra dostupnosti leka za krajnji fiziološki efekat nanosistema;
- Ispitivanje relativnog uticaja različitih parametara na krajnji fiziološki efekat.

Iako se na ovaj način dobijaju korisni detalji koji treba da omoguće lakši i efikasniji dizajn nanosistema, postoji izuzetno veliki broj različitih parametara i njihovih kombinacija koje utiču na krajnji fiziološki efekat. Ispitivanje na ovaj način toliko velikog broja mogućnosti bi bilo izuzetno skupo, nepraktično i trajalo bi izuzetno dugo. Zbog toga će se u okviru drugog pristupa ispitati i korišćenje evolutivnih algoritama veštačke inteligencije sa modelovanjem zasnovanom na agentima. **U okviru druge celine** postavljeni su naredni pojedinačni ciljevi:

- Ispitivanje rezistentnosti tumora i optimizacija tretmana korišćenjem veštačke inteligencije;
- Ispitivanje tretmana na homogenom tumoru koji evoluira/ne evoluira;
- Ispitivanje tretmana na heterogenom tumoru koji evoluira/ne evoluira;
- Ispitivanje rezistentnosti tumora;
- Ispitivanje uticaja tumora koji raste.

Dobijeni podaci bi u širem smislu predstavljali doprinos naučnoj zajednici koja se bavi ovom multidisciplinarnom tematikom. Takođe, u okviru projekta H2020 FET Open EVO-NANO (u okviru kog je rađena disertacija) kreirana je platforma gde je integrisano više različitih modela i skala. Integrisana platforma treba da služi kao model za brzu procenu fiziološke aktivnosti različitih nanosistema. Dugoročno, rezultati ove disertacije treba da doprinesu bržem razvoju novih nanosistema, bržoj proceni njihove aktivnosti, odnosno bržem dovođenju ovih nanosistema od laboratorije do pacijenta.

Među širokim spektrom različitih tipova nanočestica, nanočestice zlata (AuNP) se u velikoj meri koriste za dostavu lekova zbog svojih poželjnih svojstava [22,23] i one su bile fokus ove disertacije. Odabrane su jer su inertne i netoksične. Iako se mogu sintetisati u različitim oblicima i veličinama, i funkcionalizovati (karakteristike njihove površine omogućavaju vezivanje većeg broja liganada i više tipova liganda). Vezivanje liganada na površinu stvara monosloj koji menja fizičko-hemijska svojstva površine jezgra od zlata. Prema tome, ponašanje funkcionalizovanih zlatnih nanočestica ne određuje jezgro, već svojstva monosloja. Korišćenjem molekula sa specifičnim karakteristikama, svojstva funkcionalizovane nanočestice zlata se mogu podesiti da bi se iskontrolisali biokompatibilnost i biodistribucija [24-27].

2. Pregled literature

U ovoj sekciji biće opisan pregled vladajućih stavova i shvatanja u literaturi o upotrebi nanočestica kao nosača lekova, njihovoj eksperimentalnoj karakterizaciji, kao i objašnjenje korišćenih metoda. Razmatranja predstavljena u ovom delu su objavljena u knjizi *Cancer, Complexity, Computation* (poglavlje *The Role of Molecular Dynamics Simulations in Multiscale Modeling of Nanocarriers for Cancer Treatment*)[28].

2.1. Upotreba nanočestica kao nosača lekova

Kao što je pomenuto u uvodu, odobreni anitumorski lekovi, iako efikasni, imaju mnoštvo nedostataka. Neki od njih su da ovi lekovi nisu dovoljno rastvorni, brzo se izbace iz krvotoka, budu eliminisani dejstvom imunog sistema, ne mogu da prođu ćelijsku membranu, nisu dovoljno specifični, itd. [1]. Kada se nađu u krvotoku, moraju da savladaju veliki broj prepreka kako bi stigli do ciljnog mesta i obavili svoju funkciju [29]. Pored toga, distribucija lekova u organizmu može biti ograničena njihovim fizičko-hemijskim svojstvima [29-31]. To znači da samo mali procenat injektovane doze stiže do tumora, dok se ostatak distribuira u drugim organima, utičući na zdrave ćelije i prouzrokujući ozbiljne nuspojave. Tačna količina leka koja stiže do ciljanog mesta zavisi od više parametara: fizičko-hemijskih osobina samog leka, zdravstvenog stanja pacijenta, tipa tumora itd. Procenjeno je da su vrednosti u opsegu od 0,01-0,1 % injektovane doze [32,33]. Kako bi se postigla zadovoljavajuća efikasnost, neophodne su veće doze i veća učestalost administracije lekova. Ali ovo je, evidentno, daleko od optimalnog rešenja. Ovaj pristup dovodi do još ozbiljnijih nuspojava koja se javljaju usled nespecifičnosti i neselektivnosti ovih lekova.

S druge strane, pokazano je da upotreba nanočestica kao nosača ima potencijal da prevaziđe ove prepreke: njihovom upotrebom povećava se rastvorljivost celog sistema, sistemi su stabilni u organizmu, lekovi su zaštićeni od biorazgradnje, produžava se vreme provedeno u cirkulaciji, itd. [24-27]. Dodatno, one mogu biti funkcionalizovane tako da otpuštaju lekove pod tačno određenim uslovima, mogu biti funkcionalizovane ligandima za aktivno ciljanje receptora na ćelijama raka, mogu da nose velike količine leka, ili više različitih lekova za kombinovanu terapiju, itd. [34,35]. Njihova mala veličina i jedinstvene karakteristike nude širok spektar mogućnosti za prevazilaženje prepreka sa kojima se suočavaju sami lekovi. Takođe su veoma raznovrsne. Nosači mogu biti organski (lipozomi, dendrimeri, polimeri itd.), ili neorganski (zlatu, srebro, silicijum itd.) Mogu lako da se funkcionalizuju različitim molekulima što pruža mogućnost za fino podešavanje njihovih svojstava, što povećava kontrolu nad njihovom biokompatibilnošću i biodistribucijom. Takođe, pokazano je da su nanočestice uopšteno manje sistemski toksične u poređenju sa klasičnim formulacijama, uglavnom zbog mogućnosti modifikovanja farmakokinetičkih i farmakodinamičkih karakteristika lekova koje nose [36].

2.2. Eksperimentalna karakterizacija nanosistema i njeni nedostaci

Da bi se nanosistem (nanočestica + lek) bezbedno ubrizgao u krvotok, on mora biti dovoljno stabilan u takvom okruženju kako bi ostao u cirkulaciji dovoljno dugo. Međutim, stabilnost mora biti fino podešena tako da se lek može osloboditi iz nanosistema kada dođe na ciljno mesto [37]. Ako nanosistem nije dovoljno stabilan, lek se može prerano osloboditi i dovesti do toksičnih efekata. S druge strane, ako je previše stabilan, lek neće biti otpušten na ciljnom mestu. Lek takođe treba da bude zaštićen od biorazgradnje, imunog sistema i interakcija sa drugim molekulima. Ove interakcije mogu izmeniti i strukturu i predviđenu funkciju nanosistema. Da bi se postigli ovi ciljevi, neophodno je detaljno znanje o tome kako nanosistem specifičnih fizičko-hemijskih svojstava interaguje sa fiziološkom sredinom; kako promene njegove strukture utiču na fiziološki odgovor; koje osobine ili kombinaciju osobina ligandi za funkcionalizaciju treba da imaju da bi se formirala željena struktura, tako da nanosistem interaguje sa okruženjem na način na koji smo predvideli. S obzirom na to da se ubrizgava više od jedne funkcionalizovane nanočestice (nanosistema), treba da se razmotri i njihovo kolektivno ponašanje.

Nije dovoljno da nanosistemi samo dopru do tumorskih ćelija. Takođe treba da uđu u ćelije, prođu kroz ćelijsku membranu i isporuče lek na ciljnom mestu [20]. Da bi se to postiglo, neophodno je razumevanja interakcija nanosistema sa ćelijama. Na primer, koliko njih može prodreti u tumor? Koliko duboko ulaze u tumor? Treba da se uzme u obzir i to da su tumori heterogene strukture koje sadrže više od jednog tipa ćelija i da signalizacija u svakom od tih tipova ćelija ima specifičan način interakcije sa nanosistemom.

I na kraju, otpušteni lekovi treba uspešno da zaustave dalji rast tumora. Tu se postavljaju pitanja da li lekovi uspešno ubijaju tumorske ćelije i koliko ćelija? Ovo su suštinska pitanja za prilagođavanje doze i učestalosti primene. Kada se dobiju sve ove informacije, može se vratiti na početak i „programirati” ponašanje nanosistema modifikujući njihovu veličinu, oblik i hemiju površine. Ali kao što je pomenuto u uvodu, eksperimentalno dobijanje ovakvih informacija je teško, a nekad i nemoguće.

Na primer, jedan od prvih koraka u procesu ispitivanja nanosistema jeste određivanje njihovih fizičko-hemijskih karakteristika (veličine, sastava, stabilnosti i svojstava površine, itd.) [37]. Većina eksperimentalnih metoda nije dovoljno precizna za ovakva određivanja jer im nedostaje neophodna rezolucija [21]. Čak i određivanje veličine nanosistema, što je jedno od kritičnih svojstava, teško je precizno postići. Postoje brojne metode koje se mogu koristiti, kao što su dinamičko rasejanje svetlosti (DLS), transmisiona elektronska mikroskopija (TEM), mikroskopija atomskih sila (AFM) itd. Međutim, ove metode nisu pogodne za sve tipove nanočestica (mogu biti podložne stvaranju artefakata) i neće dati tačne podatke koji su potrebni [37]. Dodatni problem je to što su nanosistemi polidispergovani. Dakle, nakon sinteze, umesto da se dobije rastvor nanosistema određene veličine, postoji neka raspodela veličina. Da bi se nanosistemi smatrali monodisperznim, 90% distribucije čestica treba da se nalazi unutar 5% srednje veličine [38]. Međutim, ovo je izuzetno teško ili čak nemoguće postići budući da za kontrolu ovog aspekta tokom sinteze nema odgovarajućih eksperimentalnih metoda [39].

Druge kritične tačke su određivanje sastava i ispitivanje površine monosloja [40]. Kao što je gore pomenuto, jedna od prednosti korišćenja nanočestica je lakoća njihove funkcionalizacije. Sticanjem dubljeg razumevanja strukture monosloja, može se preciznije prilagoditi dizajn nanonosača kako bi se osiguralo da će krajnji proizvod imati željena svojstva.

Međutim, eksperimentalna karakterizacija monosloja je izazovna jer pored nedovoljne rezolucije, ne postoje npr. univerzalne tehnike za kvantifikaciju liganada [41].

Takođe je teško odrediti internalizaciju nanosistema u ćelijama. Postoji nekoliko metoda koje se koriste za ovu svrhu kao što su, na primer, konfokalna mikroskopija, protočna citometrija itd. Međutim, problem sa ovim metodama je to što je teško razlikovati internalizovani materijal od materijala vezanog za spoljnu membranu [42]. Kao i u slučaju fizičko-hemijske karakterizacije, osnovni problem je nedostatak odgovarajuće rezolucije.

Krajnja efikasnost nanosistema se određuje *in vivo*. Ali i tu postoje prepreke jer struktura i veličina samog tumora mogu uticati na njihovu efikasnost. Na primer, mali tumori, veličine do 2 mm, obično još nemaju razvijenu vaskulaturu. To može uticati na dubinu prodiranja nanosistema u tumor. Internalizacija može takođe da varira sa brzinom rasta tumora [43]. Pošto svojstva koja su predmet ispitivanja zavise od više faktora, dizajniranje eksperimenata i tumačenje rezultata zahteva dodatan oprez.

Iz pomenutog se može zaključiti da su za dizajn i testiranje novih nanosistema neophodne precizne metode za njihovu fizičko-hemijsku karakterizaciju, kao i za detaljno razumevanje odnosa ovih karakteristika i biologije tumora [37]. Da bi se postigao optimalan nivo preciznosti, neophodne su metode sa različitim nivoima rezolucije: nivo atoma za preciznu fizičko-hemijsku karakterizaciju, nivo ćelije za tačno opisivanje interakcija između nanosistema i ćelija, nivo tumora za procenu efikasnosti nanosistema, i nivo celog organizma za procenu sveukupnog delovanja nanosistema. Iako je to u nekoj meri moguće postići eksperimentalno, ovaj pristup je vremenski zahtevan, skup i nedovoljno precizan za uspostavljanje uspešnog i efikasnog puta od laboratorije do klinike.

2.3. Računarski pristup

U prethodnim sekcijama je pokazano da se za razvijanje nanosistema mora uzeti u obzir širok raspon prostornih i vremenskih skala. Tačan opis na svakoj skali pruža informacije o različitim aspektima neophodnim za efikasan dizajn. Međutim, zajednički nedostatak eksperimentalnih metoda je njihova nedovoljna rezolucija. U nekim slučajevima, za dobijanje preciznih podataka, neophodno je izvršiti merenje jednog parametra putem više različitih analiza. Ovo je dugotrajno i skupo. Dodatno, krajnji klinički efekat nije nezavisna pojava, već je rezultat interakcije različitih elemenata na više skala [44]. Tako da fokusiranje na izolovane elemente ne može biti dovoljno za potpuno razumevanje *in vivo* ponašanja nanosistema. Zbog raznovrsnosti nanočestica i širokog spektra njihovih fizičko-hemijskih karakteristika, trenutno ne postoje standardizovane metode za njihovo ispitivanje. Ovi problemi se mogu rešiti pomoću računarskog pristupa.

Modelovanje bioloških sistema predstavlja multidisciplinarnu oblast koja uključuje biologiju, hemiju, fiziku, matematiku i računarske nauke. Ovaj pristup uzima u obzir različite aspekte iz ovih disciplina kako bi se razvili što realniji modeli [45].

Ulazni podaci za simulacije su opisi interakcija izvedeni iz teorije ili eksperimenata. Kranji rezultat simulacija zavisi od vrednosti ulaznih parametara i strukture modela, što znači da rezultati računarskih eksperimenata mogu dovesti do novih uvida baš kao i u slučaju čisto eksperimentalnog pristupa.

Do danas je razvijen veliki broj različitih metoda i modela koji opisuju relevantne prostorne i vremenske skale sa preciznošću koja je nedostupna eksperimentima. Njihovim kombinovanjem otvara se mogućnost ispitivanja realnih bioloških scenarija, dok se značajno smanjuje vreme za testiranje novog dizajna i troškova povezanih sa eksperimentalnim pristupom. Međutim, većina računarskih modela se i dalje fokusira na jednu skalu. Modelovanje kroz više skala predstavlja novi skup izazova jer treba da se razmotre mnoge komponente i parametri iz različitih skala. Takođe treba uzeti u obzir složene relacije između njih [46].

Prvo pitanje koje se postavlja u ovakvom tipu modelovanja je kako odabrati odgovarajuće metode i skale? Iako bi se u „idealnom” scenariju razmotrilo sve od kvantnog nivoa do celog organizma, ovo ne bi bio najoptimalniji pristup. Prvenstveno jer je ovo tehnički izuzetno teško ili čak nemoguće postići (makar iz perspektive računarskog troška), a takođe i zbog toga što bi bila dobijena ogromna količina informacija, od kojih bi većina verovatno bila suvišna. Stoga je poseban izazov kako izdvojiti potrebne detalje ili obrasce.

Umesto toga, treba se fokusirati na elemente koji najviše doprinose fenomenu ili procese koji su predmet istraživanja i u skladu sa tim izabrati adekvatan model. Prilikom izbora modela (tj. prostorne ili vremenske skale) potrebno je pronaći ravnotežu između tačnosti i računskog troška.

U okviru ove disertacije, fokus je bio na tri različita nivoa - nivo molekula (atoma), nivo ćelije i nivo tkiva.

1. Nivo molekula – Rezolucija jednog atoma.

Opis nanosistema na molekulskom nivou je izuzetno važan aspekt jer struktura nanosistema ima značajan uticaj na klinički ishod. Ako se na ovom nivou razume koja svojstva određuju strukturu nanosistema i dinamiku njegovog ponašanja, može se postići veća kontrola nad konačnim proizvodom. Ovaj korak može dovesti do informativnijeg i efikasnijeg dizajna nanosistema. Simulacije molekulske dinamike daju opis atomističkog nivoa simuliranih sistema i mogu pružiti detaljan uvid u njihovu strukturu i dinamiku. Ovaj nivo rezolucije je uglavnom eksperimentalno nedostupan.

2. Nivo ćelije - Rezolucija jedne ćelije.

Efikasnost lečenja raka u najvećoj meri zavisi od potentnosti leka, njegovog akumulisanja na mestu tumora i dubine njegove penetracije unutar tumora [47,48]. Da bi se realno procenila efikasnost nanosistema, treba da se ispituju interakcije između nanosistema i ćelija, kao i kretanje nanosistema kroz tkivo. Ovoj rezoluciji se može pristupiti pomoću stohastičkih reakciono-difuzionih simulacija.

3. Nivo tkiva - Rezolucija celog tumora.

Da bi se precizno modelovala efikasnost nanosistema, prvo treba da se modeluje realan tumor [49]. Pristup koji omogućava najveću preciznost je takozvano modelovanje zasnovano na agentima (*agent-based modeling*), koje je korišćeno u ovoj disertaciji. U takvom pristupu, svaka

ćelija je predstavljena kao autonomna jedinica sa sopstvenim karakteristikama i unutrašnjim procesima. S obzirom na to da su u modelu opisani realistični parametri ćelija i fiziološki uslovi njihove interakcije sa sredinom, u toku simulacija modeluje se rast heterogenog tumora gde na početku nije definisano kolika će biti brojnost kog tipa ćelija, već je to rezultat interakcija među ćelijama u mikrosredini.

U narednim sekcijama će se dati teorijski pregled korišćenih skala i modela: (nivo tkiva, nivo ćelije, nivo molekula). S obzirom na to da je fokus ove disertacije bio na simulacijama molekulske dinamike, najveći fokus će biti na njihovoj ulozi.

2.3.1. Nivo tkiva - generisanje virtuelnog tumora

Virtuelni rast tumora simuliran je pomoću PhisyCell softvera otvorenog koda. PhisyCell je model baziran na agentima za 2D i 3D viševićijske simulacije [50]. Ovakav tip modelovanja omogućava visoku adaptibilnost. Krajnji efekat nije eksplicitno definisan već se u simulacijama kreće od individualnih agenata (u ovom slučaju ćelija) koji su opisani različitim parametrima i koji prate sistem pravila i relevantne dinamike. Stoga krajnji efekat nastaje kao posledica interakcija između agenata.

PhisyCell uključuje dva aspekta:

1. Na nivou pojedinačne ćelije, funkcioniše kao okruženje zasnovano na agentima. Dinamika tumora je rezultat interakcije velikog broja ćelija. Ćelije reaguju na signale iz svog mikrookruženja i, zauzvrat, utiču na svoje mikrookruženje. Ovaj aspekt uključuje biblioteku dodatnih modula koji opisuju fiziološko stanje ćelija, promenu zapremine tečnosti i čvrstih stanja, ćelijski ciklus, apoptozu, nekrozu, mehaniku i pokretljivost, kao i funkcije za izračunavanje difuzije, razgradnje, i dinamike usvajanja/otpuštanja svakog supstrata.
2. Okruženje zasnovano na agentima je povezano sa biotransportnim modulom, BioFVM [51], koji proračunava vektore difuzije svih supstrata u datoj simulaciji.

U okviru EVONANO platforme [48], urađene su modifikacije koda kojima su u simulacije dodate i matične ćelije raka kao i vaskulatura. Oba ova elementa imaju značajan uticaj na dinamika tumora i njihov značaj će biti opisan u narednoj sekciji.

2.3.1.1. Matične ćelije raka i vaskulatura

Sve veći broj istraživanja pokazuje da ćelije raka potiču od jedne ćelije sa karakteristikama matičnih ćelija [52].

Matične ćelije raka su mala subpopulacija ćelija raka. Imaju sposobnost neograničenog samoobnavljanja, diferencijacije i tumorigeneze [52]. Pored toga, neosetljive su na većinu tretmana raka, a njihov broj u tumoru se često poveća nakon hemioterapije [54,55].

Klasične terapije zasnivaju se na pretpostavci da sve somatske ćelije poseduju sličan maligni potencijal. Međutim, takav nedostatak specifičnosti smanjuje njihovu efikasnost jer se pokazalo da preostale matične ćelije raka nakon terapije mogu dovesti do pojave još agresivnijeg tumora [52].

Postoje dva glavna modela koji opisuju inicijaciju tumora, progresiju i heterogenost tumora: Hijerarhijski i Stohastički model.

Prema hijerarhijskom modelu samo mala i retka subpopulacija ćelija raka (tzv. matične ćelije raka) ima mogućnost samoobnavljanja, inicijacije tumora i uticaja na njegov rast. Prema ovom modelu, tumori su organizovani po hijerarhijskom modelu gde su matične ćelije raka primarni uzrok inicijacije tumora i njegove heterogenosti, dok sve ostale ćelije koje čine najveći deo tumora nastaju usled njihove asimetrične deobe [56-62].

Prema Stohastičkom modelu sve maligne ćelije su inicijalno biološki jednake. Ove ćelije su genetski nestabilne i tokom vremena akumuliraju genetske i epigenetske mutacije. Odnosno, sve ćelije raka imaju potencijal da postanu matične ćelije raka u zavisnosti od signala u sredini i genetskih faktora. Heterogenost tumora se u ovom modelu objašnjava selekcijom najprilagođenijih klonova [56,60-63].

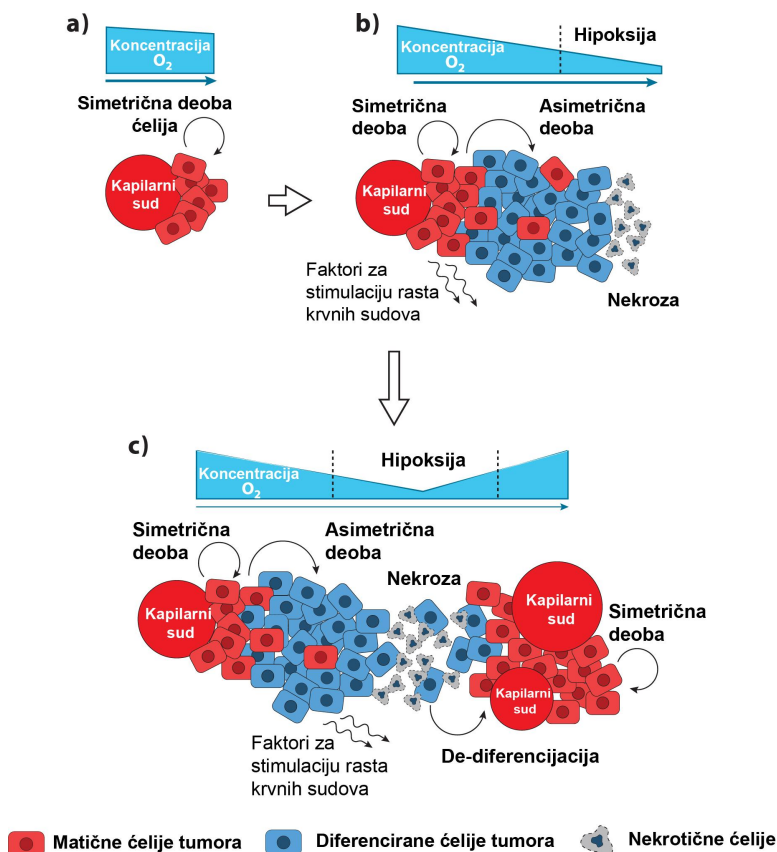
Međutim, ova dva modela nisu međusobno isključiva. Kao sinteza ova dva modela, *Model Ćelijske Plastičnosti* objašnjava da ćelije raka mogu da "prelaze" između dva stanja (diferenciranih i matičnih ćelija raka) kao odgovor na odgovarajući stimulus iz njihove najbliže sredine - niše [62]. Deoba matičnih ćelija je uslovljena uslovima niše. U zavisnosti od signala prisutnih u niši, matična ćelija tokom deobe može dati dve diferencirane ćelije raka ili može imati jednu ili dve ćerke matične ćelije [56,59,62-65]. Ovaj model dopušta mogućnost za postojanje retke populacije ćelija koje iniciraju tumor kao i za mogućnost njihove diferencijacije [56]. Signali mikrokruženja koji regulišu sudbinu matičnih ćelija raka (rast, održavanje i diferencijacija) postoje u dve osnovne forme: direktan kontakt između ćelija kao i signalni molekuli koji difunduju sa udaljenijih mesta [63]. Signalni molekuli su uglavnom proizvod samih matičnih ćelija raka. U okviru ovog modela takođe može doći do dediferencijacije ćelija raka u zavisnosti od uslova sredine u kojoj se nalaze [56,58,61-69].

Matične ćelije raka takođe imaju suštinsku ulogu u rastu tumorske vaskulature. Kada tumor dostigne približno 1-2 mm, on se i dalje oslanja na već postojeću vaskulaturu za snabdevanje krvlju. Međutim, to obično nije dovoljno da se dodatno podrži rast tumora [70,71]. To znači da ćelije raka ne dobijaju dovoljno kiseonika i hranljivih materija, što dovodi do stanja hipoksije i nekrotične smrti ćelija [56]. Međutim, pokazano je da hipoksija pozitivno utiče na proliferaciju, samoobnavljanje i genezu novih tumorskih ćelija od strane matičnih ćelija raka [58, 67]. Ovakva sredina ih takođe štiti od oksidativnog stresa [66,72].

Dakle, oba ova elementa su važna u modeliranju realističnih tumora i tretmana.

2.3.1.2. Opšti opis modela rasta tumora

Prateći ovaj pregled literature, biće opisan opšti model koji uključuje matične ćelije raka, diferencirane ćelije, ekstracelularni matriks i vaskulaturu (slika 1.)



Slika 1. Model rasta tumora. a) Inicijalna faza rasta tumora. b) Pojava hipoksičnih regiona i diferencijacija matičnih ćelija raka c) Rast vaskulature iniciran sekrecijom stimulatornih faktora od strane matičnih ćelija raka.

Povećanje broja matičnih ćelija raka može se postići i kroz simetričnu i kroz asimetričnu ćelijsku deobu [73]. Praćenje ćelijske deobe od prve, inicijalne ćelije je pokazalo da je simetrična deoba dominantna (84.6%), makar u slučaju tumora dojke [74] (Slika. 1a).

U početku, tumor je u stanju mirovanja (dormantan) i oslanja se na difuziju kiseonika i nutrijenata iz vaskulature zdravog tkiva. Tumor obično ne može da poraste preko 1-2 mm u prečniku bez adekvatnog snabdevanja krvlju [70,71]. Kada dođe do te tačke (Slika 1b), ćelije tumora ne dobijaju dovoljno nutrijenata i kiseonika što dovodi do stanja hipoksije. Kao što je prethodno objašnjeno, smatra se da je hipoksija jedna od ključnih karakteristika niše matičnih ćelija raka [75]. Hipoksija na kraju dovodi do nekrotične ćelijske smrti [71] što prouzrokuje oslobađanje proinflamatornih faktora [76]. Mikrokruženje tumora se karakteriše hroničnom upalom koja dalje stimuliše proliferaciju tumorskih ćelija i metastaze [60,63,76]. Pod hipoksičnim uslovima, matične ćelije raka proizvode signale koji dalje stimulišu rast tumora i angiogenezu [53,54,61,66,70,77-79]. Dodatno, izlazak matičnih ćelija raka iz stanja mirovanja može da se desi i usled pojačane ekspresije gena koji stimulišu generisanje dodatne vaskulature [80].

Izazivanjem angiogeneze, povećava se količina nutrijenata i kiseonika čime matične ćelije raka promovišu rast tumora [56] (Slika 1c). Ćelije tumora iskorišćavaju svoje mikrokruženje otpuštanjem citokina i faktora rasta što stimuliše neovaskularnu proliferaciju [81]. Iako proces angiogeneze inicijalno obezbeđuje tumoru više nutrijenata i kiseonika,

vaskulatura u čvrstim tumorima je neregulisana, haotična i propustljiva. Ovakva vaskulatura u kombinaciji sa povećanjem udaljenosti kroz koju nutrijenti moraju da prodifunduju ponovo vodi do hipoksičnih uslova [66,71,77,81]. U hipoksičnoj sredini, proliferacija je veća kod nediferenciranih ćelija nego kod diferenciranih, i na taj način se ravnoteža pomera na održavanje/povećanje broja matičnih ćelija raka [80]. Unutar hipoksičnog regiona, ćelija raka imaju tendenciju da budu nediferencirane (Slika 1c.) [66,70]. Spontana konverzija diferenciranih u nediferencirane ćelije tumora može se indukovati pomoću više različitih faktora kao što su infiltracija leukocita, povećana koncentracija citokina i hemokina, kao i hipoksija [53,58,74,78].

U simulacijama, rast tumora se inicijalizuje sa jednom ćelijom raka. Zatim raste dok ne dostigne veličinu od približno pola miliona ćelija raka. U tom trenutku, simulacija je zaustavljena.

Rezultat simulacije je heterogen tumor, prožet vaskulaturom.

2.3.2. Nivo ćelije

U prethodnoj sekciji opisan je model kojim se dolazi do simuliranog heterogenog tumora prožetog vaskulaturom. Sledeći korak je ispitivanje uticaja nanosistema na dinamiku tumora. Međutim, za ovakvo ispitivanje neophodan je drugi nivo rezolucije jer je modelovanje efekta nanosistema na celom tumoru izuzetno računarski zahtevno. Pored toga, ako bi se simulacije vršile samo na ovom nivou, stepen dinamike koji bi se mogao ispitati bi bio ograničen. Da bi se ovaj problem prevazišao, uzimaju se isečci dobijenog simuliranog tumora gde se biraju reprezentativni delovi tkiva koji se koriste kao ulazni parametri za simulacije na nivou ćelije.

Da bi se ispitale interakcije između ćelije i nanosistema i njihovog kretanja kroz tumor, korišćen je stohastički reakciono-difuzioni simulator *STEPS* [48,82-84].

U ovom modelu, za modelovanje interakcija između ćelija i nanosistema koristi se Michaelis-Menten jednačina [85].



gde NP_F predstavlja slobodni nanosistem, R - receptore na ćelijskoj membrani, K_a i K_d su konstante asocijacije i disocijacije između receptora i nanosistema, C predstavlja komplekse nanosistem-receptor, NP_i je internalizovani nanosistem, a K_i je konstanta brzine internalizacije nanosistema.

Nanosistemi se mogu kretati verovatnoćom [48]:

$$D/L^2 \quad (1.2)$$

gde je D koeficijent difuzije nanosistema, a L dužina jedne ćelije.

S obzirom na to da je pokazano da samo deo injektovane doze dolazi do tumora, količina nanosistema koja se oslobađa iz vaskulature i dospeva do tumora u idealnom modelu miša, NPO , se računa na sledeći način [48]:

$$NPO = ID \cdot W \cdot \frac{PID \cdot S^2 \cdot L}{V_t} \cdot \frac{N_A}{ME} \quad (1.3)$$

gde ID predstavlja injektovanu dozu nanosistema, W je težina miša, PID predstavlja procenat injektovane doze koja stiže do tumora, S je karakteristična dužina ćelije, L je ukupna, neophodna dubina penetracije u tumor kako bi se postigao efekat, V_t je zapremina tumora, M je molarna masa nošenih lekova, dok je E ukupan broj nošenih lekova, i na kraju N_A je Avogadrova konstanta.

Pomoću prethodne jednačine dolazimo do broja nanosistema koji uspeju da dođu do tumora. Međutim, postavlja se pitanje koji broj nanosistema po ćeliji je neophodan kako bi se indukovala ćelijska smrt. Ovaj broj, NP_{MAX} se računa preko sledeće jednačine [48]:

$$NP_{MAX} = \frac{P \cdot S^3 \cdot N_A}{E_r} \quad (1.4)$$

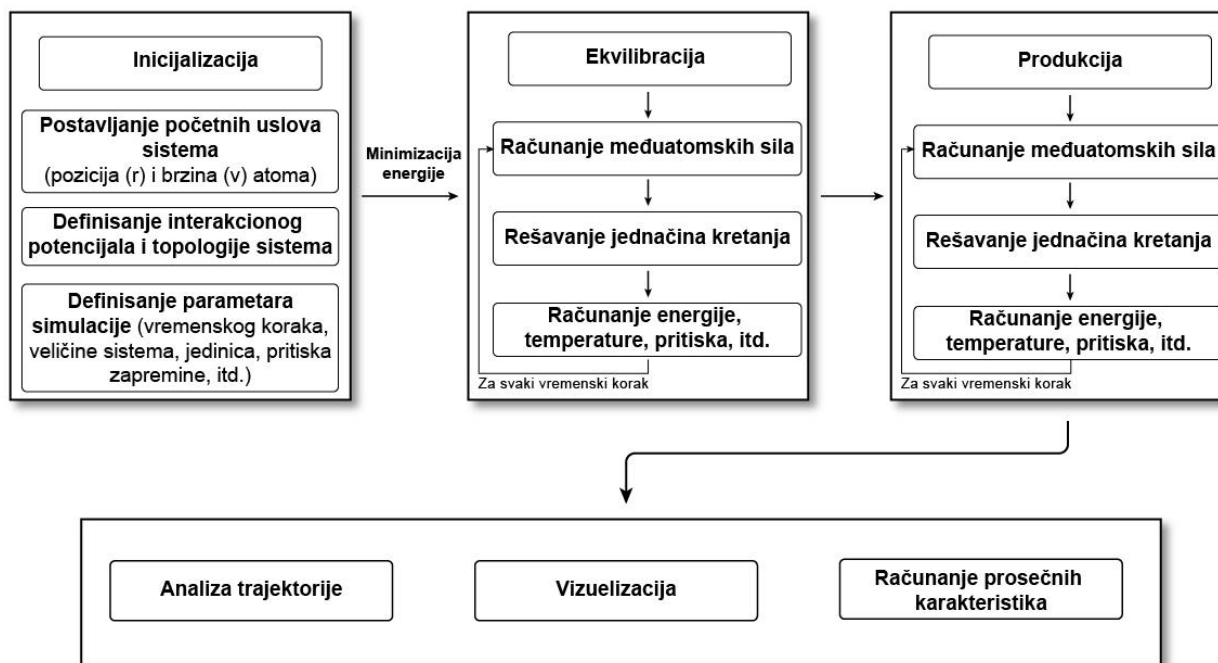
gde je P - potentnost leka izražena kao njegova $IC50$ ili $IC90$ vrednost, S^3 je zapremina ćelije, N_A je Avogadrova konstanta, a E_r je dostupan broj molekula leka po nanosistemu. E_r se koristi umesto E iz jednačine 1.3. jer postoji mogućnost da određen procenat nošenog leka nije dostupan za interakcije sa sredinom, odnosno, ne može da se oslobodi iz nanosistema. Ovde se pretpostavlja da je citotoksični efekat nanosistema funkcija nošenog tereta (dostupne količine leka u nanosistemu).

U ovom modelu, ulazni parametri za nanosistem dobijeni su iz rezultata simulacija molekulske dinamike.

2.3.3. Molekulska dinamika

Da bi se opisala struktura nanosistema, neophodno je spustiti se na nivo atoma. Da bi se ovo postiglo, korišćene su simulacije molekulske dinamike.

Opšti koncept molekulske dinamike je prilično jednostavan. Prvo se postave inicijalni uslovi sistema - lista pozicije svih atoma, veza između njih i njihovih brzina. Zatim se definiše interakcioni potencijal (polje sile) koje omogućava da se izvedu sile između svih atoma. Molekul je ovde predstavljen kao lopta sa centrom u jezgri i preciznom masom. Veze između atoma predstavljene su kao opruge sa specifičnom konstantnom sile i dužinom. Korišćenjem Drugog Njutnovog zakona može se izračunati kako te sile utiču na njihovo kretanje. Konačno, atomi interaguju u toku određenog vremenskog perioda i kao rezultat dobija se dinamička evolucija ispitivanog sistema. Kolektivno ponašanje atoma povezuje skalnu molekula sa mezo/makro fenomenima. Kada znamo mikroskopska stanja sistema u određenom vremenu, korišćenjem statističke mehanike mogu se izračunati njegove makroskopske osobine [45].



Slika 2. Opšti koraci za puštanje simulacija molekulske dinamike.

Pomenuto je da je prvi korak postavljanje početnih uslova sistema, odnosno liste pozicija svih atoma u sistemu i veza između njih. Ovaj korak se zasniva na molekularnoj mehanici gde se koriste kumulativne fizičke sile za opis geometrije i energije molekula. Geometrija molekula se prirodno prilagođava kako bi se smanjila ukupna unutrašnja energija sistema, i na taj način se dolazi do konačne prostorne konfiguracije. Termalno pristupačna stanja sistema objašnjavaju se kasnije, simulacijama molekularnom dinamikom. Drugim rečima, dok molekularna mehanika omogućava simuliranje intra- i intermolekulskih interakcija, molekularna dinamika simulira kretanje molekula i daje uvid u dinamičku evoluciju sistema u određenom vremenskom periodu.

Za simulacije molekularne dinamike, kritično je odabrati odgovarajuće polje sila (interakcioni potencijal i odgovarajući skup parametara). Ono se koristi za računanje potencijalne energije sistema. Uopšteno, polja sila uključuje izraze za "vezivne" (povezane sa kovalentnim vezama, diedralnim uglovima itd.) i "nevezivne" interakcije (elektrostatičke interakcije i Van der Valsove sile). Polja sila takođe definišu i skup parametara za opis celog sistema. Tipično, ovde spadaju mase atoma, Van der Valsov radijus, dužine veza i uglovi između njih, parcijalna naelektrisanja svakog individualnog atoma (na ovom nivou elektroni se ne modeluju eksplicitno, već se aproksimiraju kao parcijalna naelektrisanja) itd. Ovi parametri se uglavnom dobijaju empirijski (iz eksperimenata) i/ili pomoću kvantno-mehaničkih proračuna.

Uopšten opis polja sila je dat ispod. Ukupna energija se računa kao:

$$E_{ukupno} = E_{vezivne} + E_{nevezivne} \quad (1.5)$$

Gde je doprinos vezivnih interakcija dat kao:

$$E_{\text{vezivne}} = E_{\text{veze}} + E_{\text{ugla}} + E_{\text{diedarskog ugla}} + E_{\text{istezanje veze}} \quad (1.6)$$

A doprinos nevezivnih:

$$E_{\text{nevezivne}} = E_{\text{elektrostatičke}} + E_{\text{Van der Valsove}} \quad (1.7)$$

Precizna forma varira u zavisnosti od konkretnog polja sila. Za polje sila korišćeno u ovoj disertaciji (GAFF - General Amber Force Field):

$$E(R^N) = \sum_{\text{veze}} \frac{1}{2} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{\text{ugla}} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torzije}} \frac{1}{2} K_j [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \\ + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N \left\{ \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 R_{ij}} \right\} \quad (1.8)$$

Prvi član u jednačini opisuje harmonijski potencijal veze (idealna opruga) između kovalentno vezanih atoma, gde je “ l ” dužina veze, “ l_0 ” je referentna vrednost dužine veze, K_b je konstanta i zavisi od tipa uključenih atoma. Drugi član je harmonijska funkcija koja opisuje potencijal ugla veze, odnosno, predstavlja energiju kao posledicu geometrije elektronskih orbitala uključenih u kovalentno vezivanje, K_a je konstanta i zavisi od tipa uključenih atoma. Treći član je potencijalna funkcija torzionih uglova. Predstavlja energiju uvijanja veze i zavisi od toga da li je veza jednostruka, dvostruka itd. K_j predstavlja torzionu barijeru. Četvrti član opisuje energiju svih nevezivnih interakcija. U okviru njega, prvi član predstavlja doprinos Van der Valsovih interakcija, dok drugi predstavlja elektrostatičke interakcije. Van der Valsove interakcije predstavljaju se pomoću Lenard-Džonsovog potencijala, dok se elektrostatičke opisuju pomoću Kolumbovih interakcija.

S obzirom na to da parametri za polje sila mogu biti izvedeni iz različitih izvora, postoji više različitih polja sila koja se mogu koristiti. Odabir ispravnog polja sila je značajan korak u analizi. Izbor zavisi od tipa molekula koji želimo da simuliramo i fenomena koji želimo da ispitamo. Svako polje sila ima aproksimacije, i njihovi parametri su optimizovani na takav način da reprodukuju eksperimentalne podatke pod određenim uslovima. Na primer, polje sila koje se koristi za računanje slobodne energije rastvaranja aminokiselina nije podobno za isti tip proračuna kod neorganskih nanočestica. Posebna pažnja treba da se obrati na parametre koji opisuju elektrostatičke interakcije, polarizacione efekte, reprezentaciju rastvarača itd. [45]. Polje sila ima značajan uticaj na pouzdanost rezultata i zato ga treba odabrati sa velikim oprezom.

Pomenuto je da molekulska mehanika omogućava simuliranje intra i intermolekulskih interakcija, dok molekulska dinamika omogućava simuliranje kretanja molekula i daje pogled na dinamičku evoluciju sistema u određenom vremenskom okviru. Drugim rečima, molekulska dinamika je jednostavno iteracija molekulske mehanike u vremenu - u svakom koraku simulacije sistem se kreće ka ravnoteži. Ova evolucija se izvodi integracijom klasičnih njutnovskih jednačina kretanja. Rešava se sistem od N vezanih diferencijalnih jednačina. Na ovaj način se dobijaju brzine i pozicije atoma u funkciji vremena.

Integracija njutnovskih jednačina kretanja se radi u diskretnim vremenskim koracima. Vremenski korak treba izabrati tako da bude znatno kraći od najkraće relevantne vremenske skale u simulaciji. Ovo je jedna od ključnih tačaka kada se razmatra rezolucija koja je potrebna za istraživanje. U svakom vremenskom koraku se dešava ogroman broj proračuna. Osim usporavanja simulacije, na dugim vremenskim skalama i većim sistemima, broj potrebnih vremenskih koraka može postati toliko veliki da simulacije postaju izuzetno skupe u računskom smislu. Dakle, veličina sistema i vremenska skala postaju očigledna ograničenja.

Da bi se rešio skup vezanih jednačina, potrebno je definisati početne uslove na kojima počinje integracija. Drugim rečima, u svakom vremenskom koraku simulacije molekulske dinamike rešava se sledeća njutnovska jednačina kretanja:

$$F_i(t) = m_i a_i(t) \quad (1.9)$$

Gde je F sila, m masa, a ubrzanje, u vremenu t .

Stoga je neophodno da se izračuna sila $F_{(i)}$ u zavisnosti od pozicije svakog atoma u prostoru, iz potencijala $E(R)$ definisanog poljem sila. Ovo se računa za sve atome u sistemu:

$$F_i = - \nabla E_i(R_1, \dots, R_n) \quad (1.10)$$

Kada se izračuna sila (a samim tim je poznato i ubrzanje), integracijom je moguće izračunati nove koordinate svih atoma u sistemu pomoću Verlet algoritma koji je opisan sledećim jednačinama:

$$R_i(t + \Delta t) = R_i(t) + v_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}a_i(t)d\Delta t^2 \quad (1.11)$$

$$R_i(t - \Delta t) = R_i(t) - v_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}a_i(t)d\Delta t^2 \quad (1.12)$$

Sumirane zajedno dobijamo:

$$R_i(t + \Delta t) = 2R_i(t) - R_i(t - \Delta t) + a_i(t)d\Delta t^2 \quad (1.13)$$

Korišćenjem ovog algoritma moguće je izračunati nove pozicije svakog atoma u sistemu i nove potencijalne energije, kao i brzine i doprinose potencijalnoj energiji svih atoma.

$$v_i'(t) = \frac{R_i(t+\Delta t) - R_i(t-\Delta t)}{2\Delta t} \quad (1.14)$$

Iz dobijenih brzina moguće je izračunati nove vrednosti kinetičke energije kao:

$$E_{kin,i} = \frac{1}{2}m_i \left[v_i'(t) \right]^2 \quad (1.15)$$

Čime se proverava i konstantnost ukupne energije sistema:

$$E_{tot,i} = E_{pot,i} + E_{kin,i} \quad (1.16)$$

Ova procedura se ponavlja na svakom vremenskom koraku tokom celog trajanja simulacije molekulske dinamike.

Simulacije molekulske dinamike se mogu koristiti za proučavanje strukture i dinamike nanosistema kao i različitih molekulskih perturbacija posmatranjem dinamičkih procesa tokom vremena [86]. Simulacije molekulske dinamike tačno predstavljaju fizička, hemijska i termodinamička svojstva sistema. Dakle, one mogu pružiti uvid u to koliko se razlikuju različiti parametri i kako oni utiču na strukturu nanosistema. Dodatno, možemo postaviti i precizno kontrolisati uslove simulacija. Virtuelna „sinteza“ nanosistema je brza, laka i zahteva značajno manje finansijskih sredstava od eksperimentalnog pristupa. Pomoću ove metode, lako i brzo se može simulirati veliki broj sistema jer se promene u strukturi relativno lako uvode.

3. Eksperimentalni deo - Metodologija

Ova sekcija podeljena je na pet delova. U prvom delu, *Opšta procedura pripreme sistema i simulacija molekulske dinamike* će biti opisani opšti koraci procedure, koji su zajednički za sve simulacije molekulske dinamike. U drugom delu, *Analiza podataka* biće navedene analize i proračuni urađeni za ispitivane sisteme. U trećem delu, *Procedura pripreme specifičnih sistema i simulacija molekulske dinamike odabranih funkcionalizovanih nanočestica* će biti naglašena sva odstupanja od ovih koraka za specifične sisteme. U četvrtom delu, *Ispitivanje fiziološkog efekta* biće objašena metodologija puštanja simulacija zasnovanih na stohastičkim simulacijama, i konačno, u petom delu *Rezistentnost tumora i optimizacija tretmana korišćenjem veštačke inteligencije* biće opisan model i postupak puštanja simulacija zasnovanog na agentima i algoritmima veštačke inteligencije.

3.1. Opšta procedura pripreme sistema i simulacija molekulske dinamike

Prvi korak ka simuliranju funkcionalizovanih zlatnih nanočestica jeste priprema i parametrizacija odabranih struktura. S obzirom na to da su u pitanju velike strukture (sastoje se od relativno velikog broja atoma) koje su izgrađene od organskih i neorganskih elemenata (koji zahtevaju različit tretman), prvo su modelovani manji elementi strukture, koji su zatim spojeni u jedan sistem.

Elementi strukture od kojih su sastavljeni sistemi:

1. Jezgro nanočestice zlata;
2. Ligandi za funkcionalizaciju nanočestice zlata (modelovana su dva tipa liganada: i) API ligand - ligand koji nosi lek, i ii) pozadinski ligand - ligand koji služi za modifikaciju parametara sistema (npr. za povećanje rastvorljivosti sistema, smanjivanje nespecifičnih interakcija sa proteinima itd.);
3. Rastvarač;
4. Joni (opciono).

3.1.1. Nanočestice zlata

Kao prvi element sistema, modelovano je jezgro nanočestice zlata.

Iako je za pripremu sistema (i njihovo simuliranje) najvećim delom korišćen skup *AMBER* programa, polje sila GAFF (General Amber Force Field), koje je njegov deo, ne

poseduje neophodne parametre da se opišu atomi metala [87,88]. Zbog toga je zlatno jezgro pripremano zasebno koristeći softver *OpenMD* (v. 2.3.) [89].

U praksi, tip nanočestica odabran za simuliranje u ovoj disertaciji se aproksimira kao sfera. Međutim, u stvarnosti savršeno sferno zlatno jezgro nije moguće. Da bi modelovali što realniji oblik, atomi zlata su raspoređeni na takav način da formiraju ikositetraedar. Ovaj oblik je odabran jer je pokazano da je to termodinamički najstabilnija kristalna forma za nanočestice zlata ispod 10 nm [90].

Da bi se to postiglo, struktura nanočestice zlata je pripremljena tako što su atomi zlata raspoređeni na pljosno centriranu kubičnu (fcc - Face-centered cubic) rešetku u željeni geometrijski oblik određenog prečnika. Za većinu simulacija modelovano je jezgro prečnika 5,5 nm. U slučajevima kada dolazi do odstupanja od ove vrednosti, to će biti posebno naglašeno. Za parametar jedinične ćelije uzeta je vrednost od 4.08 Å. Za parametrizaciju jezgra korišćeno je polje sila "*Sutton Chen (SC)*" [91].

SC polje sila se koristi za opis interakcija između metalnih atoma. U ovom polju sila, ukupna energija N atoma sistema je data kao:

$$U = \varepsilon \sum_i^N \left[\frac{1}{2} \sum_{j \neq i} \left(\frac{a}{r_{ij}} \right)^n - c \sqrt{\sum_{j \neq i} \left(\frac{a}{r_{ij}} \right)^m} \right] \quad (3.1)$$

gde je r_{ij} udaljenost između atom i i j , c je pozitivni bezdimenzionalni parametar, ε je parametar sa dimenzijama energije, a je parametar jedinične ćelije, a m i n su pozitivni celi brojevi ($n > m$).

Nakon pripreme jezgra od zlata, prelazi se na pripremu i parametrizaciju liganada koji će služiti za funkcionalizaciju jezgra od zlata.

3.1.2. Priprema za funkcionalizaciju nanočestice zlata

Priprema liganada se sastoji iz nekoliko delova:

1. Priprema strukture manjih fragmenata;
2. Priprema strukture celog liganda;
3. Parametrizacija liganada.

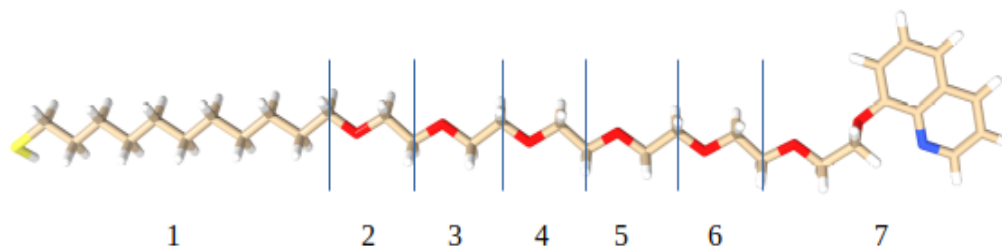
S obzirom na to da postupak nije sasvim linearan i da nisu jasne granice između ovih delova, naredne podsekcije su podeljene na sledeći način: a) Priprema strukture manjih fragmenata, b) Priprema strukture celog liganda i početak parametrizacije (ove dve stavke nisu nezavisne i oslanjaju se jedna na drugu) i na kraju c) Konačna parametrizacija celog liganda.

Nakon što je parametrizacija liganada obavljena, vrši se spajanje elemenata strukture u jedan sistem, i konačno priprema celog sistema i njegova parametrizacija.

3.1.2.1 Priprema strukture manjih fragmenata

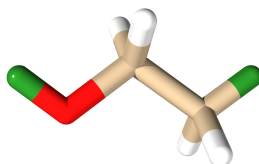
S obzirom na veličinu i broj odabranih liganada, najoptimalniji postupak je deljenje molekula na manje fragmente. Na taj način, delovi strukture se mogu brže i preciznije parametrizovati. Ligandi korišćeni za simulacije u ovoj disertaciji su međusobno sličnih struktura, odnosno neki manji fragmenti se ponavljaju u više različitih liganada. Stoga je od takvih fragmenata formirana biblioteka parametrizovanih fragmenata, koja je u daljem radu korišćena za pripremu liganada.

Za deljenje molekula na fragmente ne postoji opšte pravilo i ovaj korak je specifičan za svaku pojedinačnu strukturu. „Izdvajanje“ fragmenta iz celokupne strukture treba da ima minimalne posledice, odnosno, promene parametara koje će se desiti kada izdvojimo fragment, treba da budu minimalne i ne previše značajne kako bi se na kraju, spajanjem u ceo ligand, parametri lako mogli prilagoditi. Drugim rečima, iako se parametrizacija fragmenata radi u zasebnom koraku, u svakom trenutku treba voditi računa o kranjoj strukturi. Zbog toga, tokom deljenja treba voditi računa da konačni fragmenti budu fizički i hemijski smisleni. Odnosno, treba voditi računa o tome da se ispoštuje valentnost svakog atoma, da ima odgovarajući broj vodonika, itd. Treba takođe uzeti u obzir i hemijsku okolinu atoma (npr. elektronegativnost okoline). S obzirom na to da su fragmenti dobijeni kao parcijalni delovi strukture, njima se dodaju vodonici kako bi se ispunio uslov valentnosti. Svaki fragment treba da predstavlja molekul čija je struktura moguća u realnosti.



Slika 3.1. Deljenje molekula na fragmente.

Na slici 3.1 prikazan je molekul podeljen na fragmente. Kao prvi fragment u ovom primeru odabran je ugljovodnični niz od 11 C atoma. Fragmenti od 2-6 su strukturno identični (O-C-C), međutim, oni su parametrizovani zasebno jer je njihova hemijska okolina drugačija. Npr. fragment 2, 4 i 6 će nositi drugačija naelektrisanja zbog svoje hemijske okoline, o čemu treba posebno voditi računa.



Slika 3.2. Samostalni fragment.

Na slici 3.2 prikazan je središnji fragment O-C-C. S obzirom na to da fragment treba da bude fizički i hemijski smislen, tokom parametrizacije, izdvojenom fragmentu se dodaju vodonici. Dodati vodonici obojeni su zelenom bojom. Pri spajanju fragmenata u jedan molekul, ovi vodonici će biti uklonjeni i parametri fragmenata prilagođeni kako bi se npr. razlika u naelektrisanju uzela u obzir.

Sve strukture su napravljene u softverima *Avogadro* [92] i *USCF Chimera* [93]. U njima su strukture nacrtane i čuvaju se u .pdb formatu.

HETATM	1	SH	C11	1	-17.111	1.129	-3.549
HETATM	2	HS	C11	1	-16.745	0.560	-4.707
HETATM	3	C1	C11	1	-15.590	2.088	-3.298
HETATM	4	H11	C11	1	-15.726	2.721	-2.415
HETATM	5	H12	C11	1	-15.445	2.742	-4.164
HETATM	6	C2	C11	1	-14.390	1.163	-3.113
HETATM	7	H21	C11	1	-14.272	0.515	-3.990
HETATM	8	H22	C11	1	-14.549	0.512	-2.243
HETATM	9	C3	C11	1	-13.107	1.973	-2.910
HETATM	10	H31	C11	1	-13.231	2.647	-2.053
HETATM	11	H32	C11	1	-12.927	2.600	-3.791
HETATM	12	C4	C11	1	-11.899	1.064	-2.671
HETATM	13	H41	C11	1	-11.768	0.389	-3.526
HETATM	14	H42	C11	1	-12.080	0.439	-1.788
HETATM	15	C5	C11	1	-10.627	1.887	-2.466
HETATM	16	H51	C11	1	-10.777	2.590	-1.638
HETATM	17	H52	C11	1	-10.429	2.485	-3.364
HETATM	18	C6	C11	1	-9.419	0.998	-2.165
HETATM	19	H61	C11	1	-9.257	0.299	-2.994
HETATM	20	H62	C11	1	-9.620	0.397	-1.269
HETATM	21	C7	C11	1	-8.163	1.841	-1.947
HETATM	22	H71	C11	1	-8.344	2.567	-1.144
HETATM	23	H72	C11	1	-7.945	2.416	-2.856
HETATM	24	C8	C11	1	-6.953	0.977	-1.585
HETATM	25	H81	C11	1	-6.757	0.259	-2.390
HETATM	26	H82	C11	1	-7.171	0.399	-0.679
HETATM	27	C9	C11	1	-5.716	1.846	-1.355
HETATM	28	H91	C11	1	-5.926	2.580	-0.567

Slika 3.3. Primer .pdb datoteke.

Struktura .pdb datoteke je prilično jednostavna (slika 3.3). Prva kolona predstavlja identifikator pripadnosti atoma (npr. HETATM se koristi za sve atome koji pripadaju malim molekulima), druga predstavlja redni broj atoma u strukturi, treća kolona je naziv atoma. Svaki atom mora da ima unikatan naziv kako bi se razlikovao od drugih u strukturi (u suprotnom, *AMBER* pretpostavlja da je u pitanju kopija i briše te atome), treća kolona je naziv fragmenta

(rezidue) kom ti atomi pripadaju, četvrta kolona je redni broj fragmenta u celom molekulu, dok kolone 5, 6, 7 predstavljaju X, Y, Z koordinate atoma.

3.1.2.2 Priprema strukture celog liganada i početak parametrizacije

Nakon što je pripremljena struktura fragmenata, oni se spajaju u finalni molekul i prelazi se na parametrizaciju. Parametrizacija se ne vrši linearno: prvo fragmenti, pa finalni molekul. Umesto toga, prvo se delimično parametrizuje ceo molekul čime se dobija preliminarna topologija. Zatim se vrši parametrizacija fragmenata u skladu sa dobijenom preliminarnom topologijom. Objašnjenje je dato u sekciji 3.1.2.1 gde je naglašeno da iako se parametrizacija fragmenata radi u zasebnom koraku, u svakom trenutku treba voditi računa o krajnjoj strukturi. S obzirom na to da fragmenti moraju da postoje kao stvarne, samostalne strukture, neke vrednosti parametra odstupaju od onih kada su fragmenti povezani u finalni molekul. Zbog toga se na kraju vrši konačna parametrizacija celog molekula kako bi se prilagodili parametri fragmenata čija se vrednost razlikuje u odnosu na situaciju kada su oni samostalni.

Kao što je pomenuto, strukture fragmenata i celih liganada se čuvaju u .pdb formatu. Međutim, format .pdb datoteke je takav da može da čuva samo informacije koje opisuju strukturu molekula (tip atoma, redni broj atoma, koordinate atoma i *opciono* veze među atomima). U ovom kontekstu “veza” označava samo to da su konkretni atomi vezani jedni za druge, bez obzira na hemijski karakter te veze. S obzirom na to da parametrizacija služi za detaljan i kompletan hemijski opis molekula, uključujući i njegovu topologiju (detaljnije objašnjeno u sekciji 3.1.4.2.) pre same parametrizacije .pdb datoteka treba da se “konvertuje” u odgovarajući format kako bi mogle da se dodaju neophodne informacije. To je urađeno pomoću *ANTECHAMBER* programa, koji je deo *AMBER* paketa.

Ulazni parametar u ovom koraku je .pdb datoteka, a kao izlazne datoteke dobijaju se .mol2 i .frcmod [94]. U tabeli 3.1. dat je pregled svih datoteka (i informacija koje sadrže) koje se koriste u procesu pripreme sistema za simulacije. Zbog preglednosti i jasnoće, forma svake datoteke biće objašnjena u sekciji gde se taj tip datoteke koristi.

Tabela 3.1. Pregled svih ulaznih i izlaznih datoteka i informacija koje sadrže. Crvenom bojom su označene informacije koje mogu, a ne moraju da budu sadržane u datoteci.

	Ulazne datoteke		Datoteke Polja sila		Izlazne datoteke	
	.PDB	.mol2	.lib/.mol2	.frcmod	Topologija .prmtop	Koordinate .inpcrd
jedinice	✓	✓	✓		✓	
imena	✓	✓	✓		✓	
tip atoma		✓	✓	✓	✓	
naelektrisanja		✓	✓		✓	

konekcije	✓	✓	✓		✓	
koordinate	✓	✓	✓			✓
mase				✓	✓	
Vezivni parametri				✓	✓	
Nevezivni parametri				✓	✓	

Datoteke .mol2, za razliku od .pdb datoteka, uključuju tip atoma i njihova naelektrisanja. Zbog toga su neophodne da bi se došlo do topologije molekula. Takođe, .mol2 datoteka je neophodna kako bi se dobila .frcmod datoteka.

GAFF polje sila ima neophodne parametre za detaljan opis velikog broja “standardnih” organskih molekula (standardni molekuli su dobro opisani i poznati molekuli kao što su npr. aminokiseline, neki proteini itd.). Međutim, u slučaju “nestandardnih” molekula ne postoje odgovarajuće .lib datoteke u GAFF-u i korisnik mora sam da ih napravi. U tom slučaju, koristi se *parmchk2* program zasnovan na .mol2 formatu kako bi se napravio .frcmod koji treba da sadrži sve neophodne parametre polja sila koji nedostaju u GAFF-u za ispitivani molekul [94].

U ovom koraku, atomima se dodeljuje tip atoma (npr. uopšten tip atoma je C (ugljenik), detaljnije - C(sp² hibridizovan) itd). Ovaj korak se radi i za strukturu celog liganda i za strukture pojedinačnih fragmenata. Nakon što se dobije ova .mol2 datoteka, dobijeni tipovi atoma se manuelno moraju uporediti sa tipovima atoma u GAFF polju sila kako bi se ispravile eventualne greške, posebno u slučaju fragmenata. Razlog tome je to što smo u prethodnom koraku fragmentima dodali vodonike koji se gube povezivanjem fragmenata u veći molekul (umesto njih se formira kovalentna veza). Samim time može se promeniti hibridizacija ugljenikovog atoma i drugi parametri, na šta posebno treba obratiti pažnju.

Sledeći korak u parametrizaciji je asignacija parcijalnih naelektrisanja atoma za svaki atom u ligandu. Ovo je urađeno korišćenjem web servisa *REDserver* prateći RESP proceduru (više detalja o RESP proceduri se može naći u [95]).

Uopšteno, da bi se došlo do parcijalnih naelektrisanja prate se tri glavna koraka:

1. Željeni molekul se prvo optimizuje kako bi se odredio stabilan minimum (korišćenjem softvera za kvantnu hemiju);
2. Zatim se ova minimizovana struktura koristi kako bi se izračunao Molekularni Elektrostatički Potencijal (MEP - Molecular Electrostatic Potential) na trodimenzionalnoj mreži (korišćenjem softvera za kvantnu hemiju);
3. Zatim se ova mreža eksportuje u RESP program.

Iako je u praksi prihvaćeno da bilo koji softver za kvantnu hemiju može da se koristi za minimizaciju početne strukture i računanje MEP-a, poznato je da su parcijalna naelektrisanja dobijena korišćenjem npr. *GAMESS* softvera drugačija od onih određenih *Gaussian* softverom. Takođe, ako se počinje od različitih skupova početnih Kartezijanskih koordinata za isti molekul, RESP naelektrisanja u nekim slučajevima nisu ponovljiva i može doći do grešaka koje je teško detektovati.

REDserver koristi poseban protokol kako bi dobijena naelektrisanja bila nezavisna od korišćenja konkretne računarske metode, osnovnih parametara (skupa funkcija u teorijskoj i računarskoj hemiji), molekulske orijentacije ili konformacije, i kako bi mogli da se reprodukuju eksperimentalno dobijeni multipolni momenti kako bi bili u skladu sa elektronegativnošću atoma. *REDserver* povezuje različite kvantnomehaničke programe koji se koriste za optimizaciju geometrije i izračunavanje MEP-a, i vrši prilagođavanje naelektrisanja koristeći RESP program. Definisanjem strogih kriterijuma optimizacije i kontrolom orijentacije svake optimizovane geometrije, vrednosti naelektrisanja se reprodukuju na bilo kojoj računarskoj platformi sa tačnošću od 0,0001 e. Naelektrisanja se mogu dobiti korišćenjem višestrukih konformacija, što ih čini pogodnim za simulacije molekulske dinamike. Kao rezultat dobijaju se parcijalna naelektrisanja atoma za željeni ligand.

Nakon toga, ručno se dorađuju .mol2 datoteke pojedinačnih fragmenata. U svakoj .mol2 datoteci, brišu se vodonici umesto kojih će se formirati veze spajanjem struktura, i smanjuje se definisan broj atoma i veza unutar fragmenta. Izuzetno važan korak je i prilagođavanje konekcija između atoma, jer nakon brisanja vodonika, neke prestaju da postoje.

```

1 @<TRIPOS>MOLECULE
2 OCC
3   7   6   1   0   0
4 SMALL
5 No Charge or Current Charge
6
7
8 @<TRIPOS>ATOM
9   1 O1      -9.3510    2.3040    0.1750 os    1 OCC    0.000000
10  2 C1      -8.1420    3.0430    0.0820 c3    1 OCC    0.000000
11  3 H11     -8.0500    3.6810    0.9660 h1    1 OCC    0.000000
12  4 H12     -8.1820    3.6720   -0.8120 h1    1 OCC    0.000000
13  5 C2      -6.9800    2.0760   -0.0000 c3    1 OCC    0.000000
14  6 H21     -6.9530    1.4290    0.8820 h1    1 OCC    0.000000
15  7 H22     -6.0300    2.6140   -0.0730 h1    1 OCC    0.000000
16 @<TRIPOS>BOND
17   1   1   2   1
18   2   2   3   1
19   3   2   4   1
20   4   2   5   1
21   5   5   6   1
22   6   5   7   1
23 @<TRIPOS>SUBSTRUCTURE
24   1 OCC          1 TEMP          0 ****   ****   0 ROOT
25

```

Slika 3.4. Primer .mol2 datoteke.

U poslednju kolonu se zatim ubacuju dobijena parcijalna naelektrisanja za svaki fragment. Ovako pripremljen .mol2 služi kao ulazna datoteka za Amberov *TLEAP* program.

```

Source leaprc.gaff
loadamberparams ../../PegOQL/PegOQL.frcmod
OCH = loadmol2 OCH.antechamber.charged.mol2
set OCH head OCH.1.O1
set OCH tail OCH.1.c2

```

```

desc OCH
check OCH
savepdb OCH OCH.amber.pdb
saveoff OCH OCH.gaff.lib

```

Slika 3.5. Primer skripte za parametrizaciju pojedinačnih fragmenata u *TLEAP* programu.

U ovom koraku je neophodno definisati “glavu” (head) i “rep” (za svaki fragment), kako bi se povezivanje sa drugim fragmentima izvršilo u odgovarajućoj orijentaciji i preko definisanih atoma.

Kao izlazne datoteke u ovom koraku dobijaju se *.amber.pdb* i *.gaff.lib* datoteke. Datoteka *.amber.pdb* praktično sadrži sve informacije kao i standardna *.pdb* datoteka. Razlikuje se samo format koji *Amber* program može da pročita. Datoteke *.gaff.lib* sadrže informacije o parametrima sistema koje su neophodne za konstruisanje simulacije. Za razliku od *.prmtop* datoteke koja opisuje potpunu topologiju sistema, *.gaff.lib* datoteke ne sadrže informacije o masi atoma, kao ni o vezivnim i nevezivnim parametrima.

3.1.2.3. Konačna parametrizacija celog liganda

Nakon što je završena asignacija parcijalnih naelektrisanja prelazi se na konačnu parametrizaciju celog liganda.

```

source leaprc.gaff
loadamberparams OQL.frcmod
loadoff ../Fragments/C11/C11.gaff.lib
loadoff ../Fragments/OCB/OCB.gaff.lib
loadoff ../Fragments/OCC/OCC.gaff.lib
loadoff ../Fragments/OCQ/OCQ.gaff.lib
loadoff ../Fragments/OQL/OQL.gaff.lib
a = loadpdb OQL.chm.min.pdb
check a
charge a
savepdb a OQL.amber.pdb
saveamberparm a OQL.prmtop OQL.inpcrd

```

Slika 3.6. Primer skripte za parametrizaciju celog liganda u *TLEAP* programu.

U prethodnom koraku urađena je parametrizacija pojedinačnih fragmenata i njihovi detaljni opisi su sačuvani u *.gaff.lib* datotekama. Takođe su definisani “glava” i “rep” svakog fragmenta kako bi se veze formirale preko definisanih atoma. U slučaju parametrizacije celog liganda, koristimo pojedinačno dobijene *.gaff.lib* datoteke i *.frcmod* sa dodatnim opisima koji nedostaju u GAFF polju sila, kako bismo potpuno opisali ligand i dobili topologiju (*.prmtop*; Detaljan opis *.prmtop* datoteke biće opisan u sekciji 3.1.4.2.) i koordinate (*.inpcrd*) za ceo ligand.

Na ovaj način su pripremane i parametrizovane strukture svakog pojedinačnog liganda koji je korišćen u simulacijama.

3.1.3. Spajanje elemenata strukture u jedan sistem

Nakon što su pripremljeni svi elementi (jezgro nanočestice zlata i svi ligandi), sledi priprema struktura za spajanje u jedan sistem, odnosno celu funkcionalizovanu nanočesticu.

Pojedinačni elementi strukture se spajaju u jedan sistem korišćenjem *Packmol* softvera. *Packmol* je program otvorenog koda koji služi za građenje početne konfiguracije sistema za simulacije molekulske dinamike [96]. Da bi se došlo do takve konfiguracije treba da se uzme u obzir da atomi ili molekuli unutar sistema treba da budu raspoređeni na takav način da dobro aproksimiraju strukturu celog sistema unutar željene simulacione kutije (čija struktura je opisana u sekciji 3.1.4). S obzirom na to da polje sila sadrži i član koji opisuje odbojne interakcije, atomi iz različitih molekula treba da budu na "sigurnoj" udaljenosti. *Packmol* ovo posmatra kao problem pakovanja: svaki tip molekula mora da zadovolji određena prostorna ograničenja u skladu sa geometrijom sistema i udaljenošću atoma iz različitih molekula koji moraju biti veći od definisanog praga kako ne bi došlo do njihovog preklapanja. Zadovoljavanjem tih uslova se osigurava da simulacija neće "pući" i da na rezultate neće uticati velike vrednosti Van der Valsovih odbojnih interakcija.

Iako je struktura dobijena na ovaj način dobra početna konfiguracija za simulacije molekulske dinamike, minimizacija strukture tokom same simulacije je neophodna. Nakon ovog koraka, dobijeni sistem dodatno treba rastvoriti u vodi (ili nekom drugom rastvaraču) i prilagoditi polju sila koje će se koristiti. U nekim slučajevima ovi koraci mogu dovesti do toga da se atomi iz različitih molekula preklapaju.

Ulazne datoteke za *Packmol* su:

1. .pdb datoteka jezgra od zlata,
2. .amber.pdb datoteka svakog tipa liganda kojim želimo da funkcionalizujemo zlatno jezgro,
3. Ulazna skripta.

U ulaznoj skripti definišemo:

1. Koji je (centralni) fragment sistema na koji ćemo vezati ostale elemente strukture. U ovom slučaju, centralni fragment je uvek zlatno jezgro, čiji centralni atom ima koordinate 0.0 0.0 0.0.
2. Definišemo broj tih fragmenata koji će se graditi u sistemu. U ovom slučaju, to je 1.
3. Zatim se pojedinačno definišu svi fragmenti koji će biti izgrađeni, koje su dimenzije tih fragmenata, koja je njihova dužina, preko kog atoma se vezuju za centralni fragment, i koliko fragmenata određenog tipa treba da bude u sistemu.

Na primer, da bi zlatno jezgro imalo 100% pokrivenost površine, za njega treba da bude vezano 420 liganada – 5 liganada po nm². U zavisnosti od toga da li je nanočestica funkcionalizovana homogeno ili mešovito, 420 liganada može biti istog ili drugačijeg tipa. U skladu sa tim treba definisati koliko liganada kog tipa treba da se rasporedi po površini. Takođe treba definisati željenu distribuciju (da li će ligandi biti nasumično raspoređeni po površini, da li će formirati "pruge" (stripes), da li želimo janus konfiguraciju gde je jedan tip liganada

raspoređen na jednoj strani nanočestice, a drugi tip liganada sa suprotne strane itd.). Kod nasumične distribucije dovoljno je u skripti upotrebiti komandu *random seed* kako bi softver nasumično ređao ligande po površini. U slučaju janus konformacije, neophodno je definisati različite ravni i definisati koji tip liganda može da se rasporedi na koju ravan.

U eksperimentima su simulirana dva tipa konformacije: nasumična i janus.

```
# Spherical AuNP functionalized with PegGEM and Pz2
# random configuration
tolerance 2.0
filetype pdb
output GEM11Pz2.pdb
add_amber_ter
seed 1659638
```

```
structure ico_shell_9_5.1768.pdb
number 1
fixed 0. 0. 0. 0. 0. 0.
radius 1.7
end structure
```

```
structure PegGEM.amber.pdb
number 210
atoms 1
inside sphere 0. 0. 0. 26.884
end atoms
atoms 64
outside sphere 0. 0. 0. 51.025
end atoms
end structure
```

```
structure Pz2.amber.pdb
number 210
atoms 1
inside sphere 0. 0. 0. 26.884
end atoms
atoms 36
outside sphere 0. 0. 0. 40.371
end atoms
end structure
```

Slika 3.7. Primer ulazne skripte za *Packmol* za građenje početne konfiguracije sa nasumičnim rasporedom liganada na površini zlatne čestice.

```
# Spherical AuNP functionalized with PegGEM and Pz2
# janus configuration
tolerance 2.0
filetype pdb
output GEM11Pz2janus.pdb
```



```

Add_amber_ter

structure ico_shell_9_5.1768.pdb
number 1
fixed 0. 0. 0. 0. 0. 0.
radius 1.7
end structure

structure PegGEM.amber.pdb
number 210
atoms 1
inside sphere 0. 0. 0. 26.884
below plane 0. 26. 26. 26.
end atoms
atoms 64
outside sphere 0. 0. 0. 51.025
end atoms
end structure

structure Pz2.amber.pdb
number 210
atoms 1
inside sphere 0. 0. 0. 26.884
over plane 0. 26. 26. 26.
end atoms
atoms 36
outside sphere 0. 0. 0. 40.371
end atoms
end structure

```

Slika 3.8. Primer ulazne skripte za *Packmol* za građenje početne janus konfiguracije.

Da bi strukture dobijene na ovakav način mogle da se koriste za simulacije molekulske dinamike u *Amberu*, neophodno je pripremiti dodatnu datoteku. S obzirom na to da GAFF polje sila ne sadrži opis za atome metala, nezavisno treba definisati Au-S vezu. Da bi se ona definisala, napravljena je posebna skripta gde je definisan potencijal koji ova dva tipa atoma drži na specifičnoj udaljenosti. Vrednost za ovu udaljenost je preuzeta iz literature i to je standardna praksa za ovaj tip sistema.

3.1.4. Priprema celog sistema i njegova parametrizacija

Nakon što je pripremljena struktura celog sistema, treba uraditi nekoliko dodatnih koraka pre samih simulacija:

- Detaljna provera strukture korišćenjem *TLEAP* programa,
- Definisanje graničnih uslova,
- Rastvaranje sistema u vodi,

- Dodavanje jona,
- Provera ukupnog naelektrisanja sistema (bez obzira na naelektrisanje nanočestice, ceo sistem (nanočestica + molekuli vode \pm joni) mora da bude elektroneutralan),
- Priprema ulaznih datoteka za simulaciju (topologija (.prmtop), koordinate (.inpcrd), Au-S potencijal (restraint file), ulazna skirpta za puštanje simulacije i datoteke koje definišu različite faze simulacije i uslove pod kojima se vrši simulacija).

Sve simulacije su izvedene u eksplicitnom rastvaraču i unutar definisanih periodičnih graničnih uslova (PBC-Periodic boundary conditions).

Pod periodičnim graničnim uslovima se podrazumeva da je modelovani sistem (ispitivan molekul + molekuli rastvarača) postavljen u jediničnu ćeliju (*unit cell*) - simulacionu kutiju koja može da se ponavlja beskonačno puta u trodimenzionalnom prostoru. U toku simulacije, čuvaju se (i prate) samo koordinate jedne jedinične ćelije.

Uslov periodičnosti je definisan tako da svi atomi i molekuli koji dođu do "zida" kutije, izlaze sa jedne strane, i ponovo ulaze sa suprotne. Na ovaj način je garantovano da je sadržaj jedinične ćelije uvek isti. Bez PBC uslova, molekul bi se npr. sudario sa zidom što bi dovelo do stvaranja numeričkih artefakta, koji mogu da naruše rezultate simulacije. Na taj način se, preko jedinične ćelije, vrši zadovoljavajuća aproksimacija velikih sistema čije ponašanje bi bilo nemoguće izračunati.

Da bismo izbegli bilo koji granični efekat, veličina jedinične ćelije treba da je dovoljno velika. Dimenzije kutije zavise od granične vrednosti koja se koristi za Van der Valsove interakcije i od pokretljivosti rastvorene supstance. Razumna veličina ćelije uključuje ispitivani molekul rastvoren sa najmanje 10 Å slojeva molekula vode. U simulacijama urađenim u ovoj disertaciji, korišćeno je 12 Å.

Na prvi pogled može se učiniti da je ova metoda veoma računski intenzivna i da zahteva procenu beskonačnog broja interaktivnih parova. Ovaj problem se prevazilazi korišćenjem granične vrednosti za račun interakcija dugog dometa (cut-off). To se radi tako što se potencijalna energija postavlja na nulu nakon određenog rastojanja r . Za proračune produkcije korišćeno je ograničenje vrednosti za račun interakcija dugog dometa od 10 Å². Međutim, uvođenjem ove aproksimacije, zanemarujemo interakcije dugog dometa nakon odabranog rastojanja r što može dovesti do stvaranja drugih neželjenih artefakta u simulaciji. Ovo se rešava korišćenjem tehnike poznate kao Evaldova suma, (Ewald sum) ili njenog modernijeg ekvivalenta PME (Particle-mesh Ewald - PME) gde se uvodi nova aproksimacija svih nevezivnih interakcija. Za korišćenje PME tehnike jedan uslov mora biti ispunjen, a to je da je sistem kao celina neutralan. Ako je sistem naelektrisan, naelektrisanje će se ponavljati u svim kopijama što bi dovelo do besmisleno velikih energija i verovatno "pucanja" simulacije. Neutralnost sistema se postiže dodavanjem određenog broja jona suprotnog naelektrisanja.

Geometrija simulacione kutije se bira zavisno od geometrije rastvorene supstance kako bi se što više smanjilo prisustvo molekula vode u sistemu. S obzirom na to da su simulirane sferne nanočestice, najoptimalniji oblik je oktaedar.

3.1.4.1. Model vode

Sledeći korak je rastvaranje nanočestice u rastvaraču, u ovom slučaju u vodi.

Postoji više različitih modela vode koji se mogu koristiti za simulacije. Neki modeli su pogodniji za simuliranje dipolnih efekata jer je moguće definisati više od tri lokacije za interakcije dok drugi modeli gube malo preciznosti (fiksiranjem nekog parametra) radi ubrzavanja proračuna.

U svim simulacijama korišćen je model vode TIP3P [97]. Ovaj model koristi ukupno tri mesta za elektrostatičke interakcije (delimično pozitivna naelektrisanja na atomima vodonika koja su uravnotežena odgovarajućim negativnim naelektrisanjem na atomu kiseonika).

Van der Valsove interakcije između dva molekula vode se računaju korišćenjem Lennard-Jonesove funkcije i one ne uključuju interakcije između atoma vodonika. Ugao između dva atoma vodonika je konstantan, pa ovaj model vode ima krutu geometriju. Za korišćenje TIP3P modela neophodna je upotreba SHAKE algoritma kako bi se ograničile sve veze koje uključuju atome vodonika. Ova aproksimacija omogućava ubrzavanje proračuna.

Vremenski korak u simulacijama molekulske dinamike treba da bude kraći od trajanja najbrže frekvencije vibracija u sistemu. U ovom slučaju to su frekvencije koje potiču od kretanja vodonika (1 fs). Korišćenje SHAKE algoritma uvodi ograničenje na kretanje vodonika, odnosno na sve veze koje uključuju vodonik. To omogućava da se vremenski korak poveća sa 1 fs na 2 fs čime se smanjuje računarski trošak i ubrzavaju simulacije.

3.1.4.2. Joni

U zavisnosti od naelektrisanja ispitivane nanočestice ili uslova pod kojim želimo da je simuliramo, nakon rastvaranja nanočestice u vodi, ponekad je neophodno dodavanje jona u sistem. Nanočestica može biti naelektrisana, ali ceo sistem koji se simulira mora da bude elektroneutralan. Razlog za to je uvođenje uslova PBC. Ako nanočestica nosi npr. negativno naelektrisanje, ono će se ponavljati u svim kutijama (u svim dimenzijama, beskonačno) što bi dovelo do besmisleno velikih energija. Takođe, joni mogu da utiču na mogućnost kretanja molekula što ima uticaj na konačnu trajektoriju dinamike. Koliko jona (i kojih jona) treba dodati u sistem zavisi od naelektrisanja nanočestice, zapremine vode u kutiji i uslova pod kojim želimo da pustimo simulaciju (da li želimo da radimo simulacije u vodenom ili fiziološkom rastvoru - 0,15 M [NaCl]). Na⁺ i Cl⁻ joni se dodaju u *TLEAP* programu, i ubacuju se u sistem prateći elektrostatički potencijal površine nanočestice.

Ako se tokom dodavanja protivjona javi konflikt (superpozicija) sa molekulima vode, ceo molekul vode se zamenjuje jonom koji se smešta na poziciju centra mase uklonjenog molekula vode. S obzirom na to da je broj molekula u simulacionoj kutiji prilično veliki, skoro svi protivjoni zamenjuju po molekul vode. Ovo može da dovede do neuniformnosti u kutiji jer jedan atom Na⁺

ili Cl⁻ jona zamenjuje tri atoma koji čine molekul vode. To je jedan od razloga zbog čega se npr., tokom prvog dela simulacije koriste uslovi konstantnog pritiska i temperature (NPT ansambl) koji dozvoljava da se promeni zapremina vodene kutije kako bi se prilagodila gustina kutije (gustina vode u kutiji treba da reflektuje stvarnu gustinu vode).

Simulacije su puštane ili u vodenom rastvoru gde su joni dodati samo da kompenzuju naelektrisanje nanočestice, ili su puštane u fiziološkom rastvoru gde je koncentracija Na⁺ i Cl⁻ jona izračunata na osnovu nanočestice, zapremine i gustine simulacione kutije, kako bi konačan rastvor bio 0,15 M.

Ovaj korak se radi u *TLEAP* programu, gde se, kao izlazne datoteke, dobijaju konačna topologija (.prmtop) i koordinate (.incprd).

Datoteka .prmtop koja opisuje topologiju celog sistema sadrži izuzetno veliki broj informacija kao što su npr. ukupan broja atoma, broj atoma različitog tipa, tipovi atoma, broj veza koje (ne) sadrže vodonik, broj uglova koji (ne) sadrže vodonik, broj jedinstvenih tipova veza itd. Potpuni opis .prmtop datoteke je dat u okviru *Amber* programa i može se pronaći u referenci [98].

3.1.5. Procedura simulacije

Ovde će ukratko biti opisana uopštena procedura korišćena za simulacije. Sva odstupanja će biti posebno naglašena.

3.1.5.1. Minimizacija

Iako je minimizacija strukture već urađena u prethodnim koracima, i dalje postoji mogućnost preklapanja atoma u strukturi između različitih ostataka. Zbog toga se dodatno radi minimizacija pre samog započinjanja molekulske dinamike kako bi se eliminisali svi "loši" kontakti i kako bi se ispitivani sistem prilagodio polju sila koje se koristi. Da bi se to postiglo, korišćena su dva algoritma: *Steepest Descent* i *Conjugated Gradient*. *Steepest descent* je brži algoritam, ali manje precizan i služi za grubu minimizaciju sistema, nakon čega se koristi *Conjugated Gradient* za finija podešavanja. Minimizacija se prvo radi sa ograničenjem na nanočestici od 5.0 kcal/(mol*Å²) kako bi se relaksirao rastvarač. Primer je dat u skripti ispod (slika 3.9).

```
&cntrl
  ntptr = 10           ! how often to print mdout
  ioutfm = 1          ! use netCDF
  ntxo = 1            ! [1] use formatted txt for restart
  iwrap = 0           ! wrap coordinates to original box
  cut = 10.0          ! nonbonded cutoff, in Å
  imin = 1            ! min
```

```

maxcyc = 2000          ! max cycles of min
ncyc = 1000           ! SteepestDesc (SD) to ConjGrad (CG)
ntmin = 1              ! [1, def] nycyc of SD, then CG
ntr = 1                ! cartesian restraint
restraint_wt = 50,
restraintmask = `!:WAT,Na+,Cl-',
nmropt = 0
/

```

Slika 3.9. Primer skripte za minimizaciju energije sistema sa ograničenjem na nanočestici.

Zatim se ograničenje na nanočestici uklanja kako bi se elimisali svi loši kontakti u celom sistemu što je prikazano na slici 3.10.

```

&cntrl
ntpr = 10              ! how often to print mdout
ioutfm = 1             ! use netCDF
ntxo = 1               ! [1] use formatted txt for restart
iwrap = 0              ! wrap coordinates to original box
cut = 10.0             ! nonbonded cutoff, in Å
imin = 1               ! min
maxcyc = 2000          ! max cycles of min
ncyc = 1000           ! SteepestDesc (SD) to ConjGrad (CG)
ntmin = 1              ! [1, def] nycyc of SD, then CG
nmropt = 0
/
&wt type='END'
/
DISANG=restraint.txt

```

Slika 3.10. Primer skripte za minimizaciju energije celog sistema (ograničenje na nanočestici je uklonjeno).

3.1.5.2. Zagrevanje i relaksacija gustine

Nakon minimizacije može da se krene sa konkretnom molekulskom dinamikom. Prvi korak jeste zagrevanje sistema na željenu temperaturu (300/310,15 K). S obzirom na to da se sistem postepeno zagreva, za prve korake korišćen je vremenski korak od 1 fs kako bi se izbegle velike devijacije usled porasta temperature i velike fluktuacije kretanja molekula rastvarača. Velike fluktuacije u ovoj fazi su očekivane jer se sistemu “dodaje” velika količina kinetičke energije kako bi se sistem zagrejavao na željenu temperaturu. Kao i kod minimizacije u prvom koraku se prvo radi sa ograničenjem na nanočestici od 5.0 kcal/(mol*Å²). Ova faza zagrevanja trajala je 50 ps i urađena je pri uslovima konstantne zapremine i temperature (NVT ansambl). Za regulaciju temperature u sistemu korišćen je Langevin-ov termostat sa frekvencijom sudara od 2 ps⁻¹.

```

&cntrl
  ioutfm = 1,           ! use netCDF
  ntxo = 2,            ! use netCDF for restart
  iwrap = 0,          ! wrap coordinates to original box
  cut = 9.0,          ! nonbonded cutoff, in A
  ntc = 2,            ! SHAKE (1 no, 2 H, 3 all)
  tol = 0.000001,    ! geom tolerance (max <0.00005, def 0.00001)
  ntf = 2,            ! force evaluation, to use 2 with SHAKE
  ntp = 500,          ! every NTPR steps print to out-info
  ntwx = 1000,        ! every NTWX to mdcrd-nc
  ntwr = 50000,       ! every X rst; anyway at nstlim...
  nstlim = 10000,    ! nstep (in remd nstep between exchanges)
  dt = 0.001,        ! dt, in psec
  ig = -1,           ! random seed
  ntt = 3,           ! 3(Langevin)
  gamma_ln = 1.0,    ! collision frequency
  temp0 = 150.0,     ! T at which the system is to be kept
  ntr = 1,           ! crtesian restraint
  restraint_wt = 10,
  restraintmask = '!:WAT,Na+,Cl-',
/
&wt TYPE='TEMP0',
  value1=0.1, value2=150.0,
  istep1=0, istep2=10000,
/
&wt TYPE='END'
/

```

Slika 3.11. Zagrevanje sistema na željenu temperaturu.

U narednih 50 ps zagrevanje je rađeno pri uslovima konstantnog pritiska i temperature (NPT ansambl) kako bi se uradila ekvibracije vodene kutije (odnosno kako bi se gustina vode dovela na “realnu” vrednost).

Kontrola pritiska je postignuta korišćenjem Berendsendovog termostata (sa vremenom relaksacije pritiska od 1 ps). Relaksacija gustine rađena je u dve faze - sa i bez ograničenja na nanočestici.

```

&cntrl
  ioutfm = 1,           ! use netCDF
  ntxo = 2,            ! use netCDF for restart
  iwrap = 0,          ! wrap coordinates to original box
  cut = 9.0,          ! nonbonded cutoff, in A
  irest = 1,          ! restart, req velocities in input
  ntc = 2,            ! SHAKE (1 no, 2 H, 3 all)
  tol = 0.000001,    ! geom tolerance (max <0.00005, def 0.00001)
  ntf = 2,            ! force evaluation, to use 2 with SHAKE
  ntx = 5,            ! 5(read all velocities)
  ntb = 2,            ! PBC, 2(const P)
  ntp = 500,          ! every NTPR steps print to out-info

```

```

ntwx = 5000,          ! every NTWX to mdcrd-nc
ntwr = 100000,       ! every X rst; anyway at nstlim...
nstlim = 20000,     ! nstep (in remd nstep between exchanges)
dt = 0.001,         ! dt, in psec
ig = -1,            ! random seed
ntt = 3,            ! 3(Langevin)
gamma_ln = 1.0,     ! collision frequency
temp0 = 310.15,     ! T at which the system is to be kept
ntp = 1,           ! pressure (1)isotropic
barostat = 1,      ! [1]Berendsen, (2)Monte Carlo barostat
mcbarint = 50,     ! interval steps to MC volume changes
taup = 5.0,        ! pressure relaxation time in psec (1-5)
ntr = 1,           ! crtesian restraint
restraint_wt = 5,
restraintmask = '!:WAT,Na+,Cl-',
/
&wt TYPE='TEMPO',
    value1=150.1, value2=310.15,
    istep1=0, istep2=20000,
/
TYPE='END'
/

```

Slika 3.12. Relaksacija gustine sa ograničenjem na nanočestici.

```

&cntrl
ioutfm = 1,          ! use netCDF
ntxo = 2,           ! use netCDF for restart
iwrap = 0,         ! wrap coordinates to original box
cut = 9.0,         ! nonbonded cutoff, in A
irest = 1,         ! restart, req velocities in input
ntc = 2,           ! SHAKE (1 no, 2 H, 3 all)
tol = 0.000001,   ! geom tolerance (max <0.00005, def 0.00001)
ntf = 2,           ! force evaluation, to use 2 with SHAKE
ntx = 5,           ! 5(read all velocities)
ntb = 2,           ! PBC, 2(const P)
ntpr = 500,        ! every NTPR steps print to out-info
ntwx = 5000,       ! every NTWX to mdcrd-nc
ntwr = 100000,     ! every X rst; anyway at nstlim...
nstlim = 20000,   ! nstep (in remd nstep between exchanges)
dt = 0.001,       ! dt, in psec
ig = -1,          ! random seed
ntt = 3,          ! 3(Langevin)
gamma_ln = 1.0,   ! collision frequency
temp0 = 310.15,  ! T at which the system is to be kept
ntp = 1,          ! pressure (1)isotropic
barostat = 1,     ! [1]Berendsen barostat
mcbarint = 50,    ! interval steps to MC volume changes
taup = 3.0,       ! pressure relaxation time in psec (1-5)

```

```

nmropt = 1,
/
&wt type='END'
/
DISANG=restraint.txt

```

Slika 3.13. Relaksacija gustine bez ograničenja na nanočestici.

3.1.5.3. Ekvilibracija

U fazi ekvilibracije sva ograničenja su postupno uklonjena i sistemi su ekvilibrirani pod uslovima konstantnog pritiska i temperature (NPT ansambl) sa vremenskim korakom od 1 fs. U zavisnosti od konformacije molekula, ova faza traje od nekoliko ns do nekoliko desetina ns i radi se postupno. U simulacijama koje su izvršene u ovoj disertaciji, ta faza trajala je oko 8 ns. Nakon toga, sistem je ekvilibriran dodatnih 5 ns korišćenjem Monte Carlo barostata. Razlog za promenu barostata koji kontroliše pritisak u sistemu je taj što je Berendsen barostat otporniji na velike fluktuacije pritiska u sistemu koje se javljaju u prvim koracima ekvilibracije sistema, dok je Monte Carlo barostat precizniji. Monte Carlo se koristi kada se fluktuacije male, jer u suprotnom dolazi do “pucanja” simulacije.

```

&cntrl
  ioutfm = 1,           ! use netCDF
  ntxo = 2,            ! use netCDF for restart
  iwrap = 0,          ! wrap coordinates to original box
  cut = 9.0,          ! nonbonded cutoff, in A
  irest = 1,          ! restart, req velocities in input
  ntc = 2,             ! SHAKE (1 no, 2 H, 3 all)
  tol = 0.000001,     ! geom tolerance (max <0.00005, def 0.00001)
  ntf = 2,            ! force evaluation, to use 2 with SHAKE
  ntx = 5,            ! 5(read all velocities)
  ntb = 2,            ! PBC, 2(const P)
  ntpr = 10000,       ! every NTPR steps print to out-info
  ntwx = 10000,       ! every NTWX to mdcrd-nc
  ntwr = 1000000,     ! every X rst; anyway at nstlim...
  nstlim = 100000,   ! nstep (in remd nstep between exchanges)
  dt = 0.002,         ! dt, in psec
  ig = -1,            ! random seed
  ntt = 3,            ! 3(Langevin)
  gamma_ln = 1.0,    ! collision frequency
  temp0 = 310.15,    ! T at which the system is to be kept
  ntp = 1,            ! pressure (1)isotropic
  barostat = 1,       ! [1]Berendsen
  taup = 2.0,         ! pressure relaxation time in psec (1-5)
  nmropt = 1,
/

```



```

&wt type='END'
/
DISANG=restraint.txt

```

Slika 3.14. I faza ekvibracije.

```

&cntrl
  ioutfm = 1,           ! use netCDF
  ntxo = 2,            ! use netCDF for restart
  iwrap = 0,          ! wrap coordinates to original box
  cut = 9.0,          ! nonbonded cutoff, in A
  irst = 1,           ! restart, req velocities in input
  ntc = 2,             ! SHAKE (1 no, 2 H, 3 all)
  tol = 0.000001,    ! geom tolerance (max <0.00005, def 0.00001)
  ntf = 2,            ! force evaluation, to use 2 with SHAKE
  ntx = 5,            ! 5(read all velocities)
  ntb= 2,             ! PBC, 2(const P)
  ntp = 10000,        ! every NTPR steps print to out-info
  ntw = 50000,        ! every NTWX to mdcrd-nc
  ntwr = 1000000,    ! every X rst; anyway at nstlim...
  nstlim = 500000,   ! nstep (in remd nstep between exchanges)
  dt = 0.002,         ! dt, in psec
  ig = -1,            ! random seed
  ntt = 3,            ! 3(Langevin),
  gamma_ln = 2.0,    ! collision frequency
  temp0 = 310.15,    ! T at which the system is to be kept
  ntp = 1,            ! pressure (1)isotropic
  barostat = 1,       ! [1]Berendsen barostat
  taup = 1.5,         ! pressure relaxation time in psec (1-5)
  nmropt = 1,
/
&wt type='END'
/

```

```
DISANG=restraint.txt
```

Slika 3.15. II faza ekvibracije - Berendsen barostat.

```

&cntrl
  ioutfm = 1,           ! use netCDF
  ntxo = 2,            ! use netCDF for restart
  iwrap = 0,          ! wrap coordinates to original box
  cut = 9.0,          ! nonbonded cutoff, in A
  irst = 1,           ! restart, req velocities in input
  ntc = 2,             ! SHAKE (1 no, 2 H, 3 all)
  tol = 0.000001,    ! geom tolerance (max <0.00005, def 0.00001)
  ntf = 2,            ! force evaluation, to use 2 with SHAKE
  ntx = 5,            ! 5(read all)
  ntb= 2,             ! PBC, 2(const P)
  ntp = 10000,        ! every NTPR steps print to out-info

```

```

ntwx = 50000,          ! every NTWX to mdcrd-nc
ntwr = 1000000,      ! every X rst; anyway at nstlim...
nstlim = 500000,    ! nstep (in remd nstep between exchanges)
dt = 0.002,         ! dt, in psec
ig = -1,            ! random seed
ntt = 3,            ! 3(Langevin)
gamma_ln = 2.0,     ! collision frequency
temp0 = 310.15,     ! T at which the system is to be kept
ntp = 1,            ! pressure (1)isotropic
barostat = 2,       ! (2)Monte Carlo barostat
taup = 1.2,         ! pressure relaxation time in psec (1-5)
nmropt = 1,
/
&wt type='END'
/
DISANG=restraint.txt

```

Slika 3.16. III faza ekvibracije - Monte Carlo barostat.

3.1.5.4. Produkcija

Trajanje faze produkcije varirano je u zavisnosti od osobina koje su ispitivane (obično između 200-300 ns). Ova faza nema fiksirano trajanje. Takođe, trajanje ekvibracije se ne može predvideti unapred, što znači da ekvibracija može da se nastavi i u fazi produkcije. Simulacija se produžava dokle god se ne postigne konvergencija parametra kojeg ispitujemo. Faza produkcije se pušta pod istim uslovima kao i poslednja faza ekvibracije, i služi za prikupljanje podataka (trajektorije) koji će biti kasnije analizirani. Prvih n nanosekundi faze produkcije se odbacuje zbog minimalnih perturbacija do kojih može doći pri promeni uslova (ansambla) i eventualno produžene faze ekvibracije.

```

&cntrl
ioutfm = 1,          ! use netCDF
ntxo = 2,           ! use netCDF for restart
iwrap = 0,          ! wrap coordinates to original box
cut = 9.0,          ! nonbonded cutoff, in Å
irest = 1,          ! restart, req velocities in input
ntc = 2,            ! SHAKE (1 no, 2 H, 3 all)
tol = 0.000001,    ! geom tolerance (max <0.00005, def 0.00001)
ntf = 2,            ! force evaluation, to use 2 with SHAKE
ntx = 5,            ! 5(read all)
ntb = 2,            ! PBC, 2(const P)
ntpr = 10000,       ! every NTPR steps print to out-info
ntwx = 50000,       ! every NTWX to mdcrd-nc
ntwr = 1000000,     ! every X rst; anyway at nstlim...
nstlim = 5000000,   ! nstep (in remd nstep between exchanges)
dt = 0.002,         ! dt, in psec

```

```

ig = -1,                ! random seed
ntt = 3,                ! 3(Langevin)
gamma_ln = 2.0,        ! collision frequency
temp0 = 310.15,        ! T at which the system is to be kept
ntp = 1,                ! pressure (1)isotropic
barostat = 2,          ! (2)Monte Carlo barostat
taup = 1.2,            ! pressure relaxation time in psec (1-5)
nmropt = 1,
/
&wt type='END'
/
DISANG=restraint.txt

```

Slika 3.17. Produkcija molekulske dinamike.

3.1.5.5. Puštanje simulacija

Pored gore opisanih ulaznih datoteka (topologija, koordinate, Au-S potencijal, datoteke koje definišu različite faze simulacije i uslove pod kojima se simulacija pušta) neophodno je pripremiti i skriptu za samo puštanje simulacija. Primer skripte pokazan je na slici 3.18. Sve simulacije puštane su na superkompjuteru Sisu u Finskoj.

```

export syn='PAN_11v3.solv'
export inpcrd='PAN_11v3.solv'
export CUDA_VISIBLE_DEVICES=1
export NCPU=20

mkdir -p equil
mkdir -p prod
mkdir -p pre_equil

mpirun -np $NCPU -mca btl ^openib pmemd.MPI -O -p "$syn".prmtop -i
./mdin/min_sol.in \
  -o ./pre_equil/min_sol_"$syn".out \
  -x ./pre_equil/min_sol_"$syn".nc \
  -r ./pre_equil/min_sol_"$syn".rst \
  -c "$inpcrd".inpcrd \
  -ref "$inpcrd".inpcrd
mpirun -np $NCPU -mca btl ^openib pmemd.MPI -O -p "$syn".prmtop -i
./mdin/min_all.in \
  -o ./pre_equil/min_all_"$syn".out \
  -x ./pre_equil/min_all_"$syn".nc \
  -r ./pre_equil/min_all_"$syn".rst \
  -c ./pre_equil/min_sol_"$syn".rst \
  -ref ./pre_equil/min_sol_"$syn".rst
mpirun -np $NCPU -mca btl ^openib pmemd.MPI -O -p "$syn".prmtop -i
./mdin/heat.in \

```

```

-o ./pre_equil/heat_"$syn".out \
-x ./pre_equil/heat_"$syn".nc \
-r ./pre_equil/heat_"$syn".rst \
-c ./pre_equil/min_all_"$syn".rst \
-ref ./pre_equil/min_all_"$syn".rst
mpirun -np $NCPU pmemd.MPI -O -p "$syn".prmtop -i ./mdin/density.in \
-o ./pre_equil/density_"$syn".out \
-x ./pre_equil/density_"$syn".nc \
-r ./pre_equil/density_"$syn".rst \
-c ./pre_equil/heat_"$syn".rst \
-ref ./pre_equil/heat_"$syn".rst
mpirun -np $NCPU pmemd.MPI -O -p "$syn".prmtop -i ./mdin/density2.in \
-o ./pre_equil/density2_"$syn".out \
-x ./pre_equil/density2_"$syn".nc \
-r ./pre_equil/density2_"$syn".rst \
-c ./pre_equil/density_"$syn".rst \
-ref ./pre_equil/density_"$syn".rst

pmemd.cuda -O -p "$syn".prmtop -i ./mdin/equil.in \
-o ./equil/equill_"$syn".out \
-x ./equil/equill_"$syn".nc \
-r ./equil/equill_"$syn".rst \
-c ./pre_equil/density2_"$syn".rst \
-ref ./pre_equil/density2_"$syn".rst
export x=2
while [[ $x -le 10 ]] ; do
let y=x-1
pmemd.cuda -O -p "$syn".prmtop -i ./mdin/equil.in \
-o ./equil/equil"$x"_"$syn".out \
-x ./equil/equil"$x"_"$syn".nc \
-r ./equil/equil"$x"_"$syn".rst \
-c ./equil/equil"$y"_"$syn".rst \
-ref ./equil/equil"$y"_"$syn".rst
let x+=1
done

pmemd.cuda -O -p "$syn".prmtop -i ./mdin/NPT_BER.in \
-o ./equil/NPT_BER1_"$syn".out \
-x ./equil/NPT_BER1_"$syn".nc \
-r ./equil/NPT_BER1_"$syn".rst \
-c ./equil/equill10_"$syn".rst \
-ref ./equil/equill10_"$syn".rst
export x=2
while [[ $x -le 8 ]] ; do
let y=x-1 -o ./equil/NPT_BER"$x"_"$syn".out \
-x ./equil/NPT_BER"$x"_"$syn".nc \
-r ./equil/NPT_BER"$x"_"$syn".rst \
-c ./equil/NPT_BER"$y"_"$syn".rst \
-ref ./equil/NPT_BER"$y"_"$syn".rst

```

```

let x+=1
done
pmemd.cuda -O -p "$syn".prmtop -i ./mdin/NPT_MCEq.in \
  -o ./equil/NPT_MC1_"$syn".out \
  -x ./equil/NPT_MC1_"$syn".nc \
  -r ./equil/NPT_MC1_"$syn".rst \
  -c ./equil/NPT_BER8_"$syn".rst \
  -ref ./equil/NPT_BER8_"$syn".rst
export x=2
while [[ $x -le 5 ]] ; do
let y=x-1
pmemd.cuda -O -p "$syn".prmtop -i ./mdin/NPT_MCEq.in \
  -o ./equil/NPT_MC"$x"_"$syn".out \
  -x ./equil/NPT_MC"$x"_"$syn".nc \
  -r ./equil/NPT_MC"$x"_"$syn".rst \
  -c ./equil/NPT_MC"$y"_"$syn".rst \
  -ref ./equil/NPT_MC"$y"_"$syn".rst
let x+=1
done
pmemd.cuda -O -p "$syn".prmtop -i ./mdin/NPT_MC.in \
  -o ./prod/NPT_MC1_"$syn".out \
  -x ./prod/NPT_MC1_"$syn".nc \
  -r ./prod/NPT_MC1_"$syn".rst \
  -c ./equil/NPT_MC5_"$syn".rst \
  -ref ./equil/NPT_MC5_"$syn".rst
export x=2
while [[ $x -le 30 ]] ; do
let y=x-1
pmemd.cuda -O -p "$syn".prmtop -i ./mdin/NPT_MC.in \
  -o ./prod/NPT_MC"$x"_"$syn".out \
  -x ./prod/NPT_MC"$x"_"$syn".nc \
  -r ./prod/NPT_MC"$x"_"$syn".rst \
  -c ./prod/NPT_MC"$y"_"$syn".rst \
  -ref ./prod/NPT_MC"$y"_"$syn".rst
let x+=1
done

```

Slika 3.18. Primer skripte za puštanje simulacija.

3.2. Analiza podataka

Analiza trajektorija urađena je korišćenjem *Amberovog* programa *cpptraj*, *VMD1.9.3* programa [102] i korišćenjem *Python* skripti specijalno napravljenih za konkretne analize.

Pre analize trajektorija, potrebno je sređivanje i objedinjavanje svih datoteka trajektorija. To je urađeno korišćenjem *cpptraj* programa i sledeće skripte:

```

set sysname = PAN31_27_ions
parm $sysname.solv.prmtop

trajin equil/equil?_$sysname.solv.nc 1 last 1
trajin equil/equil??_$sysname.solv.nc 1 last 1
autoimage
trajout equil/equil_2ns_100psf.$sysname.solv.nc offset 5
go
strip :WAT outprefix noWAT
trajout equil/equil_2ns_20psf.$sysname.noWAT.nc
go
clear trajin

trajin equil/NPT_BER?_$sysname.solv.nc 1 last 1
autoimage
trajout equil/NPT_BER_8ns_500psf.$sysname.solv.nc offset 5
go
strip :WAT outprefix noWAT
trajout equil/NPT_BER_8ns_100psf.$sysname.noWAT.nc
go
clear trajin

trajin equil/NPT_MC?_$sysname.solv.nc 1 last 1
autoimage
trajout equil/NPT_MC_5ns_500psf.$sysname.solv.nc offset 5
go
strip :WAT outprefix noWAT
trajout equil/NPT_MC_5ns_100psf.$sysname.noWAT.nc
go
clear trajin

set ProdRange = 000-100ns
for i=1;i<11;i++
  trajin prod/NPT_MC$i_$sysname.solv.nc 1 last 1
done
autoimage
trajout prod/NPT_MC_$ProdRange_1nsf.$sysname.solv.nc offset 10
go
strip :WAT outprefix noWAT
autoimage
trajout prod/NPT_MC_$ProdRange_100psf.$sysname.noWAT.nc
go
clear trajin

set ProdRange = 101-200ns
for i=11;i<21;i++
  trajin prod/NPT_MC$i_$sysname.solv.nc 1 last 1
done

```

```

autoimage
trajout prod/NPT_MC_${ProdRange}_1nsf.$sysname.solv.nc offset 10
go
strip :WAT outprefix noWAT
autoimage
trajout prod/NPT_MC_${ProdRange}_100psf.$sysname.noWAT.nc
go
clear trajin

set ProdRange = 201-300ns
for i=21;i<31;i++
  trajin prod/NPT_MC$i_.$sysname.solv.nc 1 last 1
done
autoimage
trajout prod/NPT_MC_${ProdRange}_1nsf.$sysname.solv.nc offset 10
go
strip :WAT outprefix noWAT
autoimage
trajout prod/NPT_MC_${ProdRange}_100psf.$sysname.noWAT.nc
go
clear trajin

```

Slika 3.19. Primer skripte za sredjivanje i objedinjavanje datoteka trajektorija.

3.2.1. Funkcija radijalne distribucije (RDF - Radial distribution function)

Funkcija radijalne distribucije opisuje variranje gustine čestica (atoma/molekula/delova molekula) kao funkciju udaljenosti od referentne čestice. Ovo je korisna alatka za opisivanje atomske strukture simuliranog sistema. Ona opisuje lokalnu organizaciju oko bilo kog atoma i daje informacije o dinamičkoj promeni strukture. Uopšteno, računa se koji broj čestica se nalazi unutar udaljenosti r i $r+dr$ od referentne čestice. Skripta korišćene za proračun u *cpptraj* programu prikazana je ispod na slici 3.20.

```

set sysname = PAN13_27_ions
parm $sysname.solv.prmtop
trajin prod/NPT_MC_000-100ns_1nsf.PAN13_27_ions.solv.nc 1 last 1
trajin prod/NPT_MC_101-200ns_1nsf.PAN13_27_ions.solv.nc 1 last 1
trajin prod/NPT_MC_201-300ns_1nsf.PAN13_27_ions.solv.nc 1 last 1
autoimage
radgyr RG !:WAT,Na+,Cl- out RadGyr_all.txt tensor

rdf out rdf.txt 0.5 90.0 :C11,OCC,OCB,OCP,OCN,PAN,ONC :NP rdf_Lig rawrdf
rdf_raw.txt center2
rdf out rdf.txt 0.5 90.0 :PAN :NP rdf_PAN rawrdf rdf_raw.txt center2
rdf out rdf.txt 0.5 90.0 :ONC :NP rdf_ONC rawrdf rdf_raw.txt center2
rdf out rdf.txt 0.5 90.0 :WAT@O :NP rdf_WAT rawrdf rdf_raw.txt center2

```

go
quit

Slika 3.20. Primer skripte za računanje funkcije radijalne distribucije

3.2.2. Veličina funkcionalizovane nanočestice

Veličina funkcionalizovane nanočestice je jedan od ključnih parametara za procenu njenog efekta. Veličina nanočestice utiče na dužinu cirkulacije, brzinu izbacivanja iz organizma, mehanizam ulaska u ćeliju itd.

S obzirom na to da funkcionalizovane nanočestice ispitivane u ovoj disertaciji nisu savšenog sfernog oblika, za procenu veličine korišćene su dve veličine:

1. Maksimalna veličina nanočestice,
2. Prosečna veličina nanočestice.

Maksimalna veličina nanočestice

Maksimalna veličina nanočestice (d_{max}) računata je na osnovu funkcije radijalne distribucije kao najveća udaljenost terminalnog kraja liganada u odnosu na centralni atom jezgra od zlata.

Prosečna veličina nanočestice

Zbog fleksibilnost liganada, veličina funkcionalizovane nanočestice u rastvoru može da se razlikuje od veličine "predviđene" na osnovu molekulske formule (u vakuumu). *Prosečna* veličina nanočestice (d_m) je računata nakon simulacije kao prosečna udaljenost terminalnih grupa od centra mase jezgra od zlata [103].

Proračun veličine nanočestice potvrđen je eksperimentalno. Najčešće korišćena eksperimentalna metoda za određivanje veličine nanočestica je DLS - Diffusion light scattering. S obzirom na to da su nanočestice zlata polidisperzne, one se u rastvoru javljaju u određenom opsegu veličina, a kao rezultat dobija se prosečna vrednost sa odstupanjem. S druge strane, u molekulskoj dinamici simulira se samo jedna nanočestica i ona predstavlja idealizovan sistem. Rezultati su dati u tabeli ispod:

Tabela 3.2. Upoređivanje dobijenih vrednosti veličine nanočestice između molekulske dinamike i eksperimenta.

Izvor	Analiza	Veličina (nm)
Molekulska dinamika	d_{max}	12,45
Molekulska dinamika	d_m	10,05
Eksperiment	DLS	13,31 \pm 3

Sinteza i eksperimentalna karakterizacija nanočestica rađena je u okviru projekta EVO-NANO od strane kompanije ProChimia Surfaces (Poljska).

3.2.3. Prosečna debljina monosloja

Prosečna debljina monosloja je, pored veličine, dodatni aspekt koji upotpunjuje sliku o strukturi nanočestice. Karakteristike monosloja imaju ključnu ulogu u dinamici i interakcijama između nanočestica, i između nanočestica i sredine u kojoj se nalaze. Prosečna debljina monosloja računata je kao debljina sloja koja sadrži 97% atoma u monosloju [24]. Početna tačka za proračun je prethodno izračunat RDF.

Da bi se prikazalo odstupanje u odnosu na teorijske vrednosti takođe je računata i teorijska debljina monosloja - R_s-n (sa potpuno izduženim ligandima). Ona se računa kao prosečna udaljenost pozicije sumpora od terminalnog kraja potpuno izduženih liganada (u vakuumu).

3.2.4. Florijev radijus i konformacija monosloja

Florijeva teorija polimera se sve češće koristi u karakterizaciji strukture nanosistema. Razlog za to je funkcionalizacija nanočestica polimernim ligandima, uglavnom polietilenglikolom (PEG). Cilj upotrebe PEG liganada je postizanje "nevidljivosti" nanočestica u organizmu. U trenutku kada se lek, funkcionalizovana nanočestica ili neki drugi molekuli injektuju u krvotok, dolazi do adsorpcije proteina krvi na površinu tih struktura, odnosno, dolazi do formiranja proteinske korone. Adsorpcija proteina menja veličinu, oblik i naelektrisanje što utiče na fizičko-hemijske karakteristike i biološku aktivnost injektovanih nanosistema. PEG smanjuje nespecifične interakcije i smanjuje verovatnoću adsorpcije proteina. Ovo takođe značajno utiče i na vreme koje nanočestica provodi u cirkulaciji [99, 104, 105].

S obzirom na to da polimerni molekuli mogu da zauzmu veliki broj položaja u prostoru, to direktno utiče na konformaciju monosloja nanočestice. Različite konformacije javljaju se kao posledica rotacije lanca, u ovom slučaju liganda, oko jednostrukih hemijskih veza. Kakav će položaj lanac zauzeti u prostoru zavisi od ugla između hemijskih veza, ugla rotacije susednih segmenata, dužine lanca, i fleksibilnosti segmenata.

Dva opšta tipa konformacije koja se javljaju usled gustine liganada na površini nanočestice su "nasumično klupko" (eng. "mushroom") i "konformacije četke" gde su potpuno opruženi lanci (eng. "brush"). Najoptimalnija konformacija monosloja je između ove dve konformacije [99].

Konformacija nasumičnog klupka javlja se u slučaju kada je gustina liganada vezanih za površinu nanočestica mala (kada je udaljenost između dve tačke vezivanja liganada na površinu, D , veća od Florijevog radijusa, R_F , ili kada je debljina monosloja, L , jednaka Florijevom

radijusu). Konformacije četke javlja se u suprotnom slučaju, kada je D manje od R_F . Najoptimalnija konformacija monosloja je između konformacije nasumičnog klupka i konformacije četke ($R_F/D \approx 1$) jer je izbegavanje adsorpcije proteina smanjivanjem nespecifičnih interakcija sa njima najveće.

Florijev radijus predstavlja udaljenost terminalnog kraja lanca od tačke vezivanja. Računa se kao:

$$R_F = aN^{3/5} \quad (3.2)$$

gde je a - dužina jednog monomera, N je broj monomernih jedinica po lancu, a koeficijent $3/5$ (koji se najčešće koristi) služi da opiše da se polimerni lanac nalazi u "dobrom" rastvaraču, odnosno, pokazuje da je rastvorljivost polimera u ovom rastvaraču dobra. U drugim slučajevima, koriste se drugi koeficijenti.

Udaljenost između dve tačke vezivanja liganada na površinu, D , može se izračunati aproksimiranjem AuNP kao sferne čestice sa prečnikom d i površinom S . Pretpostavljajući da je prosečna površina po ligandu $A = S/N_{PEG}$:

$$D = 2\sqrt{\frac{S}{\pi N_{PEG}}} = 2\frac{d}{\sqrt{N_{PEG}}} \quad (3.3)$$

Teorijska debljina monosloja (sa potpuno izduženim ligandima) i debljina monosloja dobijenim iz simulacija računaju se na način koji je opisan ranije, u sekciji 3.2.3.

Iako ligandi korišćeni u ovoj disertaciji nisu čisto polimerni, središnji deo liganada se sastoji iz ponavljajućih PEG jedinica. S obzirom na važnost uticaja konformacije monosloja na ponašanje funkcionalizovane nanočestice u fiziološkoj sredini, jednačina za određivanje Florijevog radijusa je prilagođena kako bi se uzela u obzir heterogenost fragmenata koji čine jedan ligand.

S obzirom na to da je središnji deo liganda svakako sačinjen od PEG monomera, akcenat je bio na definisanju ostalih fragmenata koji se mogu aproksimirati kao monomerne jedinice. Da bi se do toga došlo, kroz simulacije je posmatrana struktura ostalih fragmenata. S obzirom na to da je sastavni deo svakog liganda alkilni niz od 11 C atoma, primećeno je da dolazi do značajnog savijanja fragmenta na njegovoj sredini. Niz od 5-6 C atoma je dovoljno krut da može da se posmatra kao jedna monomerna jedinica. Takođe, ono što je zajedničko svim ligandima korišćenim u ovoj disertaciji jeste to da je na krajnju PEG monomernu jedinicu vezan lek koji je ujedno terminalni kraj liganda. Ovaj terminalni kraj je aproksimiran kao poslednja monomerna jedinica liganda.

Na primer:

Ligand koji nosi antitumorski lek Gemcitabin (GEM) sastoji se iz sledećih monomernih jedinica:

C5-C6-(PEG)₆-GEM

Jedinice C5 i C6 su ugljovodonični nizovi od 5 i 6 ugljenikov atoma. Ove jedinice su aproksimirane kao jedan tip (C5*) tako što su prvo izračunate dužine tih fragmenata ($L(C5) = 6.6 \text{ \AA}$, $L(C6)=6.4 \text{ \AA}$). S obzirom na malo odstupanje u dužini (i ponašanju fragmenta C11 tokom simulacija gde je primećeno da dolazi do značajnog savijanja fragmenta skoro isključivo na njegovoj sredini između atoma C5 i C6) kao dužina monomerne jedinice uzeta je srednja vrednost dužine ovih fragmenata. PEG jedinice su ponavljajuće O-C-C strukture, dok je GEM terminalni kraj liganda odnosno nošeni lek Gemcitabin.

Da bi se izračunao Florijev radijus za ovakav heterogeni ligand, prvo je izračunat Florijev radijus za jedan tip fragmenta.

U slučaju liganda koji nosi Gemcitabin izračunat je Florijev radijus za C5* monomernu jedinicu (2 jedinice), zatim zasebno Florijev radijus za 6 PEG jedinica i konačno Florijev radijus za 1 GEM jedinicu. Konačan, tj. ukupan Florijev radijus dobijen je sabiranjem svih izračunatih vrednosti.

S obzirom na to da su neki od korišćenih liganada hidrofobni (oni koji nose lekove), a neki hidrofilni (pozadinski ligandi), a da su simulacije rađene u vodi, korišćena su dva različita koeficijenta u jednačini. U slučaju hidrofobnih liganada korišćen je koeficijent od $\frac{1}{3}$, a u slučaju hidrofilnih liganada koeficijent od $\frac{2}{3}$.

Da bi se potvrdila tačnost proračuna, vrednost Florijevog radijusa korišćena za izračunavanje prosečne veličine nanočestice, i ovaj rezultat upoređen je sa prosečnom veličinom nanočestice izračunate preko trajektorija na ranije opisan način.

Tabela 3.2. Upoređivanje veličine nanočestica izračunatih preko Florijevog radijusa i preko trajektorija za heterogene sisteme gde je odnos liganada koji nose lek naspram pozadinskih liganada 1:1.

Sistemi	GEM11	NCL11	OQL11	PAN11
Veličina nanočestice preko Florijevog radijusa (nm)	10,14	9,87	9,45	10,32
Veličina nanočestice preko trajektorija (nm)	10,85	10,25	10,05	10,95
Odstupanje (nm)	0,71	0,38	0,6	0,63

Tabela 3.3. Upoređivanje veličine nanočestica izračunatih preko Florijevog radijusa i preko trajektorija za homogene sisteme gde je nanočestica 100% pokrivena samo jednim tipom liganda koji nosi lek

Sistemi	GEM100	NCL100	OQL100	PAN100
Veličina nanočestice preko Florijevog radijusa (nm)	10,44	9,60	9,56	10,40
Veličina nanočestice preko trajektorija (nm)	10,85	9,55	9,85	11,35
Odstupanje (nm)	0,41	0,05	0,29	0,95

Eksperimentalno određivanje veličine funkcionalizovanih nanočestica zlata DLS metodom ima preciznost od ± 3 nm. Vrednosti u tabelama 3.2. i 3.3. ukazuju na to da je odstupanje između dva tipa proračuna minimalno i zadovoljavajuće. U slučaju heterogeno funkcionalizovanih nanočestica najveće odstupanje je 0,71 nm. Kod homogeno funkcionalizovanih nanočestica najveće odstupanje kod Panobinostat sistema od 0,95 nm, dok je u drugim sistemima manje od pola nanometra.

3.2.5. Površina dostupna rastvaraču (SASA - Solvent Accessible Surface Area)

Površina dostupna rastvaraču (SASA) opisuje deo površine sistema koji je dovoljno izložen rastvaraču tako da ispitivani molekuli mogu da interaguju sa molekulima rastvarača. Ove interakcije imaju ključnu ulogu u stabilizaciji strukture, rastvorljivosti molekula i imaju veliki uticaj na ispoljavanje biološke aktivnosti.

Površina dostupna rastvaraču se računa korišćenjem algoritma "kotrljajuće lopte" ("rolling ball" algorithm). Na ovaj način se molekul rastvarača aproksimira kao sfera koja se kotrlja po Van der Valsovoj površini i mapira površinu kojoj može da pristupi. S obzirom na to da je u svim simulacijama rastvarač voda, za veličinu sfere je uzeta tipična vrednost od 1.4 Å.

Ovaj parametar je izračunat i za celu funkcionalizovanu nanočesticu, kao i za pojedine fragmente kako bi se utvrdilo da li su oni adekvatno izloženi, odnosno, da li su oni dostupni za interakcije sa svojom okolinom. Ovo je posebno važno za molekule leka koje nosi nanočestica.

3.2.6. Izloženost leka / Dostupnost leka

Kako bi se pronašao optimalan dizajn, u smislu dostupnosti leka i izvodljivosti sinteze, najbolje rešenje bi bilo da se teži maksimalnoj koncentraciji leka dostupnoj rastvaraču u odnosu na ukupnu koncentraciju leka vezanog za nanočesticu, tako da je što veći broj molekula leka dostupan za interakciju sa okolinom. Na taj način se omogućava da se maksimalno izrazi biološka aktivnost. Ovaj parametar se izračunava kao odnos površine leka dostupne rastvaraču i ukupne teorijske dostupne površine istog molekula leka.

Dostupnost leka je izuzetno važna za procenu efikasnosti funkcionalizovane nanočestice. Ligandi koji su korišćeni za funkcionalizaciju zlatnih nanočestica su sintetisani u projektu u okviru kog je rađena disertacija. Lekovi su vezani na terminalnim krajevima liganada i povezani su sa pH-osetljivim linkerima. Lek koji nije dostupan (sakriven je od rastvarača i generalno sredine u kojoj se nalazi) ne može da se oslobodi niti da interaguje sa svojom okolinom. Da bi se potvrdio teorijski proračun, rezultat dobijen na ovaj način upoređen je sa eksperimentalnom vrednošću procenta leka koji se oslobađa sa funkcionalizovane nanočestice. Ovi eksperimenti su urađeni od strane kompanije ProChimia Surfaces. S obzirom na to da se u simulacijama molekulske dinamike modeluje idealizovan sistem, i da se modeluje samo jedna

nanočestica, rezultat dobijen na ovaj način predstavlja maksimalni procenat leka koji može da se oslobodi. Eksperimentalne vrednosti mogu biti jednake ili manje od toga.

Na primer, u slučaju Kvinolinol sistema gde je nanočestica funkcionalizovana ligandima koji nose lek Kvinolinol i cviterjonskim pozadinskim ligandom u odnosu 1:1, početni broj molekula u sistemu je 210. Teorijski izračunata vrednost dostupnosti leka uravnoteženog sistema u vodi je 14.4 %, odnosno ~ 30 molekula leka. Eksperimentalno je određeno da se procenat leka koji se otpušta u sistemu od 4-10 % (~ 9-21 molekula leka).

3.2.7. Intramolekulske interakcije

Da bismo dobili detaljniji uvid u strukturu nanočestica, ispitivane su intramolekulske interakcije korišćenjem softvera Discovery studio [106].

Interakcije su razvrstane u dva osnovna tipa:

- **Povoljne:** interakcije koje doprinose stabilizaciji strukture (vodonične veze, elektrostatičke interakcije između parova suprotno naelektrisanih grupa, hidrofobne interakcije i druge kao što su interakcije sa halogenim elementima, interakcije između metalnih katjona i akceptora vodonične veze, interakcije sa atomima sumpora itd.).
- **Nepovoljne:** interakcije koje utiču na destabilizaciju strukture (sterne smetnje (koje nastaju usled interakcija atoma/grupa u bliskom kontaktu), odbijanje naelektrisanja (između isto naelektrisanih grupa), interakcije između metalnog katjona i donora vodonične veze, interakcije između para donora ili akceptora u bliskom kontaktu).

3.2.8. Energija sistema

U svakom koraku simulacije računaju se ukupna energija, potencijalna energija i kinetička energija.

Praćenje ovih vrednosti takođe ukazuje na to da li je sistem uravnotežen (u ravnoteži, promene energije treba da su male i ustaljene). Ako se javljaju iznenadni pikovi, to može ukazati na probleme sa protokolom simulacije, na lošu početnu strukturu, previše velik vremenski korak, neprikladno odabrane parametre, itd.

Takođe, međusobnim upoređivanjem ukupnih energija između sistema može se dobiti uvid u njihovu relativnu stabilnost, pod pretpostavkom da su sve simulacije puštane na isti način, sa istim početnim uslovima.

3.3. Procedura pripreme specifičnih sistema i simulacija odabranih funkcionalizovanih nanočestica

3.3.1. Priprema sistema za ispitivanje strukture nanočestica zlata funkcionalizovanih homogenim monoslojem u vodenom rastvoru

U okviru ove disertacije, akcenat je bio na nanočesticama funkcionalizovanim heterogenim monoslojem. Međutim, uvođenje više različitih tipova liganada unosi veću kompleksnost u sistem i dovodi do novih tipova interakcija koje je teško izolovati. Zbog toga je prvi korak bio da se simuliraju nanočestice sa homogenim monoslojem kako bi se jasnije video uticaj uvođenja novog tipa liganada u sistem.

U ovoj grupi eksperimenata modelovana su dva tipa sistema:

1. nanočestice zlata prečnika 5.5 nm funkcionalizovane samo API ligandom koji nosi lek
 - a) N-Kvinolinol (Kvinolinol je vezan za ligand preko azota) - **NHQ**
 - b) O-Kvinolinol (Kvinolinol je vezan za ligand preko kiseonika) - **OQL**
 - c) Vik - **WYC**
 - d) Niklozamid - **NCL**
 - e) Zileuton - **ZIL**
 - f) Gemcitabin - **GEM**
 - g) Panobinostat - **PAN**
2. nanočestice zlata funkcionalizovane samo pozadinskim ligandom različitih dužina:
 - a) Pz2 - kratki
 - b) PegZ - srednji
 - c) Pz4 - dugački

Svi sistemi modelovani su na 310,15 K u vodenoj sredini (temperatura od 310,15 K predstavlja fiziološku temperaturu). Simulacije sistema koji nose lek puštane su 300 ns, dok su simulacije sistema funkcionalizovanih samo pozadinskim ligandom puštane 200 ns. Strukture ispitivanih liganada prikazane su u tabelama 3.4 i 3.5.

Tabela 3.4. Strukture ispitivanih API liganada.

TL	Naziv Liganda	Struktura
API	HS-C11-Peg 6 -Gemcitabin [GEM]	

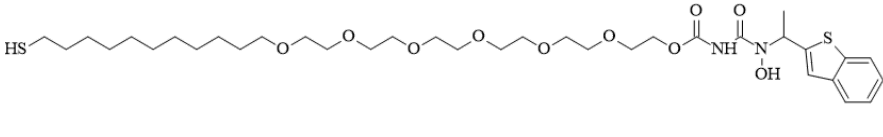
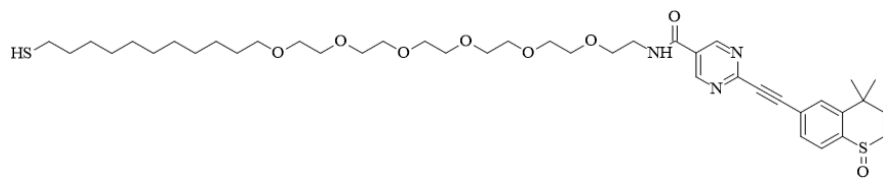
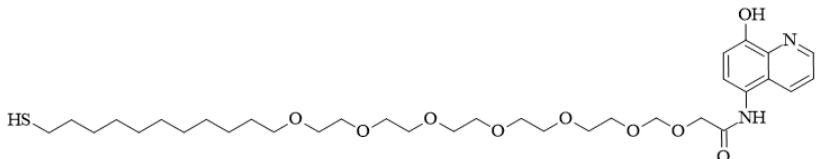
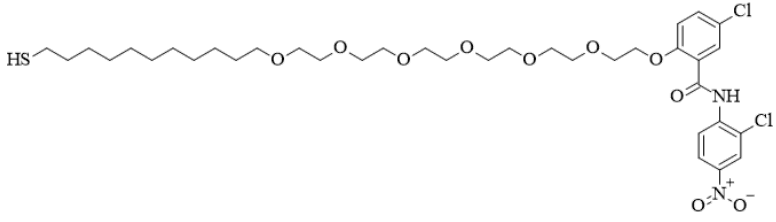
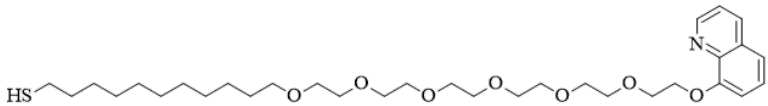
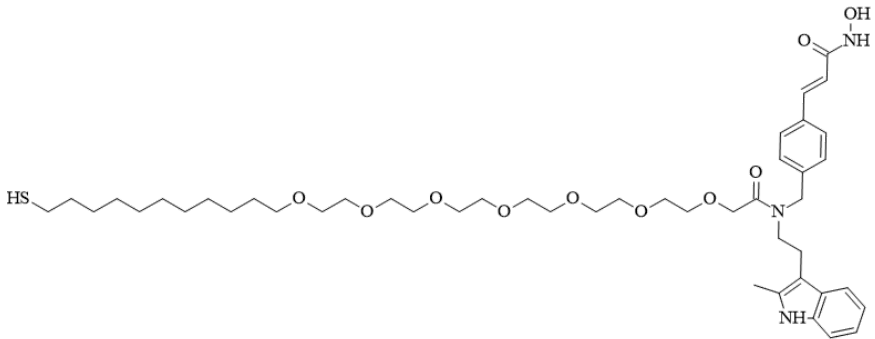
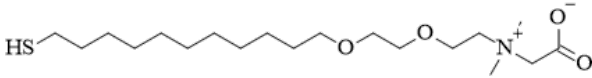
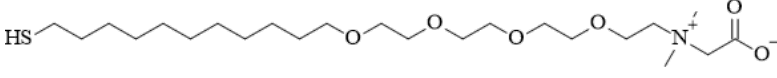
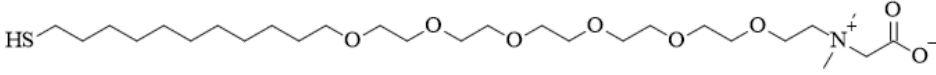
API	HS-C11-Peg 6 -Zileuton [ZIL]	
API	HS-C11-Peg 6 -Vik215 [WYC]	
API	HS-C11-Peg 6 -N-Kvinolinol [NHQ]	
API	HS-C11-Peg 6 -Niklozamid [NCL]	
API	HS-C11-Peg 6 -O-Kvinolinol [OQL]	
API	HS-C11-Peg 6 -Panobinost at [PAN]	

Tabela 3.5. Strukture ispitivanih pozadinskih liganada.

TL	Naziv Liganda	Struktura
PL	Pz2	
PL	PegZ	
PL	Pz6	

3.3.2. Priprema sistema za ispitivanje uticaja promene koncentracije liganada na strukturu nanočestice funkcionalizovane heterogenim monoslojem u vodenom rastvoru

Jedna od prednosti korišćenja nanočestica kao nosača antitumorskih lekova je široka mogućnost njihovog funkcionalizovanja različitim tipovima liganada. Odabirom liganada sa različitim fizičko-hemijskim karakteristikama može se povećati hidrofilitnost sistema, produžiti vreme cirkulacije itd. Ligandi koji ne nose lek, već služe za modifikovanje ovih parametara zovu se *pozadinski* ligandi. Dodavanjem više tipova liganada u jedan sistem gradi se heterogeni monosloj. Međutim, ovo dodatno komplikuje sistem jer dovodi do stvaranja velikog broja novih interakcija čiji je uticaj na strukturu teško predvideti.

Da bi se sistematski pristupilo ovoj problematici, grupe eksperimenta su osmišljene na takav način da se u što većoj meri izoluje i ispita svaki pojedinačni uticaj zasebno.

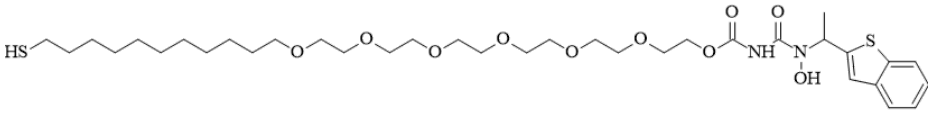
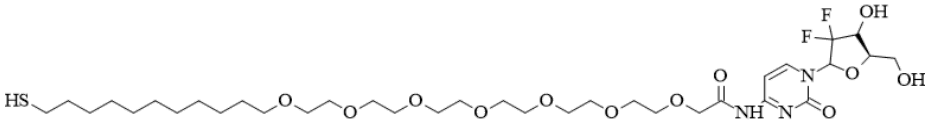
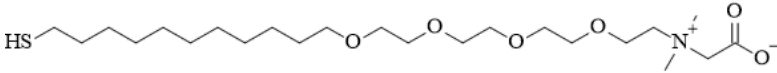
Za ispitivanje uticaja promene koncentracije liganada na strukturu funkcionalizovane nanočestice, simulirane su nanočestice zlata sa mešovitim monoslojem, odnosno, nanočestice funkcionalizovane sa dva tipa tiolnih liganada:

- ligand koji služi kao nosač za lek (API)
- cviterjonski pozadinski ligand (PL).

Modelovani su heterogeni sistemi sa cviterjonskim pozadinskim ligandom i API ligandom u različitim odnosima (API:PL+5:1-1:5). API ligandi su nosili antitumorske lekove Zileuton i Gemcitabin. Strukture korišćenih liganada prikazane su u tabeli 3.6.

Cviterjonski pozadinski ligand je odabran zbog širokog opsega korisnih parametara kao što su produžavanje vremena cirkulacije, smanjivanje verovatnoće adsorpcije proteina, regulisanje površinskog naelektrisanja nanočestice itd. [99-101]. Cviterjonski pozadinski ligandi su korišćeni za najveći broj simulacija u okviru ove disertacije. U slučajevima gde postoji odstupanje, biće posebno naglašeno.

Tabela 3.6. Strukture ispitivanih liganada.

TL	Naziv Liganda	Struktura
AP I	HS-C11-Peg6 -Zileuton [ZIL]	
AP I	HS-C11-Peg6 -Gemcitabin [GEM]	
PL	PegZ	

3.3.3. Priprema sistema za ispitivanje stabilnosti funkcionalizovane nanočestice pod različitim uslovima

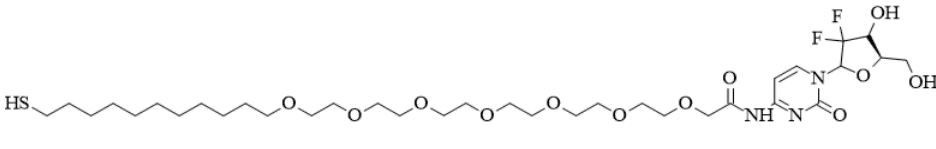
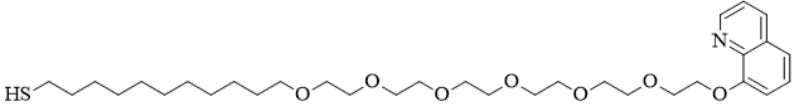
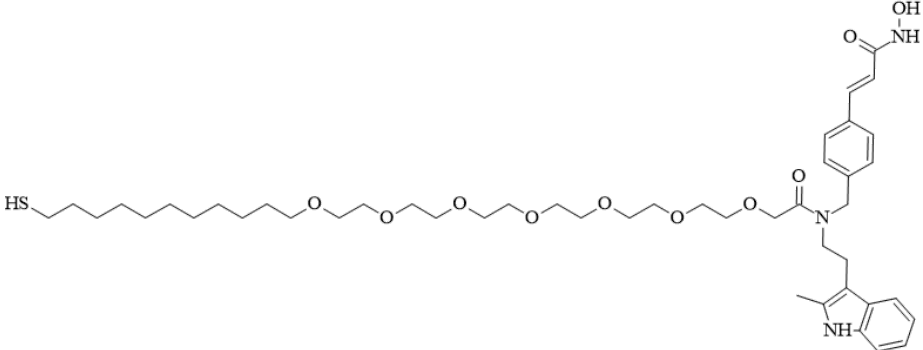
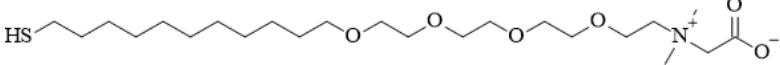
Funkcionalizovane nanočestice moraju biti stabilne u fiziološkim uslovima kako bi ispunile svoju funkciju. Međutim, takođe treba uzeti u obzir i jednostavnost njihove pripreme i transporta. Stabilnost nanočestica u vodenoj sredini i na sobnoj temperaturi je izuzeno poželjna. Stoga, u ovoj grupi eksperimenata, funkcionalizovane nanočestice su simulirane pri različitim uslovima:

1. Na 300 K u vodenoj sredini;
2. Na 300 K u fiziološkoj sredini;
3. Na 310,15 K u vodenoj sredini;
4. Na 310,15 K u fiziološkoj sredini.

Detaljno modelovanje fiziološke sredine bi bilo previše zahtevno i u ovom trenutku je nemoguće simulirati je kao takvu. Za simulacije se koristi pojednostavljen sistem gde se modeluje fiziološki rastvor koji sadrži 0,15 M rastvor NaCl.

S obzirom na to da su neki od korišćenih liganada naelektrisani, prvi korak je da se ubace joni kako bi se kompenzovalo njihovo naelektrisanje. A kasnije je preračunato koliko Na⁺ i Cl⁻ jona treba dodati u rastvor da bi se postigla željena koncentracija.

Tabela 3.7. Strukture ispitivanih liganada.

TL	Naziv Liganda	Struktura
API	HS-C11-Peg6 -Gemcitabin [GEM]	
API	HS-C11-Peg6 -O-Kvinolinol [OQL]	
API	HS-C11-Peg6 -Panobinostat [PAN]	
PL	PegZ	

3.3.4. Priprema sistema za ispitivanje uticaja veličine, hidrofobnosti i koncentracije leka u funkcionalizovanom monosloju na strukturu nanočestice u vodenoj sredini

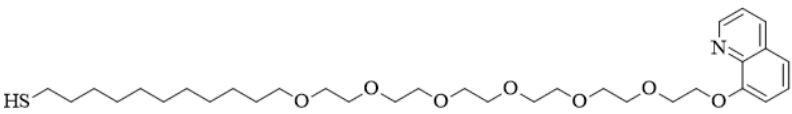
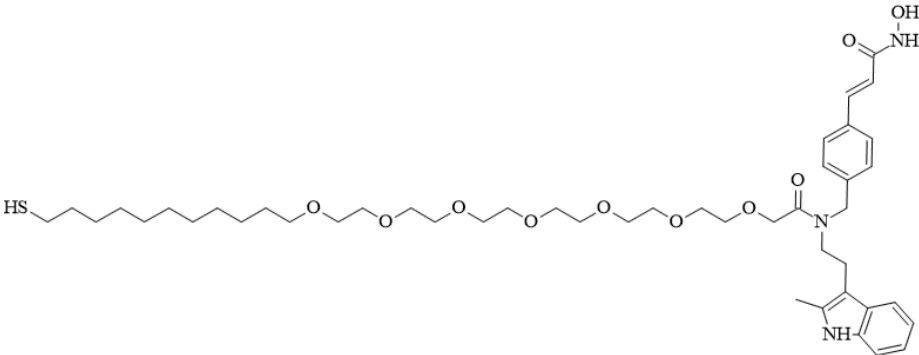
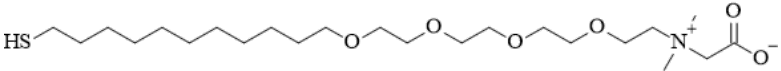
Za ispitivanje uticaja veličine, hidrofobnosti i koncentracije leka u funkcionalizovanom monosloju na strukturu nanočestice u vodenoj sredini, simulirane su nanočestice zlata funkcionalizovane sa dva tipa sistema:

1. Nanočestice zlata funkcionalizovane API ligandom koji nosi mali hidrofobni lek Kvinolinol (API-OQL) I cviterjonskim pozadinskim ligandom PL),
2. Nanočestice zlata funkcionalizovane API ligandom koji nosi veliki hidrofilni lek Panobinostat (API-PAN) cviterjonskim pozadinskim ligandom (PL).

Kako bi se osiguralo da su sve razlike u strukturi monosloja isključivo rezultat fizičko-hemijskih osobina leka, veličina jezgra zlatnih nanočestica (5,5 nm), API ligandi koji nose

lekove i pozadinski ligandi su bili identični u svim sistemima. Varirani su samo korišćeni lek i relativne koncentracije liganada kako bi se ispitao i efekat manjih promena u sastavu monosloja. Sistemi su simulirani u vodenom rastvoru. Da bi se ispitao uticaj promene koncentracije, odnosi liganada na površini nanočestice varirani su u sledećim odnosima: API:PL=3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3. Strukture ispitivanih liganada prikazane su u tabeli 3.8.

Tabela 3.8. Strukture ispitivanih liganada.

TL	Naziv Liganda	Struktura
API	HS-C11-Peg 6 -O-Kvinolinol [OQL]	
API	HS-C11-Peg 6 -Panobinostat [PAN]	
PL	PegZ	

3.3.5. Uticaj dužine pozadinskog liganda na strukturu

Kako bi se ispitao uticaj dužine pozadinskog liganda na strukturu monosloja u vodenoj sredini, modelovane su nanočestice zlata koje nose lekove različitih fizičko-hemijskih karakteristika u kombinaciji sa pozadinskim ligandima različitih dužina.

Skraćivanje/produžavanje liganada svakako dovodi do promena njegovih fizičko-hemijskih osobina zbog toga što se time menja i njihova struktura. S obzirom na to da je cilj da se ispita uticaj dužine, težnja je bila da se ove promene svedu na minimum. Drugim rečima cilj je bio da se odaberu takvi ligandi gde će promene u strukturi funkcionalizovane nanočestice biti isključivo rezultat variranja dužine pozadinskog liganda. Kako bismo to postigli, prilagođavanje dužine je postignuto menjanjem broja ponavljajućih O-C-C jedinica u sredini strukture (tabela 3.9.) što je

dovoljno daleko i od mesta vezivanja na nanočesticu i od terminalnog kraja liganda. Takođe, s obzirom na to da svi ligandi imaju ovu ponavljajuću jedinicu u svojoj strukturi, pretpostavlja se da ta jedinica ima isti efekat kroz sve simulirane sisteme.

Lekovi koji su modelovani u ovoj grupi simulacija su Kvinolinol, Gemcitabin, WYC, Zorak, Zileuton i Doksorubicin.

Tabela 3.9. Strukture ispitivanih liganda.

TL	Naziv Liganda	Struktura
API	HS-C11-Peg 4 -Doksorubicin [DOX]	
API	HS-C11-Peg -Vik215 [WYC]	
API	HS-C11-Peg -Zorak [ZOR]	
API	HS-C11-Peg -Zileuton [ZIL]	
PL	Pz2	
PL	PegZ	
PL	Pz6	

3.3.6. Uticaj različitih konfiguracija monosloja na strukturu funkcionalizovanih nanočestica

Iako se tokom funkcionalizacije pažljivo razmatra detaljna struktura celog liganda i njegove fizičko-hemijske karakteristike, onog trenutka kada se nanočestica nađe u organizmu, najvažniji aspekt je površina nanočestice jer je to deo sistema koji ćelija "vidi" i sa kojim delom interaguje. S obzirom na veliki broj različitih konfiguracija koje monosloj može da zauzme, u ovoj grupi eksperimenata akcenat je bio na upoređivanju ekstrema gde su razlike najveće: nasumične i janus konformacije.

Kako bi se ispitao ovaj uticaj, modelovani su sistemi koji nose izrazito hidrofoban lek Kvinolinol, i hidrofilniji lek Gemcitabin. Oni su modelovani u kombinaciji sa cviterjonskim ligandima različitih dužina u nasumičnoj i u janus konformaciji. Lekovi različite hidrofobnosti i veličine, i pozadinski ligandi različitih dužina su modelovani kako bi se ovi uticaji eliminisali, odnosno, kako bi se ispitale promene koje nastaju samo usled promene konformacije.

Tabela 3.10. Strukture ispitivanih liganada.

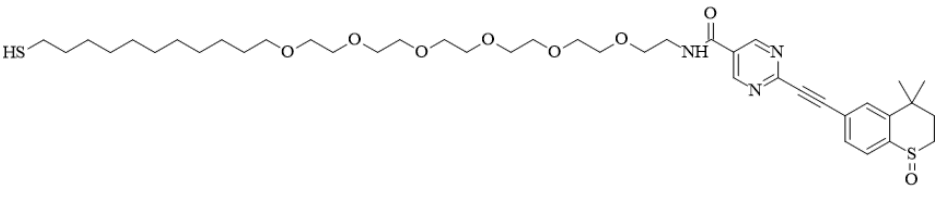
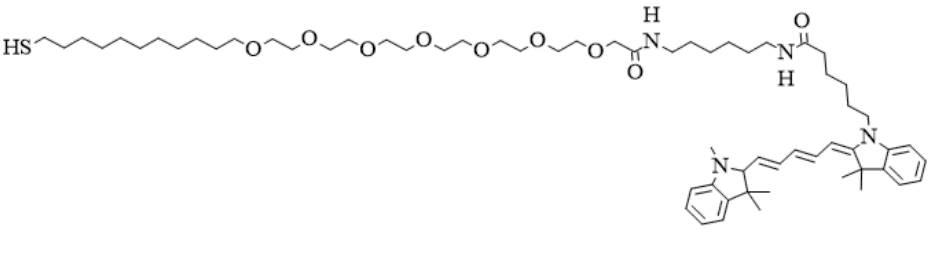
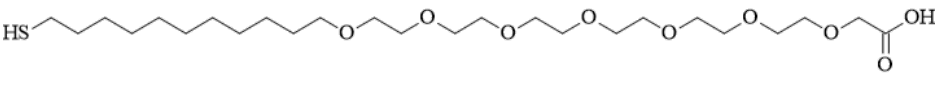
TL	Naziv Liganda	Struktura
API	HS-C11-Peg -Gemcitabin [GEM]	
API	HS-C11-Peg -O-Kvinolinol [OQL]	
PL	Pz2	
PL	PegZ	
PL	Pz6	

3.3.7. Uticaj veličine jezgra od zlata na strukturu funkcionalizovanih nanočestica

Kako bi se ispitao uticaj veličine jezgra na strukturu monosloja modelovane su funkcionalizovane nanočestice sa različitim veličinama jezgra od zlata od 1 nm, 2,5 nm, 4 nm i 5,5 nm u prečniku.

U prvoj grupi simulacija, modelovani su sistemi sa homogenim monoslojem (API ligandom koji nosi lek WYC). Nakon toga modelovani su sistemi i sa heterogenim monoslojem gde su korišćeni fluorescentni API i pozadinski ligand. S obzirom na veličinu ovih sistema i računarski trošak ovih simulacija, za ovu grupu eksperimenata modelovane su veličine jezgra od zlata od 2,5 i 5,5 nm. Strukture ispitivanih liganada prikazane su u tabeli 3.11.

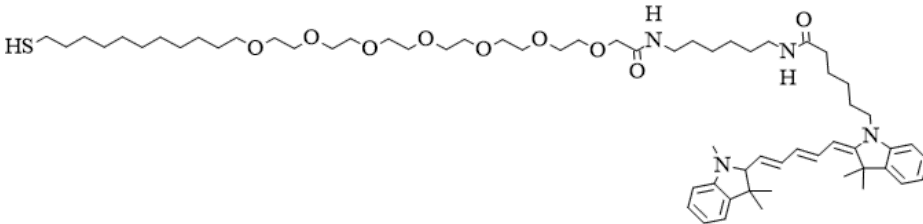
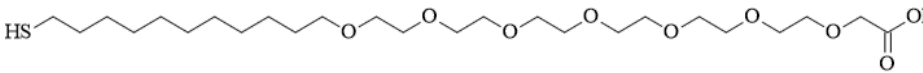
Tabela 3.11. Strukture ispitivanih liganada.

TL	Naziv Liganda	Struktura
API	HS-C11-Peg6 -Vik215 [WYC]	
F	CY5	
FPL	CY5-PL	

3.3.8. Fluorescentne nanočestice kao model sistemi u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima

S obzirom na to da eksperimentalne metode koje se koriste u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima ne poseduju dovoljnu rezoluciju i osetljivost, standardna praksa je da se za ovaj tip eksperimenata koriste fluorescentne nanočestice koje je moguće ispitivati spektrofotometrijom ili drugim metodama zasnovanim na emisiji zračenja u vidljivoj oblasti. Međutim, fluorescentni molekuli imaju strukturu koja se značajno razlikuje od molekula koji nemaju fluorescenciju. Zbog toga se javlja pitanje, da li je ovo validan model? Odnosno, koliko se menjaju parametri celog sistema uvođenjem fluorescentnog molekula? Kako bismo to ispitali, uporedili smo sisteme u kojima je jedina razlika u terminalnom kraju API liganda, gde su lekovi vezani za ligand zamenjeni fluorescentnim CY5 terminalnim krajem. Strukture uspitivanih liganada prikazane su u tabeli 3.12.

Tabela 3.12. Strukture ispitivanih liganada

TL	Naziv Liganda	Struktura
F	CY5	
FPL	CY5-PL	

3.4. Ispitivanje fiziološkog efekta stohastičkim reakciono-difuzionim simulacijama

Nakon simuliranja molekulske dinamike nanosistema i karakterizacije njihove strukture, ispitivan je njihov fiziološki efekat. Da bi se to postiglo, prvo je simuliran rast tumora. Kada tumor naraste do željene veličine, uzimaju se odsečki tumora koji predstavljaju realistične histološke scenarije. Pored parametara dobijenih iz Molekulske dinamike, ovi isečci služe kao ulazni parametri za stohastičke simulacije što će biti opisano u narednoj sekciji.

3.4.1. Virtuelni tumor i isečci tumora koji predstavljaju realistične histološke scenarije

Kao što je pomenuto, da bi se simulirao fiziološki efekat, prvi korak je simuliranje heterogenog tumora prožetog vaskulaturom.

Rast tumora u simulacijama se inicijalizuje od jedne ćelije raka. Tumor raste dok ne dostigne veličinu od ~500000 ćelija i tada se simulacija zaustavlja. Zatim se iz takvog tumora, uzimaju odsečki koji predstavljaju realistične histološke scenarije i koriste se kao ulazni parametri za stohastičke simulacije. Da bi bilo određeno koliko ćelija treba da sadrži svaki isečak, prvo je izračunata minimalna udaljenost od krvnog suda za sve ćelije simuliranog tumora, i ova vrednost je zatim korišćena da se izračuna udaljenost koja je dovoljna kako bi nanosistemi stigli do 95% diferenciranih i matičnih ćelija raka, u odnosu na datu, maksimalnu (neophodnu) dubinu prodiranja u tumor. I za homogen i za heterogen tumor, dobijeno je da je ova vrednost 22 ćelije [48]. Slično je dobijeno u eksperimentalnom radu Jaina i Stylianopoulos [108].

3.4.2. Ispitivanje fiziološkog efekta Kvinolinol nanosistema

Nanočestice funkcionalizovane API ligandima koji nose Kvinolinol su eksperimentalno sintetisane i okarakterisane (ProChimia Surfaces, Poljska), i njihova efikasnost je ispitivana u *in vitro* (IMDEA, Španija) i *in vivo* (VHIR, Španija) modelima. *In silico* karakterizacija je urađena u okviru ove disertacije. Na osnovu dobijenih podataka, *in silico* dobijeni rezultati su upoređeni sa eksperimentalnim vrednostima.

Nažalost, eksperimentalno je pokazano da ovi nanosistemi nemaju zadovoljavajuć fiziološki efekat. Pretpostavka je bila da je uzrok tome to što ne dolazi do njihovog ulaženja nanosistema u ćelije. Da bismo to proverili, simulirani su Kvinolinol sistemi gde je konstanta asocijacije između nanosistema i ćelije postavljena na izuzetno malu vrednost (pretpostavka je da nanosistem ne ulazi u ćeliju, ili ulazi u zanemarljivo maloj koncentraciji, $Ka \ll Kd$), i simulacije

gde nanosistemi ulaze u ćeliju. Takođe, simulirani su sistemi sa dve različite injektovane doze. Svi korišćeni parametri i njihove vrednosti dati su u tabeli 3.13.

Tabela 3.13. Korišćene vrednosti parametara.

ID	Injektovana doza	43.5/435 μM
PID	Procenat injektovane doze koja stiže do tumora	1%
W	Težina miša	20g
S	Karakteristična dužina ćelije	10 μm
L	Neophodna dubina penetracije u tumor kako bi se postigao efekat	220 μm
V_t	Zapremina tumora	125 mm^3
M	Molarna masa API liganda	596 g/mol
E	Ukupan broj nošenih lekova po nanosistemu	210
D	Koeficijent difuzije	4,2e-7 cm^2/s
E_r	Dostupan broj lekova po nanosistemu	30
K_a	Konstanta asocijacije	10e2/10e5
NP₀	Količina nanosistema koja se oslobađa iz vaskulature i dospeva do tumora	43916
NP_{MAX} (ćelija raka)	Broj nanosistema neophodnih da ubiju jednu ćeliju raka (IC50= 34 μM)	682
NP_{MAX} (matična ćelija raka)	Broj nanosistema neophodnih da ubiju jednu matičnu ćeliju raka (IC50= 19 μM)	381

3.4.3. Najmanja injektovana doza i važnost parametra dostupnosti leka - primer Niklozamid sistema

Najoptimalnija doza bi bila najmanja doza dovoljna da ubije sve ćelije raka i matične ćelije raka. Da bi se ta vrednost utvrdila, simulirani su Niklozamid sistemi sa početnom injektovanom dozom 150 μL intravenozno gde je koncentracija nanočestica 1,2E+14/mL sa

koncentracijom liganada od 1 μM . Koncentracija je povećavana postupno do trenutka kada je ubijeno 95% ćelija raka i matičnih ćelija raka. Simulacije sa određenom dozom ponavljane su pet puta i broj ubijenih ćelija izračunat je kao prosek u svim simulacijama.

Za određivanje eksperimentalne injektovane doze uzima se teorijska, apsolutna koncentracija leka u sistemu. Apsolutna koncentracija odnosi se na ukupnu količinu leka u sistemu, odnosno pretpostavlja se da je dostupnost leka 100%. S druge strane, simulacijama molekulske dinamike je utvrđeno da nije sva količina leka u sistemu dostupna za interakcije sa sredinom. Da bi se utvrdilo koliko je važno precizno određivanje ovog parametra, simulacije su puštane na sledeći način:

1. Utvrđena je minimalna injektovana doza za sisteme sa apsolutnom koncentracijom leka u sistemu.
2. Dobijena injektovana doza je korišćena za ispitivanje efekta nanosistema sa vrednostima broja nošenih lekova dobijenih iz simulacija molekulske dinamike (% Dostupnost leka).
3. Utvrđena je najmanja injektovana doza za sistem sa vrednostima nošenih lekova dobijenih iz simulacija molekulske dinamike.

3.4.4. Relativan uticaj parametara nanosistema na krajnji fiziološki efekat

U uvodu je rečeno da je eksperimentalna karakterizacija nanočestica često teška i zahtevna. Simulacijama molekulske dinamike je takođe pokazano da na molekulskom nivou čak i male promene u sastavu mogu prouzrokovati velike promene u konačnoj strukturi nanosistema. Međutim, postavlja se pitanje, koliki je uticaj promena ovih parametara na krajnji fiziološki efekat. Da bi se to ispitalo, urađena je analiza osetljivosti modela.

Ako se pogledaju jednačine 1.2 i 1.3 u sekciji 2.3.2. može se videti da se svi parametri nanosistema koriste za proračun ili NP_0 ili NP_{MAX} . S obzirom na to da oba parametra figuriraju u krajnjem rezultatu, njihov doprinos se ne može izolovati i okarakterisati individualno. Zbog toga su puštane simulacije gde su varirani odnosi ova dva parametra kako bi se ispita njihov uticaj na konačani efekat.

NP_{MAX} vrednost je bila konstanta ($NP_{MAX}=100$), dok su se NP_0 vrednosti menjale ($NP_0 = 1000, 2000, 3000, 4000, \dots, 10000$). Kod obe grupe simulacija je posmatrano koliko ima ubijenih ćelija raka na kraju simulacije. Analiza je urađena na primeru homogenog tumora.

Nakon toga je rađena analiza osetljivosti NP_0 i NP_{MAX} jednačina tako što su svi parametri osim jednog držani konstantnim. Cilj je bio da se ispita koliko promena vrednosti jednog od parametara ima uticaj na promenu vrednosti NP_0 ili NP_{MAX} . Vrednosti parametara menjane su postupno za 1% u opsegu od 0-10%, i za 10% u opsegu od 10-100%. Nakon toga je izračunata standardna devijacija dobijenih rezultata. Ispitivani su samo oni parametri koji se odnose na opis nanosistema.

3.5. Rezistentnost tumora i optimizacija tretmana korišćenjem veštačke inteligencije

Svi eksperimenti u ovoj disertaciji do sada su imali istu teorijsku pozadinu: zna se krajnji cilj (tip tumora) što daje informacije o leku koji treba primeniti. Takođe su poznate prepreke koje lek treba da savlada da bi došao do ciljnog mesta. U skladu sa tim, eksperimenti su osmišljeni sa ciljem da se dobije odgovor na pitanje kako funkcionalizovati nanočesticu da bi se dobila željena struktura koja bi omogućila kontrolu ponašanja nanosistema u organizmu, odnosno, kako funkcionalizovati nanočesticu da se savladaju biološke prepreke i lek dostavi na ciljno mesto. U okviru ove disertacije ispitano je nekoliko različitih uticaja (hidrofobnost, relativna koncentracija liganada u sistemu, dužina liganada, veličina jezgra od zlata, uticaj početne konfiguracije) kako bi se došlo do korisnih smernica za dizajn nanosistema. Proces ispitivanja ovih uticaja zahtevao je četiri godine puštanja simulacija molekulske dinamike na superkompjuteru. Eksperimentalno, trajalo bi značajno duže, i takođe bi bilo izuzetno skupo, sve pod uslovom da eksperimentalne tehnike uopšte imaju zadovoljavajuću rezoluciju. Međutim, iako ovaj tip simulacija značajno ubrzava proces, postoji izuzetno veliki broj različitih parametara i kombinacija parametara koji nisu ispitani, i ispitivanje svih njih bi trajalo godinama. A sve je to u slučaju da naša meta, odnosno ciljno mesto ostaje nepromenljivo u vremenu.

U uvodu je pomenuto da su tumori heterogene strukture i mogu brzo da steknu rezistenciju na primenjenu terapiju. Terapije mogu dovesti do značajne regresije tumora, ali efekat je često kratkotrajan i rak evoluirao i postaje otporan u roku od nekoliko meseci [109,110]. Rezistencija na tretman se razvija preko dva glavna mehanizma: (i) selekcijom već postojećih rezistentnih ćelija i (ii) pojavom rezistentnih ćelija raka koje nastavljaju da evoluiraju pod selektivnim pritiskom [111]. Ukratko, da bismo dizajnirali efikasan tretman prilagođen specifičnom tumoru, suočavamo se sa ogromnim prostorom mogućih stanja koje stvaraju: (i) različiti lekovi za ciljanje specifičnih ćelija raka, (ii) nanosistemi koji mogu da modifikuju fizičko-hemijska svojstva tih lekova (iii) heterogen i visoko prilagodljiv tumor koji može brzo da postane otporan na primarnu terapiju, i (iv) pojedinosti specifične za tretman, kao što su koncentracija i raspored doza. Iako nam simulacije molekulske dinamike sigurno mogu pomoći da donosimo informativne odluke, testiranje svih mogućnosti na ovaj način je nemoguće. Način da se pristupi rešavanju problema je korišćenja algoritama veštačke inteligencije, konkretno evolutivnog pristupa otvorenog tipa što je urađeno u narednim eksperimentima. Takođe, za ove eksperimente korišćeno je modelovanje zasnovano na agentima. Ova razmatranja, kao i rezultati eksperimenta objavljeni su u časopisu *BioSystems* [112]. Ovo istraživanje urađeno je u saradnji naše grupe sa istraživačkim grupama iz Bristola (University of West England i Bristol University).

Evolutivni algoritmi koriste rešenja zasnovana na biološkoj evoluciji kao što su reprodukcija, mutacija, rekombinacija i selekcija. U evolutivnim algoritmima, svaka jedinka u populaciji simuliranih agenata varira (korišćenjem različitih računarskih rutina za mutacija i rekombinacije), skup promenljivih parametara kojima je definisana. Vrednosti tih parametara definišu trenutni položaj agenta u N -dimenzionalnom adaptivnom prostoru. Adaptivni prostor se definiše na takav način da predstavlja skup svih teorijski mogućih rešenja problema za koji je

dizajniran evolutivni algoritam. Mutacijama i rekombinacijama svaki simulirani agent pretražuje adaptivni prostor i na taj način predstavlja potencijalno rešenje datog problema. Za svaku individuu u sistemu se računa adaptivna vrednost (fitnes) funkcija (pogodnost) koja određuje kvalitet rešenja, odnosno, selektuju se najpogodnije individue za sledeću generaciju, dok one loše umiru. U klasičnom pristupu fitnes se određuje predefinisanom formulom koja obuhvata parametre koji treba da evoluiraju. Za rešavanje navedenog problema to nije optimalno rešenje. Umesto toga, ovde je fitnes funkcija definisana isključivo preko efekta kojeg treba ostvariti.

3.5.1. Arhitektura modela

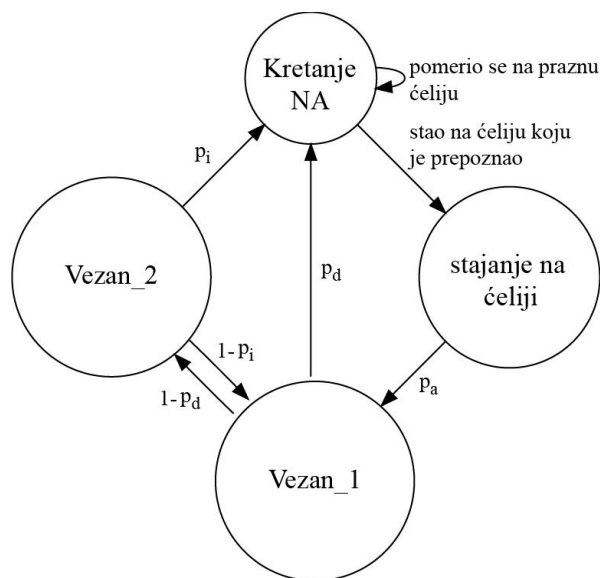
Kreiran je sistem nano-agenata koji ne intereaguju međusobno i mogu da evoluiraju u toku simulacije. Oni se nalaze u okruženju u zdravih ćelija i ćelija raka. S obzirom na to da tumor može da se prilagodi i samim tim postane otporan na nano-agente, adaptivni prostor nano-agenata je pod stalnim modifikacijama, tako da se kontekst u kom se dešava njihova evolucija kontinualno menja. Kao rezultat, populacija nano-agenata se preoblikuje i stvara heterogenu populaciju specijalizovanih grupa jedinki optimizovanih za praćenje i ubijanje različitih fenotipa ćelija raka. Za ove eksperimente korišćena je *Mesa*, platforma za modelovanje zasnovano na agentima [113]. Simulacije su se odvijale u 2D mreži naseljenoj sa tri tipa ćelijskih agenata (ćelije raka — CC (Cancer Cell); matične ćelije raka — CSC (Cancer Stem Cell); zdrave ćelije — HC (Healthy Cell)) i nano-agentima (nanosistemima) — NA. Više agenata može zauzeti istu lokaciju u mreži.

Opis agenata:

Ćelijski agenti: Svi ćelijski agenti su nepomični. CC i CSC mogu da mutiraju sa malom verovatnoćom. Mutiranjem oni menjaju svoja "vidljiva" svojstva preko kojih ih nano-agenti mogu prepoznati. Tumor može da raste kroz deobu CC i CSC. U scenarijima sa tumorom koji raste, nakon svakog vremenskog koraka, ćelije tumora se dele određenom verovatnoćom (koja se u daljem tekstu naziva „stopa rasta“) ako u njihovom neposrednom okruženju postoje slobodna mesta. Zdrave ćelije (HC) mogu biti ubijene, ali ne mutiraju ili rastu.

Nano-agenti (nanosistemi): Nano-agenti mogu da se kreću, napadaju, posmatraju i pamte svoje okruženje. Mogu pokazati dve vrste ponašanja. Oni mogu ili pokušati da ubiju ćelijske agente ili da inhibiraju njihovu deobu. Broj svakog tipa agenata se određuje na početku simulacije (tabela 3.12). Na početku simulacije, nano-agenti nemaju nikakvo znanje o okruženju tako da oni ne prepoznaju nijednu vrstu ćelijskih agenata. **Kretanje:** U svakom vremenskom koraku svaki nano-agent se nasumično kreće unutar 2D mreže. Parametar brzine određuje koliko daleko može ići. **Posmatranje i učenje:** Nakon pomeranja, nano-agent posmatra svoje okruženje, koje je, u ovoj verziji, ograničeno samo na ćeliju do koje je nano-agent došao. Posmatranjem, nano-agent proverava vidljiva svojstva ćelijskog agenta sa kojim deli lokaciju i upoređuje ih sa onima uskladištenim u svojoj memoriji. Ako naiđe na nepoznatu ćeliju, nano-agent pamti njena svojstva. Memorija je konačna i njena veličina se nasumično bira u

opsegu 1-3 (npr. ako je veličina memorije 3, to omogućava skladištenje do tri vidljiva svojstva). Ako je memorija puna, nova informacija istiskuje najstariju postojeću. **Napad na tumor i zdrave ćelije:** Kada je NA na istoj lokaciji kao i ćelija, prolazi kroz niz stanja opisanih na slici 3.21. NA će pokušati da ubije ili inhibira deobu ćelije samo ako je naučio da je prepoznaje. Pošto je cilj da se virtuelno razviju potencijalne strategije lečenja, nakon pokušaja da napadnu ćeliju, NA ne nestaju već nastavljaju sa kretanjem u sledećem vremenskom koraku. Da bi razlikovao relativnu važnost ćelija, NA dobija +1 poen za ubijanje ili zaustavljanje deobe CC, -1 poen za HC i +5 poena za CSC. Ako NA naiđe na već memorisanu ćeliju, vezivanje je definisano određenom verovatnoćom p_a . U suprotnom, verovatnoća vezivanja se smanjuje množenjem sa faktorom c kojim možemo fino podesiti „radoznalost“ NA u istraživanju okruženja.



Slika 3.21. Dijagram stanja koji opisuje ponašanje nano-agenata nakon prepoznavanja ćelije raka: p_a - verovatnoća vezivanja za ćeliju; p_d - verovatnoća odvajanja od ćelije; p_i - verovatnoća internalizacije (ulaska) u ćeliju.

Rezistencija tumora: Nasumično odabrana subpopulacija tumorskih ćelija je delimično rezistentna na NA, dodavanjem modifikatora rezistencije na njih. Podrazumevana veličina subpopulacije je 10% od ukupnog broja tumorskih ćelija. Nakon interakcije sa NA, rezistentna ćelija može da modifikuje jedno od sledećih svojstava NA: vezivanje (p_a), disocijacija (p_d), internalizacija (ulazak u ćelije) (p_i), ubijanje (p_k) i inhibicija deobe (p_{sd}). Tačno svojstvo na koje je ćelijski agent rezistentan se nasumično određuje na početku simulacije. Jačina rezistencije se nasumično bira u intervalu 30-80%. To znači da se pri interakciji između rezistentne ćelije i nano-agenta, odgovarajuće svojstvo nano-agenta smanjuje za izabrani procenat. Ako se ćelije podele, rezistentnost se prenosi na sledeću generaciju. Sve matične ćelije raka (CSC) su delimično otporne na ubijanje i inhibiciju deobe, nasumično birajući jačinu rezistencije u zadanom intervalu od 50-80%, na početku simulacije.

Evolucija nano-agenata: Kada NA ubije ćelijskog agenta, dodeljuju mu se pozitivni ili negativni poeni (opisano gore). Učinak svakog NA se meri nakon 10 vremenskih koraka upoređivanjem prikupljenih poena. Pet procenata najboljih individua se duplira, a isti procenat najlošijih eliminiše. Stoga, veličina populacije NA ostaje konstantna. Srednjih pet procenata preostalih NA je mutirano. Promenljiva svojstva su brzina, veličina memorije, verovatnoće asocijacije, disocijacije i internalizacije (ulaska u ćelije), kao i ponašanje (inhibiraju deobu ćelije ili ubijaju ćeliju). Da bi se uporedile različite simulacije, definisana je opšta fites funkcija:

$$f(NA) = \sum HC / (r \sum CSC + \sum CC) \quad (3.4)$$

Gde je $r=5$ relativna važnost, što daje prednost nano-agentima koji ubijaju matične ćelije raka.

Metastaze: S obzirom na to da matična ćelija raka (CSC) pokreće metastazu [114], primenjena je pojednostavljena mera metastaze kao dodatno numeričko svojstvo „odvajanja“ agenta CSC (d). U svakom koraku, CSC će napustiti tumor sa verovatnoćom od 10%. Ako CSC ode, ocena metastaza se povećava za 1.

3.5.2. Podešavanje simulacija

Dva glavna cilja kod ovog tipa modelovanja su:

1. Da li su, i u kojoj meri NA sposobne da se nose sa tumorom koji evoluiraju (mutira);
2. Da li spontano evoluirana kombinovana terapija može biti efikasnija u odnosu na uopštenu terapiju.

Da bi se to ispitalo, napravljene su tri klase NA:

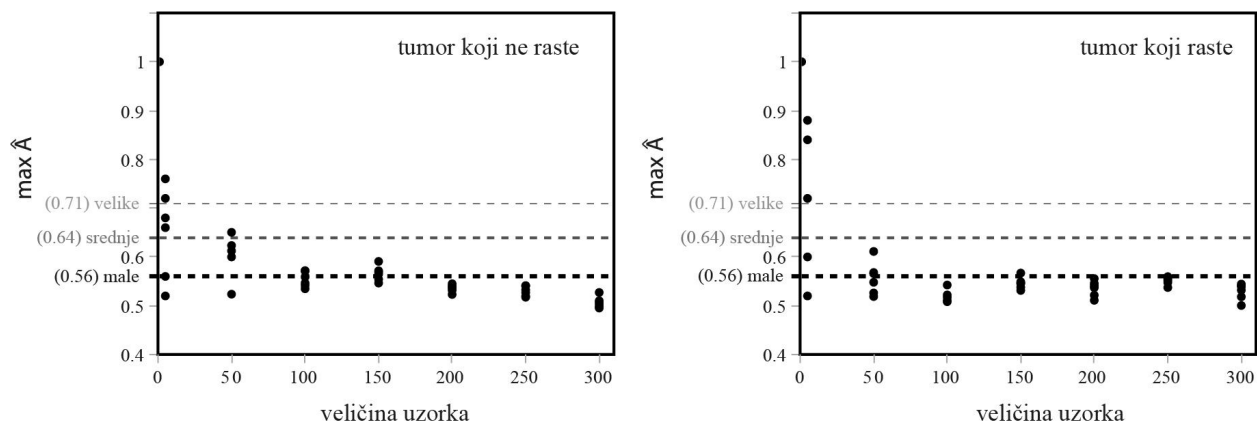
1. NA^0 - nano-agenti koji ne mogu da uče. Oni mogu da prepoznaju i napadnu samo inicijalne (nemutirane) ćelije raka. Ekvivalent u realnosti je lečenje pojedinačnim antitumorskim lekovima koji su specijalizovani za jedan tip tumora;
2. NA^E - nano-agenti koji evoluiraju;
3. NA^G - nano-agenti koji napadaju sve ćelije (i zdrave i ćelije raka), sa blagom pristrasnošću ka ćelijama raka. Ekvivalent u realnosti je lečenje citostaticima.

Da bi se predstavilo oslobađanje nanočestica kroz krvotok, NA se ubrizgavaju n nasumično odabranih lokacija u mreži. Nakon injektovanja, agenti disperguju kroz mrežu brzinom s .

Tabela 3.14. Parametri korišćeni u simulacijama. p_a - verovatnoća asocijacije, p_d - verovatnoća disasocijacije, p_i - verovatnoća ulaska u ćeliju, p_k - verovatnoća ubijanja, p_{sd} - verovatnoća inhibiranja ćelijske deobe

Opis	Vrednost
Veličina mreže	35x35
Početni broj ćelija raka (CC)	297
Početni broj matičnih ćelija raka (CSC)	3
Početni broj zdravih ćelija (HC)	925
Veličina populacije nano-agenata (NA)	500
Verovatnoća mutacija za CC i CSC	0,1
Brzina rasta CC i CSC	0,01; 0,005; 0,001
Radoznanost (c)	0,5
Odvajanje (d)	10%
Broj mesta injektovanja (n)	5
Opseg brzina	1-5
$p_a, p_d, p_i, p_k, p_{sd}$ za NA ^G koje napadaju CC	0,7; 0,5; 0,7; 0,7; 0,7; 0,7
$p_a, p_d, p_i, p_k, p_{sd}$ za NA ^G koje napadaju HC	0,5; 0,5; 0,5; 0,5; 0,5; 0,5

Kako bi se izbegla nestabilnost koja proizilazi iz stohastičkih modela, urađena je analiza konzistentnosti, čime je utvrđeno koliko puta treba ponoviti svaki eksperiment (označeno kao e^*). Analizirani su uzorci od 1, 5, 50, 100, 150 i 200 ponavljanja. Za svaku veličinu uzorka napravljene su grupe distribucija veličine 20, koje su generisane korišćenjem istog fiksnog skupa vrednosti parametara i koje sadrže identičan broj simulacionih uzoraka. Tako, na primer, veličina uzorka 100, znači da je za svaku od 20 grupa distribucija izračunato 100 ponavljanja (što daje ukupno 2000 ponavljanja). Zatim, da bi se uporedile distribucije unutar jedne grupe, urađen je Vargha–Delaney \hat{A} test [115] koji meri jačinu efekta nasumičnih varijacija. \hat{A} test upoređuje distribucije dve populacije i daje vrednost u opsegu 0-1 koja opisuje verovatnoću da je nasumično odabran uzorak uzet iz populacije A veći od nasumično odabranog uzorka iz populacije B. Vrednost od 0,5 ukazuje da između njih nema razlike, dok vrednosti od 0,71 ukazuju na “veliku” razliku između distribucije. Kao prihvatljiv nivo vrednosti za “male razlike” korišćena je vrednost od 0,56. Minimalna veličina uzorka gde je $\max \hat{A}$ veličina ispod 0,56 za sva testirana ponavljanja (do 1000 koraka) i za oba scenarija (statički tumor i tumor koji raste) je $e^*=200$ (slika 3.22). Stoga, svi rezultati predstavljaju prosek 200 ponavljanja.



Slika 3.22. Rezultati \hat{A} testa za do 1000 ponavljanja. Za svaku veličinu uzorka urađen je \hat{A} test nakon 50, 100, 250, 300, 500 i 1000 vremenskih koraka (crne tačke).

3.5.2.1. Homogeni tumor koji ne evoluira

Da bi se testirala osnovna dinamika nano-agenata, prvo je simulirano njihovo ponašanje u najjednostavnijem scenariju tumora: homogeni tumor koji ne evoluira. Ovde ćelije raka ne mogu da mutiraju i nemaju modifikatore rezistencije. U kombinaciji sa NA agentima ovo predstavlja minimalno podešavanje našeg modela.

3.5.2.2. Rezistencija tumora

Prethodni scenario tumora je krajnje nerealan. Pravi tumori nisu homogene mase identičnih ćelija. Zapravo, glavni ograničavajući faktor u lečenju pacijenata sa rakom jeste rezistencija na lekove, koja potiče od heterogenosti tumora [116]. Rezistentnost tumora se može podeliti u dve kategorije: 1) inherentna rezistentnost (kao rezultat već postojećih rezistentnih ćelija u tumoru, pre tretmana lekovima) i 2) stečena rezistentnost (razvijena tokom ili posle terapije ili genetskim promenama u mikrokruženju tumora). Zbog toga su urađeni eksperimenti da ispituju u kojoj meri evolucija nano-agenata otvorenog tipa može da se koristi za modelovanje oba tipa rezistencije.

U ovoj grupi eksperimenata simulirane su evolucije sve tri klase nano-agenata u tri scenarija tumora:

- 1) Heterogeni tumor koji ne evoluira (ćelije raka ne mogu da mutiraju) i 10% ćelija raka je delimično rezistentno);
- 2) Homogeni tumor koji evoluira (ćelije raka mogu da mutiraju i nemaju modifikatore rezistentnosti);
- 3) Heterogeni tumor koji evoluira (ćelije raka mogu da mutiraju i 10% ćelija je delimično otporno).

U modelu, mutacije ćelija raka menjaju njihov fenotip, tako da mogu da izbegnu prepoznavanje od strane NA. Stoga, prvi scenario predstavlja tumor samo sa inherentnom rezistencijom, drugi scenario predstavlja homogeni tumor samo sa stečenom rezistencijom, dok treći scenario predstavlja realističniji scenario tumora sa inherentnom i stečenom rezistencijom.

3.5.2.3. Tumor koji raste

Da bi se ispitalo da li će tumor koji raste značajno promeniti ishod tretmana sa NA, simuliran je heterogen, evoluirajući tumor sa sledećim stopama rasta: 0,01, 0,005 i 0,0001.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Simulacije molekulske dinamike

4.1.1. Ispitivanje uticaja veličine, hidrofobnosti i koncentracije leka u funkcionalizovanom monosloju na strukturu nanočestica u vodenoj sredini

Da li funkcionalizovane nanočestice zlata mogu biti univerzalni nosači lekova?

U uvodu je pomenuto da je jedna od prednosti korišćenja zlatnih nanočestica širok opseg mogućnosti njihovog funkcionalizovanja (dodavanjem velikog broja različitih liganada i/ili različitih tipova liganada). Funkcionalizacija stvara monosloj koji menja fizičko-hemijske osobine zlatne površine. To znači da najveći uticaj na ponašanje nanočestice zlata u organizmu nema samo zlato, već stvoreni monosloj. U teoriji, ova činjenica omogućava "programiranje" fiziološkog efekta nanočestica u organizmu: biranjem liganada sa specifičnim fizičko-hemijskim osobinama možemo sintetisati nanočesticu koja na očekivani način intereaguje sa svojom sredinom i dostavlja lek isključivo na ciljno mesto. Tako se npr. cviterjonski ligandi koriste radi produžavanja vremena cirkulacije, smanjivanja nespecifičnih interakcija sa proteinima čime se smanjuje verovatnoća stvaranja proteinske korone, regulisanja površinskog naelektrisanja nanočestice, itd. S obzirom na to da je većina antitumorskih lekova hidrofobna, polarni pozadinski ligandi mogu se uvesti za povećanje rastvorljivosti sistema. Međutim, ono što se ovde zanemaruje su interakcije između liganada kao i interakcije između liganada i sredine u kojoj se nalazi nanočestica, a one će definisati uravnoteženu strukturu i samim tim biološku aktivnost datih nanosistema. Nameće se pitanje, da li se "izolovano" poznavanje fizičko-hemijskih svojstava odabranog liganada može univerzalno koristiti za dostavu bilo kog leka?

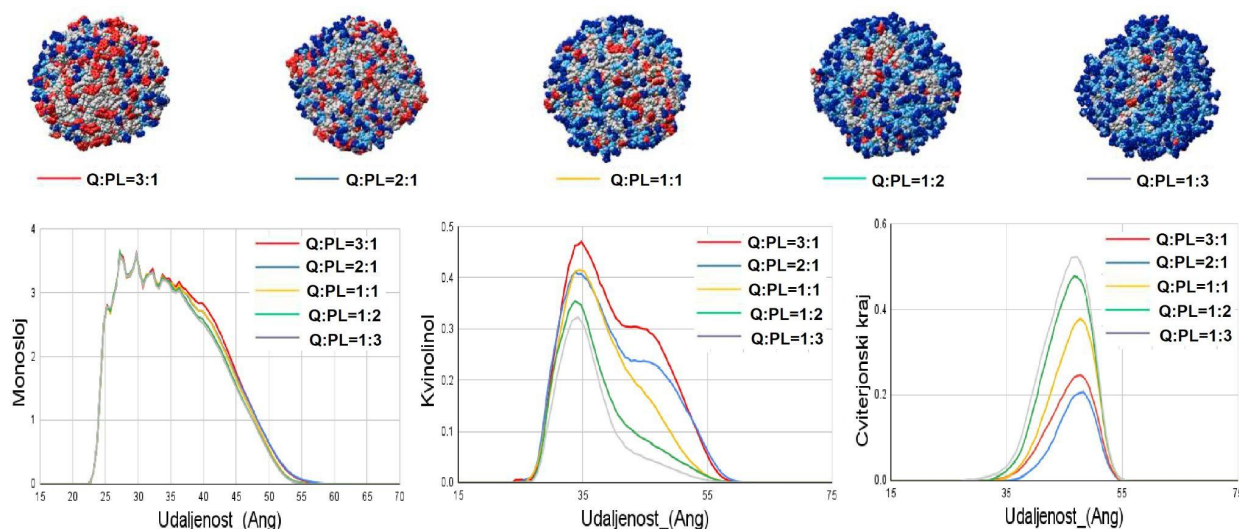
Prva grupa simulacija u okviru ove disertacije je posvećena istraživanju ovog pitanja. Rezultati ovih simulacija su objavljeni u časopisu BioSystems [107].

Da bi se osiguralo da su sve razlike u strukturi monosloja isključivo rezultat fizičko-hemijskih osobina leka, modelovani su sistemi koji su sastavljeni od jezgra od zlata istog prečnika, funkcionalizovani identičnim API i pozadinskim ligandima (strukture i detalji su dati u sekciji 3.3.1, u tabeli 3.14). Jedina promenljiva u strukturi bio je nošeni lek: korišćen je ili mali hidrofobni lek Kvinolinol ili dosta veći i hidrofilniji lek Panobinostat. Kako bi se ispitaio uticaj relativne koncentracije vezanih API i pozadinskih liganada (PL) na površini, dodatno su simulirani sistemi među kojima je jedina razlika njihov početni odnos, i to u sledećim odnosima: API:PL=3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3.

Radi lakše identifikacije, u tekstu će sistemi koje sadrže Panobinostat biti obeleženi sa "PAN", a sistemi sa Kvinolinolom sa "OQL". Ove oznake će biti praćene brojevima koji opisuju

API:PL odnos. Na primer, PAN31 opisuje zlatnu nanočesticu funkcionalizovanu API ligandom koji nosi Panobinostat i cviterjonskim pozadinskim ligandom u odnosu 3:1.

Kvinolinol sistemi - uticaj relativne koncentracije liganada na površini

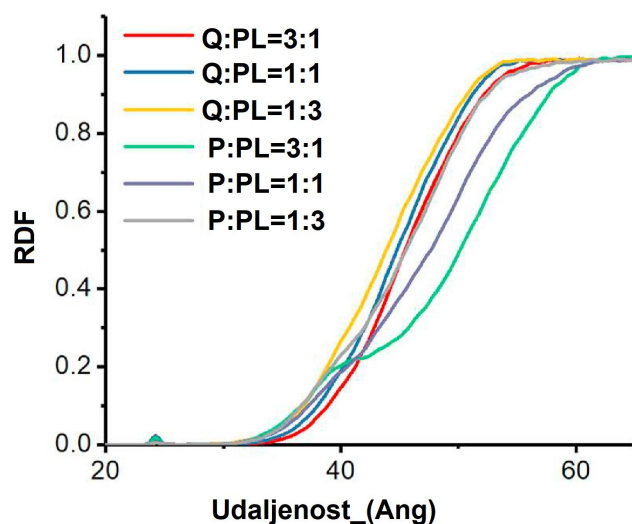


Slika 4.1. **Slike simulacija i RDF grafici OQL sistema.** Slike uravnoteženih struktura iz simulacija za OQL sisteme gde je API:PL odnos 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 i RDF grafici za (s leva na desno): monosloj, lek, terminalni kraj pozadinskog liganda. Na slikama je API ligand koji nosi lek obojen sivo, Kvinolinol je obojen crveno, pozadinski ligand obojen je svetlo plavo sa tamno plavim terminalnim krajem.

RDF analiza pokazuje da se distribucija gustine monosloja ne razlikuje značajno među sistemima (slika 4.1). Ovo je očekivan rezultat s obzirom na to da su svi sistemi funkcionalizovani istim ligandima. U slučaju cviterjonskog terminalnog kraja, najveća gustina se nalazi na oko 55 Å od centralnog atoma jezgra od zlata, odnosno, nalazi sa na samoj površini nanočestice u kontaktu sa rastvaračem. Površina ispod krive se proporcionalno povećava sa porastom koncentracije pozadinskog liganda. Slike simulacija (slika 4.1) se slažu sa ovim zapažanjima. Očigledno je da hidrofilni pozadinski ligandi imaju tendenciju da „pokrivaju“ hidrofobni lek. Za manje koncentracije leka (npr. OQL12, OQL13), površina u kontaktu sa rastvaračem je gotovo u potpunosti prekrivena pozadinskim ligandima. Dodatna potvrda je RDF grafik za manje koncentracije leka gde se može videti da je njegova prosečna gustina locirana blizu površine zlata. I ovo je u skladu sa očekivanjima: hidrofobni lek teži da se „sakrije“ od vode. Fleksibilni API ligand ovo omogućava savijanjem ka površini, dok se hidrofilni pozadinski ligand izdužuje ka rastvaraču.

S druge strane, sa povećanjem koncentracije Kvinolinola, na RDF grafiku se može videti da se pikovi šire i javlja se novi „maksimum“ koji je bliže rastvaraču. Mogući razlog mogao bi biti taj što savijeni ligandi zauzimaju veću zapreminu blizu površine zlata u odnosu na izdužene ligande. Dakle, sa povećanjem koncentracije API liganda, nema dovoljno mesta za sve ligande u blizini površine zlata. Kao rezultat, neki od njih su prisiljeni da se istegnu ka površini u kontaktu sa rastvaračem. Pored toga, iako polarni pozadinski ligandi teže da „pokriju“ hidrofobni

lek, u simuliranim sistemima oni su dosta kraći od API liganada i samim tim pri nižim PL koncentracijama to fizički nije moguće.



Slika 4.2. **RDF grafik vode za simulirane sisteme.** Radi preglednosti grafika, API ligand koji nosi Kvinolinol je obeležen sa OQL.

Na koji način odnos API i pozadinskog liganda utiče na dubinu prodiranja vode u monosloj prikazano je na slici 4.2. Prodiranje vode se povećava sledećim redosledom: OQL31 < OQL21 < OQL11 < OQL12 < OQL13. Pošto savijeni API ligandi zauzimaju veću zapreminu od izduženih, manja koncentracija API liganada može „ostaviti“ dovoljno prostora da molekuli vode prođu kroz monosloj. Povećavanjem njihove koncentracije hidrofobna površina se takođe povećava, čime se ne dozvoljava da se voda približi. Ovo ukazuje na to da je dubina do koje voda može prodreti u monosloj određena odnosom API i pozadinskog liganda. Promena odnosa takođe utiče na izmerenu debljinu monosloja - CT (tabela 4.2). Smanjenje koncentracije dovodi do blagog smanjivanja debljine monosloja sve dok ne postane stabilna za niske API:PL odnose. Ova relativna stabilnost se može objasniti malom količinom API liganada koja se može saviti prema površini bez narušavanja ukupne konformacije pozadinskih liganada koji su gotovo u potpunosti u kontaktu sa rastvaračem. U ovom slučaju, pozadinski ligand ima dominantnu ulogu u definisanju površine funkcionalizovane nanočestice u OQL-sistemu.

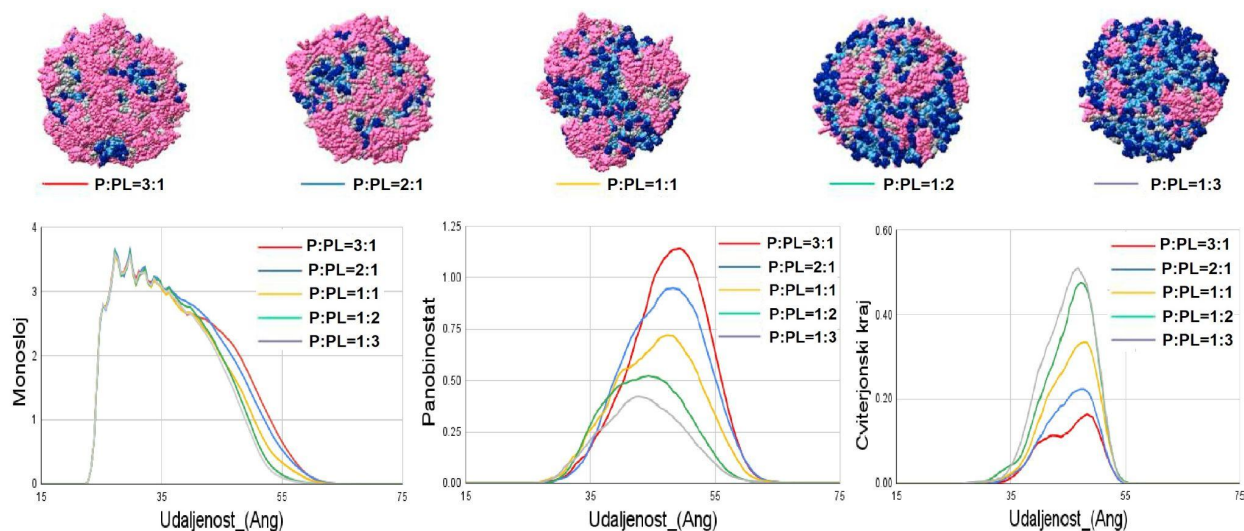
Tabela 4.1. Dostupnost leka za Kvinolinol sisteme.

Sistem	OQL31	OQL21	OQL11	OQL12	OQL13
%	20,81	20,14	14,41	11,64	8,74

Kako odnos ova dva tipa liganada utiče na dostupnost leka može se videti u tabeli 4.1. Iako uvođenje veće koncentracije pozadinskog liganda povećava rastvorljivost sistema,

dinamika interakcija dovodi do male dostupnosti leka koji je slobodan da interaguje sa svojom okolinom. Povećanje koncentracije API liganada povećava ovaj procenat, međutim, on dostiže samo nešto više od 20% čak i pri najvećem API:PL odnosu (OQL31). Ovaj procenat bi bilo teško dodatno povećati bez ugrožavanja rastvorljivosti sistema.

Panobinostat sistemi - uticaj relativne koncentracije liganada na površini



Slika 4.3. **Slike simulacija i RDF grafici PAN sistema.** Slike uravnoteženih struktura iz simulacija za Panobinostat sisteme gde je API:PL odnos 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 i RDF grafici za (s leva na desno): monosloj, lek, terminalni kraj pozadinskog liganda. Na slikama je API ligand koji nosi lek obojen sivo, panobinostat je obojen roze, pozadinski ligand obojen je svetlo plavo sa tamno plavim terminalnim krajem.

U grupi simulacija Panobinostat sistema, pikovi na ukupnom RDF grafiku (slika 4.3) postaju širi sa porastom koncentracije API liganada. To takođe dovodi do povećanja debljine monosloja kao i količine leka dostupne rastvaraču (tabele 4.2-3). Ovo je takođe vidljivo na slikama simulacija (slika 4.3). Zbog veličine leka, moguće je da su sa povećanjem koncentracije, API ligandi primorani da se distribuiraju dalje od površine zlata kako bi se izbegle sterne smetnje. Na RDF grafiku Panobinostatata i cviterjona može se videti da se sa smanjenjem koncentracije API liganada, pik Panobinostatata širi i pomera ka površini AuNP što ukazuje na njihovu fleksibilnost, dok se pik cviterjona pomera ka rastvaraču.

Objašnjenje za ovo bi bilo da su cviterjoni polarniji i imaju veći afinitet prema rastvaraču, tako da se pružaju ka njemu. Dok je koncentracija API liganada relativno niska, oni se mogu saviti i distribuirati na takav način da se ne pokriju pozadinski ligandi. Sa većom koncentracijom molekula leka, zbog dužeg lanca i veličine leka, API ligandi imaju tendenciju da pokrivaju površinu u kontaktu sa vodom, pritiskajući pozadinske ligande da se distribuiraju ispod njega. Ovo se može primetiti sa RDF grafika za veću koncentraciju leka i manju koncentraciju pozadinskog liganda, a takođe se ogleda i u debljini monosloja (tabela 4.2). Izmerena debljina

odstupa od vrednosti $Rs-n$, ali u mnogo manjem stepenu nego u slučaju Kvinolinola. To je možda zbog veće polarnosti cviterjenskog pozadinskog liganda. Iako bi debljina monosloja trebala da se smanji proporcionalno koncentraciji API liganada, iz rezultata simulacija možemo videti da se to ne dešava. U opsegu odnosa od 2: 1 do 1: 2 debljina monosloja kao i dostupnost leka se drastično menjaju, ali povećanje ili smanjenje koncentracije leka iznad tih vrednosti nema značajan uticaj na ukupnu strukturu. Uz veće koncentracije API, Panobinostat ima dominantan uticaj na rezultujuće strukture, dok je suprotno tačno za veće koncentracije pozadinskog liganda.

Tabela 4.2. Upoređivanje izračunate debljine monosloja i teorijske debljine monosloja $Rs-n$ za Kvinolinol i Panobinostat sisteme.

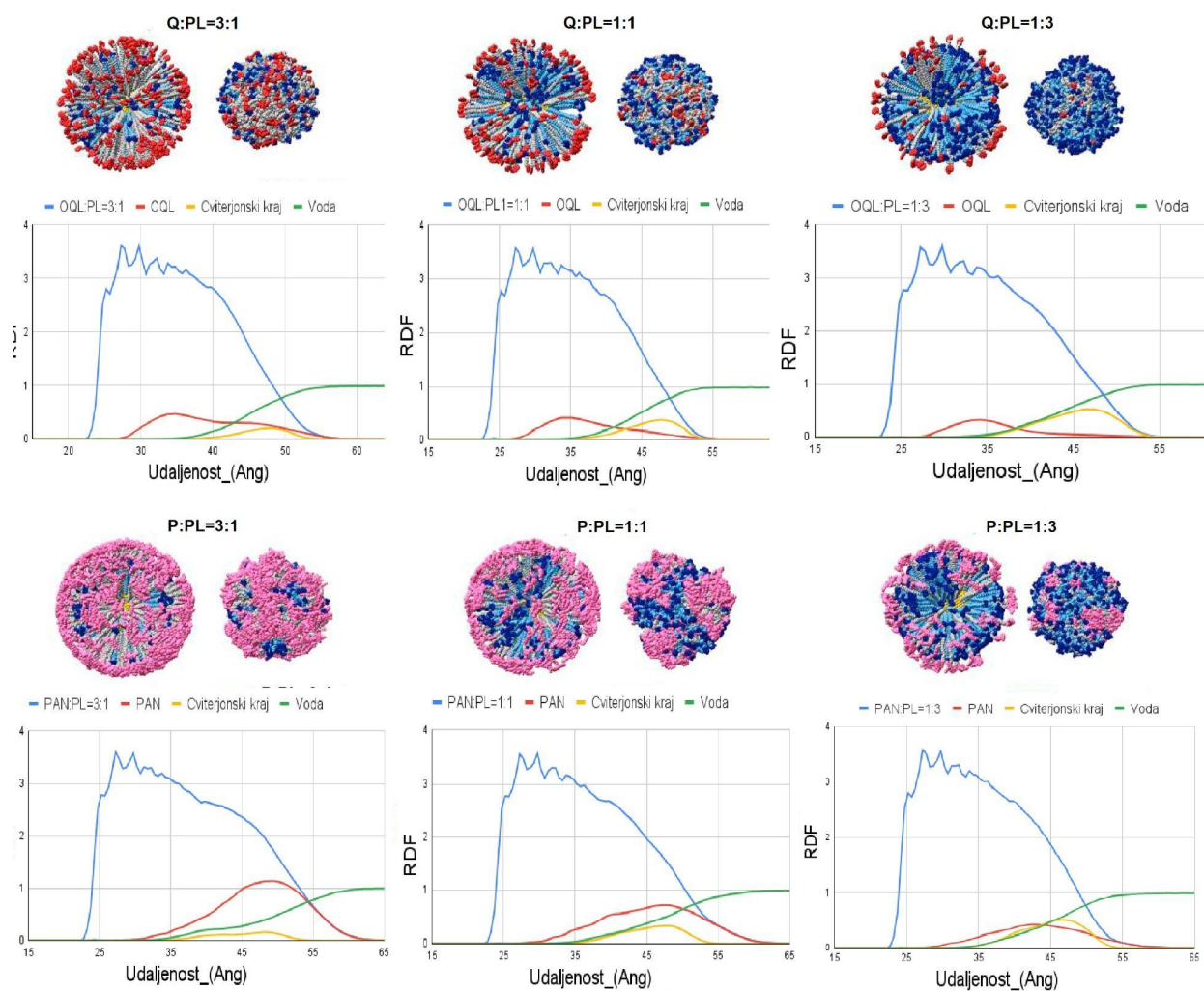
Prosek (Å)	OQL 31	OQL 21	OQL 11	OQL 12	OQL 13	PAN 31	PAN 21	PAN 11	PAN 12	PAN 13
CT	23.7	24.3	23.3	22,7	22,7	34	34	33	30	29.5
$Rs-n$	38.7	38.1	36.7	35.4	34.8	43.2	39.3	39.7	37.4	33.5
Devijacije CT od $Rs-n$	14.9	13.8	13.5	12,7	12,0	9.2	5.3	6.7	7.4	4

Slično Kvinolinol sistemima, količina leka koja je dostupna rastvaraču se povećava sa povećanjem koncentracije API liganada (tabela 4.3). Ali je važno napomenuti da je, za razliku od OQL sistema, dostupnost leka mnogo veća u PAN sistemima za svaki ispitani odnos liganda. Dok je za OQL sisteme maksimalna dostupnost leka nešto veća od 20%, za hidofilni Panobinostat mnogo veći procenat je dostignut već pri najmanjem ispitivanom odnosu (PAN13), i raste do skoro 53% (PAN31).

Tabela 4.3. Dostupnost leka za panobinostat sisteme.

Sistem	PAN31	PAN21	PAN11	PAN12	PAN13
%	52,84	49.35	43.28	36.09	34.41

Uticaj fizičko-hemijskih osobina leka



Slika 4.4. **RDF grafici i slike simulacija.** Slike simulacija: U svakom panelu, prvi kadar prikazuje nanočestice sa potpuno izduženim ligandima pre ekvibracije, dok drugi kadar prikazuje uravnoteženu strukturu u vodi sa savijenim ligandima. Ispod slike nalazi se odgovarajući RDF grafik. API ligandi su obojeni sivo sa različito obojenim lekovima: Kvinolinol je obojen crveno, a Panobinostat roze. Pozadinski ligand je obojen svetlo plavom bojom sa tamno plavim terminalnim krajem. Voda nije prikazana radi jasnije slike. Prvi red (s leva na desno): OQL31, OQL11, OQL13. Drugi red (s leva na desno): PAN31, PAN11, PAN13.

I za OQL i za PAN sisteme, bez obzira na različit API:PL odnos (Slika 4.4) možemo uočiti isti trend - veća početna koncentracija leka korelira sa većom količinom leka dostupnog na površini u kontaktu sa rastvaračem. Međutim, u slučaju Kvinolinola, pozadinski ligand ostaje dominantan na površini za sve ispitivane odnose. Ovaj trend je vidljiv na slikama simulacija, ali je takođe potvrđen RDF analizom (slika 4.4), gde je prosečna gustina Kvinolinola bliža površini zlata od prosečne gustine Panobinostata. Ova razlika se može objasniti hidrofobnošću OQL sistema. Sa slike struktura, sekcija 3.3.1, tabela 3.14 se vidi da je API ligand koji nosi lek

fleksibilan. To potvrđuje i RDF gde su pikovi liganda prilično široki (Slika 4.4), što ukazuje na njihovu fleksibilnost. S obzirom na to da je Kvinolinol hidrofoban, on teži da smanji svoju površinu koja je u kontaktu sa polarnim rastvaračem. Ovo se postiže savijanjem fleksibilnog API liganda ka zlatnom jezgru. Istovremeno, polarni pozadinski ligand se proteže prema rastvaraču koji pokriva lek ispod površine. S druge strane, Panobinostat je hidrofilan, stoga ne treba da se „krije“ od vodenog okruženja.

Savijanje liganada takođe utiče na veličinu cele funkcionalizovane nanočestice i debljinu monosloja (tabele 4.4 i 4.2). Odstupanja veličine izmerene nakon simulacije (d_m) od d_{ext} (Tabela 4.4) povećavaju se sa povećanjem API:PL odnosa. Takođe, odstupanja su veća za sisteme sa hidrofobnim lekom gde je savijanje liganada izraženije. To ukazuje na to da je do devijacija došlo zbog savijanja API, a ne pozadinskog liganda.

Tabela 4.4. Prosečna veličina funkcionalizovanih nanočestica

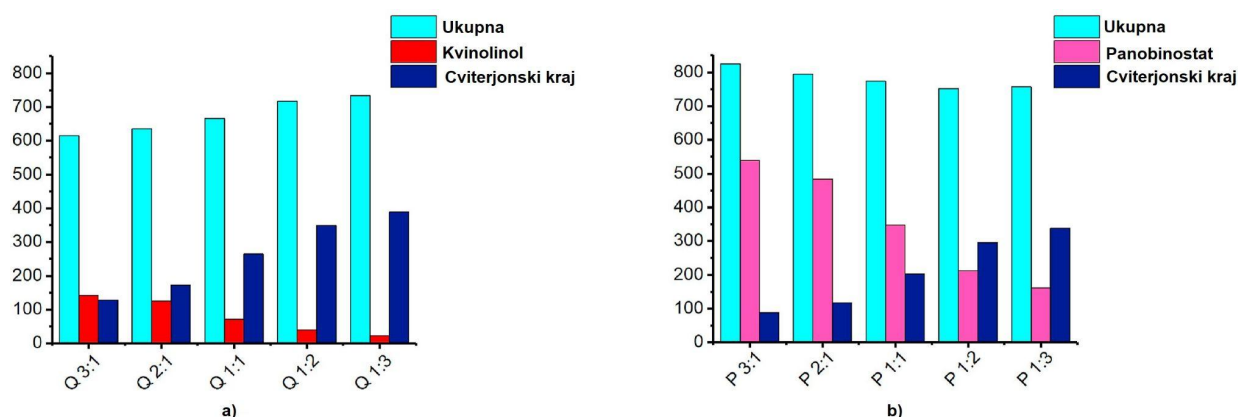
Prosečna veličina NČ (Å)	OQL 31	OQL 21	OQL 11	OQL 12	OQL 13	PAN 31	PAN 21	PAN 11	PAN 12	PAN 13
d_m	120	120	120	119.5	119.5	128.5	127.5	127	126.5	126
d_{ext}	132,4	131,1	128.5	125.9	124.5	141,4	139.1	134.5	129.8	127.6
Devijacije d_{ext} od d_m	12,4	11,1	8.5	6.4	5	12,9	11,6	7.5	3.3	1,6

Sličan trend se može uočiti upoređivanjem vrednosti debljine monosloja pre (Rs-n) i nakon simulacija (CT) (Tabela 4.2). Devijacije su veće u slučaju Kvinolinola što ukazuje na to da je savijanje dosta izraženije kod API liganada koji nose hidrofoban lek.

Koliko duboko molekuli vode mogu da prodru u monosloj? Na slici 4.2 se vidi da se u OQL sistemima voda može približiti površini zlata više nego u PAN sistemima. Iako bi bilo logično pretpostaviti da bi više molekula vode moglo prodreti u slučaju hidrofilnog Panobinostata, to se ne dešava u simulacijama. Moguće objašnjenje bi mogli biti sterni efekti usled voluminoznosti molekula Panobinostata, i veća polarnost cviterjenskog pozadinskog liganda. Zbog veće polarnosti, cviterjoni imaju veći afinitet za polarni rastvarač. Stoga, pozadinski ligandi imaju tendenciju da se protežu prema rastvaraču, dok istovremeno uzrokuju da se API-PAN savija u suprotnom smeru: dalje od rastvarača, prema površini zlata, iako u znatno manjem stepenu u poređenju sa OQL sistemima. API-PAN takođe ima ograničenu rotaciju oko svog centralnog amidnog azota (strukture su date u sekciji 3.3.1, tabela 3.14), pa veća rigidnost i sama veličina Panobinostata mogu sprečiti prodiranje vode dublje u monosloj. Dublje prodiranje vode za OQL sistem je prethodno objašnjeno. S obzirom na to da se API-OQL ligandi savijaju prema površini zlata, hidrofilni deo lanca postaje izložen rastvaraču omogućavajući molekulima vode pristup.

Površina dostupna rastvaraču je izračunata zasebno za a) celu funkcionalizovanu nanočesticu (ukupna SASA), b) samo za lek, i c) samo za cviterjenski terminalni kraj pozadinskog liganda (slika 4.5). Glavna razlika između OQL i PAN sistema je da se ukupna

površina dostupna rastvaraču za OQL sisteme povećava sa povećanjem koncentracije pozadinskog liganda (povećava se sa otprilike 600 nm² na 750 nm²), dok ukupna površina dostupna rastvaraču za PAN sisteme pokazuje suprotan trend (opada sa 820 na 750 nm²). Ovo se ponovo objašnjava hidrofobnošću leka i fleksibilnošću liganada. Hidrofobni API-OQL ligandi se savijaju prema površini zlata, dok se polarni pozadinski ligand ponaša na potpuno suprotan način protežući se prema rastvaraču i time povećavajući rastvorljivost sistema. Stoga, dodavanje više pozadinskog liganda u OQL sistem povećava sveukupnu površinu dostupnu rastvaraču. S druge strane, Panobinostat je veliki hidrofilni molekul čija je velika površina odgovorna za veću vrednost ovog parametra. Povećavanjem koncentracije pozadinskog liganda, smanjujemo ukupnu veličinu i površinu cele funkcionalizovane nanočestice, a kao posledica smanjuje se ukupna površina dostupna rastvaraču. U oba sistema, SASA cviterjonskog terminalnog kraja se povećava sa njegovom koncentracijom (za oba sistema povećava se u opsegu od ≈100-400 nm²). Ovo je očekivano s obzirom na polarnost pozadinskog liganda.



Slika 4.5. **SASA za OQL i PAN sisteme.** Radi preglednosti tabele oznaka za kvinolinol sistem je "Q" umesto OQL, a za PAN "P". a) OQL sistemi, b) PAN sistemi.

Zaključak eksperimenta

Rezultati pokazuju da za OQL sisteme hidrofobnost leka ima glavni uticaj na strukturu monosloja u vodenoj sredini. Tendencija hidrofobnog leka da smanjuje svoju površinu dostupnu polarnom rastvaraču rezultuje smanjenjem veličine nanočestice i debljine monosloja. Površina dostupna rastvaraču sistema se proporcionalno povećava sa porastom koncentracije pozadinskog liganda. To ide u prilog praksi dodavanja hidrofilnog pozadinskog liganda za povećanje rastvorljivost sistema. Međutim, to dovodi i do toga da se značajno smanjuje količina dostupnog leka. Takođe se može zaključiti da relativni odnos API i pozadinskog liganda ima ključnu ulogu u određivanju strukture u vodenom, a ekstrapolacijom i u fiziološkom rastvoru. Varirajući odnos ovih liganada, granica između rastvorljivosti i dostupnosti leka se može pomerati. Ali postoji očigledna granica. Iako se dostupnost leka može povećati povećanjem

početne koncentracije API liganada, rastvorljivost sistema može biti ugrožena ili potpuno izgubljena.

U slučaju hidrofilnog leka, ligand u višku ima dominantnu ulogu u određivanju strukture nanosistema u rastvoru. Ako je API-PAN u višku, zbog svoje veličine i voluminoznosti on se izdužuje i pokriva površinu u kontaktu sa rastvaračem, potiskujući pozadinski ligand da se savije i zauzme raspoloživo područje ispod. Ako je pozadinski ligand u višku, zbog veće polarnosti, on ima sličan uticaj na konformaciju API liganada. Dostupnost leka je značajno veća nego u hidrofobnim sistemima za bilo koji dati odnos. Ovo je očekivano zbog ukupne hidrofilne prirode PAN sistema. Ovo podrazumeva da se može očekivati veća efikasnost hidrofilnog sistema.

Iako su neki trendovi vidljivi iz dobijenih rezultata za ispitivane sisteme, u daljem radu došli smo do zaključka da ovo ne mora biti i opšte pravilo za sve sisteme. Simulirani sistemi su previše kompleksni i moguće je da postoje i drugi uticaji koje je nemoguće izolovati i okarakterisati na ovakvim sistemima, a koji značajno doprinose strukturi monosloja kao što su npr. dužina liganada i veličina nanočestice. Takođe, ova dva leka su na različitim krajevima skale hidrofobnosti i razlika u njihovoj veličini je značajna. Dodatno se postavlja pitanje da li bi isti trend postojao i ako su razlike u fizičko-hemijskim karakteristikama između lekova suptilnije. Zbog toga su u narednim grupama simulacija sistemi značajno pojednostavljeni. Kompleksnost sistema se povećavala postepeno i sistematski kako bi se izolovali i okarakterisali specifični efekti.

4.1.2. Ispitivanje strukture zlatnih nanočestica funkcionalizovanih homogenim monoslojem

U okviru ovog istraživanja, akcenat bio na nanočesticama funkcionalizovanim heterogenim monoslojem (osnovni razlog za to je je činjenica da su sistemi sintetisani u okviru projekta na kom je rađena disertacija heterogeni, tako da su samo na njima mogli biti eksperimentalno potvrđeni nalazi ovog istraživanja). Međutim, kao što je pomenuto u prethodnoj sekciji, uvođenje više različitih tipova liganada unosi veću kompleksnost u sistem i dovodi do novih tipova interakcija koje je teško izolovati i objasniti njihov uticaj. Zbog toga su u prvoj grupi simulacija modeli pojednostavljeni i simulirane su nanočestice sa homogenim monoslojem kako bi bile dobijene referentne vrednosti i kasnije jasnije videli uticaj uvođenja novog tipa liganda u sistem. U daljem radu simulirane su nanočestice sa heterogenim monoslojem koji su kombinacija ovih liganada. Uvođenje više različitih tipova liganada u sistem treba da omogući veću kontrolu nad ponašanjem krajnjeg proizvoda u biološkim uslovima. Na primer, ako je API ligand previše hidrofoban, uvođenjem polarnog pozadinskog liganda može se povećati rastvorljivost sistema što je nemoguće postići homogenom funkcionalizacijom nanočestica.

Stoga su u ovom setu eksperimenata modelovana dva tipa sistema:

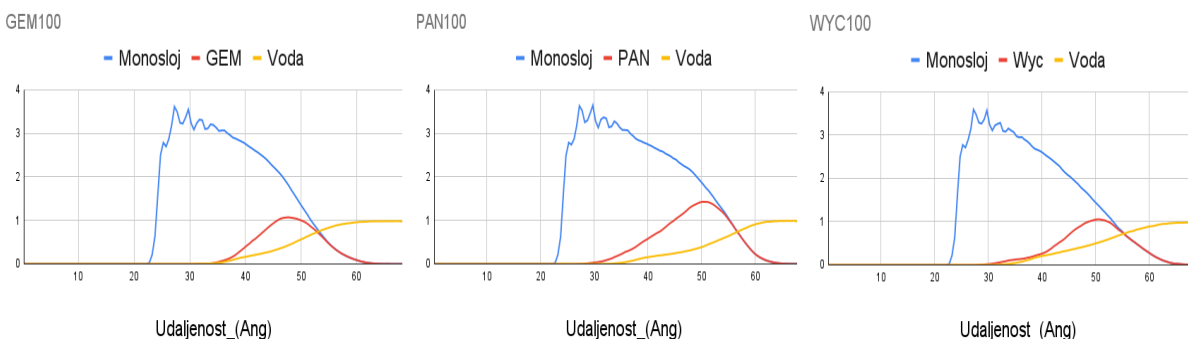
1. Nanočestice zlata funkcionalizovane samo API ligandom koji nosi lek (ispitivani lekovi: **NHQ** - Kvinolinol koji je vezan za API ligand preko azota, **OQL** - Kvinolinol koji je vezan za API ligand preko kiseonika, **WYC-215** (u nastavku obeležen kao **WYC**) - Vik-215, **NCL** - Niklozamid, **ZIL** - Zileuton, **GEM** - Gemcitabin, **PAN** - Panobinostat)

2. Nanočestice zlata funkcionalizovane samo pozadinskim ligandom (**Pz2**, **PegZ**, **Pz6** - pozadinski ligandi različitih dužina)

API ligandi su isti u svim sistemima. Strukture liganada date su u sekciji 3.3.1, u tabeli

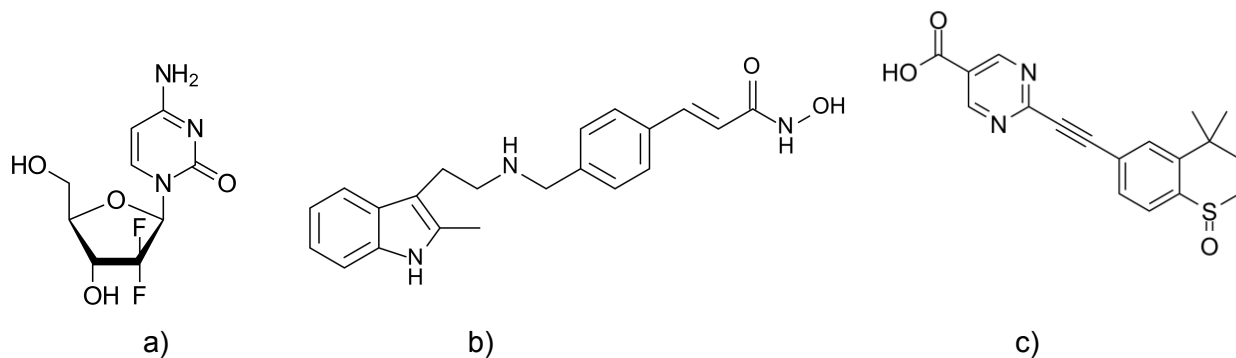
3.14.

Simulacije homogenih sistema pokazale su jasnu razliku u strukturama između nanosistema koji nose izrazito hidrofobne i onih koji nose hidrofilnije lekove. Radi preglednosti, rezultati su grupisani na takav način.



Slika 4.6. **RDF grafici**. S leva na desno: sistem funkcionalizovan API ligandom koji nosi Gemcitabin, API ligandom koji nosi Panobinostat, API ligandom koji nosi WYC.

Pomenute sličnosti među strukturama evidentne su sa gore prikazanih RDF grafika (Slika 4.6). Na RDF graficima sistema koji nosi hidrofilnije lekove (Gemcitabin, Panobinostat i Vik-215) može se videti da je prosečna gustina lekova u sistemu pomerena bliže površini u kontaktu sa rastvaračem. Pik monosloja nanosistema koji nosi Panobinostat je najširi, što se može objasniti činjenicom da je ovaj molekul veći od drugih ispitivanih lekova, po čemu se on najviše razlikuje od druge dve strukture (slika 4.7).



Slika 4.7. **Strukture lekova**. a) Gemcitabin, b) Panobinostata, c) Vik-215.

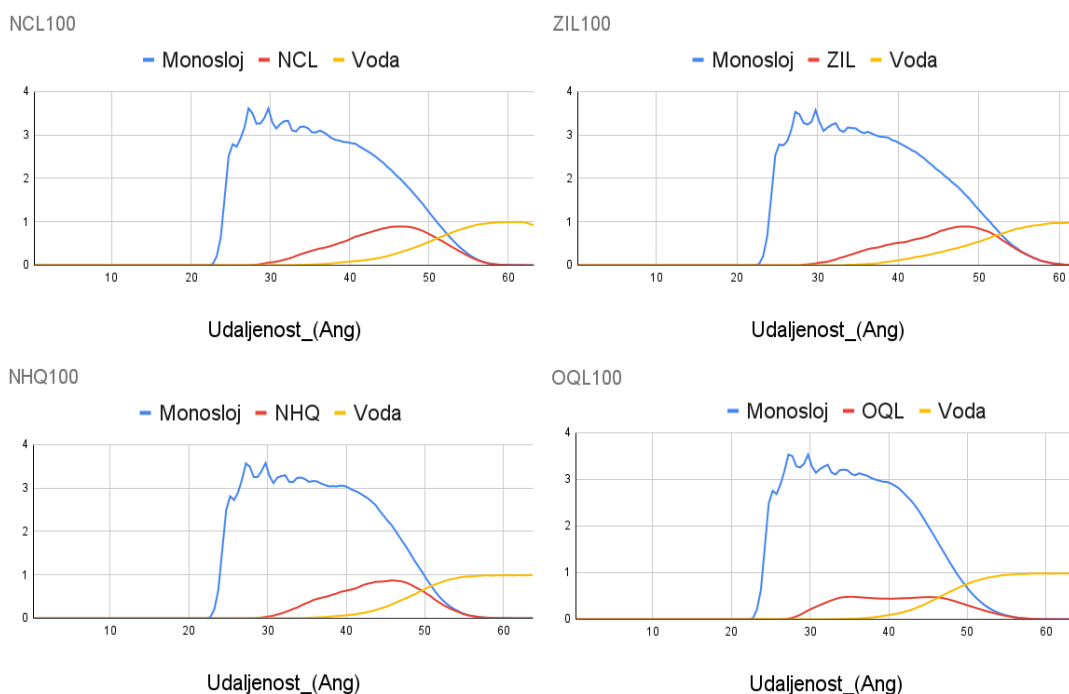
Bez obzira na to što su pikovi krivih svakog leka pomereni bliže rastvaraču, na osnovu širine pika takođe se može primetiti i da se protežu ka površini jezgra od zlata. To ukazuje da nije sva količina leka dostupna za interakciju za sredinom. S obzirom na širinu pikova monosloja koji ukazuje na fleksibilnost API liganda, može se zaključiti da se određeni procenat ovih API

liganada savija i izlaže hidrofilinije delove svog lanca rastvaraču čime “sakriva” određen procenat leka.

Tabela 4.5. Površina dostupna rastvaraču (SASA) i procenat dostupnog leka za sisteme koji nose Panobinostat (PAN), Vik-215 (WYC), Gemcitabin (GEM).

Sistem	PAN100	WYC100	GEM100
SASA (Å ²)	123621	99024	107215
%	55	55	55

Dodatna potvrda može se formulisati iz izračunatih vrednosti dostupnosti leka (tabela 4.5) koji pokazuju da je samo polovina (55%) molekula leka dostupna rastvaraču. Ono što je posebno interesantno u ovoj grupi simulacija je to da je uprkos razlikama u strukturi samih lekova, procenat dostupnosti identičan kroz sve sisteme.



Slika 4.8. RDF grafici. Gornji red, s leva na desno: sistem funkcionalizovan: API ligandom koji nosi Niklozamid, API ligandom koji nosi Zileuton, Donji red, s leva na desno: API ligandom koji nosi Kvinolinol vezan preko azota, API ligandom koji nosi Kvinolinol vezan preko kiseonika.

Kod RDF grafika funkcionalizovanih nanočestica koje nose hidrofobne lekove (Slika 4.8), najviše se ističe razlika između Kvinolinola vezanog preko azota (NHQ) i Kvinolinola vezanog preko kiseonika (OQL). Prosečna gustina NHQ pomerena je dosta bliže rastvaraču, dok je kod OQL-a prosečna gustina ravnomerno raspoređena kroz čitav monosloj. Ako se pogleda struktura Kvinolinola (slika 4.9, c) može se videti da u slučaju NHQ, OH grupa ostaje slobodna

monosloja na RDF graficima), veličina nanočestice i debljina monosloja (Slika 4.10, tabela 4.7-8).

Iako ovi sistemi ne nose ni jedan lek, izračunata je dostupnost terminalnog cviterjonskog kraja rastvaraču. Rezultati su dati ispod u tabeli 4.7.

Tabela 4.7. SASA i dostupnost terminalnog kraja pozadinskog liganda.

Sistem	Pz2	PegZ	Pz6
SASA (Å ²)	76560	84577	89574
%	56	55	55

Vrednosti u tabeli 4.7. pokazuju da se površina dostupna rastvaraču (SASA) povećava srazmerno sa dužinom liganda (sa povećanjem veličine nanočestice), dok dostupnost terminalnog kraja ostaje identična što ukazuje na to da se dinamike strukture ne menja, odnosno, da produžavanje liganda ne dovodi do novog tipa interakcija i promena u strukturi. Takođe, činjenica da je samo oko ~55% terminalnog kraja dostupno rastvaraču ukazuje da i ovaj tip liganda ima veliku mobilnost i da dolazi do njegovog savijanja prema površini jezgra od zlata.

Tabela 4.8. Maksimalna veličina nanočestice (MAXveličina), prosečna veličina nanočestica (AVG veličina), debljina monosloja (CT)

Tip liganda	Sistem	MAXveličina [Å]	AVGveličina [Å]	CT [Å]
API	WYC100	140,5	113,5	30,75
API	PAN100	140,5	113,5	30,75
API	GEM100	136,5	108,5	25,25
API	ZIL100	133,5	105,5	26,75
API	NCL100	126,5	95,5	21,75
API	NHQ100	126	101,5	24,75
API	OQL100	126,5	98,5	23,25
PL	Pz6	124,5	103,5	25,75
PL	PegZ	114,5	97,5	22,75
PL	Pz2	103,5	90,5	19,25

S obzirom na to da su API ligandi koji nose lekove identični u svim sistemima, a da je jedina razlika u strukturi vezani lek, može se zaključiti da na veličinu nanočestice i debljinu monosloja najveći uticaj ima hidrofobnost/hidrofilnost vezanog leka. API ligandi koji nose hidrofobne lekove imaju tendenciju da se savijaju ka površini jezgra od zlata kako bi "sakrili"

lekove od rastvarača, dok se oni koji nose hidrofилne lekove izdužuju u pružaju ka rastvaraču. U slučaju pozadinskih liganada, s obzirom na to da se sastoje od istih gradivnih elemenata, ali da se razlikuju u dužini, dužina liganada određuje konačnu veličinu nanočestice i debljinu monosloja.

Tabela 4.9. Ukupna, kinetička i potencijalna energija [Mcal/mol] ispitivanih sistema

Tip liganada	Sistem	Ukupna energija	Kinetička energija	Potencijalna energija
API	WYC100	-560,7	157,1	-717,8
API	PAN100	-355,1	124,9	-480,1
API	GEM100	-422,2	127,6	-549,8
API	ZIL100	-439,2	127,1	-566,2
API	NCL100	-290,6	95,9	-386,5
API	NHQ100	-381,5	118,9	-500,4
API	OQL100	-387,9	119,7	-507,6
PL	Pz6	-396,8	108,77	-505,5
PL	PegZ	-314,1	80,7	-394,7
PL	Pz2	-244,3	55,99	-300,3

U tabeli 4.9 date su energije sistema. Upoređivanjem ukupnih energija možemo doći do zaključka o relativnoj stabilnosti ispitivanih sistema. Sistemi sa hidrofилnijim lekovima su generalno dosta stabilniji od onih koji nose hidrofobne lekove, međutim unutar tih grupa ne postoji jasan trend uticaja na konkretne rezultate. Moguće objašnjenje je da savijanje liganada unosi "nestabilnost" u sistem tako što povećava vrednost potencijalne energije. Ako se uporede npr. WYC i PAN sistemi, iz tabele 4.8 može se videti da je njihova veličina ista. Međutim, sa slike 4.7, gde su prikazane strukture lekova, očigledno je da je Panobinostat veći molekul. Ovo ukazuje na to da je savijanje liganada izraženije kod Panobinostat sistema. Ako se, s druge strane, uporede Niklozamid i Kvinolinol, situacija je slična. Veličina celog sistema je slična, ali je Kvinolinol dosta manji molekul (slika 4.9). A konačno, Kvinolinol sistem je stabilniji od Niklozamid sistema.

Tabela 4.10. RF/D čija vrednost opisuje zauzetu konformaciju, Rs-n - teorijska debljina monosloja, D - Udaljenost između dve tačke vezivanja liganada na površinu, RF - Florijev radijus, CT - izračunata debljina monosloja, izračunata i predviđena veličina nanočestice [nm].

100	RF/D	Rs-n [nm]	D	RF	CT [nm]	Izračunata veličina	Predviđena veličina
PegWyc	0,81	4,80	3,40	2,75	3,10	11,35	11,00
PegGEM	0,73	4,55	3,40	2,47	2,53	10,85	10,44

PegPAN	0,72	4,53	3,40	2,45	3,08	11,35	10,4
PegZIL	0,71	4,60	3,40	2,40	2,70	10,55	10,00
Pz6	0,71	4,00	3,40	2,40	2,58	10,35	10,00
PegZOR	0,68	4,90	3,40	2,30	X	X	10,10
PegNCL	0,60	4,13	3,40	2,05	2,18	9,55	9,60
PegOQL	0,60	4,11	3,40	2,03	2,33	9,85	9,56
PegDOX	0,60	3,60	4,20	2,50	X	X	10,5
PegZ	0,56	3,28	3,90	2,20	2,28	9,75	9,90
Pz2	0,42	2,58	4,55	1,90	1,93	9,05	9,30

Do sada su ispitani različiti efekti koji utiču na strukturu nanočestice. Kakva je “makro” posledica, odnosno, kakvu konformaciju konačno zauzima monosloj možemo videti iz tabele 4.10. Kao što je pomenuto u prethodnoj sekciji 3.2.4, najoptimalnija konformacija monosloja bila bi između konformacije nasumičnog klupka i konformacije četke ($R_F/D \approx 1$). U ovoj konformaciji izbegavanje adsorpcije proteina smanjivanjem nespecifičnih interakcija sa njima je najveće. U navedenoj tabeli (tabela 4.10) rezultati pokazuju da su nanočestice homogeno funkcionalizovane API ligandima koji nose lekove Wyc, Gemcitabin i Panobinostat najpribližnije optimalnoj konformaciji (R_F/D za Wyc iznosi 0,81, za Gemcitabin 0,73 i za Panobinostat 0,72). To je u skladu sa prethodno opisanim rezultatima gde je objašnjeno da zbog veće hidrofilitnosti lekova ovi ligandi nemaju toliku tendenciju da se sakrivaju od rastvarača. Takođe, prilično su voluminozni i njihovim savijanjem ka površini zlata javljale bi se sterne smetnje. Kao posledica toga javlja se skoro optimalna konformacija monosloja. Ostali nanosistemi zauzimaju konfiguraciju nasumičnog klupka što je takođe u skladu sa prethodno opisanom mobilnošću datih API liganada. Situacija je slična i kod pozadinskih liganada. Dostupnost terminalnog kraja je pokazala da je ponašanje ovih liganada slično API ligandima koji nose hidrofilnije lekove (~55%) što ukazuje na savijanje liganada (tabela 4.7). Zbog zakrivljenosti površine nanočestice zlata relativno malog prečnika i kratke dužine ovih liganada, moguće je da postoji dovoljno slobodnog prostora što im omogućava veću mobilnost i time dovodi do ove konformacije.

Da bi se potvrdio proračun Florijevog radijusa za ovaj tip liganada, izračunata je prosečna veličina nanočestice na osnovu dobijenog rezultata i ta vrednost je upoređena sa prosečnom veličinom dobijenom preko simulacija. Kao što se iz tabele 4.10 može videti, odstupanje je minimalno i u proseku iznosi manje od 0,5 nm. Najveće odstupanje je u slučaju Panobionstat sistema (0,95 nm) što je značajno manje od eksperimentalne greške (± 3 nm). Florijev radijus je dodatno izračunat za sisteme koji nose Doksorubicin i Zorak. Iako homogeno funkcionalizovane nanočestice datim ligandima nisu simulirane, kasnije su simulirani heterogeni sistemi koji ih sadrže.

Zaključak eksperimenta

U ovoj grupi simulacija, cilj je bio dolaženje do referentnih vrednosti svih ispitivanih parametara kako bi se u kasnijem radu, pažljivim i postepenim uvođenjem različitih pozadinskih liganada mogao izolovati i objasniti njihov efekat i uticaj na konačnu uravnoteženu strukturu funkcionalizovanih nanočestica u rastvoru.

Rezultati analize nanočestica sa homogenim monoslojem ukazali su na trend u ponašanju nanosistema koji nose hidrofobne u odnosu na sisteme koji nose hidrofilne lekove. Unutar svake grupe zauzima se takva konformacija monosloja koja rezultuje istim "tipom" strukture, gde se ligandi raspoređuju na takav način da terminalni kraj, tj. lek bude dostupan na površini oko 35% u slučaju hidrofobnih, i oko 55% u slučaju hidrofilnih lekova.

Pozadinski ligandi pokazuju slično ponašanje, odnosno "tip" strukture i dinamika monosloja ostaje identična kroz različite sisteme, a sve razlike potiču isključivo od dužine simuliranih liganada. Njihovo ponašanje najbližije je API ligandima koji nose hidrofilne lekove.

Jasni trendovi koji se javljaju unutar svake grupe ispitivanih sistema su odlične referentne tačke, jer na taj način u kasnijem radu možemo doći do jasnih zaključaka u vezi efekata koji se javljaju kombinacijom liganada i pojavom novih interakcija.

4.1.3. Ispitivanje uticaja promene koncentracije liganada na strukturu nanočestica funkcionalizovanih heterogenim monoslojem

Nakon što su dobijeni rezultati simulacija homogeno funkcionalizovanih nanočestica, simulirani su heterogeni sistemi gde su postepeno i sistematično uvođeni pozadinski ligandi kako bi se ispitao njihov uticaj na strukturu funkcionalizovanih nanočestica u rastvoru.

Za ispitivanje uticaja promene koncentracije liganada na strukturu funkcionalizovane nanočestice, simulirane su nanočestice zlata sa mešovitim monoslojem, odnosno, nanočestice funkcionalizovane sa dva tipa tiolatnih liganada:

- a) ligand koji služi kao nosač za lek (API),
- b) cviterjonski pozadinski ligand (PL).

API ligandi u ovoj grupi simulacija nosili su antitumorske lekove Zileuton (**ZIL**) i Gemcitabin (**GEM**). U svim sistemima, odnos dva tipa liganada bio je variran u opsegu od API:PL=5:1-1:5. Radi utvrđivanja uticaja pozadinskog liganda na strukturu, pored rezultata iz ove grupe simulacija, takođe su prikazani i rezultati relevantnih homogenih struktura. Strukture liganada date su u sekciji 3.3.2. u tabeli 3.16.

Zileuton sistemi

Vrednosti u tabeli 4.11. pokazuju da dostupnost leka opada srazmerno povećanju koncentracije pozadinskog liganda. Međutim, ukupna energija ovih sistema (tabela 4.12) opada što sugeriše da stabilnost sistema raste. Rast se odvija postepeno sve do sistema ZIL14 gde je pozadinski ligand u značajnom višku (ukupna energija se smanjuje sa -439,2 na -563,8 Mcal/mol), i stabilnost počinje da opada. Moguće objašnjenje je da je pri visokim koncentracijama API liganda njihovo kretanje ograničeno (sterne smetnje usled velikog broja liganada). Međutim, pri smanjenju API, a povećanju koncentracije pozadinskog liganda "oslobađa" se prostor što omogućava API ligandima slobodnije kretanje čime se povećava kinetička energija i destabilizuje sistem. S obzirom na to da je najnestabilniji sistem zapravo homogeni sistem sa pozadinskim ligandom, može se zaključiti da interakcije između njega i API liganda imaju pozitivan doprinos stabilizaciji sistema.

Tabela 4.11. SASA Zileuton sistema i dostupnost leka

Sistem	SASA (Å ²)	%
ZIL100	100240	39
ZIL 51	87723	38
ZIL 41	84539	38
ZIL 31	83545	36
ZIL 21	75923	35
ZIL 11	65408	26
ZIL 12	47687	22
ZIL 13	38004	19
ZIL 14	29583	16
ZIL 15	27776	14
PL100	84577	0

U sistemima gde je API ligand u višku (API:PL=5:1-2:1), dostupnost leka varira oko 35%. To je u skladu sa rezultatima homogenih sistema koji nose hidrofoban lek. Sa daljim povećanjem koncentracije pozadinskog liganda, dostupnost leka počinje značajnije da opada. U kombinaciji sa rezultatima ukupne energije sistema, može se zaključiti da je dodavanje pozadinskog liganda u manjim koncentracijama povoljno, odnosno, iako se dostupnost leka ne menja značajno, stabilnost sistema raste. Nasuprot tome, dodavanje pozadinskog liganda u višku dovodi do smanjenja dostupnosti leka i destabilizacije sistema. Ovi rezultati navode na zaključak da API:PL interakcije počinju da budu značajne tek pri visokim koncentracijama pozadinskog liganda. Pri manjim koncentracijama heterogen monosloj ne pokazuje značajno odstupanje od homogeno funkcionalizovanih nanočestica.

Tabela 4.12. Ukupna, kinetička i potencijalna energija [Mcal/mol] ispitivanih sistema

Sistem	Ukupna energija	Kinetička	Potencijalna
ZIL100	-439,2	127,1	-566,2
ZIL 51	-471,8	125,3	-597,1
ZIL 41	-474,2	125,3	-599,5
ZIL 31	-474,5	124,7	-599,1
ZIL 21	-480,1	124,9	-604,9
ZIL 11	-500,5	127,2	-627,7
ZIL 12	-525,7	130,6	-656,4
ZIL 13	-563,8	137,6	-701,4
ZIL 14	-541,2	133,1	-674,3
ZIL 15	-500,4	122,6	-623,1
PL100	-314,1	80,7	-394,7

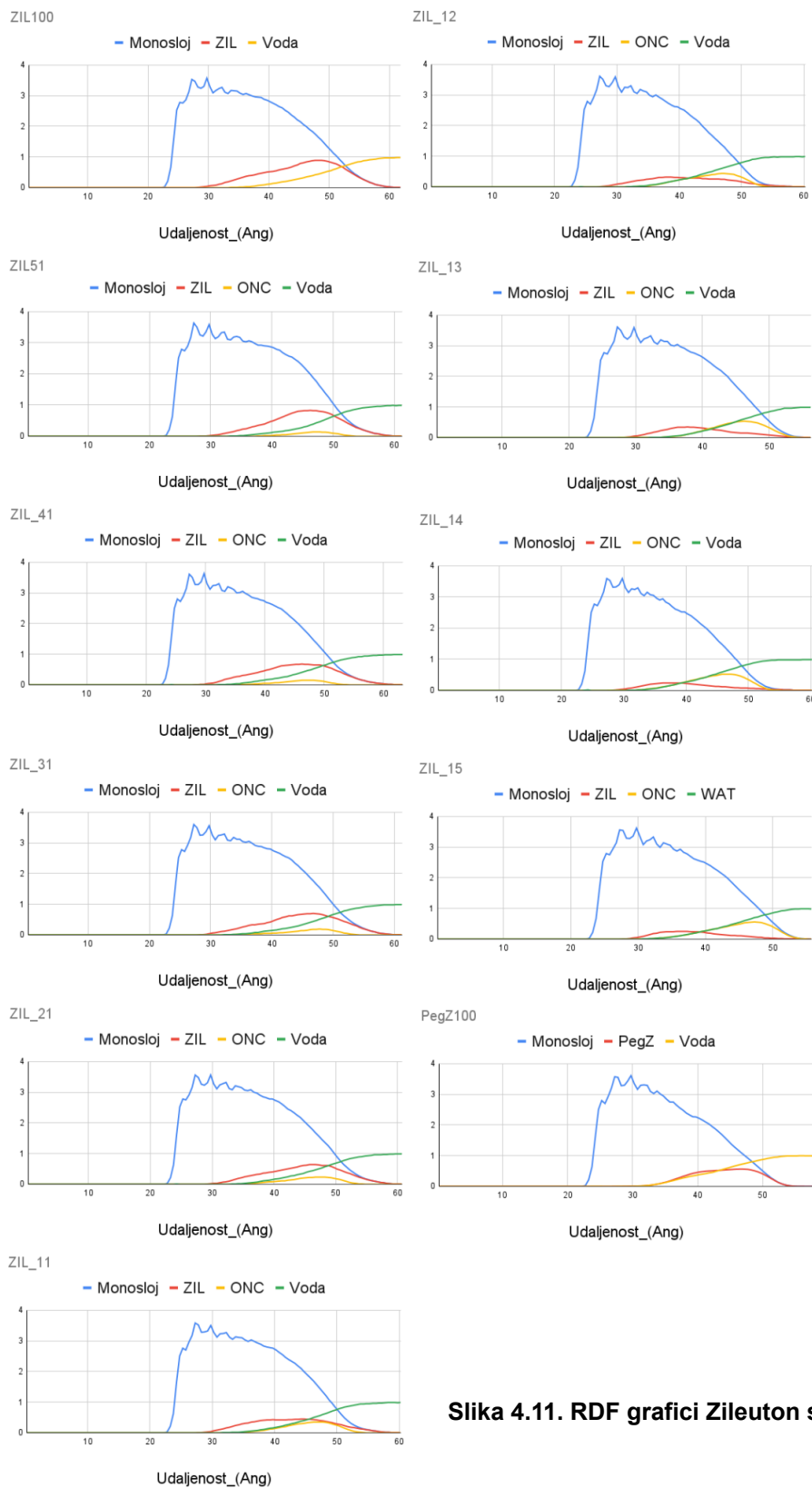
U grupi simulacija Zileuton sistema, pikovi na RDF grafiku monosloja (Slika 4.11) postaju uži sa porastom koncentracije pozadinskog liganda. Iz toga se može zaključiti da uvođenjem pozadinskog liganda dolazi do smanjenja ukupne veličine nanočestice kao i do smanjenja debljine monosloja što se može videti i iz tabele 4.13. prikazane niže. Objašnjenje za to je dužina korišćenih liganada: pozadinski ligand je kraći od API liganda.

Međutim, ako se obrati pažnja na RDF krive Zileutona, može se primetiti da se sa povećanjem koncentracije pozadinskog liganda prosečna gustina leka pomera bliže površini zlata. Pikovi leka takođe postaju širi, dok je slučaj suprotan za terminalni kraj pozadinskog liganda. Širenje pikova leka ukazuje na fleksibilnost API liganada, dok se pomeraj objašnjava hidrofobnošću Zileutona. Zbog veće hidrofilnosti pozadinskog liganda, sa povećanjem njegove koncentracije on zauzima prostor bliže rastvaraču, dok se API ligand savija ka zlatu kako bi se smanjila dostupna hidrofobna površina. Slike simulacija (slike 4.12-13) su u skladu sa ovim zaključcima i jasno pokazuju da pozadinski ligand dominira na površini sa porastom njegove koncentracije.

Tabela 4.13. Maksimalna veličina nanočestice (MAXveličina), prosečna veličina nanočestica (AVG veličina), debljina monosloja (CT).

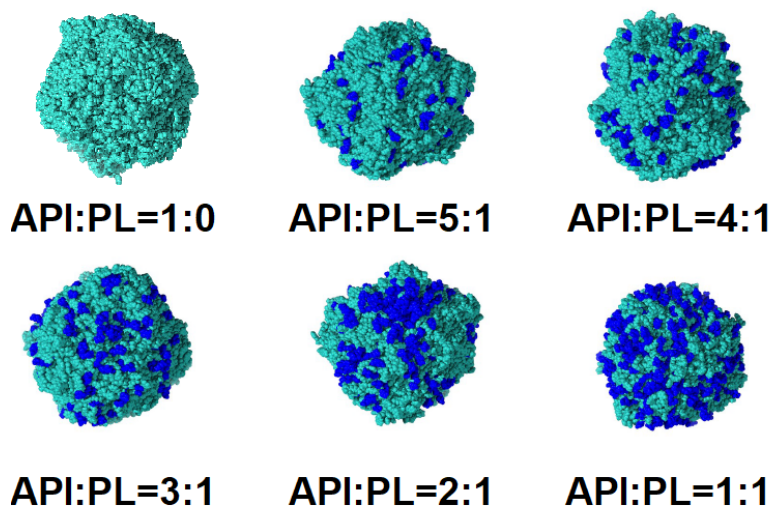
Sistem	MAXveličina [Å]	AVGveličina [Å]	CT [Å]
ZIL100	133,5	105,5	26,75
ZIL 51	132,5	106,5	27,25
ZIL 41	134,5	108,5	28,25
ZIL 31	140,5	107,5	27,75

ZIL 21	131,5	106,5	27,25
ZIL 11	135,5	104,5	26,25
ZIL 12	130,5	104,5	26,25
ZIL 13	127,5	100,5	24,25
ZIL 14	130,5	101,5	24,75
ZIL 15	129,5	100,5	24,25
PL100	114,5	97,5	22,75



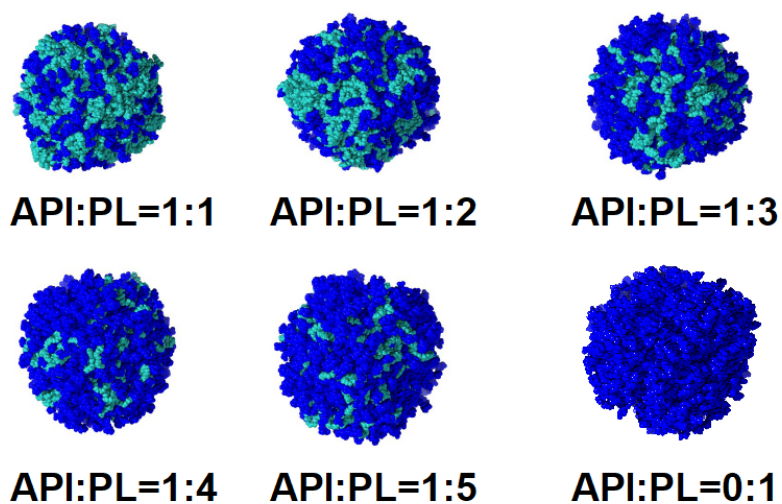
Slika 4.11. RDF grafici Zileuton sistema.

API ligand u višku



Slika 4.12. Slike simulacija Zileuton sistema gde je API ligand u višku. API ligand koji nosi Zileuton je tirkizne boje, dok je pozadinski ligand plave.

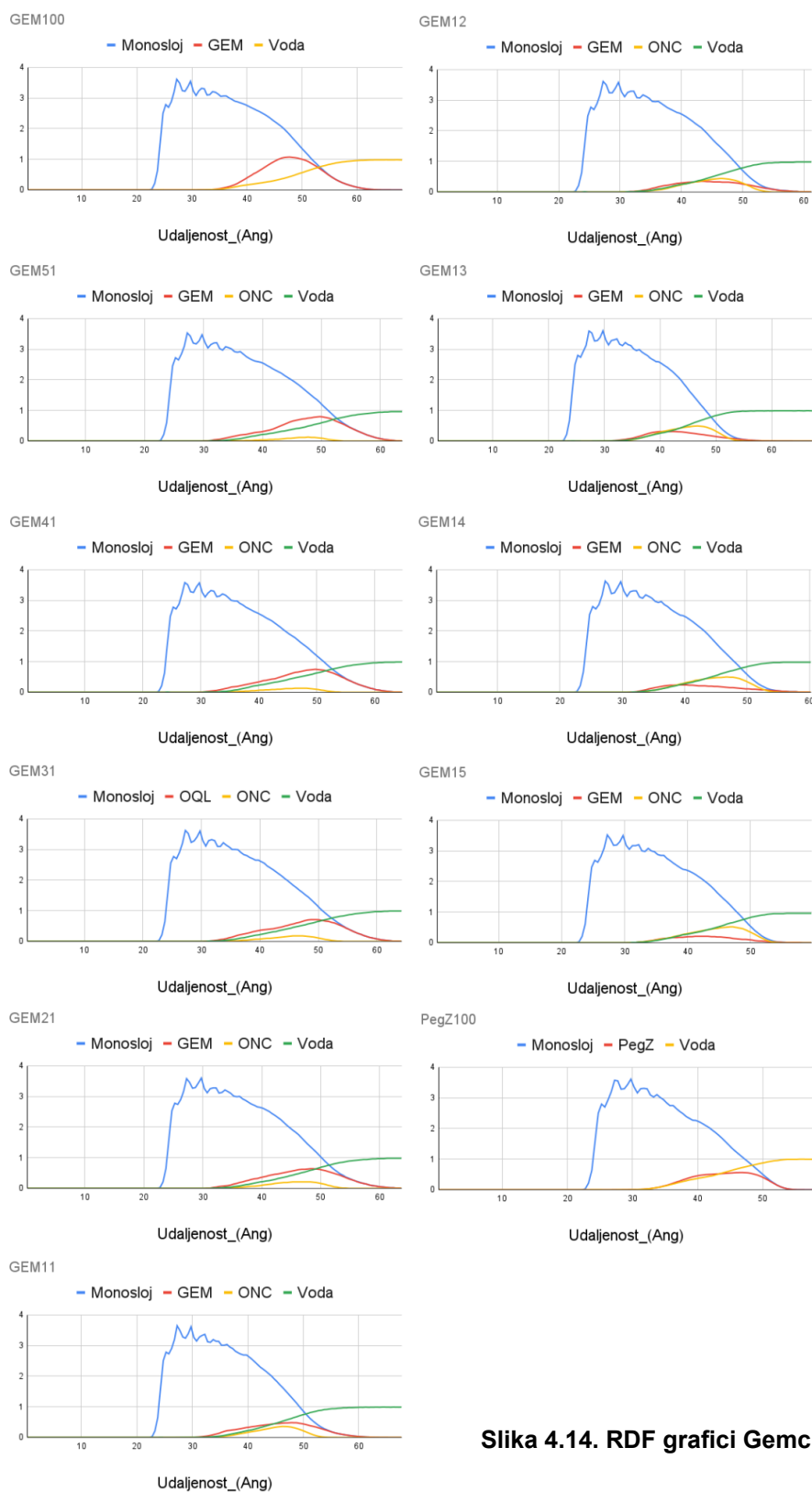
Pozadinski ligand u višku



Slika 4.13. Slike simulacija Zileuton sistema gde je pozadinski ligand u višku. API ligand koji nosi Zileuton je tirkizne boje, dok je pozadinski ligand plave.

Promena koncentracije pozadinskog liganda ne utiče značajno na veličinu funkcionalizovane nanočestice i debljinu monosloja. Manje razlike u veličini nanočestica između sistema primetne su tek pri velikim promenama koncentracije pozadinskog liganda.

Gemcitabin sistemi



Slika 4.14. RDF grafici Gemcitabin sistema.

Kao i u slučaju Zileuton sistema, na RDF graficima Gemcitabina (Slika 4.14) može se primetiti sužavanje pikova monosloja sa povećanjem koncentracije pozadinskog liganda. Takođe, pod istim uslovima (pri istim API:PL odnosima), prosečna gustina leka pomera se bliže zlatnom jezgru, dok se terminalni kraj pozadinskog liganda izdužuje ka rastvaraču. Gemcitabin spada u grupu hidrofilnijih antitumorskih lekova. To omogućava da pri većim koncentracijama API liganda u sistemu veći procenat leka (oko 55%) bude u kontaktu sa rastvaračem što se ogleda i u piku krive na RDF grafiku koja je pomerena bliže rastvaraču. Međutim, sa povećanjem koncentracije pozadinskog liganda, zbog njegove veće polarnosti API ligand se potiskuje ispod površine u kontaktu sa rastvaračem zbog čega se može primetiti pomeranje pika leka bliže površini nanočestice zlata. Činjenica da se fleksibilniji API ligand savija ka jezgru, a kraći PL izdužuje ka rastvaraču ogleda se u sužavanju pika monosloja.

Tabela 4.14. SASA i dostupnost leka za Gemcitabin sisteme.

Sistem	SASA (Å ²)	%
GEM100	107215	55
GEM 51	94131	55
GEM 41	92536	54
GEM 31	88868	53
GEM 21	80562	52
GEM 11	65312	46
GEM 12	46035	44
GEM 13	38136	38
GEM 14	31235	38
GEM 15	27041	35
PL100	84577	0

Tabela 4.15. Ukupna, kinetička i potencijalna energija [Mcal/mol] Panobinostat sistema

Sistem	Ukupna energija	Kinetička	Potencijalna
GEM100	-422,2	127,6	-549,8
GEM 51	-448,7	123,6	-572,3
GEM 41	-432,1	119,2	-551,3
GEM 31	-463,1	125,4	-588,5
GEM 21	-468,8	125,2	-593,9
GEM 11	-494,7	128,1	-622,8
GEM 12	-466,4	118,6	-585,1
GEM 13	-486,9	121,8	-608,7

GEM 14	-498,2	123,4	-621,6
GEM 15	-494,7	122,1	-616,9
PL100	-314,1	80,7	-394,7

U sistemima gde je API ligand u višku dostupnost leka je oko 55% (tabela 4.14). I ovo je trend koji je primećen kod simulacija homogenih sistema. Kao i kod Zileutona, dodavanje manjih koncentracija pozadinskog liganda dodatno stabilizuje sistem i ne utiče na dostupnost leka (ukupna energija se smanjuje sa -422,2 na 468,8 Mcal/mol, dok dostupnost leka ostaje oko 55%), dok dodavanje većih koncentracija nepovoljno utiče na dostupnost leka (dostupnost leka opada na 35%).

Iako se i veličina nanočestice i debljina monosloja smanjuju sa povećanjem koncentracije pozadinskog liganda, ove promene postaju značajne tek pri velikim promenama koncentracije, što se može videti iz tabele ispod (tabela 4.15).

Tabela 4.16. Maksimalna, prosečna veličina nanočestice i debljina monosloja za Gemcitabin sistem.

Sistem	MAXveličina [Å]	AVGveličina [Å]	CT [Å]
GEM100	136,5	108,5	25,25
GEM 51	136,5	112,5	30,25
GEM 41	136,5	113,5	30,75
GEM 31	136,5	112,5	30,25
GEM 21	138,5	110,5	29,25
GEM 11	134,5	107,5	27,75
GEM 12	136,5	104,5	26,25
GEM 13	133,5	102,5	25,25
GEM 14	135,5	102,5	25,25
GEM 15	134,5	101,5	24,75
PL100	114,5	97,5	22,75

Zaključak eksperimenta

I kod hidrofilnih i kod hidrofobnih sistema, uvođenje manjih koncentracija pozadinskog liganda dovodi do stabilizacije sistema i nema značajnog uticaja na dostupnost leka. Takođe, u oba slučaja je primećeno da su razlike u veličini nanočestice i debljini monosloja neznatne, a da dostupnost leka varira oko vrednosti dobijenih za homogene sisteme. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da manje koncentracije pozadinskog liganda povoljno utiču na stabilizaciju

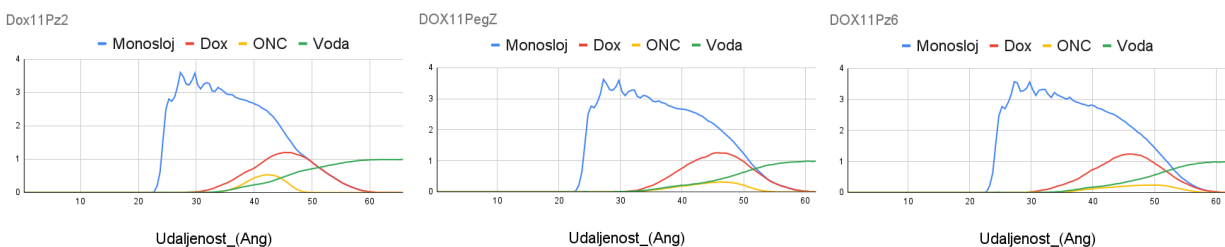
sistema, a da interakcije između API i PL ne doprinose značajno promeni strukture. (Odstupanje od homogenih sistema je minimalno).

U slučaju kada je pozadinski ligand u višku, dostupnost leka naglo opada i sistem se destabilizuje što ukazuje na to da treba paziti na ravnotežu između API i pozadinskih liganada kako bi se povećala i/ili očuvala efikasnost sistema.

4.1.4. Ispitivanje uticaja dužine pozadinskog liganda na strukturu nanočestica

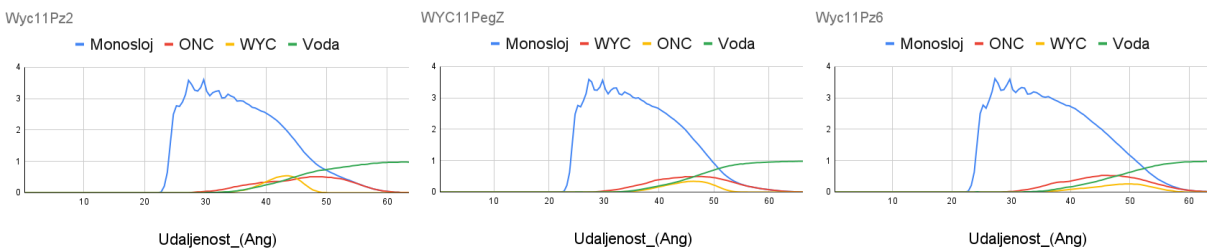
Nakon uticaja koncentracije, ispitivan je uticaj dužine pozadinskog liganda na strukturu monosloja u vodenoj sredini. Za ovu grupu eksperimenata modelovane su nanočestice koje nose lekove različitih fizičko-hemijskih karakteristika u kombinaciji sa pozadinskim ligandima različitih dužina.

Lekovi koji su modelovani u ovoj grupisimulacija su Wyc-215 - **WYC**, Zorak - **ZOR**, Zileuton - **ZIL** i Doksorubicin - **DOX**. Svaki API ligand koji nosi lek simuliran je u kombinaciji sa tri pozadinska liganda različitih dužina - **Pz2**, **PegZ** i **Pz6**. Strukture liganada date su u sekciji 3.3.5. u tabeli 3.19.



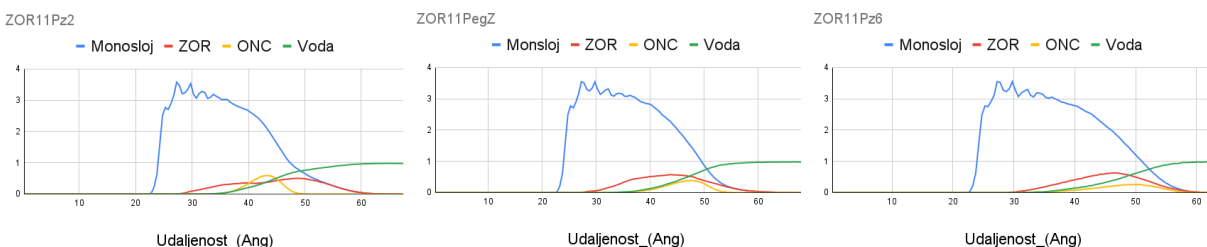
Slika 4.15. RDF grafici Doksorubicin sistema sa pozadinskim ligandima različite dužine. Dužina liganada rasta s leva na desno.

Sa RDF grafika (Slike 4.15-18) može se primetiti da je u slučaju najkraćeg pozadinskog liganda (Pz2) pik leka za većinu sistema pomeren bliže rastvaraču nego pik terminalnog kraja pozadinskog liganda Pz2. Jedini izuzetak je Zileuton sistem. S obzirom na to da je Pz2 značajno kraći od API liganada, prvi slučaj je očekivan. S obzirom na širinu pika leka jasno je da se API ligand koji ga nosi savija ka površini zlata izlažući pritom hidrofilniji deo liganda rastvaraču. Zileuton se čini najhidrofobnijim od svih sistema. U prilog toj činjenici idu i vrednosti dostupnosti leka u kombinaciji sa svakim pozadinskim ligandom koje su najmanje u poređenju sa ostalim ispitivanim API ligandima (tabela 4.17)

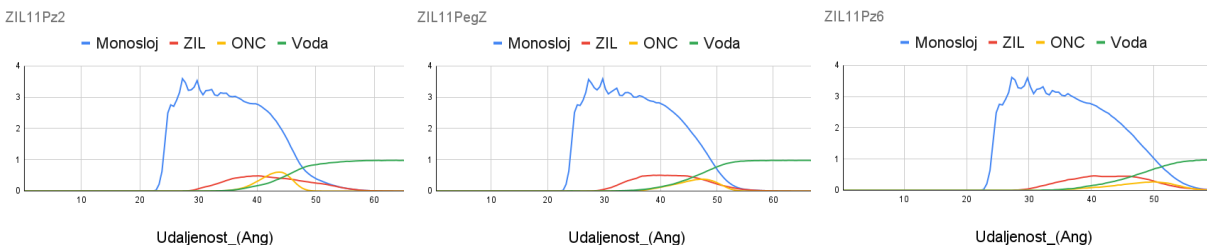


Slika 4.16. RDF grafici WYC sistema sa pozadinskim ligandima različite dužine. Dužina liganada rasta s leva na desno.

Sa povećanjem dužine pozadinskog liganda, pikovi leka pomeraju se bliže zlatu, dok se pikovi terminalnih krajeva liganada pomeraju ka rastvaraču. S obzirom na to da je u svakom ispitivanom sistemu API ligand hidrofobniji od pozadinskog liganada, moguće objašnjenje za ovakvo ponašanje je, kao i ranije, tendencija leka da se sakrije od rastvarača. Za razliku od najkraćeg PL, druga dva ispitivana pozadinska liganda su dovoljno dugačka da se rasporede na površini u kontaktu sa rastvaračem.



Slika 4.17. RDF grafici Zorak sistema sa pozadinskim ligandima različite dužine. Dužina liganada raste s leva na desno.



Slika 4.18. RDF grafici Zileuton sistema sa pozadinskim ligandima različite dužine. Dužina liganada raste s leva na desno.

Na osnovu vrednosti prikazanih u tabeli 4.17 može se uočiti jasan trend gde se sa povećanjem dužine liganda smanjuje dostupnost leka, ali i raste nestabilnost celog sistema (tabela 4.18). Dostupnost leka kod Doksorubicin nanosistema opada sa 58 na 47%, kod Wyc Nanosistema sa 49 na 39%, kod Zorak nanosistema sa 41 na 30%, i konačno kod Zileuton sistema sa 30 na 23%. S druge strane, ukupna energija kod svih sistema raste sa povećanjem dužine pozadinskog liganda: kod Doksorubicin nanosistema raste sa -415,5 na 369,8 Mcal/mol,

kod Wyc Nanosistema sa 632,7 na 599,5 Mcal/mol, kod Zorak nanosistema sa -594,5 na 564,4 Mcal/mol, i konačno kod Zileuton sistema sa -502,7 na -465,3 Mcal/mol.

Tabela 4.17. SASA i dostupnost leka ispitivanih sistema.

Sistem	SASA (Å ²)	%
DOX11Pz2	83423	58
DOX11PegZ	87980	52
DOX11Pz6	89377	47
WYC11Pz2	60589	49
WYC11PegZ	65704	44
WYC11Pz6	68030	39
ZOR11Pz2	56780	41
ZOR11PegZ	62486	34
ZOR11Pz6	65445	30
ZIL11Pz2	59695	30
ZIL11PegZ	65407	23
ZIL11Pz6	65417	23

Tabela 4.18. Ukupna, kinetička i potencijalna energija [Mcal/mol] ispitivanih sistema.

Sistem	Ukupna energija	Kinetička	Potencijalna
DOX11Pz2	-415,5	117,7	-533,2
DOX11PegZ	-398,1	117,3	-515,4
DOX11Pz6	-369,8	114,3	-484,1
WYC11Pz2	-632,7	163,2	-795,9
WYC11PegZ	-609,3	161,4	-770,7
WYC11Pz6	-599,5	162,9	-762,5
ZOR11Pz2	-594,5	157,6	-752,1
ZOR11PegZ	-574,2	155,1	-723,9
ZOR11Pz6	-564,4	157,9	-722,4
ZIL11Pz2	-502,7	131,4	-634,1
ZIL11PegZ	-487,4	131,4	-618,9
ZIL11Pz6	-465,3	129,9	-595,2

Ono što je neočekivan rezultat je da se sa povećanjem dužine pozadinskog liganda veličina ukupne nanočestice i debljina monosloja ne menjaju značajno (tabela 4.19). Ako se pogleda prosečna veličina nanočestice, vidi se da su razlike između sistema minimalne. Polarni pozadinski ligand uvek ima tendenciju da se pruža ka rastvaraču. Međutim, u slučaju kada je PL značajno kraći od API liganda, moguće je da je dovoljno daleko tako da ta tendencija nema priliku da se izrazi u istoj meri kao i kod dužih pozadinskih liganada. S obzirom na to da oni onda zauzimaju prostor bliže površini zlata, moguće je da rezultujuća sila dovodi do smanjenja potencijalne energije, pa se API ligandi pružaju ka rastvaraču u većoj meri. Kada su pozadinski ligandi dovoljno dugi, oni potiskuju API ligand ispod površine. Tako da, iako dolazi do promene u dinamici interakcija između ova dva tipa liganada, makroskopski rezultat (veličina nanočestice i debljina monosloja) ostaje nepromenjen.

Tabela 4.19. Maksimalna veličina nanočestice (MAXveličina), prosečna veličina nanočestica (AVG veličina), debljina monosloja (CT) ispitivanih sistema.

Sistem	MAXveličina [Å]	AVGveličina [Å]	CT [Å]
DOX11Pz2	130,5	105,5	26,75
DOX11PegZ	132,5	104,5	26,25
DOX11Pz6	131,5	106,5	27,25
WYC11Pz2	137,5	105,5	26,75
WYC11PegZ	138,5	104,5	26,25
WYC11Pz6	138,5	106,5	27,25
ZOR11Pz2	133,5	104,5	26,25
ZOR11PegZ	140,5	102,5	25,25
ZOR11Pz6	136,5	103,5	25,75
ZIL11Pz2	127,5	98,5	23,25
ZIL11PegZ	132,5	99,5	23,75
ZIL11Pz6	132,5	103,5	25,75

Tabela 4.20. RF/D čija vrednost opisuje zauzetu konformaciju, Rs-n - teorijska debljina monosloja, D - Udaljenost između dve tačke vezivanja liganada na površinu, RF - Florijev radijus, CT - izračunata debljina monosloja, izračunata i predviđena veličina nanočestice [nm].

11 Pz2	RF/D	Rs-n [nm]	D	RF	CT [nm]	Izračunata veličina	Predviđena veličina
WYC	0,63	3,74	3,97	2,52	2,67	10,55	10,90
ZIL	0,54	4,09	3,97	2,15	2,32	9,85	10,10
ZOR	0,53	4,25	3,97	2,10	2,62	10,45	10,70
DOX	0,50	4,51	4,37	2,20	2,67	10,55	10,90

Kod heterogenih sistema sa kratkim pozadinskim ligandom Pz2 odnos R_f/D je najmanji (Tabela 4.20). To ukazuje da svi ispitivani nanosistemi zauzimaju konformaciju nasumičnog klupka. Ovo je takođe u skladu sa prethodno opisanom mobilnošću ispitivanih liganada. Kao i kod homogenih liganada, i ovde su upoređene vrednosti prosečne veličine nanočestice dobijene preko simulacija i preko dobijenih vrednosti Florijevog radijusa. Za sve sisteme, slaganje ovih vrednosti je dobro.

Tabela 4.21. R_f/D čija vrednost opisuje zauzetu konformaciju, R_s-n - teorijska debljina monosloja, D - Udaljenost između dve tačke vezivanja liganada na površinu, R_f - Florijev radijus, CT - izračunata debljina monosloja, izračunata i predviđena veličina nanočestice [nm].

11 PegZ	R_f/D	R_s-n [nm]	D	R_f	CT [nm]	Izračunata veličina	Predviđena veličina
WYC	0,67	3,29	3,70	2,48	2,63	10,45	10,46
ZIL	0,62	3,64	3,70	2,30	2,38	9,95	10,10
ZOR	0,61	3,80	3,70	2,25	2,53	10,25	10,00
DOX	0,58	4,06	4,05	2,35	2,63	10,45	10,76

Podaci prikazani u tabelama 4.20-22. ukazuju na to da se sa povećanjem dužine pozadinskog liganda, konformacija monosloja ispitivanih sistema postepeno približava optimalnoj konformaciji između četke i nasumičnog klupka. Na primer, R_f/D za Doksorubicin sistem raste sa 0,50 na 0,64, za Zileuton sistem sa 0,54 na 0,71, itd. Međutim, iako trend postoji, promene koje se javljaju sa produžavanjem PL su minimalne, a zauzeta konformacija je u svim slučajevima i dalje konformacija nasumičnog klupka.

Tabela 4.22. R_f/D čija vrednost opisuje zauzetu konformaciju, R_s-n - teorijska debljina monosloja, D - Udaljenost između dve tačke vezivanja liganada na površinu, R_f - Florijev radijus, CT - izračunata debljina monosloja, izračunata i predviđena veličina nanočestice [nm].

11 Pz6	R_f/D	R_s-n [nm]	D	R_f	CT [nm]	Izračunata veličina	Predviđena veličina
WYC	0,76	3,36	3,40	2,58	2,70	10,65	10,66
ZIL	0,71	3,64	3,40	2,40	2,60	10,35	10,30
ZOR	0,69	3,87	3,40	2,35	2,60	10,35	10,20
DOX	0,64	4,12	3,80	2,45	2,70	10,65	10,40

Zaključak eksperimenta

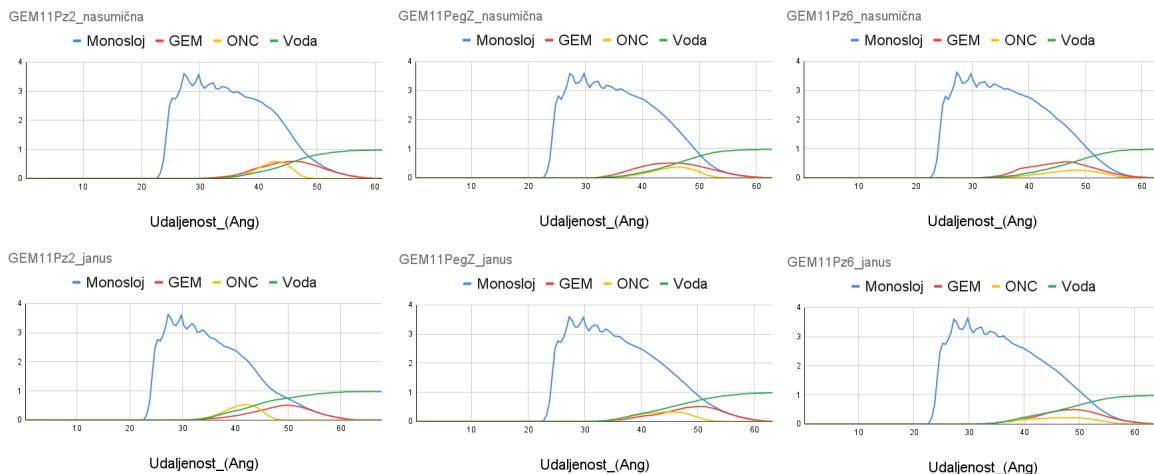
Sistemi sa kraćim ligandima su se pokazali kao najoptimalniji. Dostupnost leka je najveća i ti sistemi su najstabilniji. Sa povećanjem dužine pozadinskog liganda, dostupnost leka opada. To se može objasniti većim afinitetom pozadinskog liganda ka rastvaraču što dovodi do toga da se taj tip liganda izdužuje ka njemu i potiskuje API ligande ispod površine. To takođe objašnjava i destabilizaciju sistema. Iako se sa produžavanjem pozadinskog liganda konformacija monosloja približava optimalnoj, to se ne dešava u dovoljnoj meri. Tako da uprkos ovom trendu, opšti zaključak je prednost korišćenja kratkih pozadinskih ligandada.

4.1.5. Ispitivanje uticaja različitih konfiguracija monosloja na strukturu funkcionalizovanih nanočestica

U prethodnim sekcijama opisani su eksperimenti čiji cilj je bio ispitivanje uticaja promene kompozicije sistema na strukturu funkcionalizovanih nanočestica u rastvoru. S obzirom na to, sledeća grupa simulacija je osmišljena sa ciljem da se ispita uticaj različitih početnih konfiguracija monosloja, dok se kompozicija sistema drži konstantnom. Kao što je pomenuto u uvodu, monosloj nanočestica može zauzeti veliki broj različitih konfiguracija. Ispitati svaku bi bilo previše računarski i vremenski zahtevno. Zbog toga su ovde odabrane dva ekstrema - najneuređenija (nasumična) i najuređenija (janus) konfiguracija.

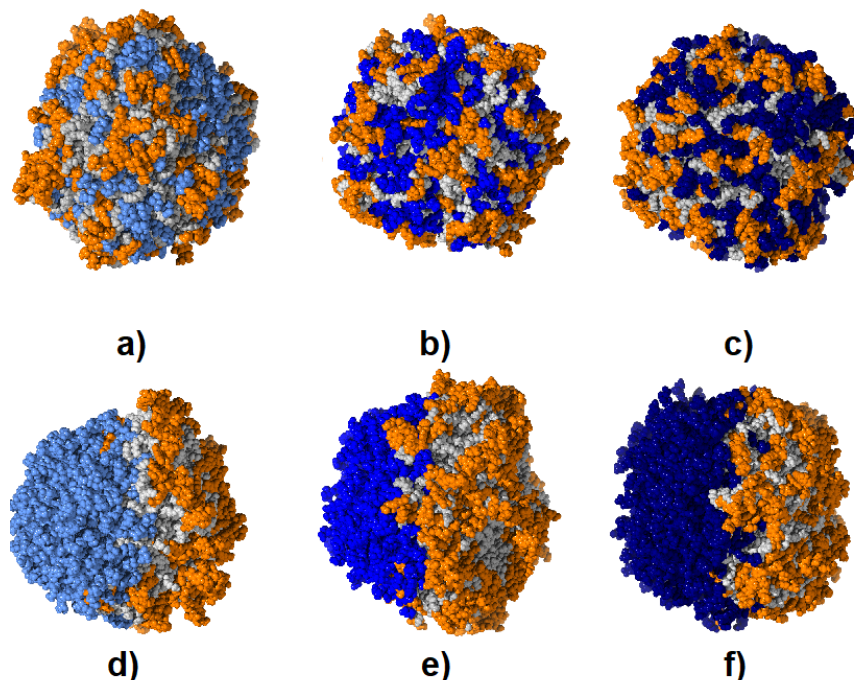
U ovoj grupi sistema modelovane su nanočestice funkcionalizovane API ligandima koji nose hidrofilan (Gemcitabin) ili hidrofoban lek (Kvinolinol) i pozadinskim ligandom u odnosu 1:1. Strukture ligandada prikazane su u sekciji 3.3.6. u tabeli 3.20.

Gemcitabin sistemi



Slika 4.19. RDF grafici Gemcitabin sistema.

Na RDF graficima sistema sa Gemcitabinom (slika 4.19) može se uočiti da su pikovi nanočestica sa monoslojem u nasumičnoj konfiguraciji uvek širi od svog janus para. To ukazuje da pod ovim uslovima fleksibilnost API liganada više dolazi do izražaja. Veće vrednosti kinetičke energije u odnosu na janus sisteme idu u prilog tome. Takođe, kod kraćih liganada (Pz2 i PegZ) prosečna gustina terminalnog kraja pozadinskog liganda je na oko 45-47 Å. S obzirom na to da zbog svoje dužine ne mogu dovoljno da se približe rastvaraču, API ligandi su primorani da budu na površini. Ovakva dinamika nepovoljno utiče i na dostupnost leka i na stabilnost sistema (tabele 4.23-24).



Slika 4.20. Slike simulacija Gemcitabin sistema. Nasumična konfiguracija nanočestice funkcionalizovane a) Gemcitabinom i kratkim ligandom (Pz2), b) Gemcitabinom i srednjim ligandom (PegZ), c) Gemcitabinom i dugačkim ligandom (Pz6). Janus konfiguracija nanočestice funkcionalizovana d) Gemcitabinom i kratkim ligandom (Pz2), e) Gemcitabinom i srednjim ligandom (PegZ), f) Gemcitabinom i dugačkim ligandom (Pz6).

Tabela 4.23. SASA i dostupnost leka za Gemcitabin sisteme. "R" označava nasumičnu konfiguraciju, dok "J" označava janus konfiguraciju.

Sistem	SASA (Å ²)	%
GEM11Pz2 R	63556	49
GEM11Pz2J	54593	55
GEM11PegZ R	66635	44
GEM11PegZ J	56553	53
GEM11Pz6 R	68482	41
GEM11Pz6 J	54863	52

Tabela 4.23. pokazuje vrednosti dostupnosti leka za Gemcitabin sisteme. Može se primetiti da je ona uvek veća u janus konfiguraciji, a da je najviše izražena u kombinaciji sa kratkim ligandom gde je dostupnost leka u janus konfiguraciji 55%, a u nasumičnoj 49%.. Ova struktura je takođe i najstabilnija od svih ispitivanih sistema u ovoj grupi simulacija (tabela 4.24).

Tabela 4.24. Ukupna, kinetička i potencijalna energija [Mcal/mol] Gemcitabin sistema. "R" označava nasumičnu konfiguraciju, dok "J" označava janus konfiguraciju.

Sistem	Ukupna energija	Kinetička	Potencijalna
GEM11Pz2 R	-478,9	128,1	-606,9
GEM11Pz2J	-494,6	131,8	-626,4
GEM11PegZ R	-486,7	133,7	-620,4
GEM11PegZ J	-437,5	121,8	-559,3
GEM11Pz6 R	-458,2	130,6	-588,8
GEM11Pz6 J	-436,6	125,4	-561,9

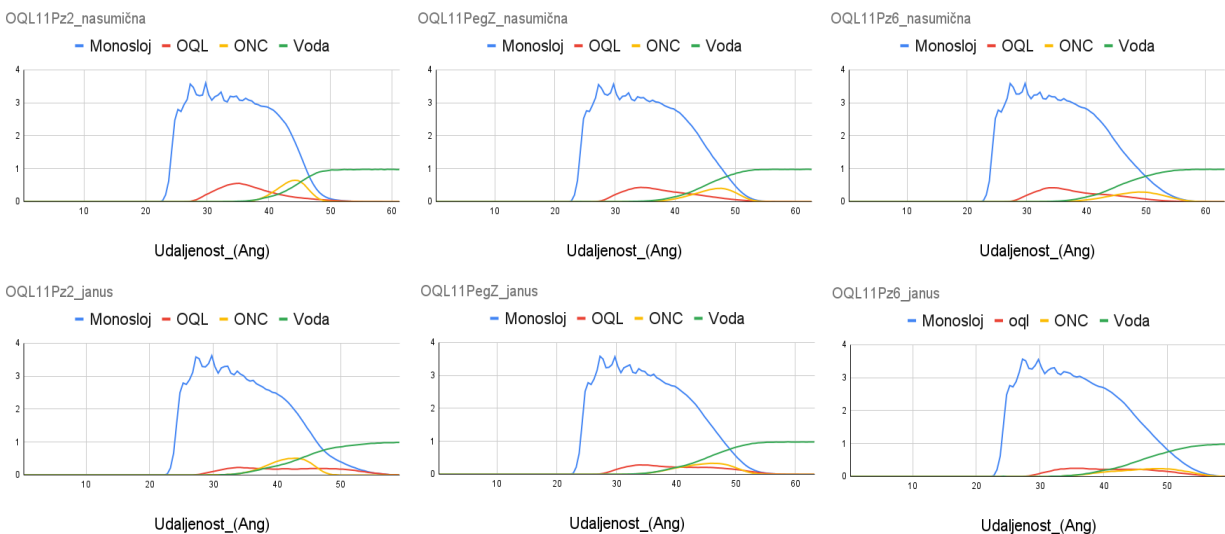
Tabela 4.25. Maksimalna i prosečna veličina nanočestica i debljina monosloja za Gemcitabin sisteme. "R" označava nasumičnu konfiguraciju, dok "J" označava janus konfiguraciju.

Sistem	MAXveličina [Å]	AVGveličina [Å]	CT [Å]
GEM11Pz2 R	134,5	105,5	26,75
GEM11Pz2J	134,5	112,5	30,25
GEM11PegZ R	137	107,5	27,75
GEM11PegZ J	136,5	111,5	29,75
GEM11Pz6 R	135,5	108,5	28,25
GEM11Pz6 J	137,5	111,5	29,75

Veličina nanočestice i debljina monosloja veće su u janus konfiguraciji (tabela 4.25). S obzirom na to da su dva tipa liganda prostorno relativno daleko, uticaj polarnosti pozadinskog liganda na strukturu API liganda nije toliko izražen koliko u nasumičnoj konfiguraciji. Kada se ova dva tipa liganda nađu u neposrednoj blizini, osobine pozadinskog liganda pokazuju veći uticaj. Kao što je ranije opisano, zbog većeg afiniteta ka rastvaraču, PL u nekoj meri potiskuje API ligand unutar monosloja i utiče na njegovo savijanje ka površini zlata. U prilog objašnjenju ide i činjenica da je dostupnost leka u janus konfiguraciji oko 55%, isto koliko i kod homogenih sistema, dok u nasumičnoj konfiguraciji dostupnost leka opada (tabela 4.23).

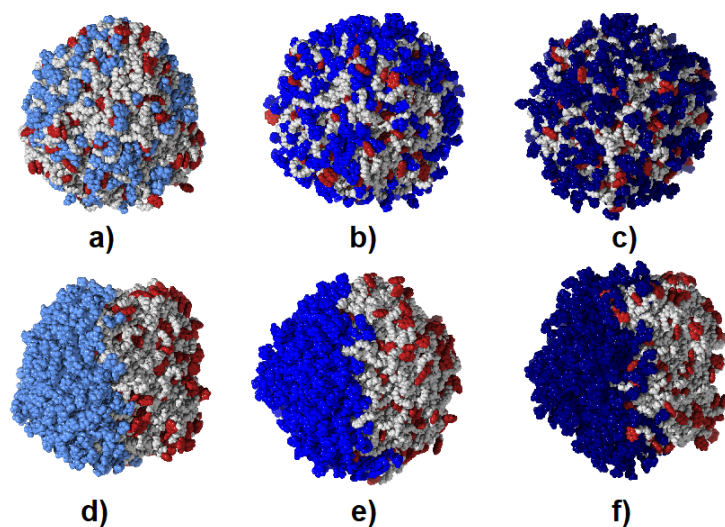
Dodatno, hidrofilna priroda Gemcitabina olakšava da se on nađe blizu površine u kontaktu sa rastvaračem.

Kvinolinol sistemi



Slika 4.21. RDF grafici Kvinolinol sistema.

Kod Kvinolinol sistema situacija je nešto drugačija. Sa RDF grafika (slika 4.21) odmah se može primetiti da je prosečna gustina Kvinolinola pomerena više ka jezgru zlatne nanočestice u odnosu na Gemcitabin sisteme, dok je terminalni kraj pozadinskog liganda pomerena ka površini u kontaktu sa rastvaračem, čak i u slučaju najkraćeg liganda. Pik krive za Kvinolinol se nalazi na ~35 Å od centralnog atoma zlata, dok je u slučaju Gemcitabina između 47-50 Å (slika 4.19). Takođe se može videti da je pik Kvinolinola u janus konfiguraciji nizak i razvučen, i daleko od rastvarača što upućuje na ekstremno savijanje API liganda.



Slika 4.22. Slike simulacija Kvinolinol sistema. Nasumična konfiguracija nanočestice funkcionalizovana a) Kvinolinolom i kratkim ligandom (Pz2), b) Kvinolinolom i srednjim ligandom (PegZ),

c) Kvinolinolom i dugačkim ligandom (Pz6). Janus konfiguracija nanočestice funkcionalizovana d) Kvinolinolom i kratkim ligandom (Pz2), e) Kvinolinolom i srednjim ligandom (PegZ), f) Kvinolinolom i dugačkim ligandom (Pz6).

Tabela 4.26. SASA i dostupnost leka Kvinolinol sistema. "R" označava nasumičnu konfiguraciju, dok "J" označava janus konfiguraciju.

Sistem	SASA (Å ²)	%
OQL11Pz2 R	48866	15
OQL11Pz2J	43045	26
OQL11PegZ R	49185	14
OQL11PegZ J	45256	22
OQL11Pz6 R	50945	14
OQL11Pz6 J	45266	23

Dostupnost Kvinolinola je relativno niska u svim ispitanim sistemima (tabela 4.26). U navedenoj tabeli može se uočiti da je dostupnost leka u nasumičnoj konfiguraciji približno 15%, dok je u janus konfiguraciji nešto viša, ali ne prelazi 26%. Iako je dostupnost veća u janus konfiguraciji, ovi sistemi su nestabilniji od svog para u nasumičnoj konfiguraciji (tabela 4.27).

Tabela 4.27. Ukupna, kinetička i potencijalna energija [Mcal/mol] Kvinolinol sistema. "R" označava nasumičnu konfiguraciju, dok "J" označava janus konfiguraciju.

Sistem	Ukupna energija	Kinetička	Potencijalna
OQL11Pz2 R	-460,7	110,5	-521,9
OQL11Pz2J	-411,3	110,5	-521,9
OQL11PegZ R	-436,7	121,8	-558,4
OQL11PegZ J	-412,5	115,9	-528,4
OQL11Pz6 R	-413,9	123,7	-584,4
OQL11Pz6 J	-421,9	122,1	-543,9

Tabela 4.28. Maksimalna i prosečna veličina nanočestica i debljina monosloja za Kvinolinol sisteme. "R" označava nasumičnu konfiguraciju, dok "J" označava janus konfiguraciju.

Sistem	MAXveličina [Å]	AVGveličina [Å]	CT [Å]
OQL11Pz2 R	121,5	94,5	21,25
OQL11Pz2J	126,5	102,5	25,25
OQL11PegZ R	124,5	100,5	24,25
OQL11PegZ J	125,5	101,5	24,75

OQL11Pz6 R	125,5	105,5	26,75
OQL11Pz6 J	127,5	105,5	26,75

U većini sistema veličina nanočestice se ne menja u velikoj meri (tabela 4.28). Izuzetak je sistem sa najkraćim ligandom u nasumičnoj konfiguraciji. S obzirom na to da je RDF (slika 4.21) pokazao da je prosečna gustina terminalnog kraja u ovom sistemu bliža rastvaraču od prosečne gustine leka, API ligand se verovatno savija u najvećoj meri kako bi se "sakrio" od rastvarača ispod pozadinskog liganda što kao posledicu ima i smanjenje veličine nanočestice.

Zaključak eksperimenta

Iako je dostupnost leka uvek veća u janus konfiguraciji, osobine leka imaju naznačajniji uticaj na konačnu stabilnost funkcionalizovane nanočestice u rastvoru. API ligandi koji nose hidrofilne lekove mogu da zauzmu "slobodniju" konformaciju i da izlože svoj terminalni kraj rastvaraču, dok to nije slučaj za hidrofobne lekove. Njihova tendencija da smanje izloženu hidrofobnu površinu utiče na savijanje liganada i destabilizaciju cele strukture.

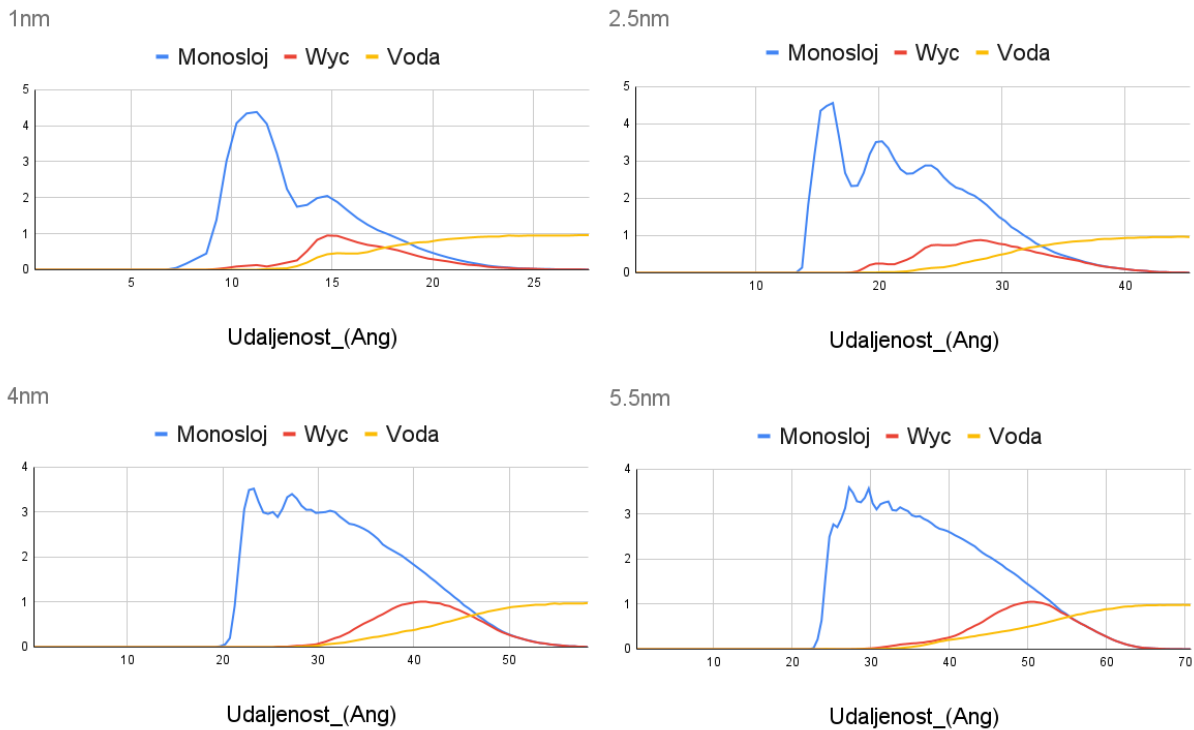
4.1.6. Ispitivanje uticaja veličine jezgra od zlata na strukturu funkcionalizovanih nanočestica

Promenom prečnika sferne nanočestice zlata menja se zakrivljenost i ukupna površina nanočestice. To znači da se menja i moguć broj liganada koji se mogu koristiti za funkcionalizaciju, ali i uglovi koje oni mogu zauzeti jedni prema drugima što može uticati na interakcije između liganada. Da bismo ispitali koliko to utiče na strukturu, modelovane su nanočestice različitih veličina (prečnika) funkcionalizovane homogenim i heterogenim monoslojem.

Homogeni sistemi su modelovani sa API ligandima koji nose WYC i simulirani su sa zlatnim jezgrima od 1 nm, 2,5 nm, 4 nm i 5,5 nm.

Heterogeni sistemi su modelovani sa fluorescentnim ligandima i simulirani su sa zlatnim jezgrima od 2,5 nm i 5,5 nm. Kao posledica velikog broja atoma u ovim sistemima, računarski resursi potrebni za njihove simulacije bi bili preveliki. Zbog toga je modelovan manji broj sistema nego u slučaju homogenih nanočestica.

Homogeni sistemi - WYC



Slika 4.23. RDF grafici WYC sistema sa različitim veličinama jezgra od zlata.

RDF grafici monosloja (slika 4.23) sa jezgrima od 1 i 2 nm ukazuju na dinamičnost API liganada. Nepravilan oblik sa više pikova ukazuje na to da su oni stalno u pokretu i da ne zauzimaju stabilnu konformaciju. U prilog tome idu i vrednosti ukupne energije sistema koje ukazuju na to da su ovi sistemi nestabilniji od zlatnih nanočestica većeg prečnika.

S druge strane, na RDF graficima monosloja sa jezgrima većim od 2 nm može se primetiti pravilniji oblik krive leka što ukazuje na stabilniju konformaciju.

Tabela 4.29. SASA i dostupnost leka WYC sistema.

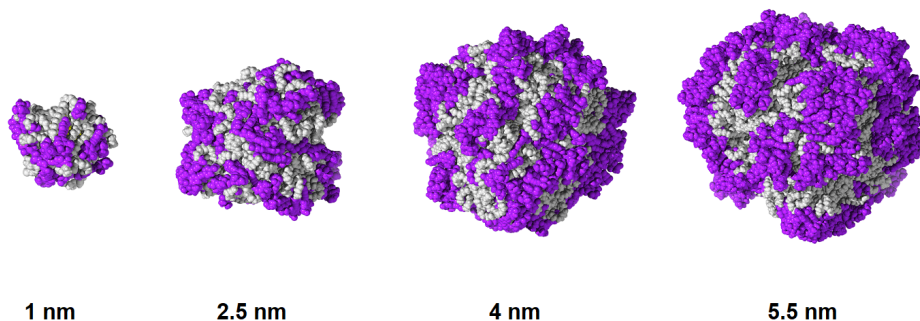
Veličina jezgra	SASA (Å ²)	%
1 nm	6168	53
2.5 nm	29934	49
4 nm	67193	53
5.5nm	99024	56

Rezultati analize površine dostupne rastvaraču (tabela 4.29) pokazuju da se ona povećava srazmerno povećanju jezgra, a samim tim i veličine cele funkcionalizovane nanočestice, dok je dostupnost leka prilično slična u svim sistemima, i iznosi ~50-55%.

Tabela 4.30. Ukupna, kinetička i potencijalna energija [Mcal/mol] ispitivanih sistema.

Veličina jezgra	Ukupna energija	Kinetička	Potencijalna
1 nm	-358,3	89,8	-448,1
2.5 nm	-422,2	110,2	-532,2
4 nm	-483,9	128,1	-612,1
5.5nm	-560,7	157,1	-717,8

Analiza ukupne energije pokazuje da stabilnost sistema raste sa povećanjem prečnika jezgra od zlata (Tabela 4.30).



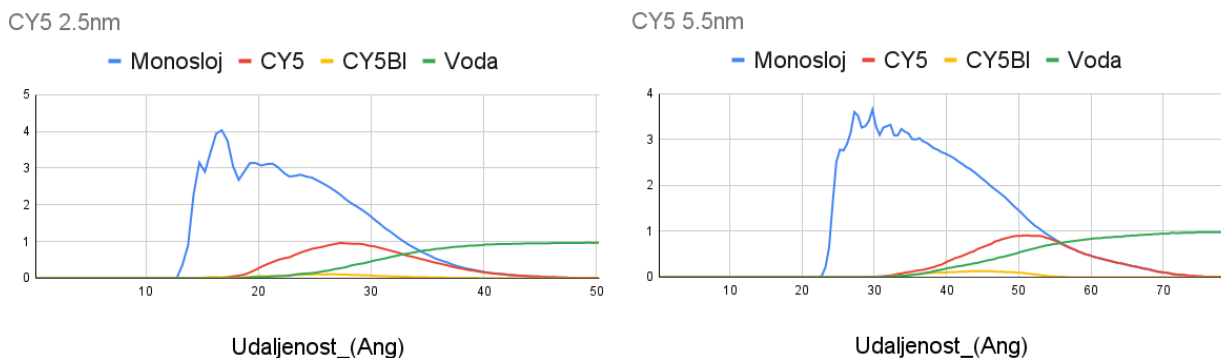
Slika 4.24. Slike simulacija WYC sistema sa različitim veličinama jezgra od zlata.

Tabela 4.31. Maksimalna veličina nanočestice (MAXveličina), prosečna veličina nanočestica (AVG veličina), debljina monosloja (CT) ispitivanih sistema.

Veličina jezgra	MAXveličina [Å]	AVGveličina [Å]	CT [Å]
1 nm	61,5	41,5	15,75
2.5 nm	105,5	70,5	22,75
4 nm	122,5	95,5	27,75
5.5nm	138,5	113,5	30,75

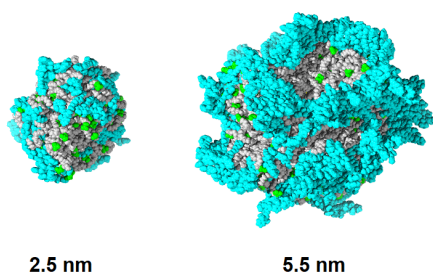
Veličina funkcionalizovane nanočestice i debljina monosloja povećavaju se srazmerno povećanju prečnika jezgra od zlata (Tabela 4.31).

Heterogeni sistemi - CY5



Slika 4.25. RDF grafici CY5 sistema sa različitim veličinama jezgra od zlata.

Na RDF graficima heterogenih sistema (slika 4.25) može se videti da pik monosloja postaje pravilniji, dok se pik leka pomera desno bliže površini u kontaktu sa rastvaračem. Pozadinski ligand je u slučaju fluorescentnih nanočestica potisnut dublje u monosloj, ali je ovaj efekat manje izražen kod većeg jezgra zlatne nanočestice. Moguće objašnjenje za ovakvo ponašanje može biti voluminoznost terminalnog kraja i dužina fluorescentnog API liganda. Sa smanjenjem prečnika zlatnog jezgra značajno se smanjuje dostupna površina same nanočestice. Pretpostavka je da uprkos većoj polarnosti pozadinskog liganda, zbog veće dužine i voluminoznosti API liganda nema dovoljno prostora blizu površine za njihovo raspoređivanje zbog čega se pozadinski ligandi raspoređuju bliže jezgru, a API ligandi bliže rastvaraču. Taj efekat se smanjuje sa jezgrom većeg prečnika jer u tom slučaju veća je i površina same zlatne nanočestice.



Slika 4.26. Slike simulacija CY5 sistema sa različitim veličinama jezgra od zlata.

Tabela 4.32. SASA i dostupnost terminalnog kraja CY5 sistema.

Veličina jezgra	SASA (Å ²)	%
2.5 nm	35615	52
5.5 nm	120721	64

U slučaju heterogenih sistema, dostupnost leka (tabela 4.32) raste značajnije sa povećanjem prečnika jezgra od zlata, za razliku od homogenih sistema gde je uticaj promene veličine bio zanemarljiv.

Tabela 4.33. Maksimalna veličina nanočestice (MAXveličina), prosečna veličina nanočestica (AVG veličina), debljina monosloja (CT) ispitivanih sistema.

Veličina jezgra	MAXveličina [Å]	AVGveličina [Å]	CT [Å]
2.5 nm	119,5	74,5	24,25
5.5 nm	169,5	123,5	35,75

Tabela 4.34. Ukupna, kinetička i potencijalna energija [Mcal/mol] ispitivanih sistema.

Veličina jezgra	Ukupna energija	Kinetička	Potencijalna
2.5 nm	-633,6	166,1	-799,7
5.5 nm	-831,6	224,5	-105,6

Stabilnost sistema takođe raste sa povećanjem veličine jezgra od zlata (tabela 4.34).

Zaključak eksperimenta

U slučaju homogeno funkcionalizovanih zlatnih nanočestica, promene veličine jezgra u ispitivanom opsegu nemaju značajan uticaj na dostupnost leka, ali sa druge strane povećava se stabilnost sistema.

Kod heterogenih sistema, povećavaju se i dostupnost i stabilnost.

Zaključak je da kod malih funkcionalizovanih nanočestica (do ~15 nm) najoptimalnije je koristiti veće prečnike jezgra od zlata za funkcionalizaciju.

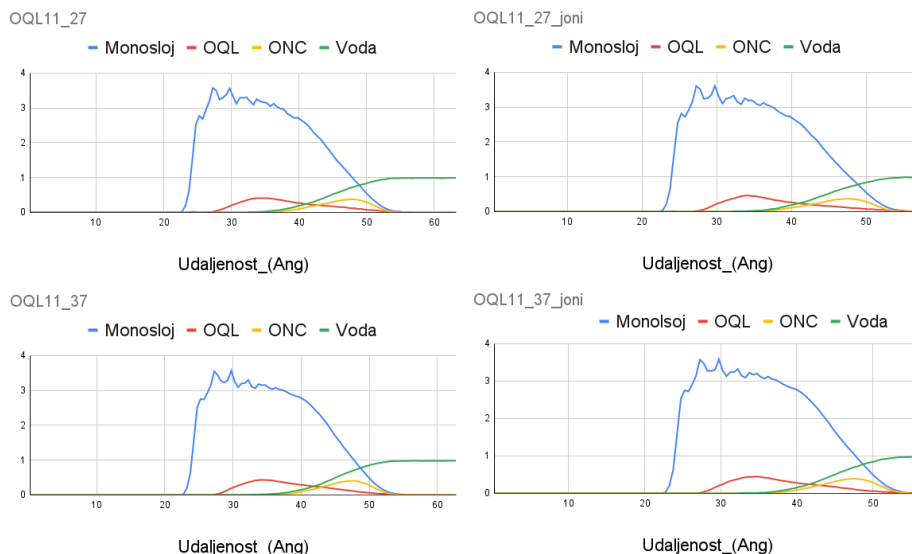
4.1.7. Ispitivanje stabilnosti funkcionalizovanih nanočestica pod različitim uslovima

Stabilnost nanočestica može značajno da utiče na proces sinteze, distribucije, skladištenja i primene. Npr. Pfizer-BioNTech kovid-19 vakcine koje sadrže lipidne nanočestice zahtevaju skladištenje na temperaturama od -90 do -60 stepeni celzijusa. Kako bi se ispitala stabilnost funkcionalizovanih nanočestica pod različitim uslovima, puštane su simulacije heterogenih sistema:

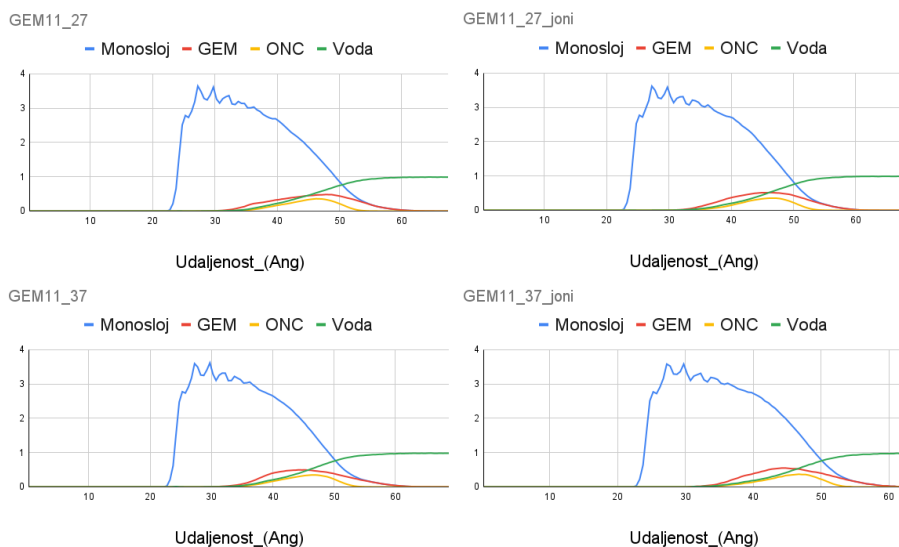
1. Na sobnoj temperaturi (300 K) u vodenoj sredini,
2. Na sobnoj temperaturi (300 K) u fiziološkoj sredini (sa jonima),

3. Na fiziološkoj temperaturi (310,15 K) u vodenoj sredini,
4. Na fiziološkoj temperaturi (310,15 K) u fiziološkoj sredini (sa jonima).

Kao što je navedeno u metodologiji, ideja je bila da se simuliraju nanočestice na sobnoj temperaturi u vodenim uslovima što predstavlja model uslova njihove sinteze, i na fiziološkoj temperaturi sa jonima što je model fiziološke sredine. S obzirom na to da detaljno modelovanje fiziološke sredine nije tehnički moguće, za simulacije se koristi pojednostavljen sistem gde se modeluje fiziološki rastvor koji sadrži 0,15 M rastvor NaCl.

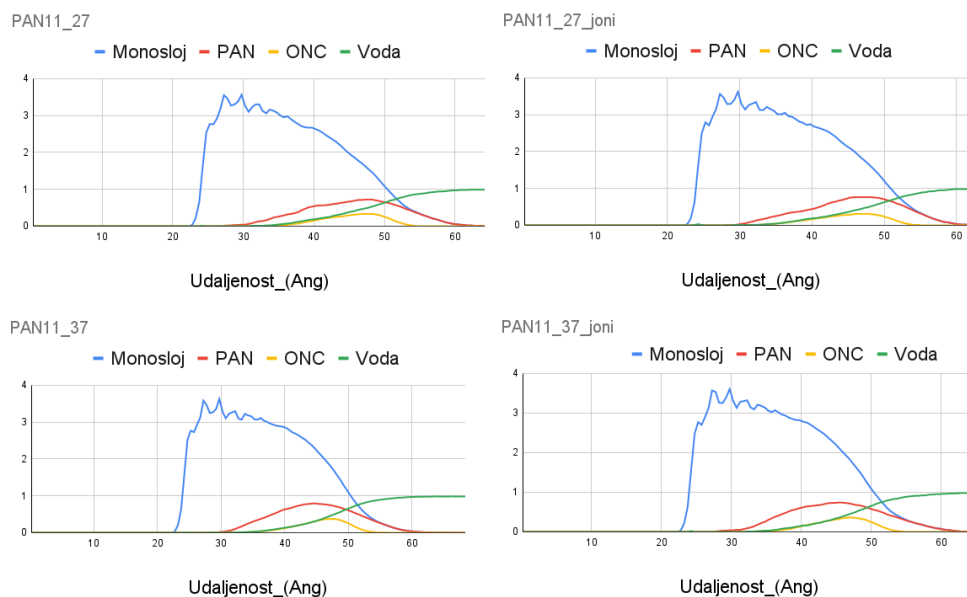


Slika 4.27. RDF grafici Kvinolinola pri različitim uslovima (na 27 i 37 stepeni Celzijusa (300, 310,15 K) sa ili bez jona).



Slika 4.28. RDF grafici Gemcitabina pri različitim uslovima (na 27 i 37 stepeni Celzijusa (300, 310,15 K) sa ili bez jona).

Kao što se može videti sa RDF grafika svih sistema (slike 4.27-4.29) promena u strukturama ispitivanih nanočestica praktično nema. Najznačajnije promene mogu se videti na RDF graficima Panobinostat sistema (slika 4.29) gde je prosečna gustina leka malo drugačije raspoređena kroz monosloj. Međutim, ako se ti rezultati uporede sa vrednostima dostupnosti leka (tabela 4.33) može se videti da su varijacije koje se javljaju među sistema i dalje u opsegu preciznosti ovih analiza (~3%, objašnjenje je dato u sekciji 4.2, iznad tabele 4.6).



Slika 4.29. RDF grafici Panobinostatata pri različitim uslovima (na 27 i 37 stepeni (300, 310,15 K) sa ili bez jona).

Tabele 4.35-37 prikazuju vrednosti površine dostupne rastvaraču i dostupnosti leka ispitivanih sistema. Kao što se iz svake tabele može primetiti, vrednosti ostaju konstantne pri različitim uslovima. U navedenim tabelama se može uočiti da dostupnost leka za Kvinolinol sisteme pri svim uslovima ostaje konstanta na 14%, za Gemcitabin sisteme na 45% i za Panobinostat sisteme oko 45%.

Tabela 4.35. SASA i dostupnost leka Kvinolinol sistema.

Sistem	OQL11_27	OQL11_27_joni	OQL11_37	OQL11_37_joni
SASA (Å ²)	49106	48268	50201	49533
%	14	14	14	14

Tabela 4.36. SASA i dostupnost leka Gemcitabin sistema.

Sistem (Å ²)	GEM11_27	GEM11_27_joni	GEM11_37	GEM11_37_joni
SASA	65312	63854	64189	64242
%	45	45	45	45

Tabela 4.37. SASA i dostupnost leka Panobinostat sistema.

Sistem	PAN11_27	PAN11_27_joni	PAN11_37	PAN11_37_joni
SASA (Å ²)	79345	78803	78302	79728
%	43	46	44	44

Tabele 4.38-4.40 prikazuju zastupljenost interakcija u ispitivanim sistemima. Različita zastupljenost određenog tipa interakcija u različitim sistemima posledica je fizičko-hemijskih osobina lekova koji su vezani za API ligande. Međutim, unutar jednog sistema, pri poređenju zastupljenosti interakcija pri različitim uslovima, može se videti da ovde, kao i ranije, promena praktično nema. Ova konzistentnost rezultata ukazuje na stabilnost struktura.

Tabela 4.38. Zastupljenost interakcija u Kvinolinol sistemima (API:PL=1:1) pri različitim uslovima.

Kvinolinol	OQL11_27	OQL11_27_joni	OQL11_37	OQL11_37_joni
Vodonična veza (%)	23,2	23,5	23,4	23,5
Elektrostatičke interakcije (%)	0,8	1,1	0,8	0,6
Hidrofobne interakcije (%)	74,9	74,2	74,7	74,7
Ostale (%)	1,1	1,2	1,1	1,3

Tabela 4.39. Zastupljenost interakcija u Gemcitabin sistemima (API:PL=1:1) pri različitim uslovima.

Gemcitabin	GEM11_27	GEM11_27_joni	GEM11_37	GEM11_37_joni
Vodonična veza (%)	39,1	39,2	39,5	39,1
Elektrostatičke interakcije (%)	3,8	3,4	3,4	4,4
Hidrofobne interakcije (%)	56,2	56,6	56,3	55,7
Ostale (%)	0,9	0,8	0,8	0,9

Tabela 4.40. Zastupljenost interakcija u Panobinostat sistemima (API:PL=1:1) pri različitim uslovima.

Panobinostat	PAN11_27	PAN11_27_joni	PAN11_37	PAN11_37_joni
Vodonična veza (%)	27,6	27,7	27,6	27,5

Elektrostatičke interakcije (%)	1,1	1,5	1,2	1,4
Hidrofobne interakcije (%)	70,4	69,9	70,4	70,2
Druge (%)	0,9	0,9	0,8	0,9

Zaključak eksperimenta

Rezultati svih urađenih analiza pokazuju da su promene strukture funkcionalizovanih zlatnih nanočestica pod različitim uslovima minimalne, odnosno, struktura ovih sistema praktično ostaje identična pod svim ispitanim uslovima.

Pored inertnosti zlatnih nanočestica, koja omogućava širok spektar mogućnosti njihove funkcionalizacije, ovo predstavlja još jednu prednost korišćenja zlatnih nanočestica kao nosača antitumorskih lekova. Stabilno skladištenje zlatnih nanočestica na sobnoj temperaturi značajno olakšava njihovu sintezu i distribuciju i smanjuje finansijske troškove.

4.1.8. Ispitivanje intramolekulskih interakcija

Kako bi se dobio bolji uvid u strukturu simuliranih sistema, takođe su ispitivane intramolekulske interakcije u monosloju nanočestica.

4.1.8.1. Zastupljenost interakcija sa promenom koncentracije liganada u sistemu

U prvoj grupi simulacija, praćene su interakcije u sistemima gde su postepeno menjane koncentracije API i pozadinskih liganada. Interakcije su ispitane prvo za homogene sisteme (nanočestice funkcionalizovane samo API ligandom i nanočestice funkcionalizovane samo pozadinskim ligandom), a zatim i za heterogene sisteme gde je odnos ova dva tipa liganada bio postepeno variran.

Tabela 4.41. Interakcije Gemcitabin sistema.

Interakcije	GEM100	GEM31	GEM11	GEM13	PL100
Vodonična veza (%)	40,2	40,2	39,4	38,2	33,1

Elektrostatičke Interakcije (%)	0	0,2	0,6	1,3	2,8
Hidrofobne Interakcije (%)	59,1	58,9	59,2	59,6	63
Ostale (%)	0,7	0,7	0,8	0,9	1,2

Na osnovu vrednosti iz tabele 4.41. može se videti da u slučaju homogeno funkcionalizovane nanočestice API ligandom koji nosi Gemcitabin praktično nema elektrostatičkih interakcija. Iako su hidrofobne interakcije malo zastupljenije, odnos hidrofobnih interakcija i vodoničnih veza je prilično izjednačen (u odnosu na druge ispitivane sisteme). Za ovako visok procenat vodoničnih veza zaslužan je veći broj proton donora i akceptora u strukturi API liganda koji omogućavaju formiranje većeg broja vodoničnih veza nego kod drugih sistema. Detaljnije objašnjenje biće dato u narednoj sekciji gde su upoređeni dopinosi interakcija među različitim sistemima. Dodavanjem pozadinskog liganda u sistem zastupljenost elektrostatičkih interakcija raste. Iako je njihov procenat relativno mali. Na osnovu simulacija homogenih sistema može se lako zaključiti da je to posledica uvođenja cviterjonskog pozadinskog liganda. Iako se može videti blag pad zastupljenosti vodoničnih veza, odnosno blag porast hidrofobnih interakcija, ove promene zastupljenosti su praktično zanemarljive.

Ako se uporede interakcije homogenog sistema sa API ligandom i homogenog sistema sa pozadinskim ligandima, može se uvideti velika sličnost. Male promene do kojih dolazi kod heterogenih sistema ukazuje na uravnotežavanje između ova dva stanja, gde je API-GEM dominantniji. Drugim rečima, doprinos prisustva pozadinskog liganda je minimalan.

Tabela 4.42. Interakcije Niklozamid sistema.

Interakcije	NCL100	NCL31	NCL11	NCL13	PL100
Vodonična veza (%)	28	29,8	30,1	30,8	33,1
Elektrostatičke Interakcije (%)	0	0,2	0,6	1,2	2,8
Hidrofobne Interakcije (%)	71,3	69,3	68	66,9	63
Ostale (%)	0,6	0,7	0,8	1	1,2

Iako je u slučaju homogenog Niklozamid sistema početna situacija malo drugačija u odnosu na Gemcitabin (NCL100) gde je zastupljenost hidrofobnih interakcija značajnija u odnosu na zastupljenost vodoničnih veza, na osnovu vrednosti iz tabele 4.42 može se uočiti da se zastupljenost interakcija takođe ne menja značajno sa uvođenjem pozadinskog liganda. Zastupljenost vodoničnih veza ostaje konstantna na oko ~30%, dok je zastupljenost hidrofobnih interakcija ~70 %.

Tabela 4.43. Interakcije Panobinostat sistema.

Interakcije	PAN100	PAN31	PAN11	PAN13	PL100
Vodonična veza (%)	23,1	25,3	27,6	30,3	33,1
Elektrostatičke Interakcije (%)	0	0,5	1,2	1,9	2,8
Hidrofobne Interakcije (%)	76,2	73,5	70,4	66,8	63
Ostale (%)	0,7	0,7	0,8	1	1,2

Kod homogenih sistema funkcionalizovanih API ligandima koji nose Panobinostat i Kvinolinol (tabele 4.42-43) takođe se može videti dominantnost hidrofobnih interakcija u sistemu. Na osnovu strukture (slike 4.8, 4.10) može se pretpostaviti da je razlog za to zajednički element ovih struktura (aromatični prstenovi) koji omogućavaju formiranje π - π interakcija. Zastupljenost hidrofobnih interakcija je najveća kod Kvinolinol sistema koji ima dva konjugovana aromatična prstena. Za razliku od Gemcitabin i Niklozamid sistema, sa uvođenjem cviterjanskog pozadinskog liganda, zastupljenost hidrofobnih interakcija opada, a zastupljenost vodoničnih veza raste. S obzirom na to da su ispitivani sistemi u nasumičnim konfiguracijama, moguće je da uvođenje cviterjona sprečava API ligande da se dovoljno međusobno približe čime se narušava mogućnost formiranja π - π interakcija. Takođe, pozadinski ligand ima veći broj proton donora i akceptora od API liganada što dovodi do povećanja procenta vodoničnih veza u sistemu.

U odnosu na Gemcitabin i Niklozamid sisteme gde je uticaj uvođenja pozadinskog liganda na zastupljenost interakcija praktično zanemarljiva, u ostalim sistemima to nije slučaj, posebno u slučaju Kvinolinol sistema čija je hidrofobnost najveća.

Tabela 4.44. Interakcije Kvinolinol sistema.

Interakcije	OQL100	OQL31	OQL11	OQL13	PL100
Vodonična veza (%)	17,7	20,5	23,4	26,4	33,1
Elektrostatičke Interakcije (%)	0	0,4	0,8	1,4	2,8
Hidrofobne Interakcije (%)	81,5	78,2	74,7	70,9	63
Ostale (%)	0,9	0,9	1,1	1,4	1,2

4.1.8.2. Poređenje interakcija među nanosistemima koji nose različite lekove pri istim koncentracijama

S obzirom na to da je jedina razlika u simuliranim sistemima u terminalnom kraju API liganda (lek), takođe je upoređena zastupljenost interakcija između sistema kako bi se izolovao uticaj samog leka.

Tabela 4.45. Interakcije u homogeno funkcionalizovanim sistemima.

Interakcije	GEM100	NCL100	PAN100	OQL100	PL100
Vodonična veza (%)	40,2	28	23,1	17,7	33,1
Elektrostatičke Interakcije (%)	0	0	0	0	2,8
Hidrofobne Interakcije (%)	59,1	71,3	76,2	81,5	63
Ostale (%)	0,7	0,6	0,7	0,9	1,2

Ako se obrati pažnja na rezultate iz tabela 4.45-4.48 može se uočiti isti trend bez obzira na odnos korišćenih liganada. Procentualno, najviše vodoničnih veza ima u Gemcitabin sistemima, dok je najmanji uvek kod Kvinolinol sistema. Situacija je suprotna kada su u pitanju hidrofobne interakcije. Ovaj trend se može objasniti strukturom lekova. Gemcitabin ima najveći broj proton donora i akceptora, dok je taj broj najmanji kod Kvinolinola. U skladu sa tim, ovakva distribucija interakcija u sistemima je i očekivana.

Tabela 4.46. Interakcije u heterogeno funkcionalizovanim sistemima gde je odnos između API i pozadinskog liganda 3:1.

Interakcije	GEM31	NCL31	PAN31	OQL31
Vodonična veza (%)	40,2	29,8	25,3	20,5
Elektrostatičke Interakcije (%)	0,2	0,2	0,5	0,4
Hidrofobne Interakcije (%)	58,9	69,3	73,5	78,2
Ostale (%)	0,7	0,7	0,7	0,9

Elektrostatičke interakcije potiču isključivo od prisustva pozadinskog liganda u sistemu. To je i očekivano s obzirom na to da je korišćen cviterjonski pozadinski ligand. Ovaj zaključak se može potvrditi upoređivanjem tabela 4.45 sa tabelama 4.46-4.48. U tabeli 4.45 se može videti da elektrostatičkih interakcija nema, dok se u tabelama 4.46-4.48 njihov procenat povećava, sa povećanjem koncentracije pozadinskog liganda u sistemu.

Tabela 4.47. Interakcije u heterogeno funkcionalizovanim sistemima gde je odnos između API i pozadinskog liganda 1:1.

Interakcije	GEM11	NCL11	PAN11	OQL11
Vodonična veza (%)	39,4	30,1	27,6	23,4
Elektrostatičke Interakcije (%)	0,6	0,6	1,2	0,8
Hidrofobne Interakcije (%)	59,2	68	70,4	74,7
Ostale (%)	0,8	0,8	0,8	1,1

Tabela 4.48. Interakcije u heterogeno funkcionalizovanim sistemima gde je odnos između API i pozadinskog liganda 1:3.

Interakcije	GEM13	NCL13	PAN13	OQL13
Vodonična veza (%)	38,2	30,8	30,3	26,4
Elektrostatičke Interakcije (%)	1,3	1,2	1,9	1,4
Hidrofobne Interakcije (%)	59,6	66,9	66,8	70,9
Ostale (%)	0,9	1	1	1,4

4.1.9. Fluorescentne nanočestice kao model sistemi u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima

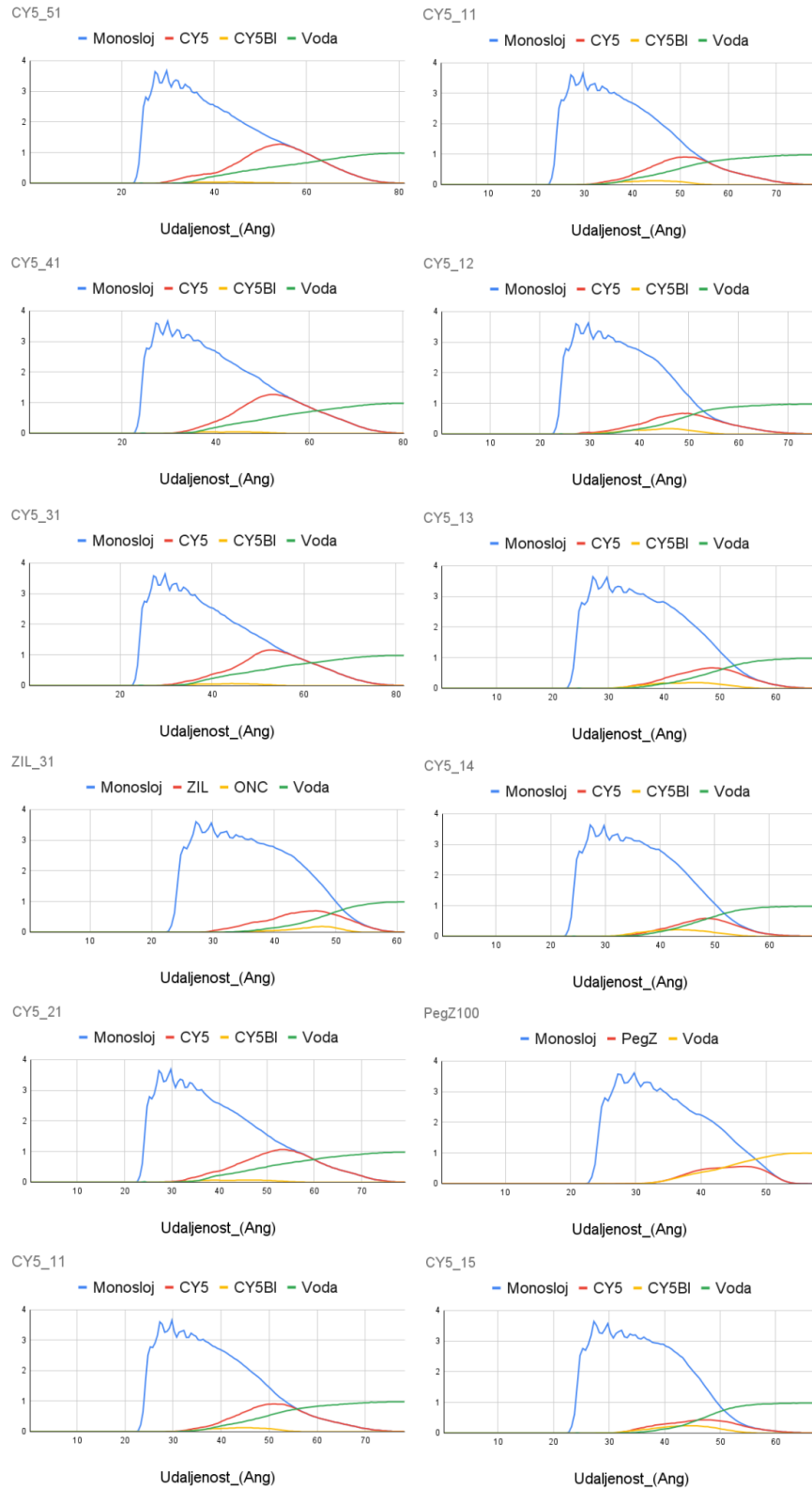
S obzirom na to da je korišćenje fluorescentnih nanočestica u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima neophodno, simulirali smo različite fluorescentne sisteme kako bismo ispitali da li one mogu biti univerzalan model nanočestica.

Da bi se to ispitalo, simulirani su sistemi sa istim API ligandom kao i u prethodnim simulacija, gde je jedina razlika terminalni kraj - umesto leka vezan je fluorescentni molekul. Takođe su simulirani sistemi sa različitim API:PL odnosima (API:PL=5:1-1:5), kako bi se ispita

dovoljno širok opseg parametara koje bismo na kraju mogli da uporedimo sa svim simuliranim sistemima i damo odgovor na postavljeno pitanje.

U slučaju simulacija nanosistema sa fluorescentnim ligandima, sa RDF grafika (slika 4.30) se može videti da je prosečna gustina terminalnog, fluorescentnog kraja API liganda pomeren desno, u kontaktu sa rastvaračem. Pri velikim početnim koncentracijama API liganda, a malih pozadinskog liganda, pozadinski ligand je potisnut, odnosno raspoređen kroz čitav monosloj, sa prosečnom gustinom bliže zlatnom jezgru. Sa povećanjem koncentracije pozadinskog liganda, pik se pomera bliže rastvaraču, dok se pik API liganda pomera bliže površini zlata. Pri odnosu ova dva liganda API:PL=1:5, ligandi pokazuju slično ponašanje.

Ovakav trend je uočen kod nanočestica koje nose hidrofilne lekove, dok one koje nose hidrofobne nisu pokazale slično ponašanje. Treba napomenuti da fluorescentni terminalni kraj predstavlja model sistem nošenih lekova. Opisano ponašanje je posledice njegove polarnosti i strukture, a ne svojstva fluorescencije, što treba uzeti u obzir u daljem razmatranju ovakvih sistema kao *in vitro* i *in vivo* modela različitih nanonosaa.



Slika 4.30. RDF grafici fluorescentnih nanočestica sa različitim odnosima API i PL.

Tabela 4.49. SASA i dostupnost terminalnog kraja fluorescentnog API liganda.

Sistem	CY5 51	CY5 41	CY5 31	CY5 21	CY5 11	CY5 12	CY5 13	CY5 14	CY5 15
SASA (Å ²)	179140	172007	164789	150539	120721	89231	75347	62163	53327
%	71	71	71	69	64	57	51	50	46

Dostupnost terminalnog kraja fluorescentnog liganda treba da reflektuje dostupnost leka u drugim sistemima (tabela 4.49). Opšti trend pokazuje da sa povećanjem koncentracije pozadinskog liganda opada dostupnost terminalnog kraja. Međutim, iz uzastopnih simulacija vidi se da malo povećanje koncentracije pozadinskog liganda nema veliki uticaj na dostupnost. Pri API:PL odnosima od 5:1 do 2:1, dostupnost se praktično ne menja. Malo značajnija promena se vidi tek kada je odnos 1:1, ali je i tu promena neznatna. Sa daljim povećanjem koncentracije, dostupnost opada drastičnije, ali se održava na vrednosti od oko 50%. Ovo takođe ide u prilog tome da fluorescentne nanočestice bolje odražavaju karakteristike hidrofilnih sistema. Međutim, pod istim uslovima (istim odnosima API i pozadinskih liganada) čak ni najhidrofilniji sistemi nisu dostigli dostupnost leka od 70%. Ovo ukazuje na to da treba voditi računa o njihovim relativnim koncentracijama kako bi se eksperimentalni rezultati mogli pripisati stvarnim sistemima.

Tabela 4.50. Ukupna, kinetička i potencijalna energija [Mcal/mol] ispitivanih sistema.

Sistem	Ukupna energija	Kinetička	Potencijalna
CY5 51	-751,6	219,1	-970,7
CY5 41	-760,1	219,7	-979,9
CY5 31	-784,1	223,3	-1007,4
CY5 21	-798,6	223,4	-1022,14
CY5 11	-831,6	224,6	-1056,2
CY5 12	-899,4	234,2	-1133,7
CY5 13	-912,8	234,1	-1146,8
CY5 14	-938,5	238,1	-1176,5
CY5 15	-929,6	234,7	-1164,4

U tabeli 4.50 koja pokazuje rezultate energija ispitivanih sistema, vidi se pozitivan uticaj uvođenja pozadinskog liganda na stabilnost sistema. Sa povećanjem njegove koncentracije, srazmerno se povećava i stabilnost.

Tabela 4.51. Maksimalna veličina nanočestice (MAXveličina), prosečna veličina nanočestica (AVG veličina), debljina monosloja (CT) ispitivanih sistema.

Sistem	CY5 51	CY5 41	CY5 31	CY5 21	CY5 11	CY5 12	CY5 13	CY5 14	CY5 15
CT [Å]	44,75	44,75	45,25	43,75	41,25	37,25	31,25	30,25	29,25
MAX Veličina [Å]	175,4	171,5	178,5	174,5	169,5	169,5	154,5	156,5	152,5
AVG veličina[Å]	141,5	141,5	142,5	139,5	134,5	126,5	114,5	112,5	110,5

Tabela 4.51 pokazuje izračunate vrednosti veličina nanočestica funkcionalizovanih fluorescentnim ligandima. Nanočestice kod kojih je API ligand u višku su značajno veće od svih ispitivanih sistema. Tek pri nižim koncentracijama API, a većim koncentracijama pozadinskog liganda, veličina nanočestice i debljina monosloja postaju uporedive sa vrednostima ranije ispitanih sistema.

Zaključak eksperimenta

Simulacije fluorescentnih nanočestica su pokazale da ovi sistemi mogu biti dobar model sistem nanočestica funkcionalizovanih API ligandima koji nose hidrofilne lekove. Ligandi pokazuju slično ponašanje u kontekstu kretanja i savijanja. Iako nisu u pitanju isti API:PL odnosi, u slučajevima kada je pozadinski ligand u višku, vrednosti dostupnosti terminalnog kraja su uporedive sa dostupnošću leka hidrofilnijih sistema. S druge strane, odstupanja od vrednosti dobijenih za sisteme funkcionalizovane API ligandima koji nose hidrofobne lekove su značajna. Iako postoje značajna odstupanja od svih sistema po pitanju veličine i debljine monosloja, ove razlike, dokle god se imaju na umu pri tumačenju rezultata, u slučaju eksperimenata mogu biti zanemarene. Previše su male kako bi uticale značajno npr. na koeficijent difuzije.

Najvažnija napomena jeste da "najvernije preslikavanje" željene strukture nije najoptimalnije. Drugim rečima, sama zamena terminalnog kraja fluorescentnim molekulom menja značajno strukturu i parametre fluorescentne nanočestice, tako da, iako mogu biti dobar model sistem, treba voditi računa o relativnoj koncentraciji liganda kako bi se moglo imati poverenje u eksperimentalne rezultate.

4.2. Ispitivanje fiziološkog efekta stohastičkim reakciono-difuzionim simulacijama

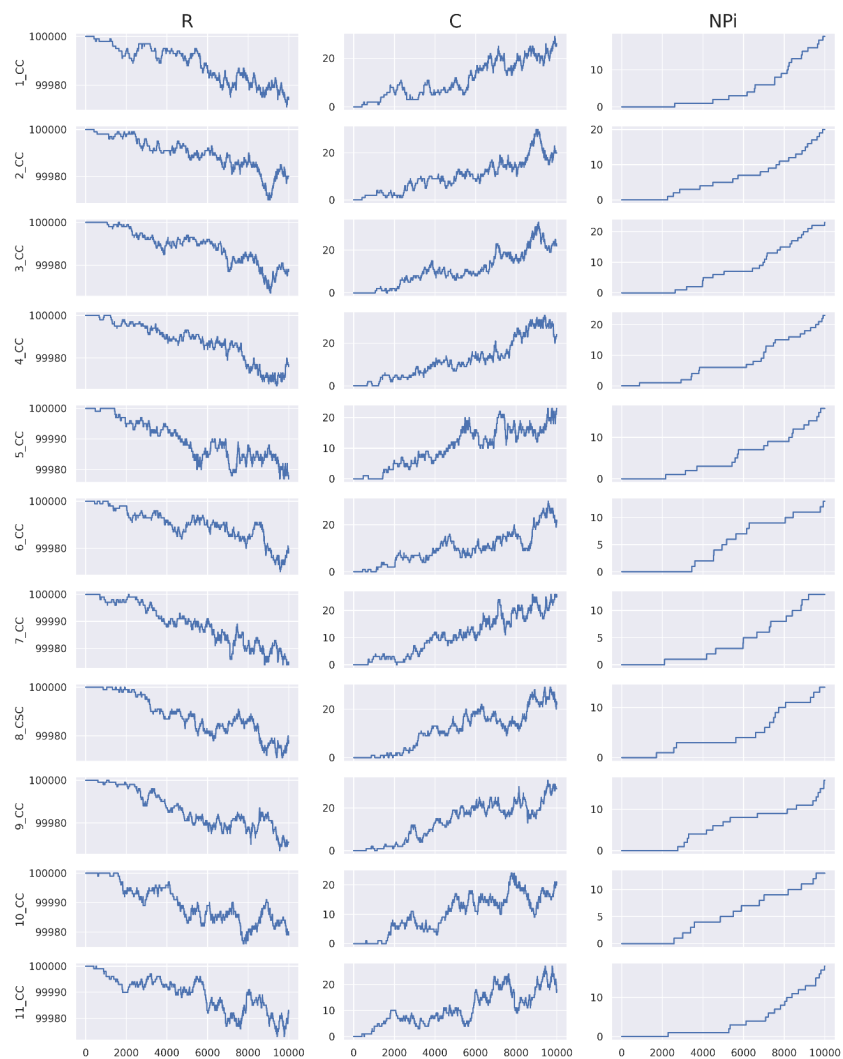
Do sada je simulirana molekulska dinamika nanosistema i urađena je njihova karakterizacija. Cilj prethodnih simulacija bio je da se dodje do korisnih strukturnih i energetskih parametara ispitivanih nanosistema. Iako dobijeni rezultati mogu biti korisni za poboljšanje dizajna nanonosača, nisu dovoljni da bi se realno procenila njihova efikasnost. Za procenu efikasnosti nanosistema neophodna je dodatna karakterizacija, kao što su je ispitivanje interakcija između nanosistema i ćelija, kao i kretanje nanosistema kroz tkivo. Zbog toga se u ovoj sekciji prelazi se na sledeći nivo simulacija - nivo ćelije, gde je ispitivan njihov fiziološki efekat.

4.2.1. Ispitivanje fiziološkog efekta Kvinolinol nanosistema

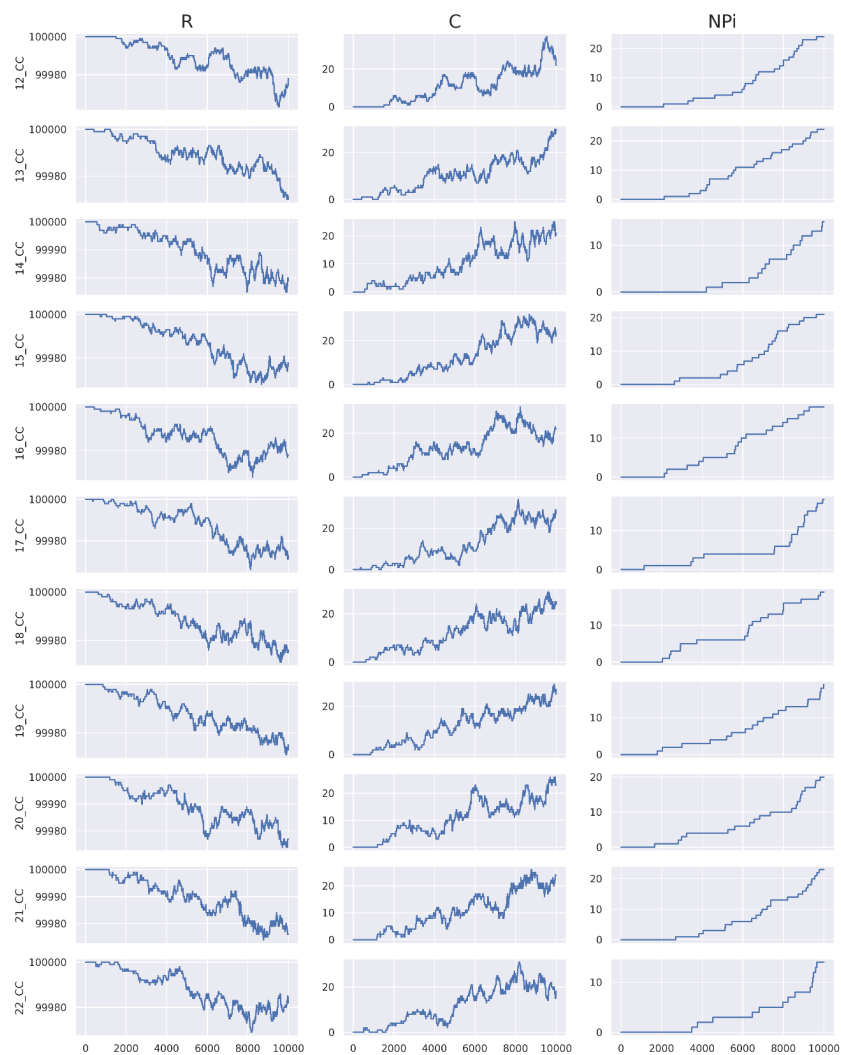
U prvom eksperimentu, konstanta asocijacije postavljena je na izuzetno malu vrednost ($K_a=100$; prosečne vrednosti K_a iz literature su reda veličine 10^5) kako bismo modelovali nanosistem koji ne ulazi, odnosno, ulazi u ćeliju u zanemarljivo malim koncentracijama ($K_d \gg K_a$). Rezultati dobijeni iz simulacija pokazuju da Kvinolinol nanosistem ne ubija ni jednu ćeliju u isečku simuliranog heterogenog isečka tumora.

Sa slika 4.31 i 4.32 se može videti da iako nanosistemi uspevaju da dođu do svake ćelije, njihova internalizacija (ulazak u ćelije) se praktično ne dešava. U ćelije ulazi do dvadesetak nanosistema, što je značajno manje od NP_{MAX} vrednosti i za diferencirane i za matične ćelije raka (NP_{MAX} (diferencirane ćelije raka) = 682, NP_{MAX} (matične ćelije raka) = 381).

Mala internalizacija nije jedino potencijalno objašnjenje nezadovoljavajuće efikasnosti Kvinolinol sistema. U simulacijama molekulske dinamike, utvrđeno je da je dostupnost leka u ovom sistemu izuzetno niska (što je takođe potvrđeno eksperimentalno preko merenja procenta oslobodjenog leka (više detalja u sekciji 3.2.6).

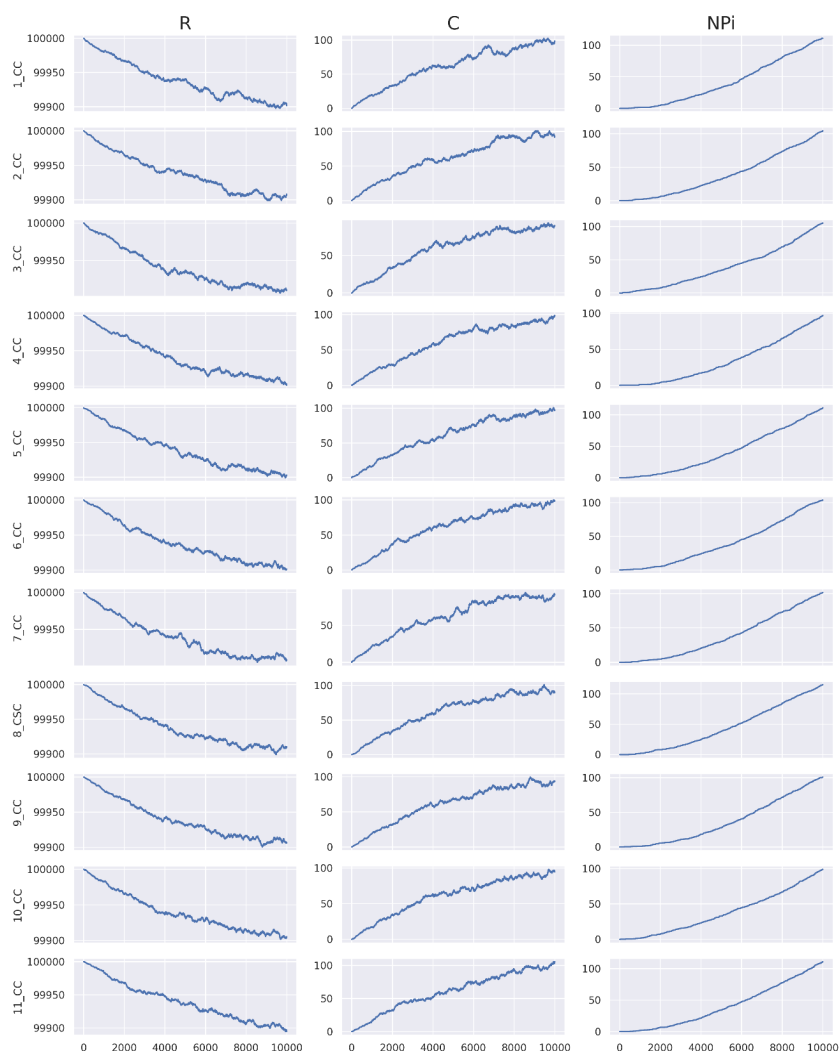


Slika 4.31. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPI). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano prvih 11 ćelija.



Slika 4.32. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPi). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano drugih 11 ćelija.

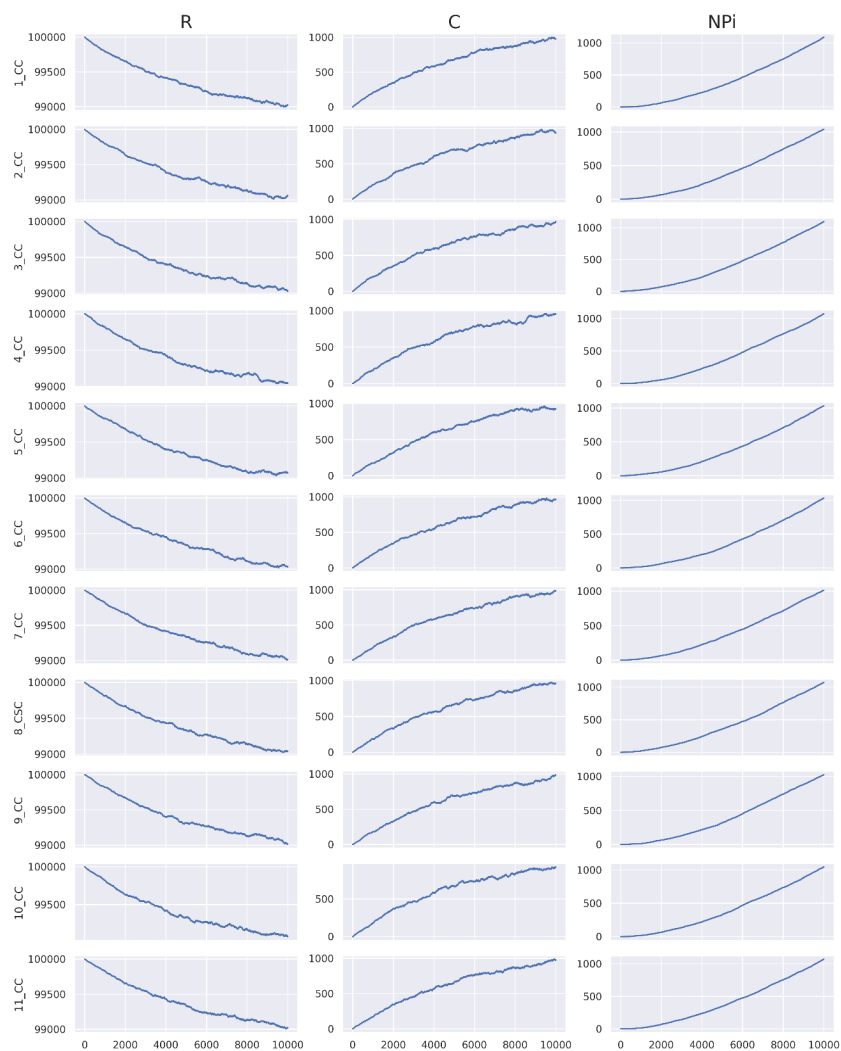
Da bismo utvrdili da je neulazak nanosistema u ćeliju zaista uzrok posmatranog efekta, takođe je simuliran nanosistem sa istim parametrima kao i ranije, osim sa promenjenom konstantnom asocijacije koja omogućava njegov ulazak u ćeliju.



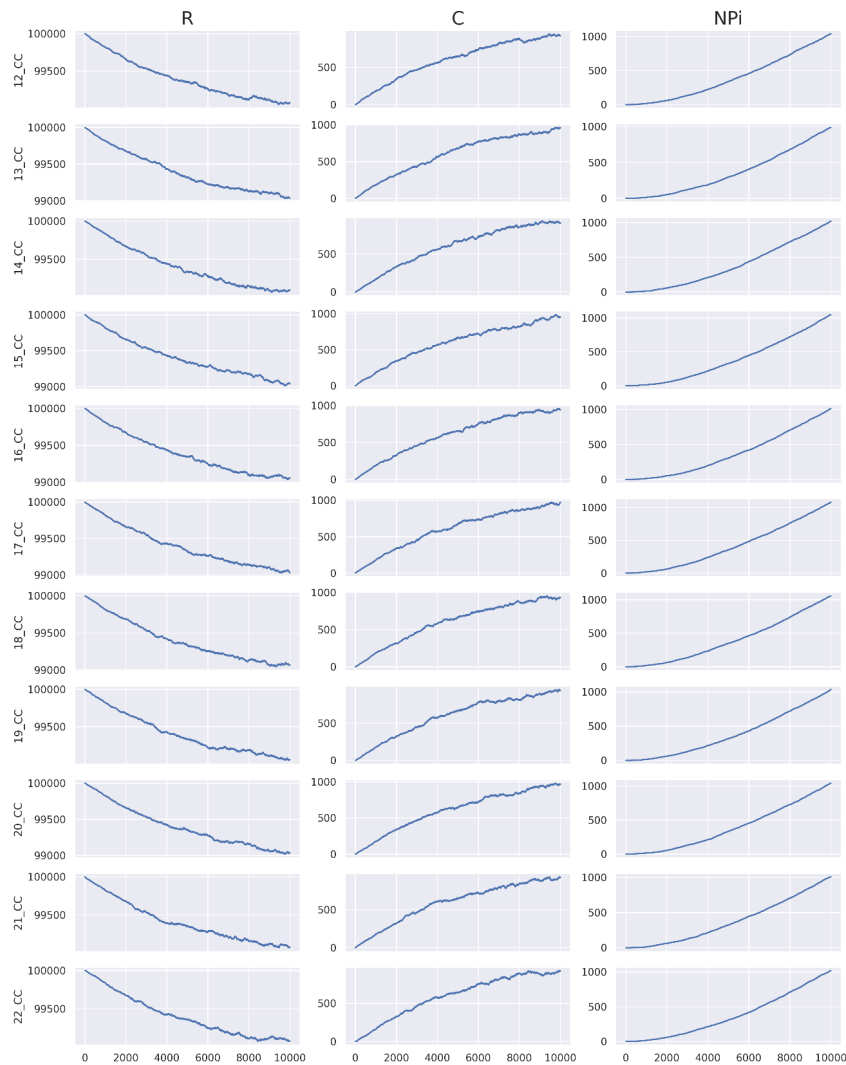
Slika 4.33. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (V), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPi). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano prvih 11 ćelija.

Na osnovu grafika 4.33 se može zaključiti da je Kvinolinol nanosistem neefikasan i u ovom slučaju. Nanosistemi dolaze do ćelije, ulaze u nju, ali ne u dovoljnoj koncentraciji da izazovu ćelijsku smrt.

Da bi se osiguralo da je glavni uzrok nezadovoljavajuće efikasnosti ovog sistema činjenica da ne ulaze u ćeliju, a ne nedovoljna injektovana doza, puštane su dodatne simulacije gde je injektovana doza povećana 100 puta (ID=435 μ M).



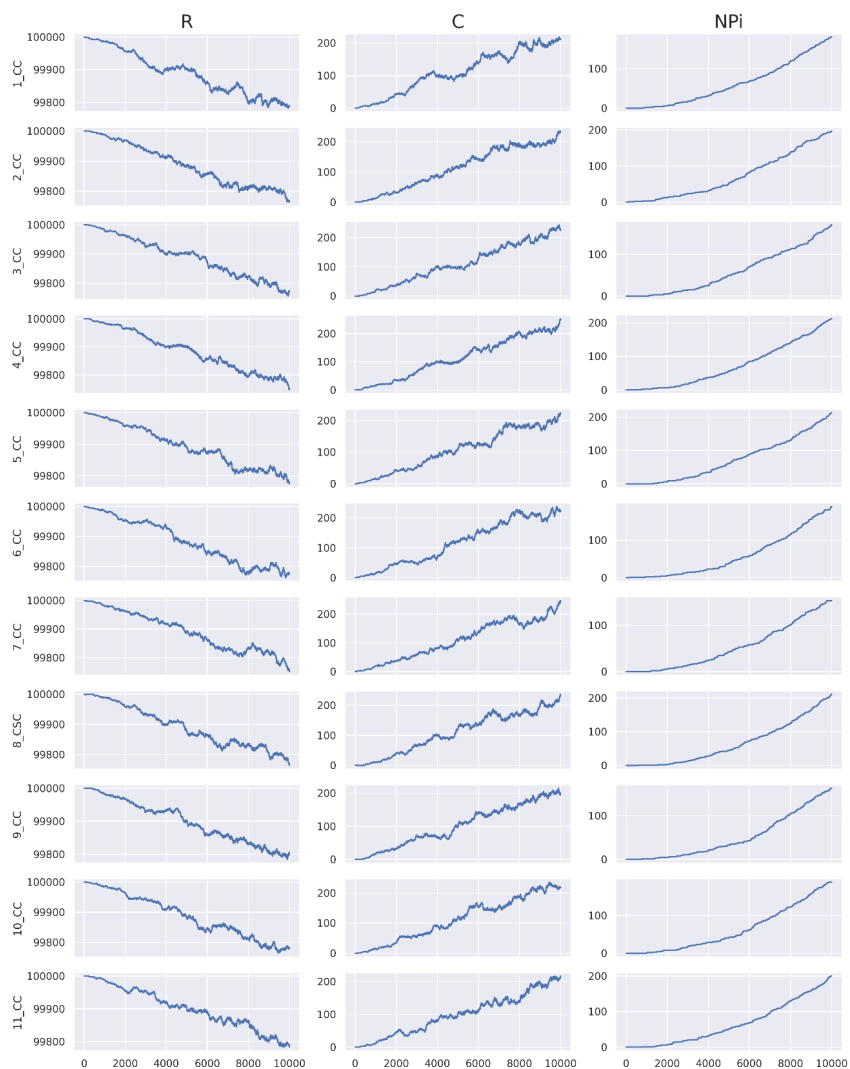
Slika 4.34. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPi). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano prvih 11 ćelija.



Slika 4.35. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPI). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano drugih 11 ćelija.

Sa slika 4.34-35 se može primetiti da pod ovim uslovima (velika injektovana doza gde K_a omogućava da nanosistemi uđu u ćelije) Kvinolinol nanosistem ubija sve ćelije u reprezentativnom isečku tumora.

I konačno, da bi se ispitalo da li ovako velika početna injektovana doza može da kompenzuje za malu vrednost K_a , odnosno, da li problem slabe internalizacije nanosistema može da se prevaziđe povećanjem koncentracije, simuliran je Kvinolinol sistem sa istom injektovanom dozom, i malom vrednosti K_a ($K_d \gg K_a$).



Slika 4.36. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPi). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano prvih 11 ćelija.

Sa slike 4.36. može se videti da iako pri velikoj početnoj injektovanoj dozi postoji veći broj nanosistema koji ulazi u ćelije u odnosu na manju injektovanu dozu (slike 4.31-32), taj broj i dalje nije dovoljan da izazove ćelijsku smrt. Iako bi u teoriji injektovana doza mogla još da se poveća, treba imati na umu da bi to dovelo do pojave toksičnosti, i samim tim do ozbiljnih nuspojava kod pacijenata.

Zaključak eksperimenta

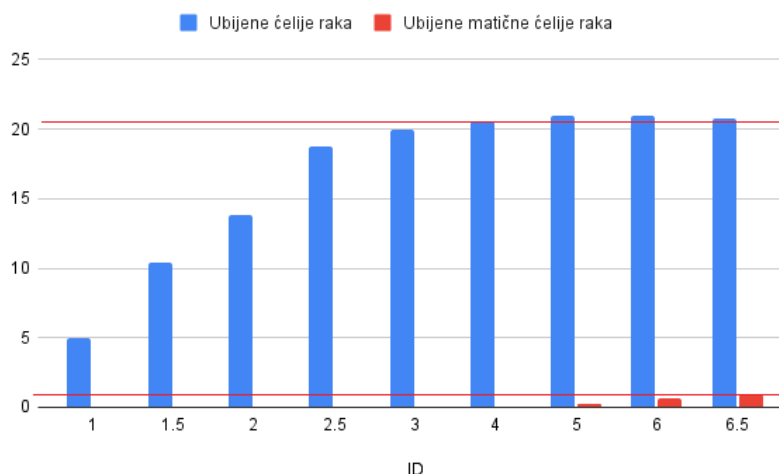
Rezultati simulacija su pokazali da je objašnjenje za neefikasnost Kvinolol sistema uzrok mala/nepostojeća internalizacija u ćelije. U slučaju da ovi nanosistemi ulaze u ćelije, pri dovoljno velikoj injektovanoj dozi pokazali bi željeni biološki efekat. Neefikasnost ovog sistema je pokazana i eksperimentalno. Takođe, eksperimentalno je potvrđeno da ne dolazi do internalizacije ovog sistema, odnosno, rezultati simulacija su u skladu sa rezultatima eksperimenata.

4.2.2. Najmanja injektovana doza i važnost parametra dostupnosti leka - primer Niklozamid sistema

4.2.2.1. Određivanje minimalne injektovane doze sa apsolutnom koncentracijom leka u sistemu

Prvi eksperimenti odnosili su se na određivanje minimalne injektovane doze Niklozamid sistema na osnovu apsolutne koncentracije leka u sistemu. Apsolutna koncentracija odnosi se na ukupnu količinu leka u sistemu, bez obzira na njegovu dostupnost. Drugim rečima pretpostavlja se da je dostupnost leka 100%.

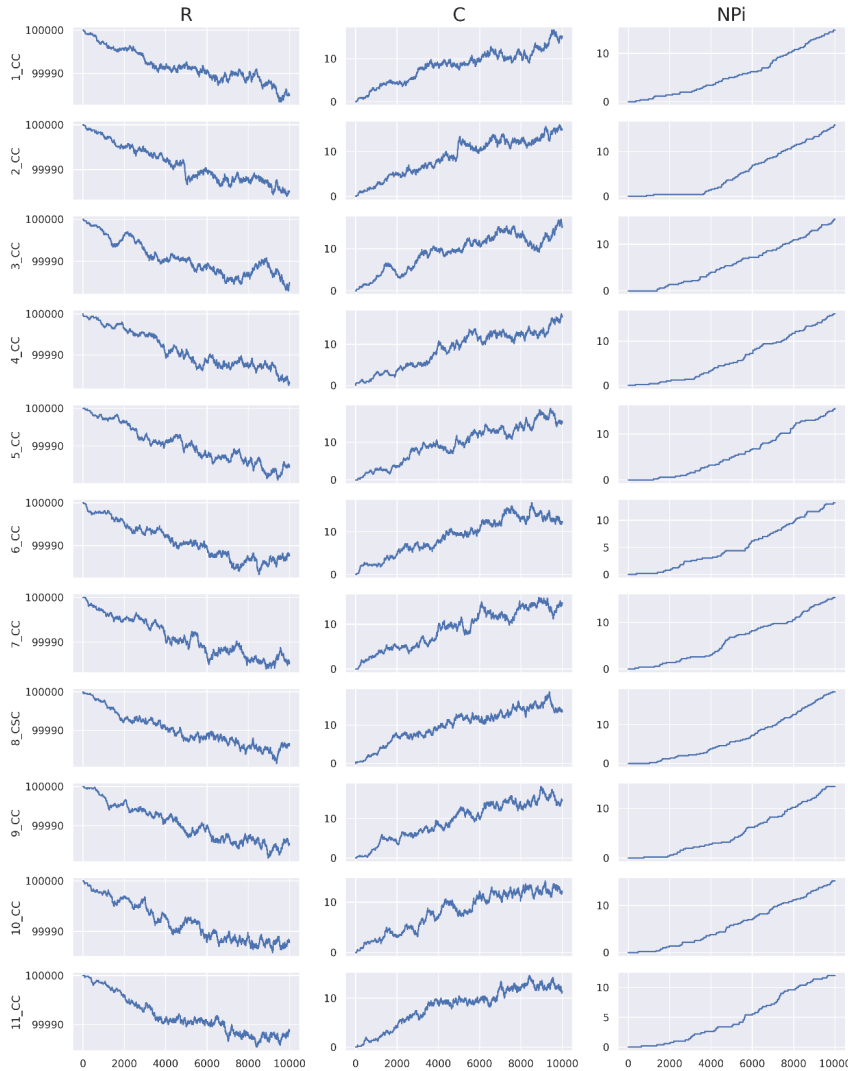
Da bi se odredila minimalna injektovana doza, primenjivane su simulacije gde je početna injektovana doza 1 μM (koncentracija API liganada u rastvoru). Doza je postepeno povećavana sve dok se nije postigla zadovoljavajuća efikasnost, odnosno, dok nanosistem ne ubije $\geq 95\%$ ćelija raka i matičnih ćelija raka. Svaka injektovana doza simulirana je 5 puta, i efikasnost je izračunata na osnovu prosečnih vrednosti svih simulacija.



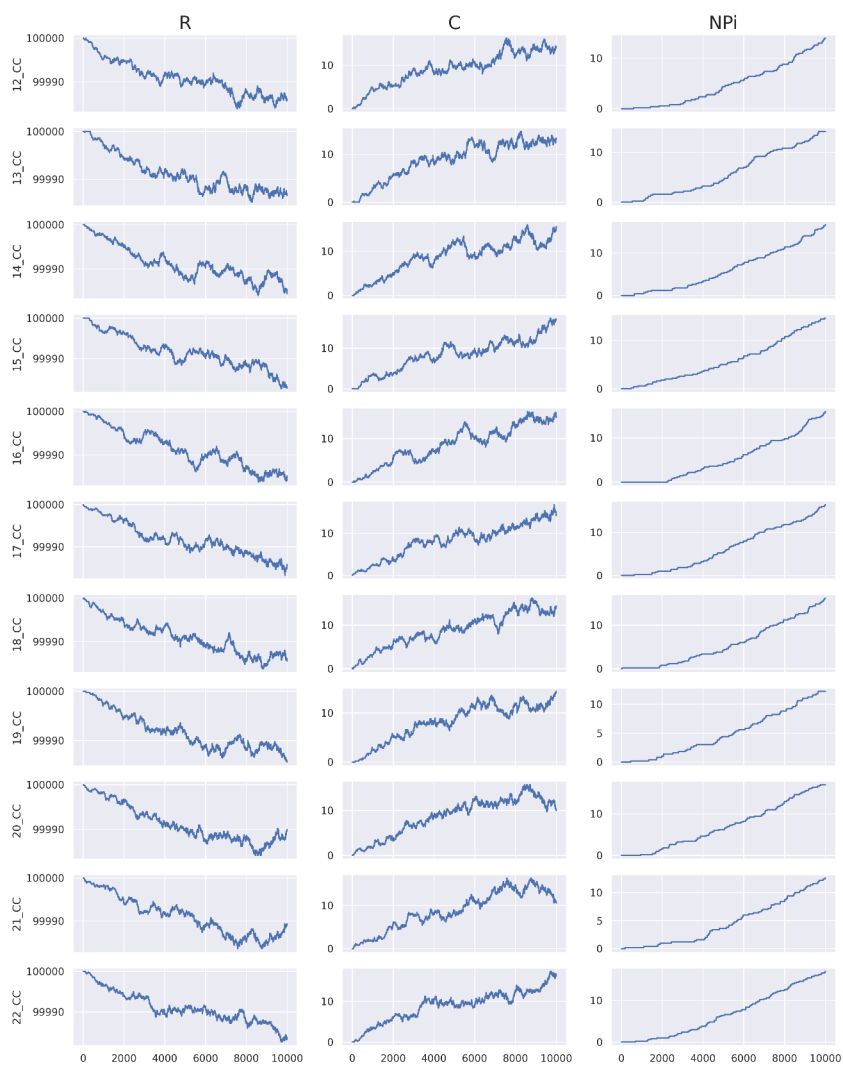
Slika 4.37. Grafik efikasnosti Niklozamid sistema. Crvene linije na grafiku pokazuju prag broja ubijenih diferenciranih i matičnih ćelija koji je neophodno dostići kako bi se sistem okarakterisao kao efikasan.

Sa grafika 4.37 može se videti da je zadovoljavajuća efikasnost dostignuta pri koncentraciji API liganada u sistemu od 6,5 μM . Objašnjenje ovako niske doze leži u IC50 vrednosti prema ćelijama raka i matičnim ćelijama raka. Drugim rečima, potentnost Niklozamida je izuzetno visoka, i u slučaju selektivne dostave na ciljno mesto, optimalna doza je mala.

Na slika 4.38-39. prikazanim ispod može se videti da dovoljan broj Niklozamid nanosistema stiže do ćelija i ulazi u njih (Na osnovu IC50 vrednosti i pretpostavkom dostupnosti od 100%, NPM_{AX} (diferencirane ćelije raka) = 3, NPM_{AX} (diferencirane ćelije raka) = 14).

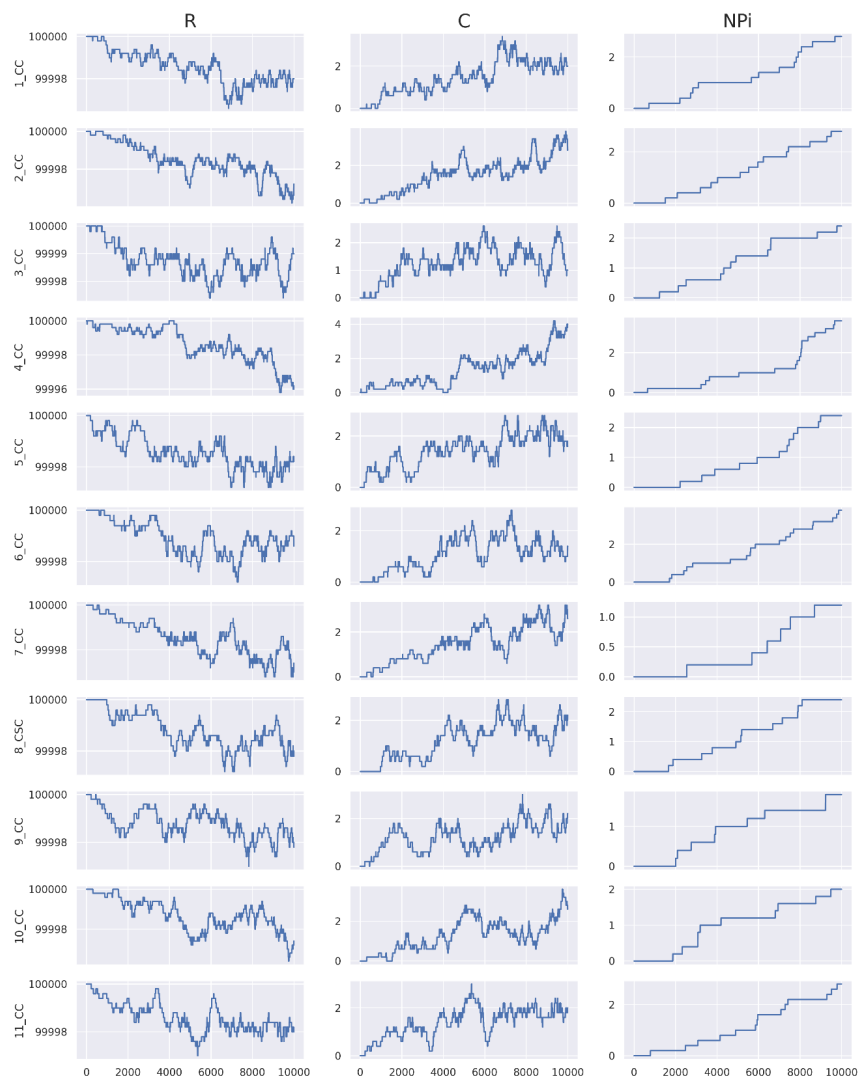


Slika 4.38. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPi). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano prvih 11 ćelija.



Slika 4.39. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (Np). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano drugih 11 ćelija.

Radi poređenja, na slici 4.40 ispod se mogu videti grafici za injektovanu dozu od 1 μM .

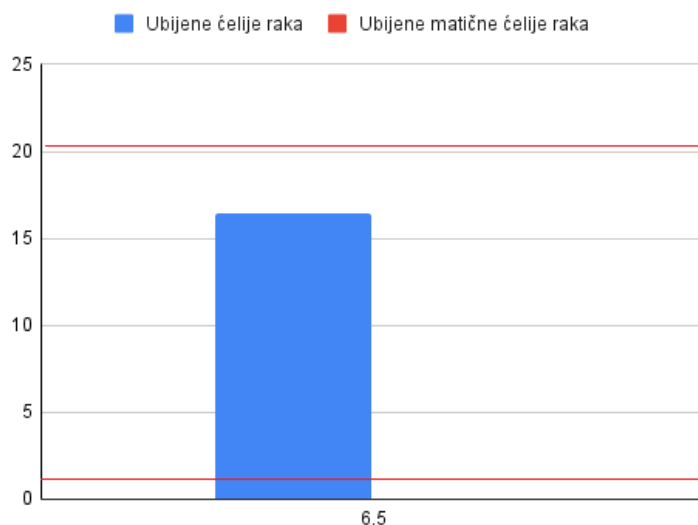


Slika 4.40. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPI). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano prvih 11 ćelija.

Sa grafika 4.40. se može videti da je u slučaju kada je injektovana doza suviše niska, broj nanosistema koji ulazi u ćeliju zanemarljiv (<5). S obzirom na ove podatke, prikazano je samo prvih 11 ćelija od vaskulature.

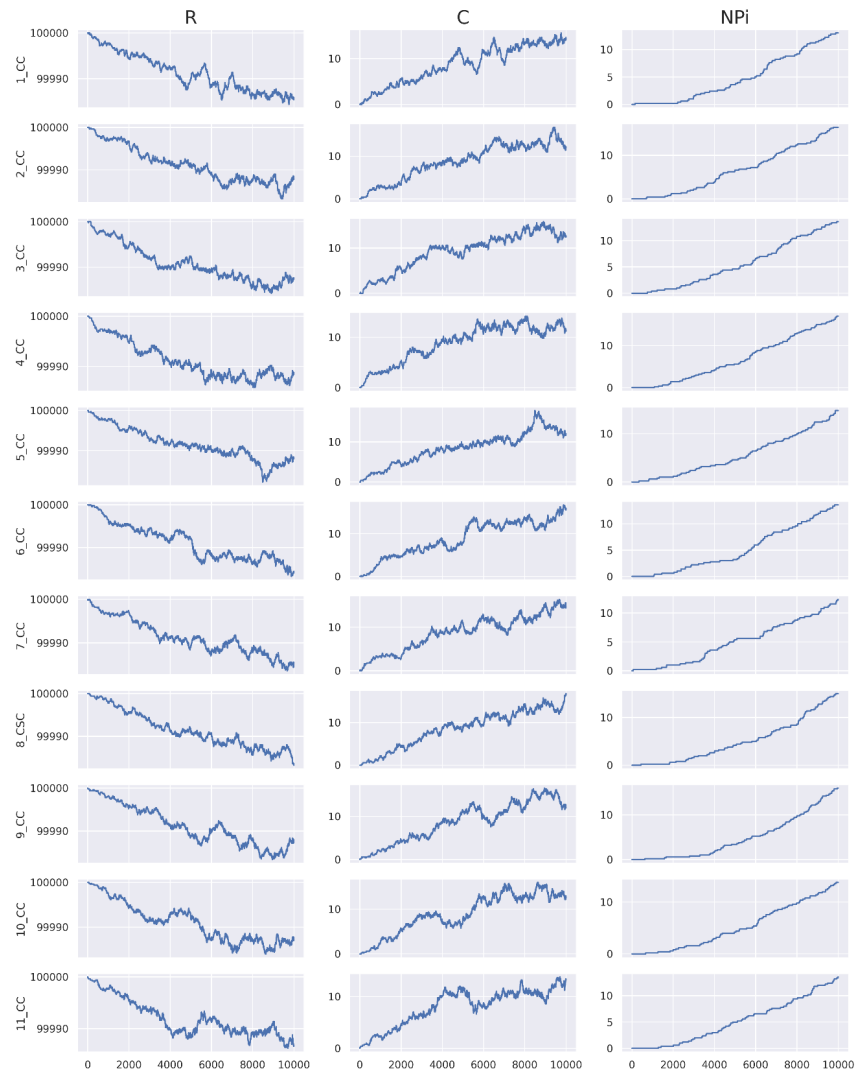
4.2.2.3. Testiranje efikasnosti određene minimalne injektovane doze sa izračunatim procentom dostupnog leka u sistemu

Koliko je važna dostupnost leka ispitano je u narednoj grupi simulacija. Ukupan broj molekula Niklozamida u ispitivanom sistemu je 210. S druge strane, u simulacijama molekulske dinamike dobijeno je da je dostupnost takva da je samo 50 molekula dostupno za interakcije sa sredinom. S obzirom na to da ova vrednost direktno utiče na parametar NP_{MAX} (jednačina 1.4, sekcija 2.3.2), odnosno na broj nanosistema koji mora ući u ćeliju da izazove ćelijsku smrt, ispitana je efikasnost sistema sa 50 dostupnih molekula, i injektovanom dozom dobijenom u prethodnoj grupi simulacija (Sa 50 dostupnih molekula po nanosistemu NP_{MAX} (diferencirane ćelije raka)=12, NP_{MAX} (matične ćelije raka)=60).



Slika 4.41. Grafik efikasnosti Niklozamid sistema. Crvene linije na grafiku pokazuju prag broja ubijenih ćelija koji je neophodno dostići kako bi se sistem okarakterisao kao efikasan. Pod ovim uslovima Niklozamid sistem ne ubija matične ćelije raka (donja crvena linija pokazuje prag koji mora da se dostigne).

Sa grafika 4.41 je očigledno da nije postignuta zadovoljavajuća efikasnost. Pod ovim uslovima, Niklozamid sistem ubija samo deo ćelija raka, dok nema nikakav uticaj na matične ćelije raka (nije ubijena ni jedna). Minimalna injektovana doza bi bila značajno podcenjena, ako se u obzir ne uzme i stvarna dostupnost leka u sistemu.

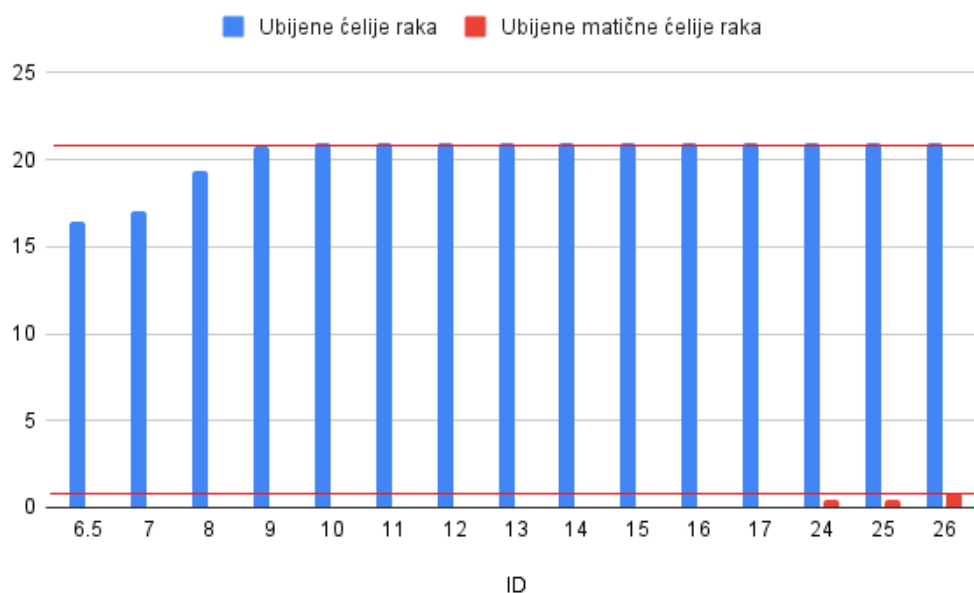


Slika 4.42. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPi). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano prvih 11 ćelija.

Grafici prikazani na slici 4.42. su u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima. Iako nanosistemi ulaze u ćelije, njihov broj nije dovoljno značajan da izazove ćelijsku smrt ni diferenciranih ni matičnih ćelija raka.

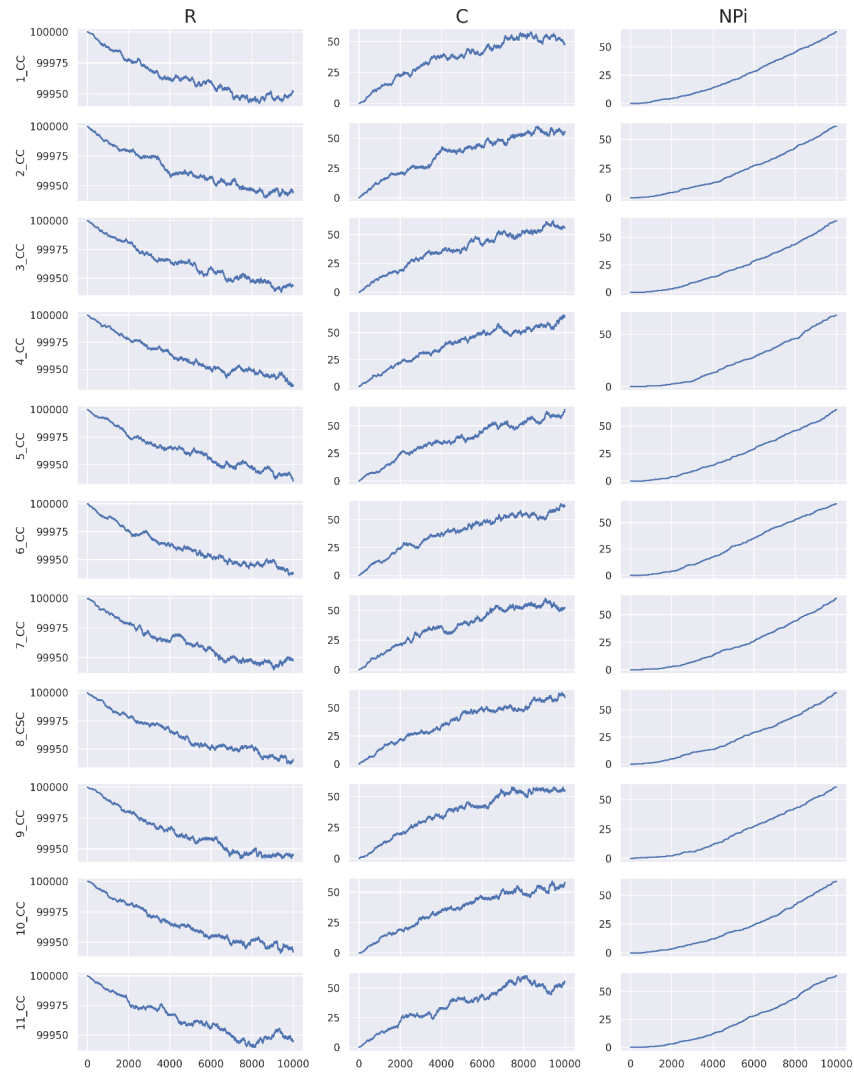
4.2.2.4. Određivanje minimalne injektovane doze sa izračunatim procentom dostupnog leka u sistemu

Da bi se utvrdilo u kojoj meri je potcenjena minimalna injektovana doza u prethodnoj grupi simulacija, određena je minimalna injektovana doza za Niklozamid sisteme sa 50 dostupnih molekula leka po nanosistemu. Kao i ranije, za svaku dozu pušteno je 5 simulacija i efikasnost je izračunata kao njihova prosečna vrednost. Da bi se sistem pokazao kao efikasan, odnosno, da bi se utvrdila optimalna doza, uslov je bio da nanosistem ubije $\geq 95\%$ ćelija raka i matičnih ćelija raka. Rezultati simulacija su prikazani na slici 4.43.



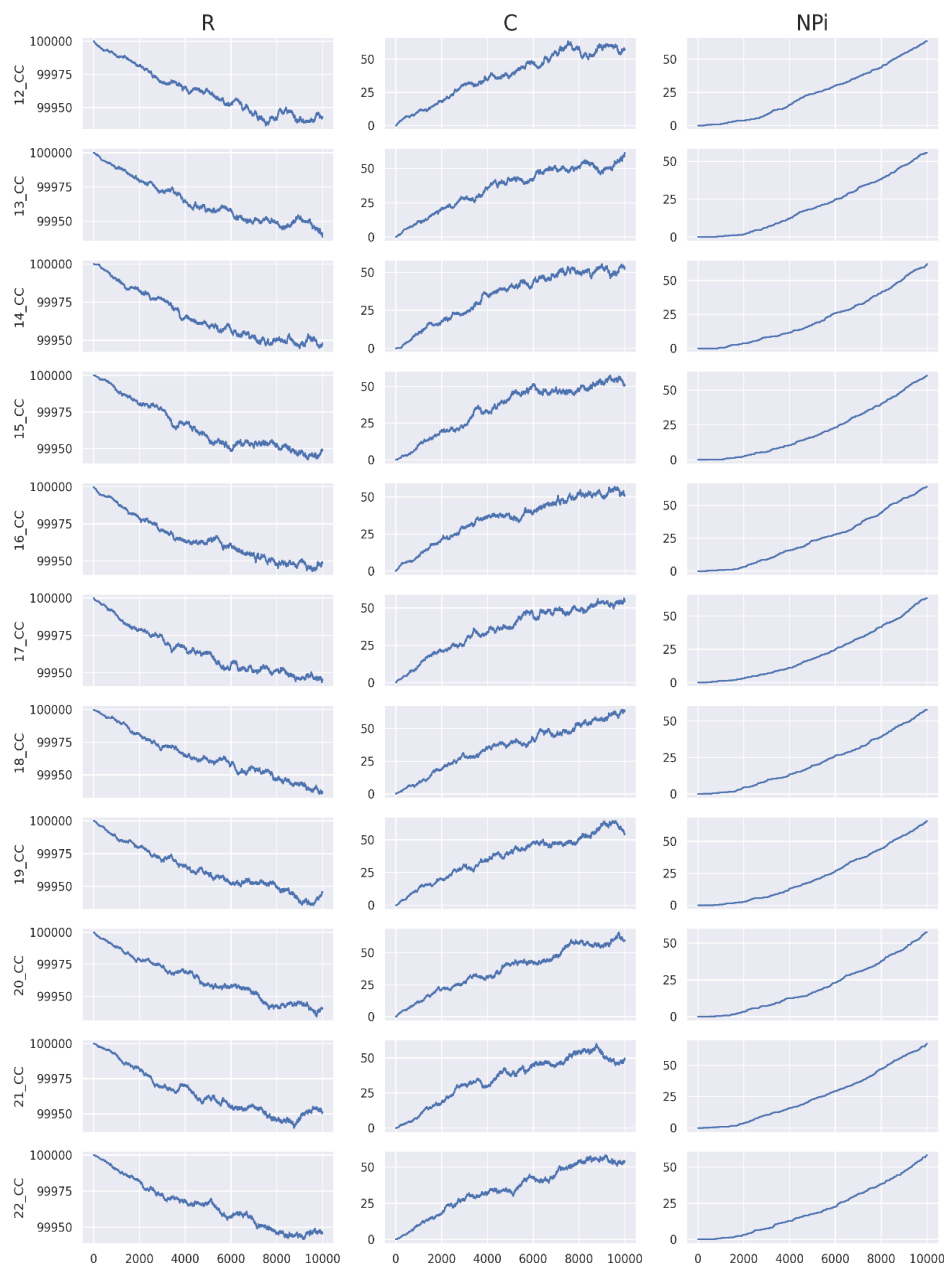
Slika 4.43. Grafik efikasnosti Niklozamid sistema. Crvene linije na grafiku pokazuju prag broja ubijenih ćelija koji je neophodno dostići kako bi se sistem okarakterisao kao efikasan.

Iako se sa grafika 4.43 može videti da Niklozamid sistem ubije sve ćelije raka već pri injektovanoj dozi od 9 μM , ne počne uopšte da ubija matične ćelije raka sve do 24 μM . Zadovoljavajuća efikasnost injektovane doze ($\geq 95\%$), dešava se tek pri koncentracijama od 26 μM . Do ovog efekta dolazi jer je IC_{50} vrednost Niklozamida prema njima izuzetno visoka, što znači da je neophodno da mnogo veći broj nanosistema stigne i uđe u ćeliju, da bi došlo do ćelijske smrti. Posledica toga je da se minimalna injektovana doza povećava 3 puta (sa 9 na 26 μM). Radi poređenja, u prethodnoj grupi simulacija gde je pretpostavljeno da je dostupnost leka 100%, određena minimalna injektovana doza bila je 6,5 μM , odnosno, ona je 4 puta manja (NP_{MAX} je niži kada se pretpostavlja dostupnost leka od 100%, odnosno, u tom slučaju NP_{MAX} za matične ćelije raka je 14, a za diferencirane ćelije 3).



Slika 4.44. Niklozamid sistem. Injektovana doza = 26 μM . Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (NPI). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano prvih 11 ćelija.

Na slikama 4.44-45 prikazan su grafici za injektovanu dozu od 26 μM . U ovom slučaju se može videti da pri ovoj injektovanoj dozi, dovoljan broj nanosistema stiže do svih ćelija i ulazi u njih u dovoljnoj koncentraciji da izazove ćelijsku smrt i diferenciranih i matičnih ćelija raka.



Slika 4.45. Prva kolona prikazuje broj slobodnih receptora po ćeliji u toku vremena (R), druga kolona prikazuje broj kompleksa nanosistem-receptor (C), treća kolona prikazuje broj nanosistema koji su ušli u ćeliju (Np). Redovi označavaju tip ćelije (CC - diferencirane ćelije raka, CSC - matične ćelije raka) kao i redni broj koji pokazuje njihovu udaljenost od vaskulature (npr. ćelija 1 je prva ćelija do krvnog suda). Na slici je prikazano dugih 11 ćelija.

Zaključak eksperimenta

Rezultati simulacija su pokazali da je dostupnost leka u ovakvom tipu nanosistema izuzetno važan parametar. Bez znanja o dostupnosti leka injektovana doza je značajno potcenjena, odnosno, efikasnost nanosistema je značajno manja.

4.2.3. Relativan uticaj parametara nanosistema na krajnji fiziološki efekat

Da bi se ispitao relativan uticaj parametara nanosistema na krajnji fiziološki efekat urađena je analiza osetljivosti modela.

U prvom koraku ispitano je koliko efikasnost sistema zavisi od odnosa NP_{MAX}/NP_0 . Rezultati su prikazani u tabeli 4.52.

Tabela 4.52. Uticaj promene odnosa NP_{MAX} / NP_0 na efikasnost nanosistema. % predstavlja procenat vrednosti NP_{MAX} od ukupnog broja nanosistema koji stižu do tumora (NP₀), #Ć predstavlja broj ubijenih ćelija raka tokom simulacije (Ukupan broj ćelija raka u isečku tumora = 22).

NPmax	100	%	#Ć	#Ć	#Ć	#Ć	#Ć	#Ć	#Ć	#Ć	#Ć	Prosek	% ubijenog tumora
NP ₀	1000	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	5	0	16	0	0	0	0	10	0	1	3	13,64
	3000	3,33	5	20	6	20	4	7	3	4	16	9	40,91
	4000	2.5	13	21	21	7	9	8	9	17	9	13	59,09
	5000	2	11	13	10	15	12	12	11	14	15	13	59,09
	6000	1,66	15	20	14	16	16	20	18	17	15	17	77,27
	7000	1,42	20	14	18	21	19	20	20	21	20	19	86,36
	8000	1,25	19	17	20	22	22	22	22	21	17	20	90,91
	9000	1,11	21	20	21	19	21	22	21	16	21	20	90,81
	10000	1	22	22	14	19	14	21	18	22	22	19	86,36

S obzirom na to da NP_{MAX} predstavlja broj nanosistema neophodnih da izazovu smrt jedne ćelije, broj nanosistema koji stigne do tumora, NP_0 , mora biti značajno veći. Rezultati pokazuju da njihov odnos ima izuzetno veliki uticaj na efikasnost. Kada se procenat koji čini NP_{MAX} menja u malom opsegu vrednosti od 1-10%, procenat ubijenog tumora varira u opsegu od 0-91%.

Zatim je ispitana pojedinačna osetljivost ovih parametara sa promenom vrednosti parametara koji opisuju nanosisteme.

Tabela 4.53. Osetljivost parametra NP0 sa promenom vrednosti injektovane doze, procenta injektovane doze koja stigne do tumora i broja molekula leka po nanosistemu.

NPO	ID	PID	E
STDEV	3,35E+05	3,31E+05	2,41E+04

Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 4.53) gde je standardna devijacija najveća u slučaju promena vrednosti injektovane doze, može se zaključiti da ovaj parametar ima najveći uticaj na vrednost NP0 od svih ispitivanih parametara, a u skladu sa prethodnim rezultatima (tabela 4.52) i veliki uticaj na efikasnost nanosistema. Iako u proračunu za NP0 figurira i molarna masa, ona nije uključena u ove rezultate. Razlog za to je uporedivost sa ostalim rezultatima. Opsezi u kojima su menjane ostale vrednosti ne predstavljaju mogući opseg vrednosti za ovaj parametar i samim tim rezultati bi bili obmanjujući. Međutim, kroz praktičan rad je ustanovljeno da je promena ovih vrednosti u realnom opsegu ima zanemarljiv uticaj na promenu vrednosti NP0.

Tabela 4.54. Osetljivost parametra NP_{MAX} sa promenom IC50 vrednost (P) i broja molekula leka po nanosistemu.

NPMAX	P	E
STDEV	4,80E+05	7,25E+03

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4.54 može se videti da iako i P i E značajno utiču na NP_{MAX}, doprinosi potentnosti leka (IC50) je značajniji.

4.3. Rezistentnost tumora i optimizacija tretmana korišćenjem veštačke inteligencije

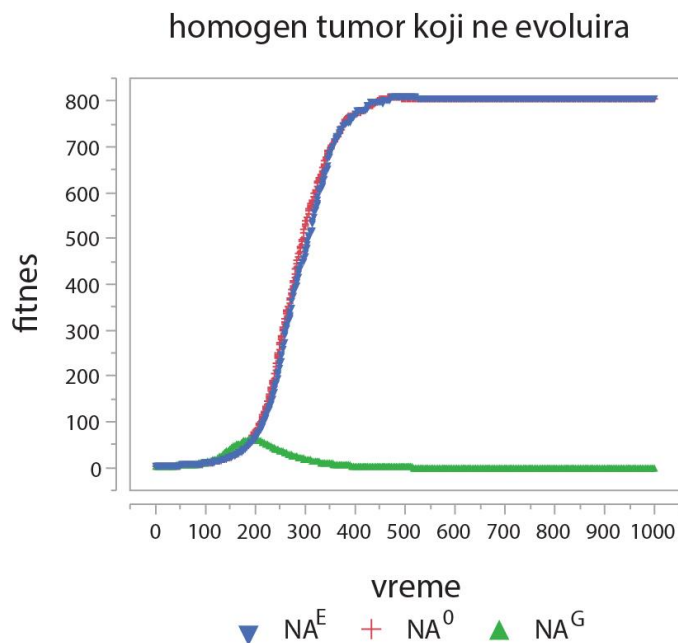
U prethodnim sekcijama, fokus je bio na ispitivanjima specifičnih nanosistema. Međutim, kao što je pomenuto u sekciji 3.5. kod dizajna nanosistema treba imati u vidu da postoji izuzetno veliki broj različitih parametara i kombinacija parametara koji utiču na krajnji fiziološki efekat i njihovo ispitivanje bi trajalo jako dugo. Problem se dodatno komplikuje kada se uzme u obzir i činjenica da se tumor stalno menja. Zbog toga se u ovoj sekciji fokus pomera se specifičnih detalja na apstraktniji nivo, gde se ne ispituju hemijski detalji već širi problem pristupa dizajniranju nanosistema. S obzirom na to da je cilj eksperimenata u ovoj sekciji bio da se

demonstrira pristup rešavanju problema dizajniranja nanosistema, model treba dalje razvijati jer trenutno nedostaju neophodni detalji koji bi omogućili da se ovaj model koristi u kliničkoj praksi. Da bi se to postiglo, i simulirani agenti i simulirani tumor moraju biti zasnovani na stvarnim parametrima dobijenim na osnovu fizičko-hemijskog ispitivanja nanočestica i fiziologije tumora. Nastavak ovog rada u okviru naše grupe (koji nije uključen u disertaciju) može se pronaći u referenci gde su evoluirani parametri mapirani u realne [117].

Takođe, iako u ovom modelu nedostaju realni parametri, ovo istraživanje je deo šireg evropskog projekta H2020 FET OPEN EVO-NANO u okviru kog je kreirana simulaciona platforma za veštačku evoluciju i validaciju novih nanočestica kao nosača antitumorskih lekova (nanosistema)[48]. U okviru navedene platforme koja uzima u obzir više vremenskih i prostornih skala uzimaju se u obzir parametri koji nedostaju u ovom modelu. Ova platforma korišćena je za eksperimente opisane u prethodnim poglavljima (opisani u sekcijama 2.3.1 i 2.3.2).

4.3.1. Homogeni tumor koji ne evoluiru

Ovde je testirana osnovna dinamika nano-agenata. Simulirano je njihovo ponašanje na najjednostavnijim modelu tumora - homogenom tumoru koji ne evoluiru.



Slika 4.46. Fitness evolucija NA^0 (nano-agenti koji ne mogu da uče), NA^E (nano-agenti koji evoluiraju) i NA^G (nano-agenti koji napadaju sve ćelije (i zdrave i ćelije raka), sa blagom pristrasnošću ka ćelijama raka) agenata.

U ovakvom scenariju, ponašanje svih tipova nano-agenata je identično (i onih koji evoluiraju i onih koji ne evoluiraju). Nano-agenti uspevaju da eliminišu ceo tumor i dostižu pik fitnesa u prvim vremenskim koracima. NA^0 agenti (nano-agenti koji ne uče) imaju najlošiji

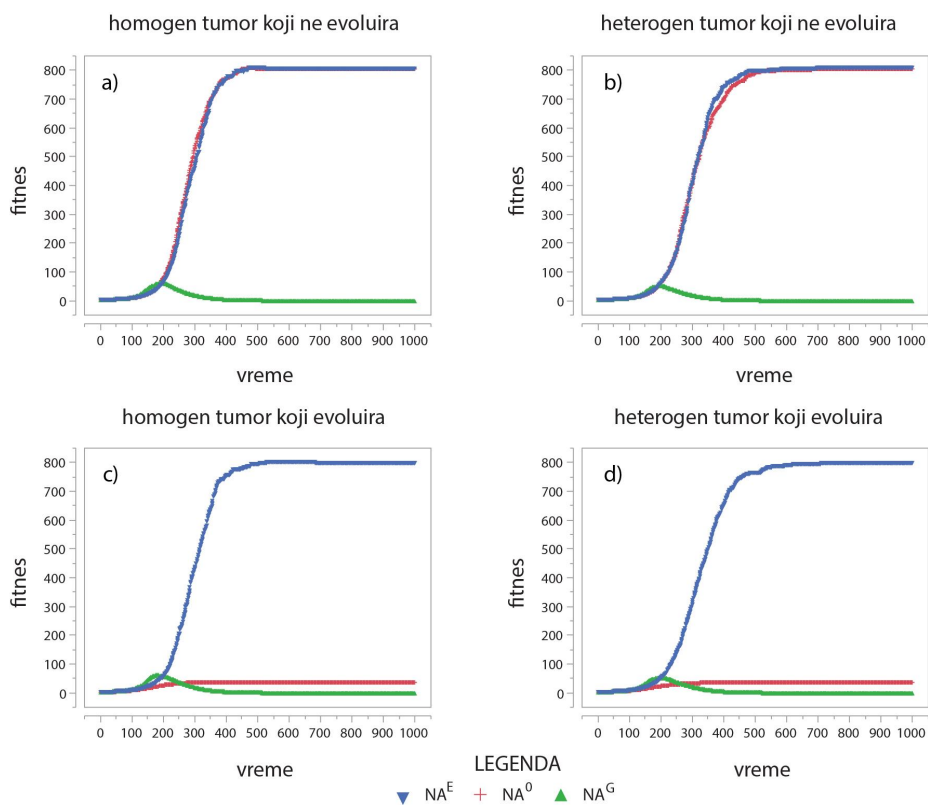
učinak. Iako uspeavaju da ubiju ceo tumor, oni takođe ubijaju i sve zdrave ćelije. S obzirom na visok podsticaj da se eliminišu matične ćelije raka - CSC (što je definisano fitness funkcijom) i nizak broj CSC, sva tri tipa nano-agenata eliminišu celokupnu populaciju CSC u prvih 40–60 generacija, tako da metastatični rezultat ostaje nizak.

Iako rezultat izgledaju obećavajuće, ovaj scenario tumora nije realističan, ali predstavlja dobru osnovu za ispitivanje osnovne dinamike modela.

4.3.2. Rezistentnost tumora

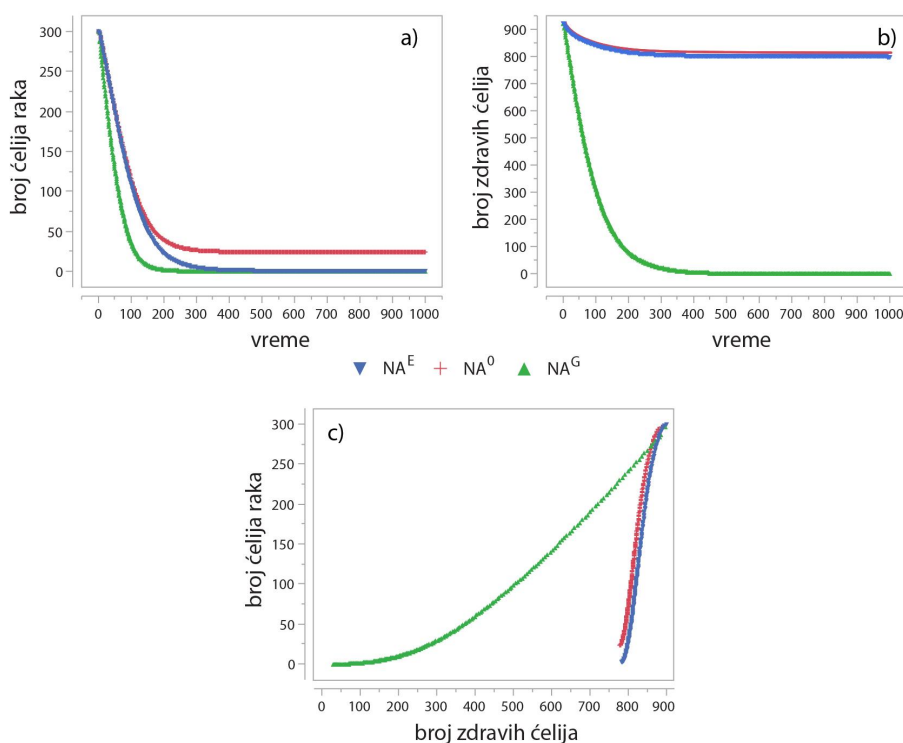
U ovoj grupi eksperimenata simulirane su evolucije sve tri klase nano-agenata u tri scenarija tumora:

1. Tumor sa inherentnom rezistencijom;
2. Tumor sa stečenom rezistencijom;
3. Tumor i sa inherentnom i sa stečenom rezistencijom koji predstavlja najrealniji scenario tumora.

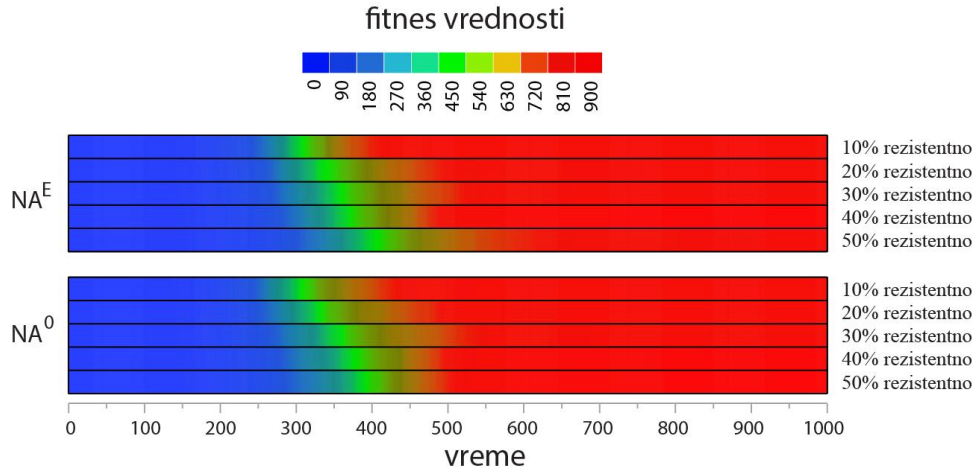


Slika 4.47. Fitness evolucija nano-agenata za različite scenarije tumora. Na^0 (nano-agenti koji ne mogu da uče), NA^E (nano-agenti koji evoluiraju) i NA^G (nano-agenti koji napadaju sve ćelije (i zdrave i ćelije raka), sa blagom pristrasnošću ka ćelijama raka) agenata. Heterogeni tumori imaju 10% rezistentnih ćelija.

U svim ovim izazovnijim scenarijima, nano-agenti koji evoluiraju, NA^E pokazuju sličnu efikasnost. U prvih 400-500 generacija nauče da prepoznaju i ubiju sve ćelije raka (slika 4.47 b,c,d), dok zdrave ćelije održavaju uglavnom netaknute, što je prikazano na slici 4.48. U scenariju gde tumor ne evoluira, NA^0 agenti (koji ne mogu da uče) pokazuju slično ponašanje kao i NA^E agenti. Jedina razlika je u tome što NA^0 agenti brže dostižu vrhunac fitnesa od NA^E agenata, bez obzira na početni procenat rezistentnih tumorskih ćelija (slika 4.49). Razlog za to je funkcija algoritma učenja kod NA^E agenata. Kao što je pomenuto, NA^0 agenti ne uče tokom simulacije, tako da oni odmah kreću sa ubijanjem ćelija raka. Nasuprot tome, NA^E agenti koji evoluiraju imaju ograničenu memoriju (maksimalnu memoriju) i mogu da “zaborave” stare informacije. U skladu sa tim, kako bi ubili sve ćelije raka, neki NA^E agenti moraju da ponovo nauče da prepoznaju različite ćelije raka. Proces zaboravljanja i ponovnog učenja stvara kašnjenje. Kašnjenje nestaje kada se ograničenje memorije poveća na 10.

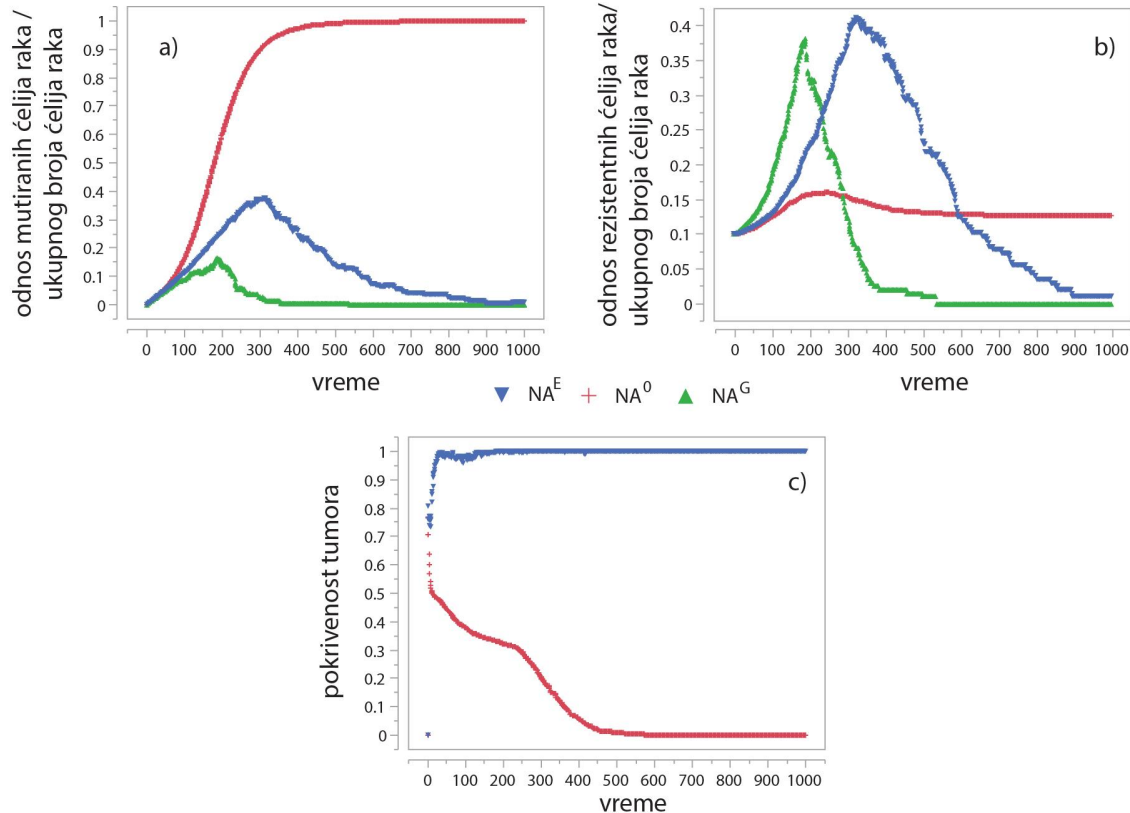


Slika 4.48. Efikasnost sve tri klase nano-agenata u scenariju heterogenog tumora koji evoluira. a) broj ćelija raka u funkciji vremena, b) broj zdravih ćelija u funkciji vremena, c) odnos između broja zdravih ćelija i broja ćelija raka.



Slika 4.49. Fitnes evolucija NA^0 i NA^E agenata za scenario heterogenog tumora koji ne evoluiraju. Procenat rezistentnosti ukazuje na inicijalni broj ćelija raka sa modifikatorima rezistentnosti.

U scenarijima gde imamo homogen i heterogen tumor koji evoluiraju, NA^E agenti pokazuju svoj puni potencijal u poređenju sa NA^0 i NA^G agentima. U oba evolutivna scenarija, tumor je uspeo kroz evoluciju da "izbegne" NA^0 agente tako što je postao potpuno sačinjen od mutiranih ćelija (za heterogene tumore videti sliku 4.50). Ovo nije slučaj kada se tumor tretira sa NA^E i NA^G agentima. Procenat mutiranih ćelija raste na početku simulacije, ali zatim naglo opada. NA^G agenti mogu da eliminišu sve ćelije raka odmah na početku simulacije, bez učenja i prepoznavanja, pa je maksimalni dostignuti procenat mutiranih ćelija prilično nizak. Međutim, kada se oba tipa tumora (homogen i heterogen) tretiraju sa NA^E agentima, broj mutiranih ćelija dostiže 40% i njihov pik se javlja otprilike 100 vremenskih koraka kasnije nego u slučaju NA^G agenata. S obzirom na to da ovo kašnjenje dostiže vrhunac fitnesa u scenariju tumora koji ne evoluiraju, objašnjenje je u procesu učenja. Nasuprot NA^G agentima, da bi NA^E agenti eliminisali sve mutirane ćelije raka, oni moraju kontinualno da uče, pamte i konačno, ponovo uče svoje okruženje. Zbog toga su u ovom scenariju NA^E agenti nešto sporiji u eliminisanju ćelija raka od NA^G agenata.

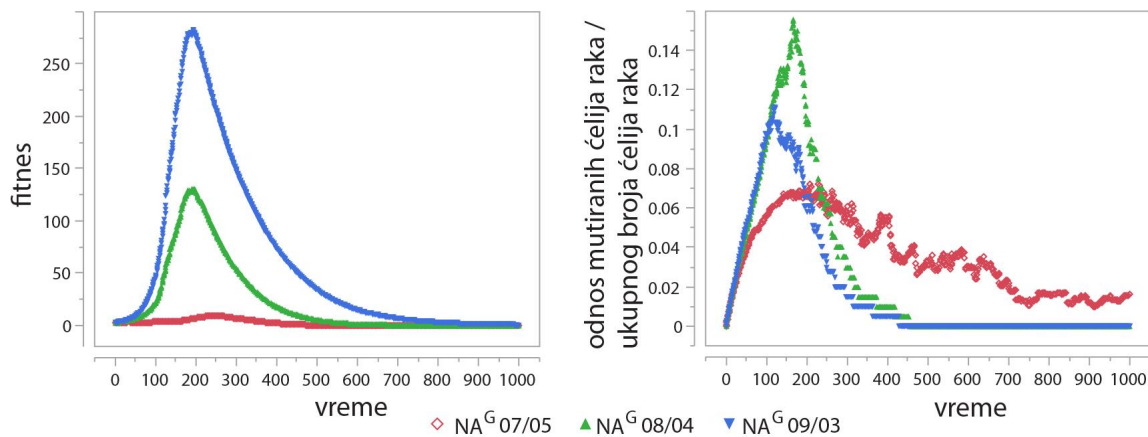


Slika 4.50. Ponašanje heterogenog tumora koji evoluira u različitim režimima lečenja. a) Vremenska evolucija odnosa fenotipa mutiranih ćelija i ukupnog broja ćelija raka, b) vremenska evolucija odnosa rezistentnih ćelija raka i ukupnog broja ćelija raka, c) Pokrivenost tumora je odnos broja tipova ćelija raka koje nano-agenti mogu da prepoznaju i ukupnog broja ćelija raka. NA^G agenti nisu pokazani jer oni uvek prepoznaju sve tipove ćelija, pa je njihova pokrivenost uvek 1.

U scenariju heterogenog rezistentnog (koja je predstavljena pomoću heterogenosti rezistentnosti ćelija) tumora koji evoluira, može se videti sličan trend za NA^E i NA^G agente (slika 4.50b). Procenat rezistentnih ćelija prvo raste zbog selektivnog pritiska: nano-agenti mogu mnogo lakše da ubiju nerezistentne ćelije, tako da se one prve eliminišu. Ovo ostavlja više prostora za deobu rezistentnijih ćelija. Sa NA^E i NA^G tretmanima, procenat rezistentnih ćelija raste do otprilike 40%, ali su pik i trajanje rezistentnosti tumora dosta niži za NA^G tretman. Kao što je pomenuto, NA^G agenti ne moraju da troše vreme da nauče da se adaptiraju na nove tipove rezistentnih ćelija raka koje nastaju kao što je to slučaj kod NA^E agenata. Bez obzira na to, NA^E agenti su veoma efikasni u procesu učenja prepoznavanja skoro svih fenotipa koji nastaju (slika 4.50c). Treba im manje od 100 generacija da nauče da prepoznaju sve novonastale fenotipe ćelija raka. U sličaju NA^0 tretmana, samo deo inicijalnih ćelija raka koje su prepoznate su eliminisane, dok ostatak tumora uspeva da izbegne prepoznavanja preko mutacija fenotipa. Nerezistentne ćelije imaju veću verovatnoću da prve budu eliminisane tako da se procenat rezistentnih ćelija samo malo poveća i onda ostaje konstantan.

Iako NA^G agenti uvek najbrže eliminišu ćelije tumora, i mogu da napadaju i mutirane i rezistentne ćelije, njihova efikasnost je konstantno najbolja. Najviše zbog toga što pored ćelija raka, ubiju i zdrave ćelije (slika 4.48b). Dodatno je testirano nekoliko scenarija gde je ispitan

afinitet ovog tipa agenata za ubijanje ćelija raka povećanjem verovatnoće napada na ćelije raka, i smanjenjem verovatnoće napada na zdrave ćelije (slika 4.51).

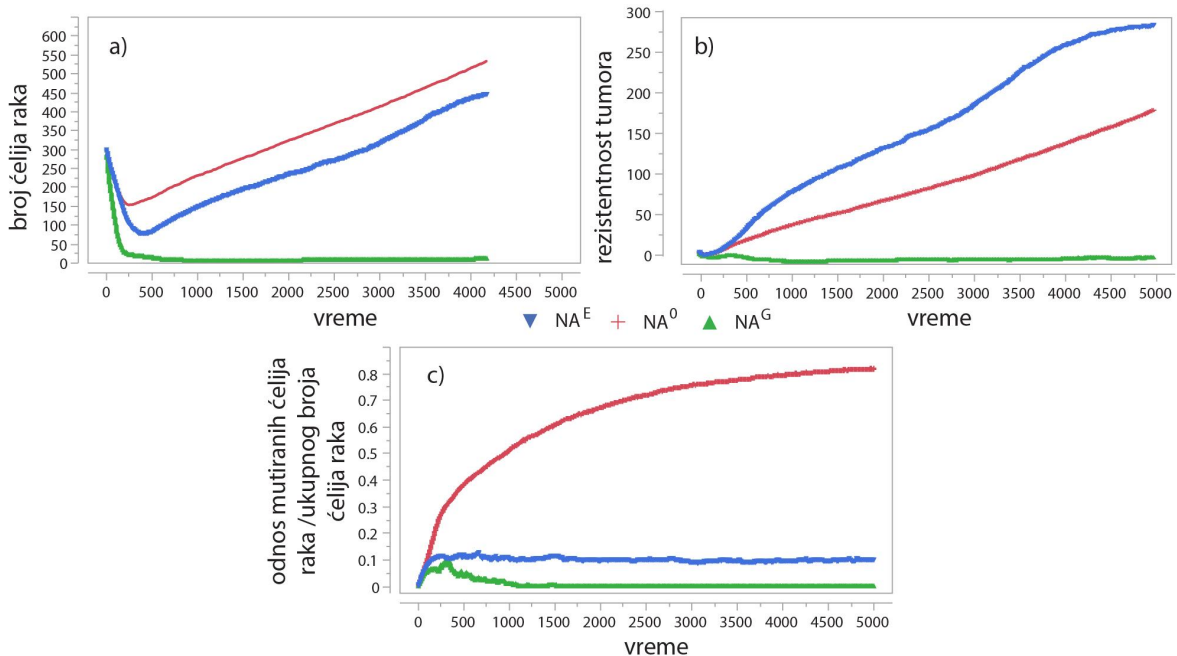


Slika 4.51. a) Fitness i b) odgovor tumora mutiranjem na tretman NA^G agentima sa različitim afinitetima prema ćelijama raka. U dodatku na osnovnu vrednost iz tabele 3.24, sekcija 3.5.2. (ovde označenom kao NA^G 07/05) za koje su p_a , p_i , p_k i p_{sd} vrednosti 0,7 (kada napadaju ćelije raka) i 0,5 (kada napadaju zdrave ćelije), takođe su testirane vrednosti NA^G 08/04 i NA^G 09/03.

Kao što je i očekivano, veći afinitet prema ćelijama raka dovodi do oštrijeg povećanja fitnessa, ali na kraju, zbog ubijanja zdravih ćelija, fitness konvergira ka nuli za sve ispitane slučajeve.

4.3.3. Tumor koji raste

Da bi se ispitao da li će tumor koji raste značajno promeniti ishod tretmana sa NA, simuliran je heterogen, evoluirajući tumor sa sledećim stopama rasta: 0,01, 0,005 i 0,0001.



Slika 4.52. Ponašanje heterogenom tumora koji evoluira i raste u različitim režimima tretmana (stopa raste = 0,01). a) Vremenska evolucija ukupnog broja ćelija raka, b) vremenska evolucija rezistentnosti tumora, definisana kao suma efekata rezistencije svih živih ćelija raka, c) vremenska evolucija odnosa mutiranih fenotipa ćelija raka i ukupnog broja ćelija raka.

Kao što je i očekivano, za veće stope rasta, nano-agentima treba više vremena da eliminišu sve ćelije raka. Za stopu rasta od 0,001, NA^E agentima treba oko 500 generacija (u poređenju sa otprilike 300 generacija za tumor koji ne raste (slika 4.48a)), dok za stopu rasta od 0,005 neophodno vreme je mnogo duže (skoro 5000 generacija). Samo u slučaju najbržeg rasta tumora (stopa rasta = 0,01), nakon inicijalno naglog opadanja, populacija preostalih ćelija raka počinje da raste (slika 4,52a) i na kraju postaje veća od originalnog tumora.

Za sve testirane stope rasta, rezistentnost tumora polako raste (primer je slika 4.52b), najviše kao rezultat uvećanja verovatnoće disocijacije od 50 puta. Ovo je suprotno od slučaja kada imamo tumor koji ne raste gde verovatnoće asocijacije, disocijacije i internalizacije ostaju konstantne tokom čitave simulacije. Takvo neslaganje jer rezultat drugačijih strategija preživljavanja. U tumoru koji ne raste, broj ćelija je fiksiran pa ne postoji mogućnost za odabir bilo kog svojstva koje će proliferirati, evoluirati i postati dominantno svojstvo kroz generacije. Međutim, u slučaju tumora koji raste, činjenica da može doći do ćelijske deobe daje tačno tu priliku rezistentnijim ćelijama. Izgleda da je svojstvo ćelija raka koje je najviše favorizovano verovatnoća disocijacije (verovtnoća internalizacija je uglavnom konstantna, dok se verovatnoća asocijacije malo povećava).

Istovremeno, procenat mutiranih ćelija raka pokazuje očekivan trend: pri NA^0 tretmanu, populacija ćelija raka kroz mutiranje polako uspeva da izbegne tretman, dok evolucija otvorenog-tipa kod NA^E agenata može kontinualno da pronalazi novonastale mutirane ćelije i da ih drži pod kontrolom (slika 4.52a).

Zaključak eksperimenata

U ovom modelu, cilj je bio da se demonstrira da evolucija nano-agenata otvorenog tipa može da dovede do kreiranja adaptivne i kombinatorne terapije koja može da eliminiše heterogen tumor koji raste i evoluira.

5. Zaključak

Glavni cilj ove doktorske disertacije bio je razvijanje modela odabranih nanosistema i računarsko simuliranje njihove strukture i fiziološkog efekta.

Za istraživanja su korišćeni modeli koji obuhvataju više vremenskih i prostornih skala (nivo molekula - molekulska dinamika, nivo ćelije - stohastičke reakciono-difuzione reakcije, nivo tumora - modelovanje zasnovano na agentima).

Opšti zaključak ovog istraživanja je da je teorijski pristup komplementaran eksperimentima jer na ovaj način možemo detaljno ispitati aspekte koje je nemoguće eksperimentalno testirati. Simulacije na više različitih nivoa mogu povezati različite vremenske i prostorne rezolucije čime se može dati preliminarna procena efikasnosti nanosistema u fiziološkim uslovima. Ovaj pristup je znatno brži i zahteva mnogo manje resursa od isključivo eksperimentalnog pristupa što može dovesti do povećanja uspešnosti i brzine dovođenja novih nanosistema u kliničku praksu.

Opšti zaključak izveden je osnovu dole navedenih pojedinačnih zaključaka dobijenih na osnovu opisanih rezultata:

Hidrofobnost nošenog leka ima dominantan uticaj na strukturu funkcionalizovanih nanočestica. Tendencija sistema da smanji hidrofobnu površinu dostupnu rastvaraču direktno utiče na konfiguraciju liganada, debljinu monosloja, stabilnost sistema, dostupnost leka na površini i veličinu cele funkcionalizovane nanočestice.

Kod heterogeno funkcionalizovanih nanosistema pokazano je da uticaj početne konfiguracije (janus ili nasumične) zavisi od hidrofobnosti sistema. Za sisteme koji nose hidrofилnije lekove, janus konfiguracija je optimalnija, dok je za hidrofobne nasumična.

Simulacije nanočestica funkcionalizovanih homogenim monoslojem su ukazale na to da svi ispitani hidrofobni sistemi zauzimaju isti "tip" konfiguracije gde je dostupnost leka na površini oko 35%, dok je u slučaju hidrofилnijih oko 55%.

Simulacije sistema homogeno funkcionalizovanih cviterjonskim ligandima su takođe u skladu sa ovim rezultatima. "Tip" strukture i dinamika monosloja bili su konzistentni kroz sve sisteme i dostupnost terminalnog kraja liganda je bila oko 55%, kao i kod hidrofилnijih sistema.

Kod heterogenih sistema, uvođenje manjih koncentracija pozadinskog liganda dovodi do stabilizacije sistema i nema značajnog uticaja na dostupnost leka, odnosno, interakcije između liganada koji nose lek i pozadinskih liganada ne doprinose značajno promeni strukture. Međutim, pri uvođenju većih koncentracija pozadinskog liganda, dostupnost leka naglo opada i sistem se destabilizuje. Opšti zaključak je da iako pozadinski ligandi imaju veliku ulogu u funkcionalizaciji (stabilizuju strukturu, povećavaju rastvorljivost, smanjuju verovatnoću formiranja proteinske korone), treba biti izuzetno pažljiv po pitanju ravnoteže između ova dva tipa liganada, jer pri većim koncentracijama pozadinskog liganda dolazi do narušavanja strukture kompleksa a time i do umanjivanja njegove fiziološke efikasnosti.

Dužina liganada korišćenih za funkcionalizaciju takođe ima značajan uticaj na strukturu nanosistema (konformaciju, konfiguraciju, stabilnost i dostupnost lekova). Sistemi sa kratkim ligandima su se pokazali kao najoptimalniji.

Kod ispitivanja uticaja veličine jezgra od zlata pokazano je da je kod malih funkcionalizovanih nanočestica (~15 nm) najoptimalnije koristiti veće prečnike jezgra od zlata jer su se ti sistemi pokazali kao stabilniji i dostupnost leka je bila veća.

Tip intramolekulskih interakcija koji se javlja u nanosistemima se može objasniti strukturom liganada. U nanosistemima koji su funkcionalizovani molekulima koji imaju veliki broj proton donora i akceptora pretežno se javljaju vodonične veze, dok u slučaju sistema sa manjim brojem donora i akceptora, i dodatno sa π -sistemima dominiraju hidrofobne interakcije. Predviđanje dominantnog tipa interakcija u monosloju može biti izuzetno korisno za dizajn nanosistema kako bi uspešno savladali prepreke sa kojima se susreću u organizmu (npr. izbegavanje formiranja proteinske korone).

Simulacije fluorescentnih nanočestica su pokazale da ovi sistemi mogu biti dobar model sistem nanočestica funkcionalizovanih API ligandima koji nose hidrofilne lekove. Ligandi pokazuju slično ponašanje u kontekstu kretanja i savijanja. Iako postoje značajna odstupanja od svih sistema po pitanju veličine i debljine monosloja, ove razlike, dokle god se imaju na umu pri tumačenju rezultata, u slučaju eksperimenata mogu biti zanemarene. Najvažnija napomena jeste da "najvernije preslikavanje" željene strukture nije uvek najbolji pristup (zamena leka na terminalnom kraju liganda fluorescentnim molekulom). Zbog veličine ovih molekula, konačna struktura model sistema se može razlikovati od konačne strukture sistema kog želimo da ispitamo. Ali to se može prilagoditi korišćenjem drugačijih relativnih koncentracija liganada na površini nanočestice zlata.

U simulacijama nanosistema pri različitim uslovima, svi sistemi su se pokazali kao stabilni, odnosno, promene u strukturi nanosistema su minimalne. Pored inertnosti zlatnih nanočestica, osobina površine koja omogućava širok spektar mogućnosti njihove funkcionalizacije, ovo predstavlja još jednu prednost korišćenja zlatnih nanočestica kao nosača antitumorskih lekova.

Kroz stohastičke simulacije pokazano je da je precizna karakterizacija strukture od izuzetne važnosti kod ispitivanja fiziološke efikasnosti nanosistema. Precizno određivanje dostupnosti leka u sistemu pokazano je kao kritično. Ovaj nivo preciznosti je teško dobiti eksperimentalno što ukazuje na važnost korišćenja teorijskih metoda (konkretno simulacija molekulske dinamike) kao komplementarnih eksperimentalnom pristupu.

U ovim simulacijama je takođe pokazano da se matične ćelije raka moraju uzeti u obzir i pri dizajnu nanosistema, i pri proceni njihove fiziološke efikasnosti. Odnosno, nije dovoljno kao cilj odabrati samo specifične, diferencirane ćelije raka, jer će efikasnost sistema zavisiti u velikoj meri od potentnosti prema matičnim ćelijama raka.

Kroz analizu osetljivosti modela pokazano je da na efikasnost nanosistema najveći uticaj ima odnos broja nanosistema koji stižu do tumora (NP_0) i broja nanosistema neophodnih da izazovu ćelijsku smrt (NP_{MAX}). Detaljnijim ispitivanjem ovih parametara zaključak se proširuje na injektovanu dozu i IC_{50} vrednost leka.

U modelu rezistentnosti tumora korišćenjem veštačke inteligencije demonstrirano je da evolucija nano-agenata otvorenog tipa može da dovede do kreiranja adaptivne i kombinatorne terapije koja može da eliminiše heterogen tumor koji raste i evoluira. Međutim, model treba dalje

razvijati jer nedostaju neophodni detalji koji bi omogućili da se ovaj model koristi u kliničkoj praksi. Da bi se to postiglo, i simulirani agenti i simulirani tumor moraju biti zasnovani na stvarnim parametrima dobijenim na osnovu fizičko-hemijskog ispitivanja nanočestica i fiziologije tumora. Ovo istraživanje je deo šireg evropskog projekta H2020 FET OPEN EVO-NANO u okviru kog je kreirana simulaciona platforma za veštačku evoluciju i validaciju novih nanočestica kao nosača antitumorskih lekova (nanosistema)[48]. Cilj platforme je da ubrza testiranje i optimizuje dizajn novih terapijskih nanosistema. U okviru navedene platforme uzimaju se u obzir parametri koji nedostaju u ovom modelu (parametri nanosistema kao i fiziologija tumora).

U uvodu je pomenuto da nanosistemi imaju veliki potencijal u oblasti dostave lekova, ali da uprkos napretku i potencijalno velikim prednostima nad klasičnom terapijom, samo je mali broj tretmana raka zasnovanih na nanočesticama odobren. Dizajn nanosistema mora biti kompleksan kako bi savladali sve prepreke u organizmu koje sam lek ne može, međutim, to značajno otežava njihovu karakterizaciju i predviđanje njihove efikasnosti. Sam eksperimentalni pristup rešavanju ovog problema je dugotrajan i skup. Takođe, zbog neophodne rezolucije za ispitivanje nekih aspekata, eksperimentalni pristup u nekim slučajevima tehnički nije moguć.

Reference

- [1] Liu H., et al. (2015), *Chemotherapy targeting cancer stem cells*, American Journal of Cancer Research, 5, 880-893.
- [2] Schirmacher V. (2018), *From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce side-effects of systemic cancer treatment*, International Journal of Oncology, 54, 407-419.
- [3] Carey M. P., et al (1988), *Etiology and treatment of the psychosocial side effects associated with cancer chemotherapy: A critical review and discussion*. American Psychological Association, 104, 307-325.
- [4] Wilhelm S., et al (2016), *Analysis of nanoparticle delivery to tumours*, Nature reviews materials, 1, 16014.
- [5] McGuire S. (2015), *World Cancer Report 2014*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press.
- [6] Schirmacher V. (2017), *Quo Vadis Cancer Therapy? Fascinating discoveries of the last 60 years*. Lambert Academic Publishing; pp. 1–353.
- [7] Koeppen B.M., Stanton B.A. (2018), *Berne and Levy Physiology*. 7th edition. Elsevier; Amsterdam.
- [8] Yetisgin A.A., et al. (2020), *Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications*, Molecules, 25, 2193.
- [9] Zamboni W.C., et al. (2012), *Best practices in cancer nanotechnology: Perspective from NCI nanotechnology alliance*, Clinical Cancer Research, 18, 3229-41.
- [10] de la Fuente, J.M., Grazu, V. (2012), *Nanobiotechnology: Inorganic nanoparticles vs organic nanoparticles*. Elsevier, Amsterdam.
- [11] Iwamoto T. (2013), *Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy: Review of the Efficacy and Side Effects of Approved drugs*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 36, 715-718.
- [12] Wicki A., et al. (2015), *Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, Opportunities, and clinical applications*, Journal of Controlled Release, 200, 138-157.
- [13] Maeda H., et al. (2013), *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumours: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumour imaging in vivo*, Advanced Drug Delivery Reviews, 65, 71-79.
- [14] Kim, D., et al. (2018), *Synthesis and biomedical applications of multifunctional nanoparticles*, Advanced Materials Interfaces, 30, 1802309.
- [15] Ahmad, A., et al. (2019), *Precision cancer nanotherapy: Evolving role of multifunctional nanoparticles for cancer active targeting*, Journal of Medicinal Chemistry, 62, 10475-10496.
- [16] Sau, S., et al. (2018), *Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy: A groundbreaking approach for reprogramming malfunctioned tumor environment*, Journal of Controlled Release, 274, 24-34.
- [17] Kim, K.-S., et al. (2019), *Multifunctional nanoparticles for genetic engineering and bioimaging of natural killer (NK) cell therapeutics*, Biomaterials, 221, 119418.

- [18] Ray, P., et al. (2019), *Size-transformable, multifunctional nanoparticles from hyperbranched polymers for environment-specific therapeutic delivery*. ACS Biomaterial Science and Engineering, 221, 119418.
- [19] Liu, Y., et al. (2018), *Dual pH-responsive multifunctional nanoparticles for targeted treatment of breast cancer by combining immunotherapy and chemotherapy*. Acta Biomaterialia, 15, 310-324.
- [20] Nichols, J.W., Bae, Y.H. (2012), *Odyssey of a cancer nanoparticle: from injection site to site of action*. Nano Today (2012), 7, 606-618.
- [21] Bouzo, B.L., et al. (2020), *In vitro-In silico modeling approach to rationally designed simple and versatile drug delivery systems*. The Journal of Physical Chemistry B., 124, 5788-5800.
- [22] Fratoddi I., et al. (2015), *How toxic are gold nanoparticles? The state of the art*, Nano Research, 8, 1771-1799.
- [23] Kumar A., et al. (2013), *Gold nanoparticles: emerging paradigm for targeted drug delivery system*, Biotechnology Advances, 31, 593-606.
- [24] Haume K., et al. (2016), *Modelling of gold nanoparticle coatings for medical applications*, The European Physical Journal D, 70, 181.
- [25] Rana S., et al. (2012), *Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications*, Advanced Drug Delivery Reviews, 64, 200-216.
- [26] Marson D., et al. (2019), *Mixed fluorinated/hydrogenated self-assembled monolayer-protected gold nanoparticles: In silico and in vitro behaviour*, Small, 1900323.
- [27] Van Lehn R.C., et al. (2013), *Structure of mixed-monolayer-protected gold nanoparticles in aqueous salt solution from atomistic molecular dynamics simulations*, The Journal of Physical Chemistry, 117, 20104-20115.
- [28] Chapter: Kovacevic M., Balaz I. *The Role of Molecular Dynamics Simulations in Multiscale Modeling of Nanocarriers for Cancer Treatment*, Balaz I., Adamtzky A. (Editors), (2022) Cancer, Complexity, Computation, Springer Nature Switzerland AG
- [29] Chrastina, A., et al. (2011), *Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 3, 421-437.
- [30] Peer D., et al. (2007), *Nanocarriers as emerging platform for cancer therapy*, Nature Nanotechnology, 2, 751-760.
- [31] Yamashita, F., Hashida, M. (2013), *Pharmacokinetic considerations for targeted drug delivery*. Advanced drug delivery reviews, 65, 139-147.
- [32] Stallard M.J.G., et al. (1990), *Distribution of doxorubicin to normal breast and tumour tissue in patients undergoing mastectomy*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 25, 286-290
- [33] Torrice, M. (2016), *Does Nanomedicine Have a Delivery Problem?*, ACS Central Science, 2, 434-437.
- [34] Murugan, C., et al. (2016), *Combinatorial nanocarrier based drug delivery approach for amalgamation of anti-tumor agents in breast cancer cells: an improved nanomedicine strategy*, Scientific Reports, 6, 34053.
- [35] Zhao, M., et al. (2020), *Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma*, Theranostics, 1, 1355-1372.
- [36] Shi J., et al. (2017), *Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities*, Nature reviews cancer, 17, 20-37.

- [37] Swierczewska M., et al. (2018), *Evaluating nanomedicines: Obstacles and advancements*, Methods in Molecular Biology, 1628, 3-16.
- [38] Xu S., et al. (2005), *Generation of monodisperse particles by using microfluidics: control over size, shape, and composition*, Angewandte Chemie International Edition in English, 44, 724-728.
- [39] Wei A., et al. (2012), *Challenges and Opportunities in the advancement of nanomedicines*, Journal of Controlled Release, 164, 236-246.
- [40] Crist R.M., et al. (2013), *Common pitfalls in nanotechnology: lesson learned from NCI's nanotechnology characterization laboratory*. Integrative Biology (Camb), 5, 66-73.
- [41] Grossman J.H., et al. (2016), *Early development challenges for drug products containing nanomaterials*. The AAPS Journal, 19, 92-102.
- [42] Rennick J.J., et al. (2021), *Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics*, Nature Nanotechnology, 16, 266-276.
- [43] Adiseshalah, P.P., et al. (2009), *Nanomaterial standards for efficacy and toxicity assessment*, WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2, 99-112.
- [44] Versypt, A.N. (2021), *Multiscale modeling in disease*. Current Opinion in Systems Biology, 27, 100340.
- [45] Schlick, T. (2002), *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- [46] Deisboeck T.S., et al. (2011), *Multiscale Cancer Modeling*, Annual Review of Biomedical Engineering, 13, 127-155.
- [47] Mellor H.R., Callaghan R. (2021), *Accumulation and distribution of doxorubicin in tumour spheroids: the influence of acidity and expression of P-glycoprotein*, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 68, 1179-1190.
- [48] Stillman N.R., et al. (2021), *Evolutionary computational platform for the automatic discovery of nanocarriers for cancer treatment*, npj Computational Materials, 7, 150.
- [49] Stillman N.R., et al. (2020), *In silico modelling of cancer nanomedicine, across scales and transport barriers*, npj Computational Materials, 6, 92.
- [50] Ghaffarizadeh A., et al. (2018), *PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems*, PLOS Computational Biology, 14, e1005991.
- [51] Ghaffarizadeh A., et al. (2016), *BioFVM: an efficient, parallelized diffusive transport solver for 3-D biological simulations*, Bioinformatics, 32, 1256-1258.
- [52] Chakraborty S., Rahman T. (2012), *The difficulties in cancer treatment*, Ecancer medical science, 6, ed16.
- [53] Hill R.P., Perris R. (2007), *Destemming cancer stem cells*, Journal of the National Cancer Institute, 99, 1435-1440.
- [54] Vinogradov S., Wei X. (2012), *Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine*, Nanomedicine, 7, 597-615.
- [55] Kurtova A.V., et al. (2015), *Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance*, Nature, 517, 209-213.
- [56] Relation T., et al. (2017), *Concise Review: An (Im)Penetrable Shield: How the Tumor Microenvironment Protects Cancer Stem Cells*, Stem Cells, 35, 1123-1130.
- [57] Chen K., et al. (2013), *Understanding and targeting cancer stem cells: Therapeutic implications and challenges*, Acta Pharmacologica Sinica, 34, 732-740.

- [58] Peitz`C., et al. (2017), *Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases*, *Seminars in Cancer Biology*, 44, 10-24.
- [59] Battle E., Clevers H. (2017), *Cancer stem cells revisited*, *Nature Medicine*, 23, 1124-1134.
- [60] Prasetyanti P.R., Medema J.P. (2017), *Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective*, *Molecular Cancer*, 16, 1-9.
- [61] Pietras A. (2011), *Cancer Stem Cells in Tumor Heterogeneity*, Elsevier Inc.
- [62] Rich J.N. (2016), *Cancer stem cells: Understanding tumor hierarchy and heterogeneity*, *Medicine (United States)*, vol. 95, no. 1, pp. S2–S7, 2016.
- [63] Plaks V. et al. (2015), *How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?*, *Cell Stem Cell*, 16, 225-238.
- [64] Visvader J.E., Lindeman G.J. (2012), *Cancer stem cells: Current status and evolving complexities*, *Cell Stem Cell*, 10, 717-728.
- [65] Friberg S., Nystrom A.M. (2016), *Nanomedicine: will it offer possibilities to overcome multiple drug resistance in cancer?*, *Journal of Nanobiotechnology*, 1-17.
- [66] Cabarcas M., et al. (2011), *The cancer stem cell niche—there goes the neighborhood?*, *International Journal of Cancer*, 129, 2315-2327.
- [67] Mohyeldin A., et al. (2010), *Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche*, *Cell Stem Cell*, 7, 150-161.
- [68] Insan M.N., Jaitak V. (2014), *New Approaches to Target Cancer Stem Cells: Current Scenario*, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14, 20-34.
- [69] Gentry S.N., Jackson T.L. (2013), *A mathematical model of cancer stem cell driven tumor initiation: implications of niche size and loss of homeostatic regulatory mechanisms*, *PLoS One*, 8, e71128.
- [70] Helczynska K., et al. (2003), *Hypoxia Promotes a Dedifferentiated Phenotype in Ductal Breast Carcinoma in Situ*. *Cancer Research*, 63, 1441-1444.
- [71] Vaupel P., Harrison L. (2004), *Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response*, *Oncologist*, 5, 4-9.
- [72] Csermely p., et al. (2015), *Cancer stem cells display extremely large evolvability: Alternating plastic and rigid networks as a potential Mechanism. Network models, novel therapeutic target strategies, and the contributions of hypoxia, inflammation and cellular senescence*, *Seminars in Cancer Biology*, 30, 42-51.
- [73] Molina-Peña R., Alvarez M.M. (2012), *A simple mathematical model based on the cancer stem cell hypothesis suggests kinetic commonalities in solid tumor growth*, *PLoS One*, 7, e26233.
- [74] Stiehl T., Marciniak-Czochra A. (2017), *Stem cell self-renewal in regeneration and cancer: Insights from mathematical modeling*, *Current Opinion in Systems Biology*, 5, 112-120.
- [75] Macklin P., et al. (2009), *Multiscale modelling and nonlinear simulation of vascular tumour growth*, *Journal of Mathematical Biology*, 58, 765-798.
- [76] Richards C.H., et al. (2011), *The prognostic value of histological tumor necrosis in solid organ malignant disease: a systematic review*, *Future Oncology*, 7, 1223-1235.
- [77] Keith B., Simon M.C. (2007), *Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer*, *Cell*, 129, 465-472.
- [78] Conley S.J., et al. (2012), *Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia*, *PNAS*, 109, 2784-2789.

- [79] Eyler C.E., et al. (2008), *Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis*, Journal of Clinical Oncology, 26, 2839-5845.
- [80] Agliano A., et al. (2017), *The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis*, Seminars in Cancer Biology, 44, 25-42.
- [81] Weis S.M., Cheresch D.A. (2011), *umor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets*, Nature Medicine, 17, 1359-1370.
- [82] Chen Q., De Schutter E. (2017), *Parallel STEPS: Large Scale Stochastic Spatial Reaction-Diffusion Simulation with High Performance Computers*, Frontiers in Neuroinformatics, 11, 1662-5196.
- [83] Hepburn I., et al. (2012), *STEPS: efficient simulation of stochastic reaction-diffusion models in realistic morphologies*, BMC Systems Biology, 6, 36.
- [84] Wils S., De Schutter E. (2008), *Reaction-diffusion in complex 3D geometries: mesh construction and stochastic simulation with STEPS*, BMC Neuroscience, 9, P85.
- [85] Hauer S., et al. (2013), *A computational framework for identifying design guidelines to increase the penetration of targeted nanoparticles into tumors*, Nano Today, 8, 566-576.
- [86] Hollingsworth S.A., Dror R.O. (2019), *Molecular dynamics simulation for all*, Neuron, 99, 1129-1143.
- [87] Case D.A., et al. (2020), *AMBER 2020*, University of California, San Francisco.
- [88] Wang J., et al. (2004), *Development and testing of a general amber force field*, Journal of Computational Chemistry, 25, 1157-1174.
- [89] Bhattarai H., et al. (2010), OPENMD, an Open Source Engine for Molecular Dynamics. Dostupan na <https://openmd.org/>
- [90] Fleury B., et al. (2015), *Gold nanoparticle internal structure and symmetry probed by unified small-angle X-ray scattering coupled with molecular dynamics analysis*, Nano Letters, 15, 6088-6094.
- [91] Qiao Z., et al. (2013), *Molecular Dynamics simulations on the melting of gold nanoparticles*, Phase Transitions: A Multinational Journal, 87, 59-70.
- [92] Hanwell M.D., et al. (2012), *Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform*, Journal of Cheminformatics., 4, 17-27.
- [93] Pettersen E.F., et al. (2004), *USCF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis*, Journal of Computational Chemistry, 13, 1605-1612.
- [94] Amber parameters, <http://ambermd.org/tutorials/pengfei/>
- [95] Vanquelef E., et al. (2011), *R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments*, Nucleic Acids Research, 39, W511-W517.
- [96] Martinez L., et al. (2009), *PACKMOL, A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations*, Journal of Computational Chemistry, 30, 2157-2164.
- [97] Jorgensen W.L., et al. (1983), *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*, The Journal of Chemical Physics, 79, 926-95.
- [98] AMBER formati datoteka <https://ambermd.org/FileFormats.php#topo.cntrl>
- [99] Fam S., et al. (2020), *Stealth coating of nanoparticles in drug-delivery systems*, Nanomaterials, 10, 787.
- [100] Chapman R.G., et al. (2000), *Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins*, Journal of the American Chemical Society, 122, 8303-8304.

- [101] Moreadith R.W., et al. (2017), *Clinical development of a poly(2-oxazoline) (POZ) polymer therapeutic for the treatment of Parkinson's disease – proof of concept of POZ as a versatile polymer platform for drug development in multiple therapeutic indications*, European Polymer Journal, 88, 524 - 552.
- [102] Humphrey W., et al. (1996), *Vmd - visual molecular dynamics*, J. Mol. Graph, 14, 33-38.
- [103] Heikkila E., et al. (2012), *Atomistic simulations of functional Au₁₄₄(SR)₆₀ gold nanoparticles in aqueous environment*, Journal of Physical Chemistry, 116, 9805-9815.
- [104] Jokerst J.V., et al. (2011), *Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy*, Nanomedicine, 6, 715-728.
- [105] Li M., et al. (2021), *Brush conformation of Polyethylene Glycol determines the stealth effect of nanocarriers in low protein adsorption regime*, Nano Letters, 21, 1591-1598.
- [106] BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Discovery studio, Visualizer, San Diego: Dassault Systèmes, 2019.
- [107] Kovacevic M., et al. (2021), *Mixed-monolayer functionalized gold nanoparticles for cancer treatment: Atomistic molecular dynamics simulations study*, BioSystems, 202, 104354.
- [108] Jain R.K, Stylianopoulos T. (2010), *Delivering nanomedicine to solid tumors*, Nature Reviews Clinical Oncology, 7, 653.
- [109] Shaffer S., et al. (2017), *Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer resistance*, Nature, 546, 431-435.
- [110] Bozic I., et al. (2013), *Evolutionary dynamics of cancer response to targeted combinatorial therapy*, eLife, 2, e00747.
- [111] Hu Z., et al. (2017), *A population genetics perspective on the determinants of intra-tumour heterogeneity*, Biochimica et Biophysica Acta, 1867, 109-126.
- [112] Balaz I., et al. (2021), *Harnessing adaptive novelty for automated generation of cancer treatments*, BioSystems, 199, 104290.
- [113] Masad D, Kazil J. (2015), *Mesa: An agent-based modelling framework*, Huff K., Bergstra J. (Eds.), Proceedings of the 14th Python in Science Conference (2015), pp. 51-58.
- [114] Gener P., et al. (2016), *Cancer stem cells and personalized cancer nanomedicine*, Nanomedicine, 11, 307-320.
- [115] Vargha A., Delaney H. (2000), *A critique and improvement of the cl common language effect size statistics of mcgraw and wong*, Journal of Educational and Behavioral Statistics, 25, 101-132
- [116] Vasan N. et al. (2019), *A view on drug resistance in cancer*, Nature, 575, 299-309.
- [117] Balaz I. et al. (2021), *Towards open-ended evolutionary simulator for developing novel tumour drug delivery systems*, arXiv preprint arXiv:2105.11760

Biografija



Marina Kovačević je rođena 03.10.1991. godine u Vrbasu. Diplomirala je 2015. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu (diplomirani biohemičar). Master rad (master hemičar) odbranjen je 2016. godine. Doktorske studije hemije je upisala iste godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Sve ispite položila je u roku sa prosečnom ocenom 10,0.

Eksperimentalni deo disertacije radila je u okviru projekta H2020 FET Open pod nazivom "Evolvable platform for programmable nanoparticle - based cancer therapies - EVO-NANO". Pored toga, bila je uključena na projekat H2020 FET Innovational Launchpad pod nazivom "Platform for rapid development of personalized nanomedicine drug delivery systems - PACE", i, kao stipendista, na projekat „Proučavanje sinteze, strukture i aktivnosti organskih jedinjenja prirodnog i sintetskog porekla“ (OI 172013).

U toku doktorskih studija učestvovala je u izvođenju vežbi iz više predmeta: Fizička hemija 1, Fizička hemija 2, Fizička hemija za smer Molekularna biologija.

U toku studija dodatno se usavršavala. Pohadjala je Letnju školu hemije na TU u Gracu, Austrija 2013. godine. Pohadjala je dve škole nanomedicine u 2019. godini, International School of Nanomedicine, Erice, Italija, i Nano2Clinic Training School, Trst, Italija. Takođe je obavila kratkoročnu naučnu misiju (Short-term scientific mission) u grupi za molekularnu biologiju i nanotehnologiju (2019), Univerzitet u Trstu, Italija, u okviru Cost akcije CA "Cancer Nanomedicine from the Bench to the Bedside".

Pohađala je treninge: u organizaciji JRC laboratorije za nanobiotehnologiju (Training and Capacity Building for Enlargment and Integration Countries (2020), Open access to JRC Research Infrastructures at the JRC Nanobiotechnology Laboratory); Communication training of the H2020 project BRIEFING - Bridging the FET Innovation Gap (2020), EIC Women Leadership Programme (2022), i EIC Innovation Bootcamp 3.0 (2022). Takođe je učestvovala u workshop-u pod nazivom Cancer, Evolution, Alife - Discovery of Cancer Treatment (2020).

Učestvovala je u kreiranju alatke za klasifikaciju Struktura leka-Status (odobren/neodobren lek) koje se nalazi na <https://www.ai4europe.eu/>.

Koautor je 11 naučnih radova (dva publikovana rada kategorije M21a, tri publikovana rada kategorije M21, tri publikovana rada kategorije M22, tri publikovana rada kategorije M23, poglavlja u knjizi, kao i pet naučnih saopštenja prezentovana na međunarodnim naučnim skupovima).

Rezultate rada objavljenog u časopisu Nature Computational Materials su takođe preneli i mejnstrim mediji kao što su Phys.org, Science Daily, ScienMag, Mirage News, Bioengineer.org itd. (navedeni u Bibliografiji).

Bibliografija

- [1] Kordić B., Jović B., Kovačević M., Tričković J. (2022), *Influence of selected amides and adsorbent particle size on the adsorption of p-nitrophenol*, **Environmental Technology**, 43, 171-182.
- [2] Stillman N., Balaž I., Tsompanas M-A., Kovačević M., Azimi S., Lafond S., Adamatzky A., Hauert S. (2021), *Evolutionary computational platform for the automatic discovery of nanocarriers for cancer treatment*, **Nature Computational Materials**, 7, 150.
- [3] Kovačević M., Balaž I., Marson D., Laurini E., Jović B. (2021), *Mixed-monolayer functionalized gold nanoparticles for cancer treatment: Atomistic Molecular Dynamics Study*, **BioSystems**, 202, 104354.
- [4] Balaž I., Petrić T., Kovačević M., Tsompanas M-A., Stillman N. (2021), *Harnessing adaptive novelty for automated generation of cancer treatments*, **BioSystems**, 199, 104290.
- [5] Stillman N., Kovačević M., Balaž I., Hauert S. (2020), *In silico modelling of cancer nanomedicine, across scales and transport barriers*, **Nature Computational Materials**, 6, 92.
- [6] Jović B., Kordić B., Miškov V., Tričković J., Kovačević M., Petrović S. (2020), *Amides as a model system of low molar mass algal organic matter. Influence on the adsorption of p-nitrophenol on activated carbon*, **Arabian Journal of Chemistry**, 13, 59-66.
- [7] Despotović V., Kordić B., Kovačević M., Petrović S., Jović B. (2019), *Investigation of N-H...O interactions in N-monosubstituted caproamide - Ether systems: FT-IR and FT-NIR spectroscopic study*, **Journal of Molecular Structure**, 1181, 19-24.
- [8] Jović B., Ćirić V., Kovačević M., Šeremešić S., Kordić B. (2019), *Empirical equation for preliminary assessment of soil texture*, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 206, 506-511.
- [9] Jović B., Petrović S., Kordić B., Kovačević M. (2018), FTIR spectroscopic study of possible interactions of N-tert-butylformamide with ethers, *Journal of Molecular Structure*, 1171, 62-68.
- [10] Kordić B., Jović B., Tričković J., Kovačević M. (2018), Adsorption of selected nitrophenols on activated carbon in the presence of nicotinamide, *Journal of Molecular Liquids*, 259, 7-15.
- [11] Kordić B., Kovačević M., Sloboda T., Vidović A., Jović B. (2017), *FT-IR and NIR spectroscopic investigation of hydrogen bonding in indole-ether systems*, **Journal of Molecular Structure**, 1144, 159-165.
- [12] Balaž I., Adamatzky A. *Cancer, Complexity, Computation*, poglavlje: Kovacevic M., Balaž I. The Role of Molecular Dynamics Simulations in Multiscale Modeling of Nanocarriers for Cancer Treatment, **Nature Springer**, Switzerland AG

Saopštenja na međunarodnim skupovima

- [1] Kovacevic M., Balaz I (2019) Computational platform for targeting cancer stem cells with nanoparticles, Interational School of Nanomedicine, Erice, Italija.
- [2] Kovacevic M., Balaz I (2019) Computer-assisted design of nanomedicine drug-delivery systems, Nano2Clinic, CA17140, Trst, Italija.
- [3] Kovacevic M., Balaz I., Marson D., Laurini E., Jovic B (2021) Molecular Dynamics Approach to Rational Design of Functionalized Gold Nanoparticles for Cancer Treatment, Characterisation of nanomaterials towards safe and efficient nanodrugs, CA17140.
- [4] Kordic B., Kovacevic M., Sloboda T., Jovic B (2017) Application of NIR spectroscopy in study of adsorption process of *p*-Nitrophenol on activated carbon in presence of selected amides, Yucomat 2017, Herceg Novi, Montenegro.
- [5] Jovic B., Ciric V., Kovacevic M., Seremesic S (2017) Estimation of soil texture in Vojvodina region by means of DRIFT spectroscopy, 2nd International and 14th National Congress of Soil Science Society – NSoil 2017, Novi Sad, Serbia.

Pominjanje rada u medijima

- [1] Phys.org, *Growing and treating virtual tumors using AI-designed nanoparticles*
<https://phys.org/news/2021-09-virtual-tumors-ai-designed-nanoparticles.html>
- [2] ScienceDaily, *Pioneering software can grow and treat virtual tumors using AI designed nanoparticles*
<https://www.sciencedaily.com/releases/2021/09/210921125134.htm>
- [3] ScienMag, *Pioneering software can grow and treat virtual tumors using AI designed nanoparticles*
<https://scienmag.com/pioneering-software-can-grow-and-treat-virtual-tumors-using-ai-designed-nanoparticles/>
- [4] Mirage, *Pioneering software can grow and treat virtual tumours using A.I*
<https://www.miragenews.com/pioneering-software-can-grow-and-treat-virtual-637248/>
- [5] AzoNano, *New AI-Optimized Software Could Improve Nanoparticle Design for Cancer Therapy*
<https://www.azonano.com/news.aspx?newsID=38168>
- [6] Newswise, *Pioneering software can grow and treat virtual tumors using AI designed nanoparticles*
<https://www.newswise.com/articles/pioneering-software-can-grow-and-treat-virtual-tumors-using-ai-designed-nanoparticles>
- [7] sciencenewsnet.it, *Pioneering software can grow and treat virtual tumors using AI designed nanoparticles*

<https://sciencenewsnet.in/pioneering-software-can-grow-and-treat-virtual-tumours-using-ai-designed-nanoparticles/>

[8] Bioengineer.org, *Pioneering software can grow and treat virtual tumors using AI designed nanoparticles*

<https://bioengineer.org/pioneering-software-can-grow-and-treat-virtual-tumors-using-ai-designed-nanoparticles/>

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Рачунарско моделовање структуре функционализованих наночестица као носача антитуморских лекова у физиолошкој средини
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Природно-математички факултет, Нови Сад б) Пољопривредни факултет, Нови Сад
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије хемије на Природно-Математичком факултету, Универзитета у Новом Саду. Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом урађена су у оквиру програма H2020 Fet Open под називом „Evolvable platform fro programmable nanoparticle-based cancer therapies – EVO-NANO“.
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Украјинко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Докторска дисертација</p> <p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни</p> <p>б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови</p> <p>б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи</p> <p>в) генотипови: навести врсту _____</p> <p>г) административни подаци: навести врсту _____</p> <p>д) узорци ткива: навести врсту _____</p> <p>ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____</p> <p>е) текст, навести врсту: PDB (Protein data bank), mol, prmtop, inpcrd</p> <p>ж) мапа, навести врсту _____</p> <p>з) остало: описати: трајекторије симулација молекулске динамике, резултати реакционо-дифузионих симулација, резултати моделовања заснованог на агентима</p> <p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података Формат: NetCDF, CSV (~4TB)</p> <p>1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке: Софтвер: Avogadro, Chimera, VMD, STEPs, PhysiCell</p> <p>а) Excel фајл, датотека: .xlsx; .csv</p>

b) SPSS фајл, датотека _____

c) PDF фајл, датотека _____

d) Текст фајл, датотека: NetCDF

e) JPG фајл, датотека _____

f) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

a) број варијабли _____

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): 300

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

a) временски размак између поновљених мера је **7-21 дан**

б) варијабле које се више пута мере односе се **на промене у структури наночестица**

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као **верзија_редни_број_понављања**

Напомене: /

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

Рачунарске симулације

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: симулације молекулске динамике, реакционо-дифузионе симулације, симулације засноване на агентима

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип: прикупљање података из литературе

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Контрола квалитета података је контролисана применом стандардних процедура.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Поређењем добијених експерименталних података са реалним и литературним.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у _____ репозиторијум.

3.1.2. URL адреса _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) **Да**
- б) Да, али после ембарја који ће трајати до _____
- в) **Не**

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

Складишни простор обезбеђен у оквиру пројекта је довољан за чување свих добијених података (Zenodo, GitHub)

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

ко је пошребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, дејалне описе варијабли, записи итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

а) Подаци нису у отвореном приступу

б) Подаци су анонимизирани

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) заштитени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Марина Ковачевић, marinak@dh.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Марина Ковачевић, marinak@dh.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Марина Ковачевић, marinak@dh.uns.ac.rs