

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych

Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego

Mateusz Pabiszczak

**Napełnianie bioagregatów fosfolipidowych
substancjami polarnymi i niepolarnymi –
symulacje komputerowe.**

PRACA DOKTORSKA

Promotor:

prof. dr hab. Zygmunt

Gburski

Katowice 2023

Streszczenie

Motywacją przeprowadzonych badań była niedawno wysunięta koncepcja transportu leków za pośrednictwem bioagregatów, występujących naturalnie w organizmie człowieka. Posłużono się zaawansowaną techniką symulacji komputerowych MD, dzięki której można uzyskać wgląd w dynamikę poszczególnych cząsteczek tworzących badany układ. Wybrano lipoproteiny HDL i nHDL, które jako składniki osocza wędrują w organizmie wraz ze strumieniem krwi. Pokazano, że można utworzyć stabilny kanał transportowy do wnętrza tych bioagregatów poprzez nanoindentację ich powierzchni za pomocą urządzenia opartego na nanorurce węglowej, czego dowiodły wykonane eksperymenty komputerowe. Umożliwiło to przejście do badania dynamiki struktury nHDL podczas jej napełniania zewnętrznymi substancjami. Wybrano dwie bardzo odmienne substancje, silnie dipolową wodę oraz niepolarny argon. Symulacje MD pokazały, że wewnątrz nHDL można zapełnić około 9 nm^3 objętości, bez naruszenia struktury tej lipoproteiny. Ponadto, aż do 42 nm^3 wewnętrznej objętości potrafią zapełnić wprowadzone cząstki, bez rozerwania nHDL, powodując jednak stopniową zmianę kształtu nHDL od dyskoidalnego do kulistego. Stwierdzona elastyczność struktury lipoproteiny nHDL, obserwowana dynamiczna zmiana jej kształtu podczas procesu napełniania, stanowi nową, nieznaną wcześniej wiedzę, pozyskaną dzięki wykonanym eksperymentom komputerowym. Wykazana możliwość ładowania cząsteczek do wnętrza bioagregatów, np. nHDL, oraz pozyskana wiedza o dynamice ich struktur podczas napełniania, stanowi istotną przesłankę przy projektowaniu w przyszłości nowatorskich, liposomalnych systemów transportu leków.

Słowa kluczowe:

symulacje komputerowe, metoda MD, lipoproteiny HDL i nHDL, nanoindentacja, nośniki leków

Abstract

The motivation for the conducted research was the recently proposed concept of drug transport via bioaggregates, naturally occurring in the human body. An advanced MD computer simulation technique was used to gain insight into the dynamics of the individual molecules that make up the system under study. HDL and nHDL lipoproteins were selected, which as plasma components migrate in the body along with the blood stream. It was shown that it is possible to create a stable transport channel, leading to the interior of these bioaggregates, by nanoindenting their surfaces with a device based on a carbon nanotube, as proved by our computer experiments. This enabled the study of the dynamics of nHDL structure during their filling with external substances. Two very different substances were chosen, strongly dipolar water and non-polar argon. MD simulations showed that approximately 9 nm^3 of volume could be filled inside nHDL without affecting the structure of this lipoprotein. In addition, up to 42 nm^3 of the internal volume can be filled by the outside particles without breaking the nHDL, however, causing a gradual change in the shape of nHDL from discoidal to spherical. The found elasticity of the lipoprotein structure, the observed dynamic change of their shape during the filling process, is a new, previously unknown knowledge, obtained thanks to our computer experiments. The demonstrated possibility of loading molecules inside bioaggregates, e.g. nHDL, and the acquired knowledge about the dynamics of their structures during filling, is an important premise for the future design of innovative, liposomal drug transport systems.

Key words:

computer simulations, MD method, HDL and nHDL lipoproteins, nanoindentation, drug carriers.

Podziękowania

Chciałbym podziękować mojemu promotorowi prof. dr hab. Zygmuntowi Gbur-
skiemu, doktorowi Krzysztofowi Górnemu i doktorowi Przemysławowi Raczyńskiemu
oraz innym członkom zespołu za ich pomoc, liczne oraz cenne wskazówki meryto-
ryczne, cierpliwość i zrozumienie.

Spis treści

Wprowadzenie	7
1 Kompleksy lipoproteinowe	9
1.1 Lipidy	9
1.1.1 Fosfolipidy	9
1.1.2 Cholesterol	10
1.2 Lipoproteiny	12
1.3 Biomolekuły HDL	14
1.3.1 Metabolizm HDL	15
1.3.2 Typy kompleksów HDL	15
2 Dynamika molekularna	17
2.1 Algorytm Velocity Verlet	19
2.2 Metoda Sterowanej Dynamiki Molekularnej	25
2.3 Potencjał CHARMM	26
2.4 Wybrane metody analizy danych symulacyjnych MD	29
3 Modelowanie i parametry symulacji	32
3.1 Symulacje struktury HDL i nHDL	34
3.2 Nanoindentacja bioagregatu nHDL nanorurką węglową	35
3.3 Symulacja wypełniania nHDL molekułami wody bądź atomami argonu w środowisku bezwodnym	37
3.4 Symulacje wypełniania nHDL molekułami wody w środowisku wodnym	39

4	Prezentacja i omówienie wyników	41
4.1	Symulacje struktury HDL i nHDL	41
4.2	Nanoindentacja bioagregatu nHDL nanorurką węglową	46
4.3	Symulacje wypełniania nHDL molekułami wody bądź atomami argonu w środowisku bezwodnym	48
4.3.1	Ładowanie nHDL cząsteczkami wody	48
4.3.2	Ładowanie nHDL atomami argonu	56
4.4	Symulacje wypełniania nHDL cząsteczkami polarnymi w środowisku wodnym.	62
	Podsumowanie	67
	Conclusion	70
	Bibliografia	71

Wprowadzenie

Lipoproteina o dużej gęstości (HDL) to bogata w białko cząsteczka zawierająca niezestryfikowany cholesterol (UC) w swojej warstwie fosfolipidowej i ester cholesterolu (CE), bardziej hydrofobową formę cholesterolu, w swoim rdzeniu. W przybliżeniu połowę całkowitej masy HDL stanowią składniki lipidowe. Biocząsteczka HDL jest zbudowana na białku szkieletowym zwanym apolipoproteiną (apoA-I), definiującym z grubsza jej kształt i agregującym jej składniki fosfolipidowe. Istnieje również pokrewna cząsteczka zwana nascent HDL (nHDL), która różni się od HDL tym, iż nie zawiera estrów cholesterolu w swoim rdzeniu. apoA-I jest głównym białkiem HDL osocza i głównym nośnikiem nadmiaru zestryfikowanego cholesterolu z wewnętrznej wyściółki naczyń krwionośnych (tkanek obwodowych) do wątroby, w procesie określanym jako odwrócony transport cholesterolu (RCT) [1]. Dlatego lipoproteiny o dużej gęstości chronią przed rozwojem miażdżycy i pokrewnych chorób układu krążenia [2]. Obecnie, wraz z wkraczaniem medycyny na poziom molekularny, istnieje pilne zapotrzebowanie na nośniki o rozmiarach nanometrów, zdolne do transportu cząsteczek leku precyzyjnie w miejsce występowania choroby. Jest to ważny, szybko rozwijający się obszar badań, by wspomnieć choćby próby wbudowania cząsteczek leków w kształt origami DNA [3, 4] czy intensywnie testowane nanonośniki polimerowe [4–6]. Ostatnio lipoproteina HDL krążąca we krwi została wskazana jako potencjalny kandydat do transportu leków w organizmie ludzkim ze względu na małe rozmiary, odpowiednie właściwości powierzchniowe, długi czas krążenia, biokompatybilność, biodegradowalność i niską stymulację immunologiczną [7, 8]. Niniejsza praca wnosi wkład w ten właśnie się rozpoczynający, nowy kierunek poszukiwań. W szczególności wykonano badanie - za pomocą symulacji komputerowych - procesu ładowania obcych cząsteczek lub atomów do wnętrza nHDL. Zgromadzona w ten sposób

wiedza, jak również wcześniejsze prace dotyczące interakcji bioagregatów fosfolipidowych z nanostrukturami węglowymi, mogą posłużyć jako inspiracja, uzupełniać i wspierać prowadzone w przyszłości rzeczywiste eksperymenty wykorzystujące HDL i nHDL do dostarczania leków w organizmie [9].

Rozdział 1

Kompleksy lipoproteinowe

1.1 Lipidy

Błony biologiczne są zorganizowanymi warstwowymi układami makromolekularnymi, złożonymi głównie z białek i lipidów. Pełnią one funkcje niezbędne do życia nadając komórkom indywidualność poprzez oddzielenie ich od środowiska. Komórki eukariotyczne zawierają również błony wewnętrzne, które wytyczają granice organelli takich jak mitochondria, chloroplasty i lizosomy. Te odrębne przedziały w komórce są ściśle związane z jej specjalizacją.

Jednak występowanie błon nie ogranicza się tylko do komórki i jest bardziej powszechne, np. otaczają one kompleksy lipoproteinowe.

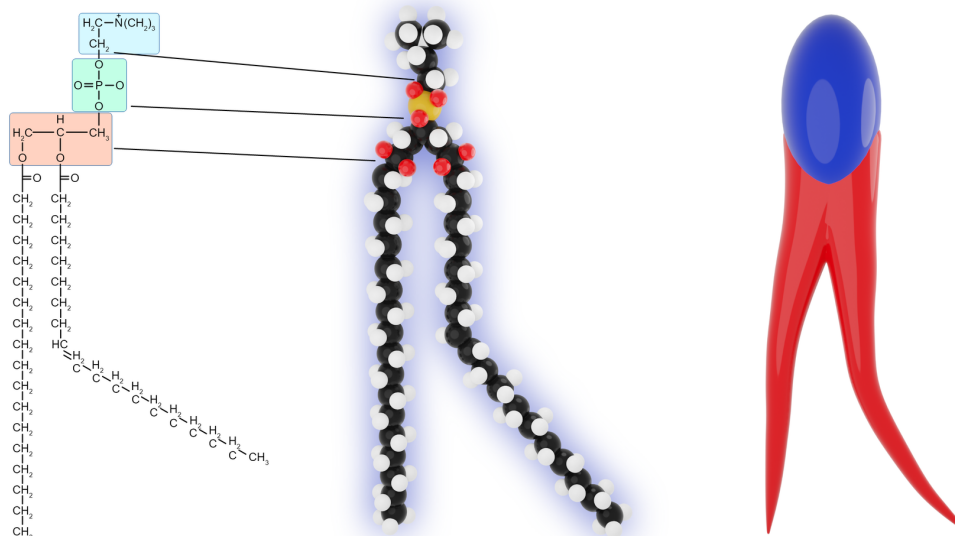
Lipidy są zróżnicowaną grupą hydrofobowych związków organicznych. Ponieważ są one nierozpuszczalne w wodzie, ich rozmieszczenie w organizmie jest nierównomierne. Większość z nich jest skupiona w cytoplazmie komórek tłuszczowych, w błonach biologicznych i kompleksach z białkami osoczowymi. Oprócz funkcji, które pełnią w błonach są one również głównym substratem energetycznym dla organizmu ludzkiego.

Lipidy wchodzące w skład błon to przede wszystkim fosfolipidy i cholesterol.

1.1.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy występują bardzo licznie we wszystkich błonach biologicznych. Są one pochodnymi glicerolu lub rzadziej, sfingozyny. Rys. 1.1 przedstawia model fosfoli-

pidu. Fosfolipidy są substancjami amfipatycznymi. Łańcuchy kwasów tłuszczowych



Rysunek 1.1: Wzór chemiczny i schemat struktury przestrzennej fosfolipidu.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

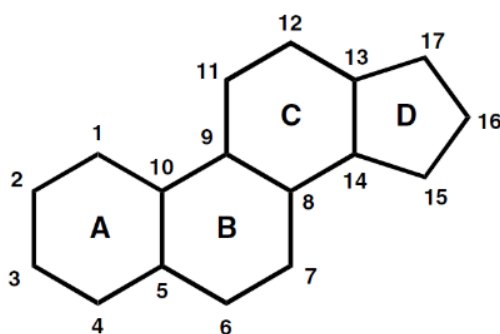
fosfolipidów zawierają zwykle parzystą liczbę atomów węgla (na ogół od 14 do 24). Długość łańcucha oraz stopień nasycenia kwasów tłuszczowych ma istotny wpływ na płynność błon. Ogony węglowe stanowią hydrofobową część molekuly. Z rys. 1.1 widać, że fosfolipid zawiera także część hydrofilową, resztę fosforanową, określaną mianem głowy. Szkielet glicerolowy/sfingozyny jest najmniej elastyczną częścią fosfolipidu i łączy ze sobą część hydrofobową i hydrofilową.

Fosfolipidy są syntetyzowane w gładkiej siateczce endoplazmatycznej, skąd są transportowane do aparatu Goldiego, a następnie do błon, gdzie stają się ich składnikami. Fosfolipidy, które nie zostały wbudowane do żadnych struktur błonowych są wydzielane drogą egzocytozy.

1.1.2 Cholesterol

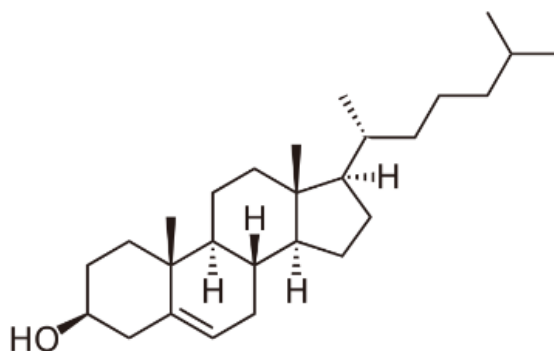
Cholesterol jest chyba najbardziej znanym steroidem ze względu na jego udział w rozwoju miażdżycy i chorób serca. Występuje on we wszystkich komórkach organizmu, zwłaszcza w tkance nerwowej. Jest ważnym składnikiem błon plazmatycznych i lipoprotein surowicy krwi, gdzie występuje jako ester cholesterolu z grupą hydroksylową w pozycji 3, zestryfikowaną długołańcuchowym kwasem tłuszczowym. Cholesterol nie występuje w roślinach i bakteriach. Jak wszystkie steroidy, również

cholesterol ma rdzeń przypominający fenantren (pierścienie A, B, C), do którego dołączony jest pierścień cyklopentanu (pierścień D) (rys. 1.2).



Rysunek 1.2: Rdzeń steroidowy.

Dzięki swojej budowie (rys. 1.3), w organizmach eukariotycznych cholesterol odgrywa krytyczną rolę w regulowaniu płynności błony komórkowej, a w szczególności jej części nazywanej dwuwarstwą fosfolipidową. Cholesterol wbudowuje się w dwu-



Rysunek 1.3: Cholesterol.

warstwę swą długą osią prostopadle do płaszczyzny błony. Grupa hydroksylowa wiąże się z atomem tlenu polarnego bieguna fosfolipidu poprzez nietrwałe wiązanie wodorowe. Z kolei węglowodorowy ogon molekuly umieszczony jest w hydrofobowym rdzeniu dwuwarstwy. Cholesterol wpasowując się między łańcuchy węglowodorowe fosfolipidów zapobiega ich krystalizacji. Im większe stężenie cholesterolu w dwuwarstwie tym bardziej łagodne przejścia fazowe w błonie. Negatywnym efektem obecności cholesterolu w błonie jest utrudnienie ruchów ogonów fosfolipidowych, co zmniejsza płynność błon.

1.2 Lipoproteiny

Lipidy mają hydrofobowy charakter. To sprawia, że ich transport we krwi jest możliwy dzięki powstawaniu rozpuszczalnych kompleksów z białkami osoczymi.

Wnętrze kompleksu lipoproteinowego stanowi silnie hydrofobowy rdzeń, złożony z estrów cholesterolu oraz triacylogliceroli. Rdzeń ten jest otoczony wolnym cholesterolem, fosfolipidami stanowiącymi hydrofilną powłokę oraz białkami nazywanymi apolipoproteinami lub apoproteinami. Transportują one trójglicerydy oraz estry cholesterolu między komórkami. Apolipoproteiny są hydrofilowymi składnikami lipoprotein, zapewniającymi im rozpuszczalność. Oprócz tego pełnią jeszcze następujące funkcje [10–12]:

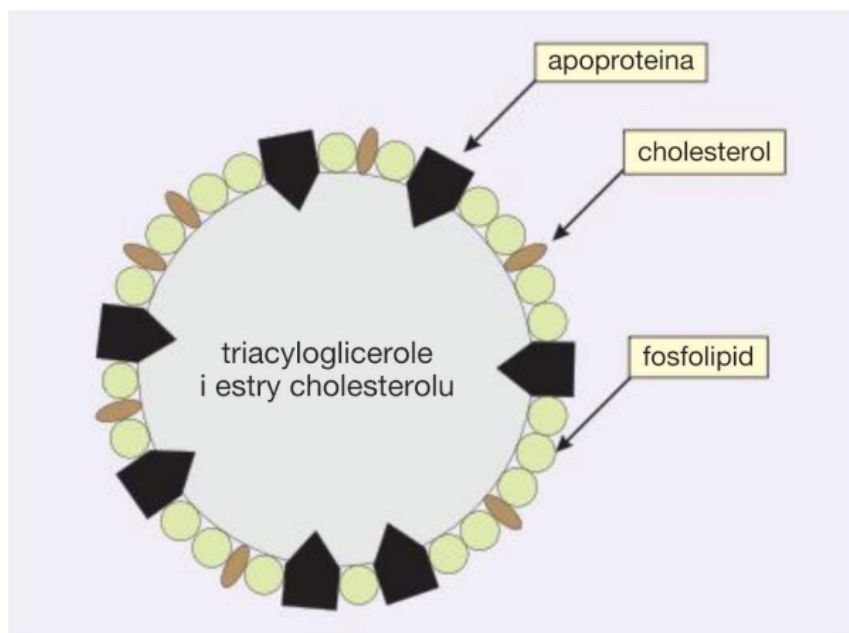
- działają jako ligandy receptorów lipoproteinowych w tkankach,
- kierują tworzeniem lipoprotein,
- pełnią rolę strukturalną,
- służą jako aktywatory lub inhibitory enzymów biorących udział w metabolizmie lipoprotein.

Apolipoproteiny ze względu na ich budowę i funkcje dzieli się na klasy, noszące symbole literowe (od apoA do apoH). Te z kolei dzieli się na podklasy (np. apoA-I, apoC-II).

Lipidowe składniki powłoki otaczające rdzeń kompleksu lipoproteinowego są tak zorientowane przestrzennie, że ich grupy niepolarne są zwrócone w stronę hydrofobowego rdzenia, a grupy polarne są skierowane na zewnątrz, ku powierzchni. Polarne grupy lipidów oraz składniki białkowe biomolekuły wiążą wodę, dzięki czemu cały kompleks lipoproteinowy staje się rozpuszczalny w osoczu i może być, pomimo swego hydrofobowego charakteru, transportowany do odległych tkanek (rys. 1.4).

Biorąc pod uwagę rozmiar oraz zawartość lipidów i apolipoprotein, lipoproteiny osocza dzieli się na pięć klas (rys. 1.5):

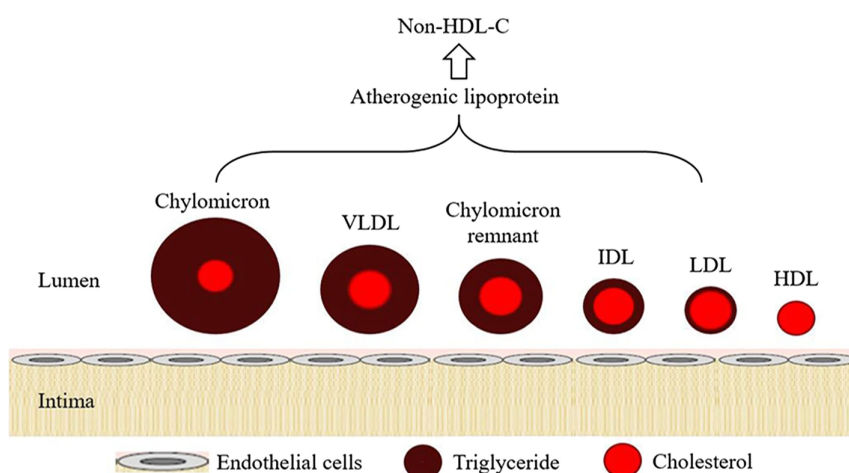
- chylomikrony;
- lipoproteiny bardzo małej gęstości (ang. Very Low Density Lipoprotein, VLDL);



Rysunek 1.4: Budowa kompleksu lipoproteinowego transportowanego w osoczu.
Źródło [10].

- lipoproteiny o pośredniej gęstości (ang. Intermediate Density Lipoprotein, IDL);
- lipoproteiny niskiej gęstości (LDL);
- lipoproteiny wysokiej gęstości (HDL).

Skład poszczególnych klas ulega wahaniom, gdyż cząsteczki lipoprotein są stale syntetyzowane, rozkładane i usuwane z krwi. Stale wymieniają również między sobą składniki lipidowe i apolipoproteinowe.



Rysunek 1.5: Ważne lipidy w ludzkim osoczu.
Źródło [13].

Chylomikrony, VLDL, IDL i LDL są lipoproteinami pro-miażdżycowymi natomiast cząsteczki HDL wykazują właściwości przeciwmiażdżycowe [13].

1.3 Biomolekuły HDL

Cząsteczki HDL są lipoproteinami o największej gęstości oraz o najwyższym stosunku białek do lipidów. Zyskały szczególne zainteresowanie w medycynie, ponieważ badania wykazały silną odwrotną zależność między stężeniem cząsteczek HDL a ryzykiem wystąpienia miażdżycy w naczyniach krwionośnych [2]. HDL jest syntetyzowany w wątrobie oraz ścianie jelita, a następnie uwalniany do krwi drogą egzocytozy. Uwolniony kompleks ma gęstość zawierającą się między 1.0 a 1.2 g cm⁻³ i średnicę 5 - 12 nm. Jeżeli chodzi o skład to jest on następujący:

- triacyloglicerole: 2 - 7 % masy HDL,
- cholesterol: 18 - 25 % masy HDL,
- fosfolipidy: 26 - 32 % masy HDL,
- białko: 45 - 55 % masy kompleksu.

W skład kompleksu HDL wchodzi apolipoproteiny, w tym białko apoA-I, użyte w modelu biomolekuły HDL i nHDL w prezentowanych w tej pracy badaniach. Apolipoproteina A-I jest zbudowanym z 243 aminokwasów polipeptydem. Jest ona syntetyzowana w wątrobie. Jej masa cząsteczkowa to 20.0kDa, stężenie w osoczu osiąga poziom 130 mg dL⁻¹. Białko apoA-I aktywuje acylotransferazę lecytyna:cholesterol (przeniesienie reszty kwasu tłuszczowego z pozycji 2 lecytyny na cholesterol) [14].

Zasadniczą rolą HDL jest wiązanie cholesterolu uwalnianego do osocza. Ponadto HDL jest krążącym rezerwuarem apolipoprotein, w tym apoC-II, która jako składnik lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) i chylomikronów jest aktywatorem lipazy lipoproteinowej, który to enzym uwalnia cholesterol z tkanek pozawątrobowych.

Jeszcze inną rolą HDL jest wychwytywanie i przechowywanie apoprotein z chylomikronów resztkowych oraz lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), zanim te ulegną endocytozie, czyli wnikięciu do wnętrza komórki poprzez związanie się z ich receptorami na powierzchni komórek.

1.3.1 Metabolizm HDL

Świeżo wydzielone z wątroby kompleksy są niekształtnymi cząsteczkami, które zawierają liczne apolipoproteiny (głównie apoA, apoC i apoE), fosfolipidy (głównie lecytynę) i cholesterol. W miarę gromadzenia się w ich wnętrzu cholesterolu przyjmują kształt kulisty.

Natychmiast po pobraniu przez HDL wolnego cholesterolu, ten ostatni jest estryfikowany. Odbywa się to przez wspomniany wcześniej enzym osoczowy, acylotransferazę lecytyna:cholesterol. Enzym ten jest syntetyzowany w wątrobie i aktywowany przez białko apoA-I.

Powstały ester cholesterolu jest mocno hydrofobowy. Dzięki temu jest silnie wiązany przez HDL i nie może go już samodzielnie opuścić. Istniejący mechanizm usuwania tego estru z bioagregatu to przeniesienie go do VLDL przez białko przenoszące estry cholesterolu. Po przekształceniu VLDL w LDL pozostaje on jego składnikiem aż do momentu pobrania, a w następnej kolejności przetworzenia lipoproteiny o niskiej gęstości przez komórkę wątrobową.

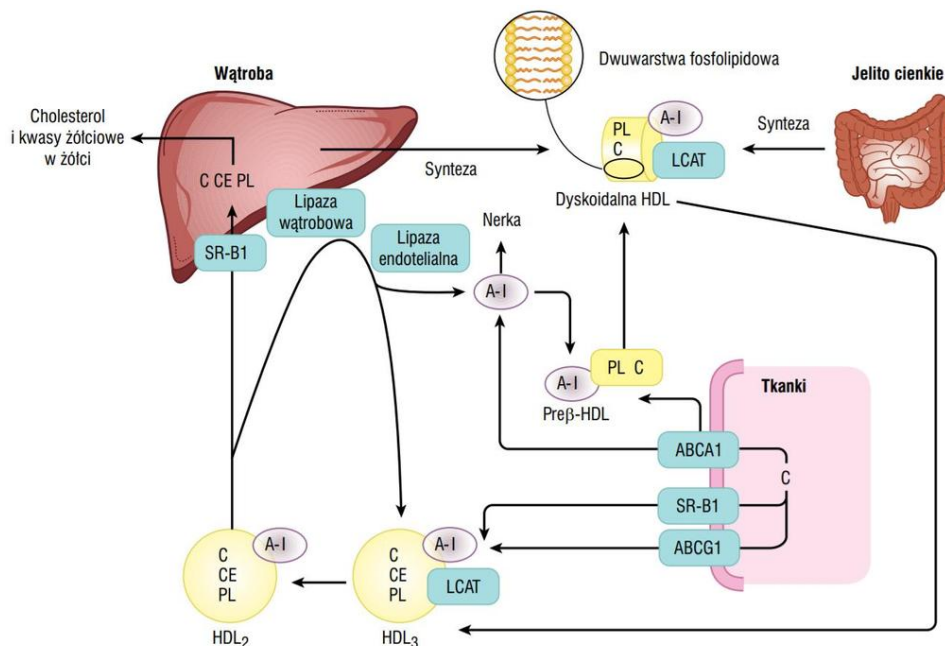
Kuliste HDL są pobierane przez komórki wątrobowe (tzw. endocytoza). Estry cholesterolu ulegają hydrolizie, a uwolniony cholesterol zostaje "przepakowany" w inne lipoproteiny, przetworzony w kwasy żółciowe lub wydzielony do żółci i wydalony z organizmu. Cykl metaboliczny HDL jest pokazany na rys. 1.6.

1.3.2 Typy kompleksów HDL

Ponieważ tłuszcz wykazuje mniejszą gęstość niż woda, gęstość lipoproteiny maleje wraz ze wzrostem proporcji lipidu do białka. Wyróżnia się cztery główne grupy lipoprotein ważne pod względem fizjologicznym (chylomicrony, VLDL, LDL, HDL). Z kolei lipoproteiny HDL dzieli się na kilka frakcji, szczegółowo scharakteryzowanych w tab. 1.1 [15].

Lipoproteina	Źródło	Średnica [nm]	Gęstość [g/mL]	Skład		Główne składniki	Apolipoproteiny
				Białko [%]	Lipid [%]		
HDL ₁	Wątroba, jelito,	20-25	1.019-1.063	32	68	lipidowe Fosfolipidy, cholesterol	A-I, A-II, A-IV C-I, C-II, C-III D ² , E
HDL ₂		10-20	1.063-1.125	33	67		
HDL ₃	VLDL,	5-10	1.125-1.210	57	43		
pre-β-HDL	chylomicrony	<5	>1.210				A-I

Tablica 1.1: Skład kompleksów HDL w osoczu krwi.



Rysunek 1.6: Metabolizm HDL w odwróconym transporcie cholesterolu.

Wyjaśnienie skrótów: LCAT - acylotransferaza lecytyna:cholesterol; C - cholesterol; CE - estry cholesterolu; PL - fosfolipid; A-I alipoproteina A-I; SR-B1 - receptor oczyszczający B1; ABCA1 - kasetowy receptor A1 wiążący ATP (adenozynotrójfosforan)[11].

Pre β -1 HDL jest estryfikowany do formy nascent HDL (nHDL) poprzez dodanie lipidów wydanych przez komórki [16]. nHDL jest w prezentowanych tutaj badaniach bioagregatem, który jest wypełniany substratem. Pre β -1 HDL jest wypełniana w reakcji katalizowanej przez enzym transportowy ABCA1 zarówno produktem w procesie tworzenia agregatu złożonego z monomerycznej cząsteczki apoA-I związanej z kilkoma cząsteczkami PL, jak i substratem podczas transportu PL i cholesterolu do rdzenia apolipoproteiny apoA-I ubogiej w fosfolipidy [16]. Stanowi tylko kilka procent molekuł HDL w osoczu. Wynika to z faktu, że cechuje go wysoka zdolność wchłaniania fosfolipidów i cholesterolu co prowadzi do szybkiego przekształcenia w inne rodzaje HDL. Przyjmuje się, że jest on pierwszym ogniwem w łańcuchu zdarzeń zapobiegających rozwojowi blaszki miażdżycowej, ponieważ usuwa cholesterol i fosfolipidy z komórek w postaci niezestryfikowanej. Pre β -1 HDL wykazuje podobne właściwości do ubogiej w cholesterol (oraz jego estry) cząsteczki nHDL (ang. NascentHDL), mającej kształt dysku. Dyskoidalna molekula jest najprostszą strukturalnie formą HDL. Składa się ona z jednej lub dwóch cząsteczek apoA-I, warstwy fosfolipidowej oraz niewielkiej ilości cholesterolu.

Rozdział 2

Dynamika molekularna

Symulacje komputerowe korzystają z rozmaitych algorytmów numerycznych do wykonywania eksperymentów maszynowych na modelach wybranych układów fizycznych [17]. Metody symulacyjne znajdują szerokie zastosowania ponieważ są one wydajnymi narzędziami umożliwiającymi testowanie własności modeli oraz ich porównanie z danymi eksperymentalnymi. Często używa się tych algorytmów do analizy problemów, dla których niemożliwe jest rozwiązanie analityczne. Symulacje komputerowe można również wielokrotnie powtarzać, zmieniając za każdym razem parametry układu w celu obserwacji i analizy wpływu tych zmian na przebieg zjawiska. Wśród metod symulacyjnych wyróżnia się dwie grupy: stochastyczne i deterministyczne. Metody stochastyczne opierają się o teorię prawdopodobieństwa i mechanikę statystyczną. Jednym z fundamentalnych elementów tego typu symulacji jest koncepcja łańcucha Markowa [18]. Metodą tą nie można obliczyć trajektorii poszczególnych cząstek, nie dostanie się ewolucji czasowej badanego układu. Przykładem metody stochastycznej jest symulacja typu Monte Carlo (MC). Metody deterministyczne to takie, w których należy sprecyzować równania ruchu układu i całkować je po czasie. Dla zbioru cząstek podlegających prawom mechaniki klasycznej, dominującą rolę odgrywa deterministyczna metoda dynamiki molekularnej (ang. Molecular Dynamics, MD), która bazuje na numerycznym obliczaniu trajektorii w przestrzeni fazowej zbioru cząstek, przy zadanych pędach i położeniach początkowych. Wielkości makroskopowe opisujące stan układu oblicza się jako średnie po trajektorii w przestrzeni fazowej.

Podstawowym elementem programu do symulacji metodą dynamiki molekularnej jest algorytm rozwiązujący układ równań różniczkowych, który opisuje ruch oddziaływających cząstek. Najprostszym przypadkiem takiego algorytmu jest wykorzystanie do obliczania sił równania ruchu Newtona (2.1).

$$F_i = m_i \ddot{r}_i \quad (2.1)$$

Gdzie F_i jest siłą, m_i masą, a \ddot{r}_i przyspieszeniem i -tego atomu. Siłę F_i oddziałującą na i -ty atom można wyznaczyć poprzez zróżniczkowanie funkcji energii potencjalnej U po położeniu r_i (2.2).

$$F_i = -\nabla_{r_i} U \quad (2.2)$$

Całkując równania ruchu (2.3), znając położenia i prędkości atomów w chwili t , można wyznaczyć położenia i prędkości w chwili $t + \Delta t$.

$$m_i \ddot{r}_i = -\nabla_{r_i} U \quad (2.3)$$

2.1 Algorytm Velocity Verlet

Równanie ruchu Lagrange'a dla układu, w którym działają siły potencjalne opisuje wzór (2.4).

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{\mathbf{q}}_i} \right) - \frac{\partial L}{\partial \mathbf{q}_i} = 0 \quad (2.4)$$

Zmienne \mathbf{q}_i i $\dot{\mathbf{q}}_i$ są odpowiednio uogólnionymi współrzędnymi położeń i prędkości w ilości równej liczbie stopni swobody układu dynamicznego. Dla N nieoddziałujących atomów gazu liczba stopni swobody wynosi $3N$.

$$L = K - U \quad (2.5)$$

Funkcja Lagrange'a L (2.5) jest różnicą energii kinetycznej K oraz energii potencjalnej U .

$$F_i = \nabla_{r_i} L \quad (2.6)$$

Używając klasycznych definicji siły potencjalnej F_i (2.6) oraz energii kinetycznej (2.7) w układzie współrzędnych kartezjańskich r_i , równanie ruchu Lagrange'a (2.4) przekształca się do równania ruchu Newtona (2.3).

$$K = \frac{1}{2} \sum_i m_i \dot{r}_i^2 \quad (2.7)$$

Innym, jeszcze wygodniejszym opisem układu jest opis hamiltonowski, w którym z każdą współrzędną uogólnioną \mathbf{q}_i wiążemy pęd uogólniony \mathbf{p}_i (2.8).

$$\mathbf{p}_i = \frac{\partial L}{\partial \dot{\mathbf{q}}_i} \quad (2.8)$$

Wprowadzenie uogólnionych pędów \mathbf{p}_i zależnych od współrzędnych położeń \mathbf{q}_i pozwala na zdefiniowanie hamiltonianu dla systemu za pomocą wzoru (2.9).

$$H = \sum_i \dot{\mathbf{q}}_i \mathbf{p}_i - L \quad (2.9)$$

Hamiltonian H jest sumą energii kinetycznej i potencjalnej (2.10).

$$H = K + U \quad (2.10)$$

Jeśli potencjał nie zależy od prędkości $\dot{\mathbf{q}}_i$ i czasu t , to hamiltonian zachowuje energię oraz hamiltonowskie równania ruchu można zapisać wzorami (2.11) i (2.12).

$$\dot{\mathbf{q}}_i = \frac{\partial H}{\partial \mathbf{p}_i} \quad (2.11)$$

$$\dot{\mathbf{p}}_i = -\frac{\partial H}{\partial \mathbf{q}_i} \quad (2.12)$$

Dla współrzędnych kartezjańskich w opisie hamiltonowskim równania ruchu opisane są wzorami (2.13) i (2.14). Podczas gdy wzory te są układem $3N$ równań różniczkowych drugiego rzędu, to wzór (2.3) jest układem $6N$ równań różniczkowe pierwszego rzędu. Oba systemy są równoważne, ale wymagają algorytmów numerycznych o różnym stopniu złożoności do ich rozwiązywania.

$$\dot{r}_i = \frac{p_i}{m_i} \quad (2.13)$$

$$\dot{p}_i = F_i \quad (2.14)$$

Ewolucja układu fizycznego może być opisana równaniem Liouville'a (2.15) używając statystyki klasycznej w funkcji rozkładu mechanicznego $\rho(\mathbf{q}, \mathbf{p}, t)$.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \sum_i \left(\frac{\partial \rho}{\partial \mathbf{q}_i} \frac{\partial H}{\partial \mathbf{p}_i} - \frac{\partial \rho}{\partial \mathbf{p}_i} \frac{\partial H}{\partial \mathbf{q}_i} \right) = -\{\rho, H\} \quad (2.15)$$

Dla przestrzeni fazowej $\Gamma = \{r_i, p_i\}$ współrzędnych kartezjańskich położeń i pędów, trajektoria jest oznaczona jako $\Gamma(t)$. Ewolucję obserwabli $A(\Gamma)$ opisuje równanie (2.16).

$$\frac{\partial A(\Gamma)}{\partial t} = \sum_i \left(\frac{\partial A(\Gamma)}{\partial r_i} \dot{r}_i + \frac{\partial A(\Gamma)}{\partial p_i} \dot{p}_i \right) = i\mathcal{L}A(\Gamma) \quad (2.16)$$

Operator Liouville'a \mathcal{L} jest zdefiniowany wzorem (2.17).

$$i\mathcal{L} = \sum_i \left(\dot{r}_i \frac{\partial}{\partial r_i} + \dot{p}_i \frac{\partial}{\partial p_i} \right) \quad (2.17)$$

Rozwiązaniem ogólnym równania (2.16) jest funkcja $A(t)$ opisana wzorem (2.18).

$$A(t) = e^{-i\mathcal{L}t} A(0) \quad (2.18)$$

Operator Liouville'a można podzielić na dwie części (2.19).

$$i\mathcal{L} = i\mathcal{L}_r + i\mathcal{L}_p \quad (2.19)$$

gdzie $i\mathcal{L}_r$ i $i\mathcal{L}_p$, składowe operatora $i\mathcal{L}$ są zdefiniowane odpowiednio wzorami (2.20) oraz (2.21).

$$i\mathcal{L}_r = \sum_i \dot{r}_i \frac{\partial}{\partial r_i} \quad (2.20)$$

$$i\mathcal{L}_p = \sum_i \dot{p}_i \frac{\partial}{\partial p_i} \quad (2.21)$$

W ogólności operatory $i\mathcal{L}_r$ i $i\mathcal{L}_p$ nie komutują (2.22).

$$i\mathcal{L}_r i\mathcal{L}_p \phi \neq i\mathcal{L}_p i\mathcal{L}_r \phi \quad (2.22)$$

Dekompozycję Trotter'a dla niekomutujących ze sobą operatorów A i B , $[A, B] \neq 0$ opisuje równanie (2.23) [19].

$$e^{A+B} = \lim_{P \rightarrow \infty} [e^{B/2P} e^{A/P} e^{B/2P}]^P \quad (2.23)$$

Dla operatora (2.19) dekompozycja Trotter'a przyjmuje postać równania (2.24).

$$e^{i\mathcal{L}t} = e^{(i\mathcal{L}_r + i\mathcal{L}_p)t} = \lim_{P \rightarrow \infty} [e^{i\mathcal{L}_p t/2P} e^{i\mathcal{L}_r t/P} e^{i\mathcal{L}_p t/2P}]^P \quad (2.24)$$

Wprowadzając mały dyskretny krok $\Delta t = t/P$ 2.25 otrzymano wzór 2.26.

$$e^{i\mathcal{L}t} = \lim_{P \rightarrow \infty, \Delta t \rightarrow 0} [e^{i\mathcal{L}_p \Delta t/2} e^{i\mathcal{L}_r \Delta t} e^{i\mathcal{L}_p \Delta t/2}]^P \quad (2.25)$$

$$e^{i\mathcal{L}t} \approx [e^{i\mathcal{L}_p \Delta t/2} e^{i\mathcal{L}_r \Delta t} e^{i\mathcal{L}_p \Delta t/2}]^P + \mathcal{O}(P \Delta t^3) \quad (2.26)$$

Uwzględniając zależność $t = P \Delta t$ otrzymano równanie 2.27.

$$e^{i\mathcal{L}t} \approx e^{i\mathcal{L}_p \Delta t/2} e^{i\mathcal{L}_r \Delta t} e^{i\mathcal{L}_p \Delta t/2} + \mathcal{O}(\Delta t^3) \quad (2.27)$$

Wzory (2.28) i (2.29) stanowią podstawę algorytmu Velocity-Verlet [20].

$$\begin{aligned}
 e^{i\frac{\Delta t}{2}\mathcal{L}_p}e^{i\Delta t\mathcal{L}_r}e^{i\frac{\Delta t}{2}\mathcal{L}_p}r_i(t) + \mathcal{O}(\Delta t^3) &= r_i(t) + \Delta t \dot{r}_i\left(\frac{\Delta t}{2}\right) + \mathcal{O}(\Delta t^3) \\
 &= r_i(t) + \Delta t v_i(t) + \frac{\Delta t^2}{2m_i}F_i(t) + \mathcal{O}(\Delta t^3) \\
 &= r_i(t + \Delta t)
 \end{aligned} \tag{2.28}$$

$$\begin{aligned}
 e^{i\frac{\Delta t}{2}\mathcal{L}_p}e^{i\Delta t\mathcal{L}_r}e^{i\frac{\Delta t}{2}\mathcal{L}_p}p_i(t) + \mathcal{O}(\Delta t^3) &= p_i(t) + \frac{\Delta t}{2}(\dot{p}_i(t) + \dot{p}_i(t + \Delta t)) + \mathcal{O}(\Delta t^3) \\
 &= v_i(t) + \frac{\Delta t}{2m_i}(F_i(t) + F_i(t + \Delta t)) + \mathcal{O}(\Delta t^3) \\
 &= v_i(t + \Delta t)
 \end{aligned} \tag{2.29}$$

Równania ruchu Langevin'a opisane są wzorami (2.30) i (2.31).

$$\frac{d}{dt}\mathbf{r}_i = \frac{1}{m_i}\mathbf{p}_i \tag{2.30}$$

$$\frac{d}{dt}\mathbf{p}_i = \mathbf{F}_i - \gamma_i \left[\frac{1}{m_i}\mathbf{p}_i - \mathbf{u}_i \right] + \eta_i \tag{2.31}$$

Dla standardowego termostatu Langevin'a F_i jest siłą zachowawczą, która zależy tylko od położenia cząstek a prędkość rozpuszczalnika wynosi zero ($\mathbf{u}_i = 0$).

$$\langle \eta_{i\alpha} \rangle = 0 \tag{2.32}$$

$$\langle \eta_{i\alpha} \eta_{i\beta} \rangle = 2\gamma_i k_B T \delta_{ij} \delta_{\alpha\beta} \delta(t - t') \tag{2.33}$$

Aby uzyskać algorytm podobny do algorytmu Verleta, przepisujemy równania ruchu za pomocą ujęcia Fokkera-Plancka (rozszerzenie Kramers-Moyal, [21]):

$$\partial_t \rho(\Gamma; t) = (L_1 + L_2 + L_3 + L_4)\rho(\Gamma; t), \tag{2.34}$$

które opisuje konserwatywną rzeczywistą przestrzeń oraz zachowany pęd. Równanie opisuje dysypatywny układ podlegający stochastycznej ewolucji. Operatory L_i za-

dane są równaniami:

$$L_1 = - \sum_i \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} \cdot \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} \quad (2.35)$$

$$L_2 = - \sum_i \frac{\partial}{\partial \mathbf{p}_i} \cdot \mathbf{F}_i \quad (2.36)$$

$$L_3 = \sum_i \gamma_i \frac{\partial}{\partial \mathbf{p}_i} \cdot \left[\frac{1}{m_i} \mathbf{p}_i - \mathbf{u}_i \right] \quad (2.37)$$

$$L_4 = k_B T \sum_i \gamma_i \frac{\partial^2}{\partial \mathbf{p}_i^2} \quad (2.38)$$

Ponownie używając rozwinięcia Trotter'a uzyskujemy:

$$\begin{aligned} \exp[(L_1 + L_2 + L_3 + L_4)\Delta t] &= \exp\left[L_1 \frac{\Delta t}{2}\right] \cdot \exp[(L_2 + L_3 + L_4)\Delta t] \cdot \exp\left[L_1 \frac{\Delta t}{2}\right] \\ &+ \mathcal{O}(\Delta t^3) \end{aligned} \quad (2.39)$$

Zauważając, że L_1 zawiera tylko pochodne po położeniu cząstek a $L_2 + L_3 + L_4$ zawiera pochodne po pędzie, to otrzymujemy algorytm rzędu $\mathcal{O}(\Delta t^3)$, który aktualizuje położenia dla $t + \Delta t/2$, pędy dla $t + \Delta t$ i ponownie położenia do kolejnego pełnego kroku czasowego $t + \Delta t$. Dla tej sekwencji można dokładnie znaleźć rozwiązania równań ruchu, pierwsza aktualizacja pozycji jest zadana przez równanie (2.40).

$$\mathbf{r}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \mathbf{r}_i(t) + \frac{\Delta t}{2} \frac{\mathbf{p}_i(t)}{m_i} \quad (2.40)$$

Aktualizacja pędu jest określana przez dokładne rozwiązanie równania Langevina. Matematycznie, równanie (2.31) to nic innego jak dobrze znany problem ruchów Browna w potencjale harmonicznym. Zatem aktualizację pędu do chwili czasu Δt można zapisać jako

$$\mathbf{p}_i(\Delta t) = d_i(\Delta t)\mathbf{p}_i(0) + q_i(\Delta t)\Phi_i + \sigma(\Delta t)\zeta_i \quad (2.41)$$

gdzie $d_i(\Delta t)$, $q_i(\Delta t)$ i $\sigma(\Delta t)$ to parametry które można obliczyć na początku symulacji:

$$d_i(\Delta t) = \exp\left(-\frac{\gamma_i}{m_i} \Delta t\right) \quad (2.42)$$

$$q_i(\Delta t) = \frac{m_i}{\gamma_i} \left[1 - \exp\left(1 - \frac{\gamma_i}{m_i} \Delta t\right)\right] \quad (2.43)$$

$$\sigma_i(\Delta t) = \sqrt{m_i k_B T \left[1 - \exp\left(-2 \frac{\gamma_i}{m_i} \Delta t\right)\right]} \quad (2.44)$$

Zmienne losowe ζ i Φ są wzajemnie nieskorelowane, zgodne z rozkładem Gaussa i mają zerową średnią i jednostkową wariancję. Zakładając zerową wartość współczynnika gamma i brak dodatkowej siły η_i przedstawiona powyżej metoda sprowadza się do algorytmu Velocity-Verlet.

2.2 Metoda Sterowanej Dynamiki Molekularnej

Technika symulacji sterowanej dynamiki molekularnej (ang. Steered Molecular Dynamics SMD) opiera się na koncepcji przyłożenia siły zewnętrznej do jednego lub więcej atomów, które określa się jako atomy SMD. Ponadto można utrzymać inną grupę atomów ustaloną w jednym miejscu, zabraniając im ruchu lub dodając dodatkowe, harmoniczne ograniczenia ich położenia.

Takie podejście pozwala badać procesy biologiczne w skali czasowej dostępnej dla symulacji MD oraz w szerokim zakresie warunków. Metodę SMD z powodzeniem zastosowano do badania rozwijania białek [22–26], ekstrakcji cholesterolu z biosystemów [27–29], nanoindentacji dwuwarstw fosfolipidowych [30–32]. Wykazano, że nierównowagowa dynamika molekularna może być wykorzystana do głębszego wglądu w procesy dynamiczne indukowane siłą zewnętrzną na poziomie molekularnym.

2.3 Potencjał CHARMM

Parametryzacja CHARMM (ang. Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) jest szeroko stosowana w dynamice molekularnej do modelowania biomolekuł. Zawiera zestaw parametrów opisujący białka [33]. W wersji CHARMM27 wprowadzono ulepszenia w opisie DNA, RNA i lipidów, a także zastosowano uogólnioną wersję potencjału dla związków o strukturze chemicznej podobnej do leków [34, 35]. CHARMM używany jest również do modelowania układów osadzonych na powierzchni lub wewnątrz nanorurek węglowych [36–38]. Funkcja energii w potencjale CHARMM opisana jest wzorem (2.45).

$$E_{charmm} = E_{bonded} + E_{nonbonded} \quad (2.45)$$

Wyraz E_{bonded} reprezentuje wiązania kowalencyjne. Wyraz $E_{nonbonded}$ odpowiada za niewiążące interakcje między cząsteczkami lub atomami. Składowe energii E_{bonded} przedstawione zostały we wzorze (2.46).

$$E_{bonded} = E_{bond} + E_{angle} + E_{ub} + E_{dihedral} + E_{improper} + E_{cmap} \quad (2.46)$$

Wyrazy E_{bond} (2.47) oraz E_{angle} (2.48) reprezentują odpowiednio zmianę długości i wartości kąta wiązania chemicznego.

$$E_{bond} = \sum_{bonds} K_i^{bond} (r_i - r_0)^2 \quad (2.47)$$

$$E_{angle} = \sum_{angles} K_i^{angle} (\theta_i - \theta_0)^2 \quad (2.48)$$

Składowa energii Urey-Bradley E_{ub} (2.49) jest dodatkowym wyrazem harmonicznym, opisującym rozciąganie wiązania E_{bond} i zginanie kątowe E_{angle} . Koryguje odległość między pierwszym a trzecim atomem w wyrażeniu kątowym. W najnowszych wersjach parametryzacji CHARMM składowa E_{ub} jest pomijana.

$$E_{ub} = \sum_{\substack{Urey \\ Bradley}} K_i^{ub} (b_i^{1-3} - b_0^{1-3})^2 \quad (2.49)$$

Wyraz dwuścienny $E_{dihedral}$ (2.50) reprezentuje poprawkę na całkowitą energię potencjalną wynikającą z obrotu skrętnego czterech atomów wokół centralnego wiązania.

$$E_{dihedral} = \begin{cases} \sum_{dihedrals} K_i^{dihedral} (1 + \cos(n\varphi_i - y_i)), & n \neq 0 \\ \sum_{dihedrals} K_i^{dihedral} (\varphi_i - y_i)^2, & n = 0 \end{cases} \quad (2.50)$$

Składową energii E_{bonded} związaną z chiralnością atomów opisuje wyraz $E_{improper}$ (2.51).

$$E_{improper} = \sum_{angles} K_i^{angle} (\omega_i - \omega_0)^2 \quad (2.51)$$

Termin E_{cmap} (2.52) będący najnowszym dodatkiem do parametryzacji CHARMM [39] jest parametrem krzyżowym dla par dwuściennych kątów szkieletu w postaci korekcyjnych map energii. W obecnym CHARMM jest używany wyłącznie do poprawy właściwości konformacyjnych szkieletów białek.

$$E_{cmap} = \sum_{cmap} e_{cmap}(\phi, \psi) \quad (2.52)$$

Sumowanie w powyższych równaniach odbywa się po wszystkich zadeklarowanych wiązaniach, kątach między wiązaniem, pierwszym i trzecim atomie pary kątów oraz dwuściennych kątach w badanym układzie, a K_i oznacza stałą siły każdej interakcji. Energia $E_{nonbonded}$ reprezentująca niekwalencyjne wiązania jest złożona z dwóch wyrazów (2.53).

$$E_{nonbonded} = E_{vdw} + E_{coulomb} \quad (2.53)$$

Oddziaływanie van der Waal'sa (2.54) modelowane jest używając standardowego potencjału Lenard-Jones'a 12 – 6 [40].

$$E_{vdw} = \sum_i \sum_{j>i} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.54)$$

Wyrażenie r_{ij} jest odległością pomiędzy i -tym i j -tym atomem, a ϵ_{ij} jest głębokością potencjału dla wartości $r_{min} = \sqrt[6]{2\sigma_{ij}}$. Parametry interakcji pomiędzy atomami różnego typu wyznaczone są z reguły mieszania Lorentz-Berthelot opisane wzorami (2.55) i (2.56).

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad (2.55)$$

$$\epsilon_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2} \quad (2.56)$$

Oddziaływania elektrostatyczne w układzie opisuje prawo Coulomba wyrażone jest poprzez równanie (2.57), w którym q_i , q_j to ładunki cząstkowe na atomach i i j , a ϵ_0 to przenikalność dielektryczna próżni.

$$E_{Coulomb} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 r_{ij}} \quad (2.57)$$

Dla uproszczenia obliczeń oddziaływania niezwiązane są zwykle odcinane w pewnej odległości. Typowy promień odcięcia w symulacjach biomolekuł mieści się w przedziale 1,0-1,5 nm. W układach z okresowymi warunkami brzegowymi (PBC) [41] nie można pominąć oddziaływań elektrostatycznych dalekiego zasięgu. Algorytmy, takie jak technika sumowania Ewalda [42] czy metoda siatki cząstek Ewalda (PME) [43], zostały opracowane w celu uwzględnienia oddziaływań elektrostatycznych dalekiego zasięgu.

Bezpośrednie wprowadzenie odległości odcięcia wprowadziłoby nieciągłość potencjału, która może wpłynąć na stabilność obliczeń dynamiki molekularnej. Aby rozwiązać ten problem, niezwiązane terminy interakcji są zawile ze specjalnymi funkcjami przełączania lub przesuwania. W symulacjach przedstawionych w tej pracy wprowadzono przełączanie członów niezwiązanych bezpośrednio, zwykle w odległości mniejszej od promienia odcięcia o 0,15 nm lub 0,2 nm.

2.4 Wybrane metody analizy danych symulacyjnych MD

Wiązanie wodorowe jest specyficznym oddziaływaniem bliskiego zasięgu, należącym do kluczowych zjawisk występujących w przyrodzie. Pełni ono istotną rolę w podstawowych procesach biochemicznych.

Wiązanie wodorowe jest efektywnym wzajemnym oddziaływaniem pomiędzy atomem wodoru pochodzącym z molekuly lub fragmentu D-H molekuly (gdzie D jest bardziej elektroujemny niż H) i atomem A lub grupą atomów w tej samej lub innej molekule. Skutkiem zmniejszenia się gęstości elektronowej w obszarze atomu wodoru i uzyskaniem cząstkowego ładunku dodatniego jest oddziaływanie atomów D i H ze sobą spolaryzowanym wiązaniem kowalencyjnym. W wyniku polaryzacji cząsteczka zostaje protonodorem i może oddziaływać z częścią innej molekuly posiadającej cząstkowy ładunek ujemny. Atomem D w wiązaniu wodorowym może być dowolny atom cechujący się większą elektroujemnością niż atom wodoru (C, N, O, P, S, Cl, Se ...). Protonoakceptor w mostku wodorowym musi charakteryzować się obszarem obfitym w elektrony, może nim być atom A dysponujący wolną parą elektronową lub grupa atomów połączona elektronami π . Wiązań wodorowych umożliwiają tworzenie się struktur przestrzennych biomolekuł takich jak białka i kwasy nukleinowe.

Wartość energii wiązania wodorowego jest pośrednia pomiędzy oddziaływaniem van der Waalsa a wiązaniem kowalencyjnym dlatego też pełni ono zasadniczą rolę w biologii. Cechuje je stosunkowo szybki czas powstawania i zanikania, co ma szczególne znaczenie w reakcjach biochemicznych, które zachodzą zazwyczaj w temperaturze pokojowej. Przykładem znaczenia wiązań wodorowych jest ich wpływ na budowę cząsteczki DNA, główny nośnik informacji genetycznej wszystkich organizmów żywych. Składa się ona z dwóch łańcuchów nukleotydowych, które są skrócone jeden dookoła drugiego, tworząc podwójną helisę. Oba łańcuchy są utrzymywane razem przez wiązania wodorowe pomiędzy komplementarnymi parami zasad azotowych.

W omawianych tutaj badaniach założono iż wiązanie wodorowe powstaje, gdy odległość D-A jest mniejsza niż odległość odcięcia (domyślnie 3.0 Å) a kąt D-A-H jest mniejszy niż kąt odcięcia (domyślnie 20 stopni) [44].

Odchylenie średniej kwadratowej pozycji atomów lub po prostu odchylenie średnio-kwadratowe (RMSD) (2.58) jest miarą średniej odległości między atomami (zwykle atomami szkieletu) porównywanych białek. Należy zauważyć, że obliczenie RMSD można zastosować do innych cząsteczek niebiałkowych, takich jak małe cząsteczki organiczne. W badaniu konformacji białek kulistych zwykle mierzy się podobieństwo struktury trójwymiarowej za pomocą RMSD współrzędnych atomów węgla C_α po optymalnej superpozycji ciała sztywnego.

$$\text{RMSD}(t) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(0))^2}{N}} \quad (2.58)$$

Najczęściej używany jest pierwiastek kwadratowy z przesunięcia pozycji atomowej (RMSD) wyrażony jako funkcja $\rho(t)$ zależna od czasu opisana wzorem 2.59.

$$\rho(t) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N w_i (\mathbf{x}_i(t) - \mathbf{x}_i^{\text{ref}})^2} \quad (2.59)$$

Jest to odległość euklidesowa w przestrzeni konfiguracyjnej bieżącej konfiguracji (być może po optymalnym przesunięciu i obrocie) od konfiguracji odniesienia podzielona przez $1/N$, gdzie N to liczba współrzędnych. Wagi w_i są obliczane z wejściowych wag w'_i w stosunku do średniej $\langle w' \rangle$ (2.60).

$$w_i = \frac{w'_i}{\langle w' \rangle} \quad (2.60)$$

Promień bezwładności R_g (RG) jest miarą rozkładu atomów w strukturze molekularnej względem środka masy lub danej osi obrotu. Mały promień bezwładności wskazuje, że atomy w strukturze znajdują się blisko środka masy, a duży promień oznacza, że atomy są daleko od tego środka. Równanie (2.61), jest używane do obliczenia promienia bezwładności.

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i m_i r_i^2}{\sum_i m_i}} \quad (2.61)$$

gdzie m_i jest masą atomu i , a r_i jest położeniem atomu i względem środka masy zaznaczenia. Promień bezwładności wokół każdej osi można również określić oddziel-

nie. Na przykład promień bezwładności wokół osi x .

$$R_{i,x} = \sqrt{\frac{\sum_i m_i [r_{i,y}^2 + r_{i,z}^2]}{\sum_i m_i}} \quad (2.62)$$

Rozdział 3

Modelowanie i parametry symulacji

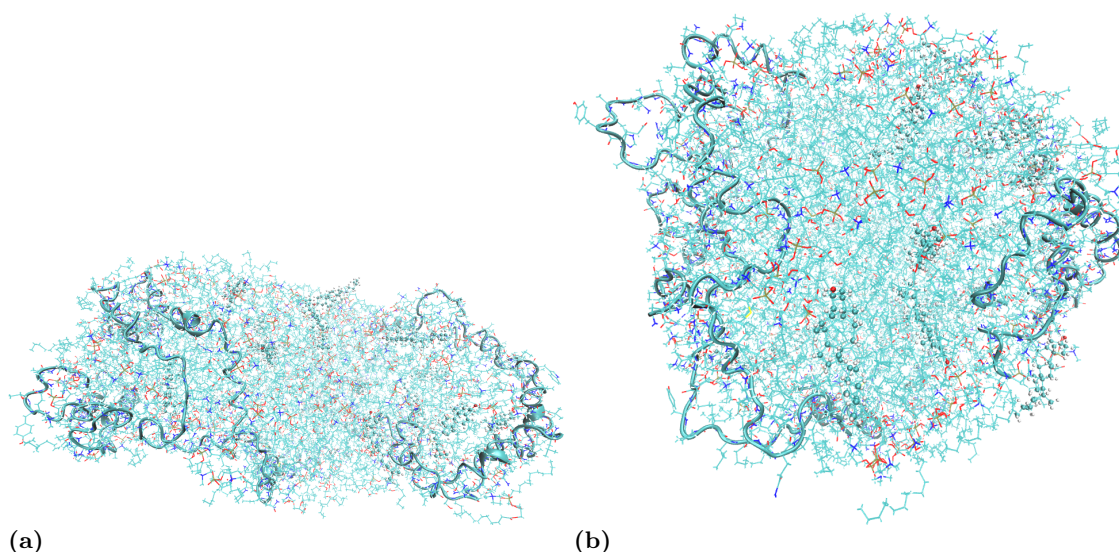
Symulacje komputerowe badanych układów przeprowadzono metodą klasycznej dynamiki molekularnej (MD - Molecular Dynamics), z wykorzystaniem programu NAMD 2.11 [45] stosując w pełni atomistyczny model. Do przygotowania atomistycznych modeli symulowanych układów, ich wizualizacji, przeglądania otrzymanych wyników oraz ich częściowej analizy wykorzystano oprogramowanie VMD 1.9.3 [46]. Analizę pozostałych wyników diskutowanych w niniejszej pracy doktorskiej wykonano przy użyciu własnoręcznie zaimplementowanego oprogramowania, przygotowanego przy użyciu języka Python oraz języka skryptowego TCL (Tool Command Language). Skrypty języka TCL zostały dodatkowo wykorzystane w głównej fazie przeprowadzonych symulacji celem utrzymania ich właściwych parametrów. Zostanie to szczegółowo opisane w dalszej części rozdziału.

Użyte w symulacjach modele nanorurki węglowej (CNT), grafenu oraz monowarstwy azotku boru zostały przygotowane przy wykorzystaniu generatora wbudowanego w program VMD.

Oprócz wyżej wymienionych nanostruktur w badanych układach wykorzystano własnoręcznie zbudowane modele bioagregatów nHDL i HDL. Model nHDL składał się apoliproteiny A-I (apoA-I), 200 molekuł 1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicero-fosfocholiny (POPC), oraz 20 molekuł cholesterolu, natomiast agregat HDL tworzy apoA-I, 188 lipidów POPC, 20 cholesteroli i 86 molekuł oleinianu cholesterolu (CE), które wypeł-

niały jego środek. Wstępnie zbudowane biomolekuły nHDL i HDL zostały poddane symulacjom równowagowym w warunkach NPT (izotermalno - izobarycznym), w wodzie (1 ns), o temperaturze fizjologicznej $T = 310$ K. Następnie układ równoważono w bezwodnym środowisku izotermalnym NT, także w czasie 1 ns i temperaturze fizjologicznej. Proces równoważenia molekuł nHDL i HDL został przeprowadzony dwukrotnie, dla niezależnych układów. Miało to na celu wykluczenie sytuacji, w której równoważony model znalazłby się w minimum lokalnym, co miałyby wpływ na wyniki symulacji głównych.

Ostatecznie, po porównaniu wyników niezależnych symulacji równowagowych i stwierdzeniu, że obydwa układy są do siebie podobne, do dalszych symulacji wybrano zrównoważone modele pokazane na rys. 3.1. Z rysunku widać, że agregaty przyjęły kształt podawany w literaturze [47, 48] - nHDL na kształt dyskooidalny, natomiast HDL ma kształt sferyczny.



Rysunek 3.1: Modele biomolekuł używane w symulacjach: (a) nHDL i (b) HDL.

We wszystkich przeprowadzonych symulacjach krok czasowy był równy 0.5 fs. Oddziaływania molekuł cholesterolu, fosfolipidu POPC i poproteiny apoA-I modelowano za pomocą potencjału CHARMM36 [33, 49]. Parametry potencjału dla oleinianu cholesterolu zostały wzięte z [50], a dla atomów argonu z [51]. Aby zachować zgodność z polem siłowym CHARMM, użyto model wody TIP3P [52]. Równania ruchu całkowano za pomocą algorytmu Brungera–Brooksa–Karplusa zaimplementowanego w programie NAMD [53]. Temperaturę kontrolowano za pomocą termostatu

Langevina, z przyjętym współczynnikiem tłumienia 5 ps^{-1} .

Cały cykl symulacji, związany z ładowaniem nHDL molekułami wody lub atomami argonu, składał się z czterech etapów:

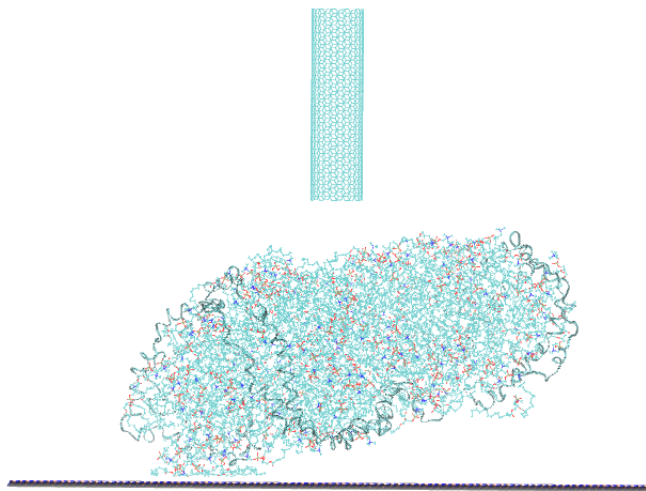
1. symulacje struktury HDL i nHDL,
2. nanoindentacji bioagregatu nHDL nanorurką węglową,
3. symulacji wypełniania nHDL molekułami wody bądź atomami argonu w środowisku bezwodnym,
4. symulacji wypełniania nHDL molekułami wody w środowisku wodnym.

3.1 Symulacje struktury HDL i nHDL

Tą część symulacji przeprowadzono dla temperatur z zakresu od 290 do 330 K, co 10 K. Przyrost temperatury nie następował skokowo - układy były podgrzewane z przyrostem 0.00005 K co 50 kroków ($0.000001 \text{ K} \cdot \text{krok symulacyjny}^{-1}$). Symulacje przeprowadzono bez obecności wody, czas trwania symulacji dla każdej temperatury wynosił 5 ns. Wyniki prezentowane w tej pracy są uśrednieniem po pięciu niezależnych przebiegach symulacyjnych.

3.2 Nanoindentacja bioagregatu nHDL nanorurką węglową

W tym przypadku układ składał się z nanorurki węglowej o chiralności (12, 12) i długości 90 Å, biomolekuły nHDL oraz monowarstwy zbudowanej z azotku boru. Konfiguracja początkowa układu jest pokazana na rys. 3.2.



Rysunek 3.2: Początkowa konfiguracja układu wykorzystanego w symulacjach nanoindentacji nHDL nanorurką węglową.

W konfiguracji początkowej nanorurka ułożona jest prostopadle do płaszczyzny dyskooidalnego nHDL, w przybliżeniu około 2 nm nad agregatem. Od spodu znajduje się warstwa azotku boru. Atomy w tej warstwie są unieruchomione, gdyż jej zadaniem jest zatrzymać przesuwany przez nanorurkę nHDL. Jest to konieczne, ponieważ w układzie nie występują żadne dodatkowe czynniki oporu i bez monowarstwy agregat byłby po prostu popychany przez nanorurkę. Tak przygotowany układ był równoważony przez 4 ns w temperaturze $T = 310$ K. W tej samej temperaturze przeprowadzono również symulacje nanoindentacji.

Nanoindentację agregatu nanorurką węglową przeprowadzono metodą SMD (Steered Molecular Dynamics) [45, 54]. Dodane wirtualne sprężyny znajdowały się między górnym (najbardziej oddalonym od nHDL - rys. 3.2) pierścieniem atomów węgla w nanorurce, a wyimaginowanymi punktami poruszającymi się ze stałą prędkością. W ten sposób uzyskano ruch CNT wzdłuż osi z , w kierunku biomolekuły nHDL, dodając sprężyny do 40 atomów (liczba atomów w każdym wyizolowanym pierścieniu nanorurki). Wartość stałej siłowej była równa $10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, a wartość prędkości nanoindentacji $v = 2.5 \text{ m s}^{-1}$. Tę część symulacji powtórzono pięciokrotnie, a wyniki

prezentowane w tej dysertacji są uśrednieniem po wszystkich trajektoriach.

Proces nanoindentacji został zatrzymany, gdy koniec CNT, znajdujący się początkowo bliżej nHDL, znalazł się wewnątrz agregatu.

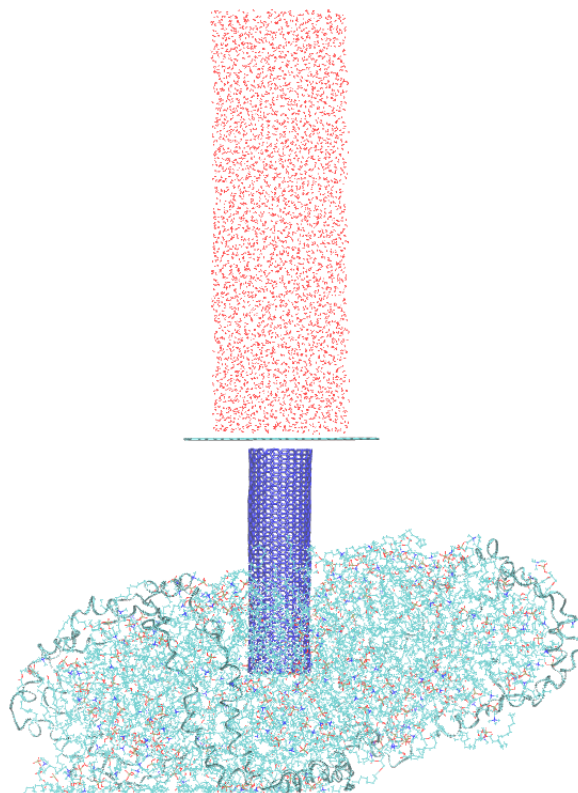
3.3 Symulacja wypełniania nHDL molekułami wody bądź atomami argonu w środowisku bezwodnym

W tej części badań wykorzystano końcową konfigurację układu opisanego w poprzednim podrozdziale. nHDL przebity nanorurką w taki sposób, że jeden jej koniec znajdował się w środku agregatu został następnie wykorzystany do zbadania, czy CNT może być wykorzystana jako kanał transportowy substancji do wnętrza biomolekuły.

W przeprowadzonych symulacjach próbowano wtłaczać do wnętrza nHDL niepolarne atomy argonu lub polarne molekuły wody. Aby możliwe było wtłoczenie substancji do wnętrza nHDL, zastosowano procedurę polegającą na unieruchomieniu atomów węgla znajdujących się na końcu nanorurki, wystającym z nHDL (górny pierścień). Następnie, przy pomocy oprogramowania VMD wygenerowana została warstwa grafenowa o rozmiarach $36 \times 36 \text{ \AA}$. Kolejnym krokiem było wybicie otworu (o średnicy CNT) w wygenerowanej warstwie grafenowej, umieszczenie jej w taki sposób, że otwór przylegał do końca nanorurki znajdującego się na zewnątrz nHDL i unieruchomienie grafenu. Następnie, na płaszczyźnie grafenu znajdującej się po przeciwnej stronie niż nanorurka wygenerowano prostopadłościan wody/argonu o wymiarach $36 \times 36 \times Z \text{ \AA}$, gdzie $Z = 100 \text{ \AA}$ w przypadku układu z wodą oraz $Z = 60 \text{ \AA}$ w przypadku układu z argonem. Finalnie układ prezentował się tak, jak pokazano na rysunku 3.3.

Należy zaznaczyć, że woda/argon znajdujący się w wirtualnym prostopadłościanie nie miały możliwości swobodnego przemieszczania się z uwagi na uwzględnione w przygotowanym skrypcie TCL ograniczenia. Można to sobie wyobrazić następująco - od spodu prostopadłościanu ruch wody/argonu był ograniczony przez grafen, z boków przez przyłożone do wirtualnych ścian prostopadłościanu pole siłowe, natomiast z góry przez wirtualny tłok, dzięki któremu zastosowano metodę redukcji dostępnej objętości. Skutkiem tego woda/argon przemieszczały się do wnętrza nHDL wykorzystując nanorurkę jako kanał pośredniczący.

W przypadku układu z wodą prostopadłościan był wypełniony 4538 cząsteczkami wody, co odpowiada gęstości 1040 kg m^{-3} . Zastosowana redukcja dostępnej objętości



Rysunek 3.3: Konfiguracja początkowa układu ładowania nHDL wodą. Nanorurka została pokolorowana na niebiesko celem wyraźnego zwizualizowania jej końca znajdującego się wewnątrz nHDL.

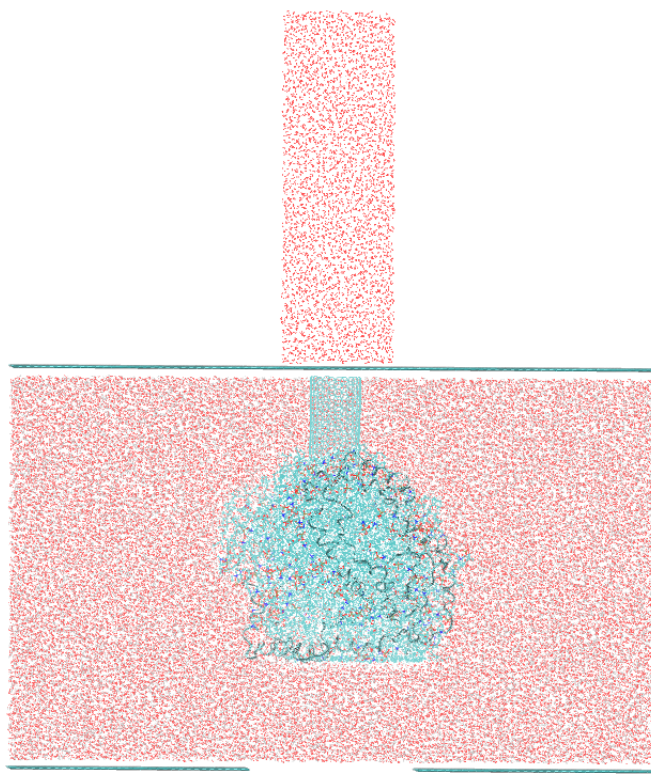
odpowiadała w warunkach normalnych przepływowi wody z prękościami równymi 4.35, 0.87 oraz 0.22 cząsteczek $\cdot \text{ps}^{-1}$ (0.00005, 0.00001 oraz 0.0000025 \AA na krok czasowy symulacji). Dla układu z argonem prostopadłościan został wypełniony 3072 atomami. Zastosowane reguły zmiany dostępnej objętości były takie same, jak dla układu z wodą.

Dla układu z wodą symulacje zostały przeprowadzone w temperaturze $T = 310\text{K}$, zaś dla układu z argonem w temperaturach $T = 310\text{ K}$ i $T = 10\text{ K}$. Tak duża różnica temperatur wynika z faktu, że dla argonu w temperaturze fizjologicznej nHDL jest niewielką przeszkodą i atomy dość swobodnie pokonują jego ściany. Szczegółowy opis dyfuzji argonu z nHDL znajduje się w następnym rozdziale.

Z uwagi na znaczny rozmiar badanego układu, w przypadku tej części symulacji przeprowadzono tylko dwa niezależne przebiegi dla każdego układu i każdej prędkości ładowania.

3.4 Symulacje wypełniania nHDL molekułami wody w środowisku wodnym

Celem tych symulacji było wskazanie potencjalnych różnic pomiędzy zachowaniem bioagregatu w próżni i w wodzie, która została wybrana z uwagi na fakt, że ciało człowieka w około 70% składa się z wody. W stosunku do układu początkowego opisanego w poprzednim podrozdziale różnica występuje tylko w fakcie otoczenia nHDL wodą. Jak można zauważyć z rys. 3.4, gdzie pokazano zrzut ekranu układu początkowego, komórkę wody otaczającą nHDL ograniczono w płaszczyźnie xy rozmiarami komórki symulacyjnej (w przybliżeniu $205 \times 205 \text{ \AA}$), zaś wzdłuż osi z granicę wyznaczają warstwy grafenowe o rozmiarach x, y zbliżonych do rozmiaru komórki symulacyjnej.



Rysunek 3.4: Konfiguracja początkowa układu ładowania nHDL wodą, w obecności wody. Aby lepiej unaocznić badany układ, nie cała woda rozmieszczona pomiędzy warstwami grafenowymi została pokazana.

Atomy warstw grafenowych są unieruchomione, dzięki czemu uzyskano sztywny box, którego nie mogą opuścić molekuly wody. Celem tej procedury było zmniejszenie liczby atomów. Tylko w układzie przedstawionym na rys. 3.4 liczba atomów wynosi powyżej 536 000. Symulacja takiej ilości atomów, modelem w pełni atomi-

stycznym, jest wartością graniczną, którą w rozsądnym czasie (rzędu kilku miesięcy) są w stanie policzyć dzisiejsze komputery znajdujące się w zasobach PL-Grid. Wypełnienie wodą całej komórki symulacyjnej wzdłuż osi z zwiększyłoby liczbę atomów o kolejne kilkaset tysięcy. Przeglądając rys. 3.4 można dodatkowo zauważyć, że rozmiary komórki wody, w której znajduje się nHDL są relatywnie duże w porównaniu do wielkości tej lipoproteiny. Dodatkowo, molekuly wody zostały rozlosowane stosunkowo rzadko. Ma to na celu umożliwienie rozprzestrzeniania się agregatu nHDL - zbyt ciasny układ uniemożliwiłby jego relatywnie swobodną ekspansję. W przypadku tak dużego układu bardzo trudne i czasochłonne byłoby powtórzenie wszystkich symulacji opisanych w poprzednim podrozdziale. Z tego też powodu do symulacji porównawczych wybrano tylko układ ładowany wodą, przy prędkości ładowania równej $0.00001 \text{ \AA} \text{ krok czasowy}^{-1}$. Dla wymienionego układu wykonano dwa niezależne przebiegi.

Rozdział 4

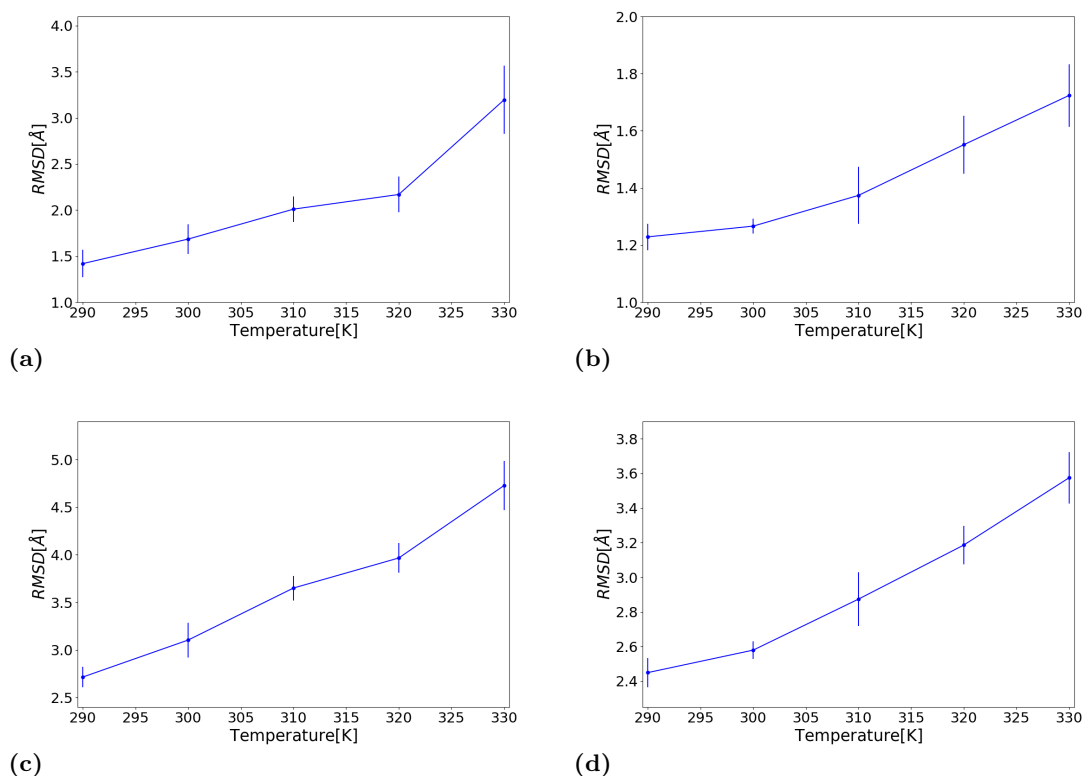
Prezentacja i omówienie wyników

Rozdział ten składa się z czterech podrozdziałów, w których są prezentowane i dyskutowane wyniki symulacji:

- symulacje struktury HDL i nHDL (4.1),
- nanoindentacja bioagregatu nHDL nanorurką węglową (4.2),
- symulacje wypełniania nHDL molekułami wody bądź atomami argonu w środowisku bezwodnym (4.3),
- symulacje wypełniania nHDL molekułami wody w środowisku wodnym (4.4).

4.1 Symulacje struktury HDL i nHDL

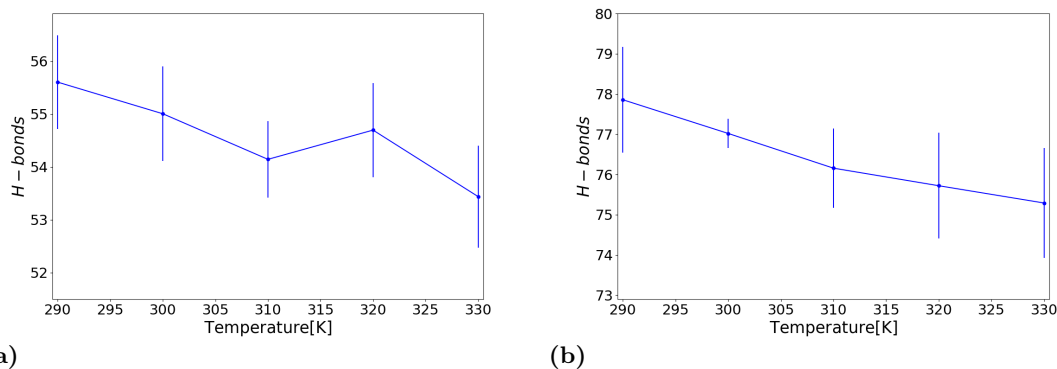
Wartości prezentowane w tym podrozdziale są uśrednieniem po pięciu niezależnych przebiegach. Symulowane struktury zarówno HDL, jak i pustego nHDL przedstawiono na rys. 3.1. Prezentację rezultatów symulacji rozpoczyna dyskusja wyników RMSD (Root Mean Square Displacement - odchylenie średniokwadratowe pozycji atomów). Wartości RMSD, obliczone oddzielnie dla apolipoproteiny apoA-I i fosfolipidów POPC i uśrednione po czasie symulacji, są pokazane na rysunku 4.1. Badana struktura nHDL jest dość stabilna do temperatury 320 K. Wskazują na to wysokie wartości RMSD otrzymane dla najwyższej badanej temperatury (3.2 Å dla apoA-I i 4.7 Å dla POPC) w porównaniu do temperatury 320 K (odpowiednio, 2.1 Å oraz 4.0 Å). Struktura HDL pozostaje natomiast stosunkowo stabilna nawet w temperaturze 330 K.



Rysunek 4.1: Średnia wartość RMSD w funkcji temperatury dla proteiny apoA-I w (a) nHDL i (b) HDL oraz dla fosfolipidów POPC w (c) nHDL i (d) struktury HDL. Na wykresie pokazane są również słupki błędów odchylenia standardowego.

Powyższe wnioski potwierdza analiza średniej liczby wiązań wodorowych obecnych w strukturach nHDL i HDL (rys. 4.2). W przypadku struktury HDL średnia liczba wiązań wodorowych w przybliżeniu równomiernie spada wraz z temperaturą. Dla nHDL średnia liczba wiązań wodorowych nie jest już monotonicznie zależna od temperatury. Nawet biorąc pod uwagę oszacowany błąd, trudno sobie wyobrazić liczbę wiązań wodorowych zależną liniowo od temperatury, co potwierdza wniosek o spadku stabilności agregatu nHDL, w porównaniu z HDL, w wyższych temperaturach.

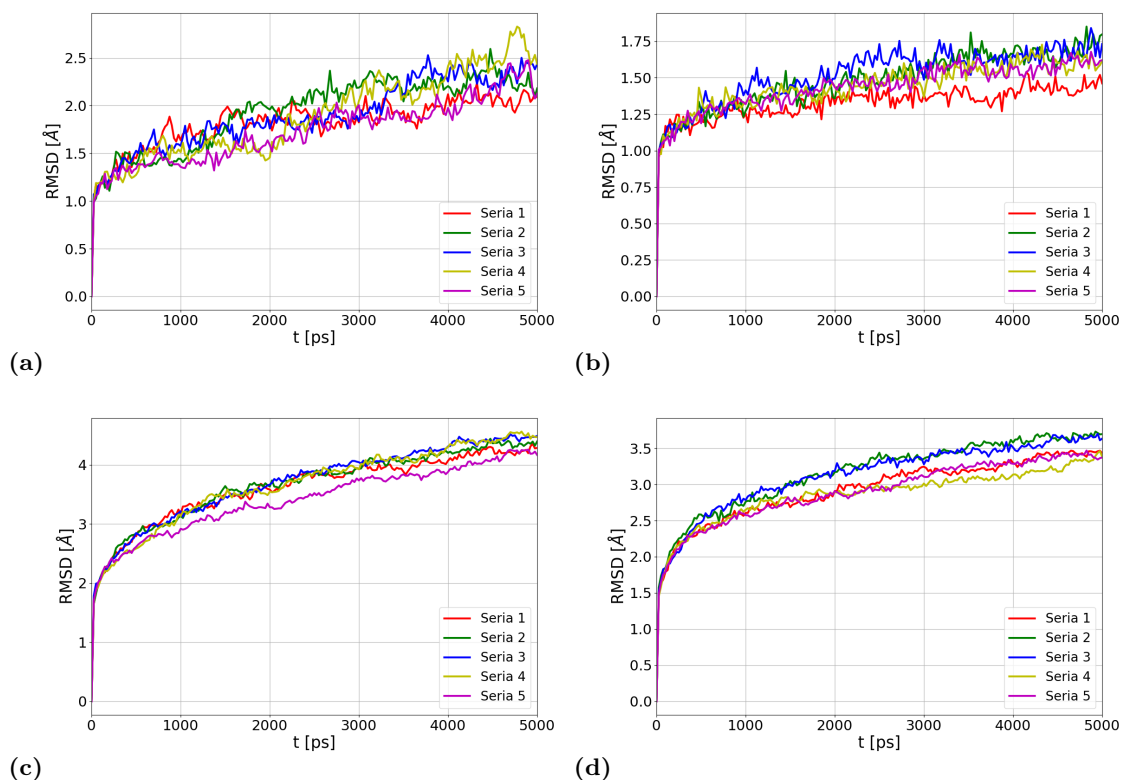
Przykładowe wykresy RMSD dla struktur nHDL i HDL przedstawiono na rys. 4.3, na którym prezentowane są wyniki dla wszystkich wykonanych w temperaturze 310 K niezależnych przebiegów. Z wykresu widać, że wszystkie krzywe są podobne, nie ma znaczących odchyżeń w ich kształtach, ani wyraźnie odstających od reszty przypadków. Mobilność białka apoA-I jest niższa niż fosfolipidów POPC, zarówno w przypadku struktury nHDL, jak i HDL. Należy również zauważyć, że ruchliwość cząsteczek jest nieco większa w przypadku struktury nHDL.



Rysunek 4.2: Średnia liczba wiązań wodorowych w funkcji temperatury dla (a) nHDL i (b) HDL.

Można to przypisać bardziej zwartej strukturze HDL, której wewnątrz jest wypełnione oleinianem cholesterolu (CE). W środku biomolekuły nHDL, nawet po przyjęciu kształtu dyskoidalnego, nadal występuje pusta przestrzeń, wskutek czego ogony fosfolipidów nie oddziałują ze sobą tworząc zwartą strukturę tak, jak to ma miejsce w przypadku dwuwarstwy fosfolipidowej otaczającej komórki eukariotyczne. Dodatkowo, dyskoidalny kształt nHDL jest mniej korzystny energetycznie w porównaniu do kulistego kształtu HDL. Ruchliwość mniejszych cząsteczek POPC jest nieco wyższa niż dla białka apoA-I, a dynamika cząsteczek tworzących strukturę HDL jest niższa w porównaniu z agregatem nHDL.

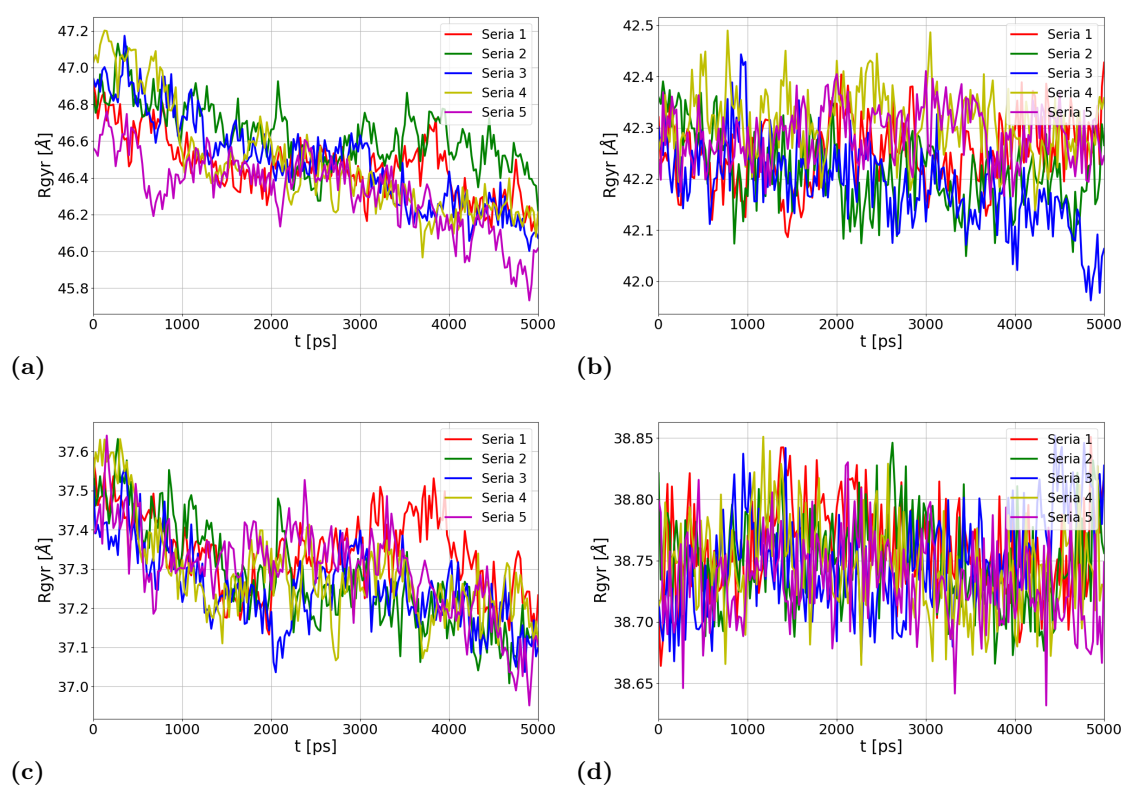
Wyniki RMSD wskazują na większą ruchliwość molekuł w agregacie nHDL, w porównaniu do HDL. Aby pogłębić analizę i znaleźć możliwe przyczyny takiego zachowania, przygotowano wykresy zmian promienia bezwładności (radius of gyration - RG) dla badanych biomolekuł. Promień bezwładności definiuje się jako charakterystyczny wymiar tego ciała, określający w sposób syntetyczny jego kształt i rozkład masy wewnątrz tego ciała względem pewnej osi, co jest często wykorzystywane w symulacjach MD do przewidywania aktywności strukturalnej makrocząsteczek [55]. RG obliczone dla struktur nHDL i HDL, w $T = 310$ K, przedstawiono na rys. 4.4. W przypadku wypełnionego agregatu molekularnego promień bezwładności pozostaje w przybliżeniu taki sam przez cały czas trwania symulacji, a jego średnia wartość wynosi około 42.2 \AA i 38.7 \AA odpowiednio dla apolipoproteiny apoA-I i fosfolipidów POPC. Świadczy to o stabilności HDL. Dla nHDL obserwuje się niewielki spadek wartości RG, dla apoA-I i POPC o odpowiednio, 0.6 \AA i 0.4 \AA w stosunku



Rysunek 4.3: Zależność czasowa RMSD w temperaturze $T = 310$ K dla proteiny apoA-I w (a) nHDL i (b) HDL oraz dla fosfolipidów POPC w (c) nHDL i (d) HDL.

do początkowych wartości. Jest to związane z niewielkimi zmianami zachodzącymi w strukturze nHDL, konkretnie ze zmniejszaniem się jamy wewnętrznej nHDL, co jest korzystne energetycznie.

Wartości RG dla nHDL są nieco wyższe w porównaniu z HDL pomimo tego, że nHDL zbudowany jest z mniejszej liczby molekuł. Przyczyną tego są różnice w kształcie biomolekuł. Jak już wspomniano, nHDL przyjmuje kształt dyskooidalny, natomiast HDL kształt sferyczny. Oznacza to większy przekrój nHDL w płaszyźnie XY, co jest również widoczne na rys. 3.1. Sugeruje to, że podczas procesu ładowania kształt nHDL powinien się zmieniać na bardziej kulisty, co powinno znaleźć odzwierciedlenie w wykresie RG tego procesu.

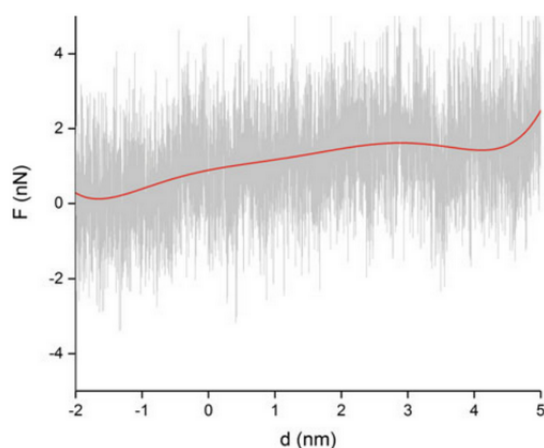


Rysunek 4.4: Promień bezwładności w funkcji czasu w temperaturze $T = 310$ K dla proteiny apoA-I w (a) nHDL i (b) HDL, oraz dla fosfolipidów POPC w (c) nHDL i (d) HDL.

4.2 Nanoindentacja bioagregatu nHDL nanorurką węglową

Ta część badań poświęcona była indentacji nHDL przy użyciu CNT i miała na celu, w pierwszej kolejności, zbadanie tego procesu poprzez analizę takich wielkości fizycznych jak siła i profil gęstości. Drugim celem było wykorzystanie nHDL wraz z indenterem w symulacjach procesu ładowania agregatu wodą i argonem. Rys. 3.2 obrazuje konfigurację początkową, zaś rys. 3.3, po odjęciu grafenu i wody, konfigurację końcową badanego układu.

W pierwszej kolejności chciałbym omówić siłę, która pojawia się podczas procesu indentacji (rys. 4.5).

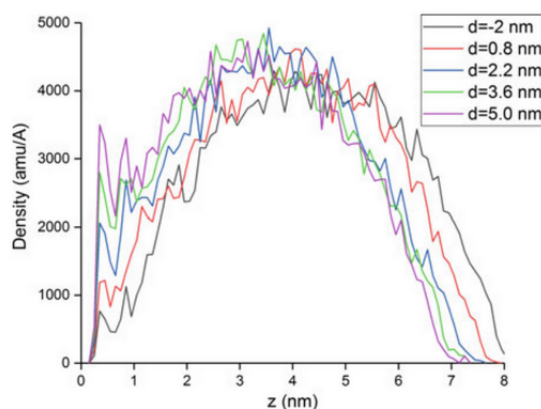


Rysunek 4.5: Siła konieczna do wbicia nanorurki do agregatu nHDL.

Ponieważ nanoindentacja jest procesem nierównowagowym, skutkiem tego jest szum widoczny na wykresie siły. Dlatego, aby ułatwić interpretację, dopasowano go wielomianem siódmego rzędu (czerwona krzywa na rys. 4.5). Wartość $d = 0$ nm na wykresie siły odzwierciedla moment, w którym nanorurka osiąga górną powierzchnię agregatu.

Uśredniona siła potrzebna do wbicia nanorurki do środka nHDL jest większa od siły potrzebnej do przebicia nanorurką o tej samej chiralności dwuwarstwy fosfolipidowej [9]. Ta różnica może częściowo wynikać z faktu, że nanorurka dodatkowo zgniata makromolekułę, która w bardzo niewielkim stopniu przylega do warstwy azotku boru (rys. 3.2). nHDL zostaje “przyciśnięty” przez nanorurkę do monowarstwy. Innym, dodatkowym powodem zaobserwowania większej siły, może być użycie sztywniejszych fosfolipidów POPC, w porównaniu do fosfolipidów DMPC, użytych w modelu dwuwarstwy fosfolipidowej w [9]. Obszar monotonicznego wzrostu siły

występuje do wartości głębokości indentacji około 3 nm, kiedy to na rys. 4.5 wi-
 dać obniżenie. Jest to moment, w którym nanorurka osiągnęła wewnętrzną pustą
 przestrzeń nHDL, a niezerowa wartość siły jest związana z przesuwaniem się CNT
 pomiędzy lipidami oraz popychaniem lipidów, które zostały wyrwane z nHDL pod-
 czas indentacji. W ostatniej fazie jest widoczny wzrost siły, jednak to już jest efekt
 dociskania POPC znajdujących się w dolnej części dysku do warstwy azotku boru.
 Rys. 4.6 pokazuje zmiany w profilu gęstości biomolekuły nHDL w kolejnych stadiach
 symulacji.



Rysunek 4.6: Zmiana profilu gęstości w kolejnych stadiach indentacji nHDL nanorurką.

Czarna krzywa reprezentuje profil gęstości przed rozpoczęciem procesu nano-
 indentacji. Wykres potwierdza wcześniejszy wniosek, że CNT, oprócz przebijania,
 także przesuwa POPC w kierunku warstwy azotku boru (punkt 0 na osi x odpow-
 iada położeniu warstwy). Czarna krzywa jest bardziej symetryczna, niż fioletowa.
 W przypadku niebieskiej, zielonej i fioletowej krzywej wyraźnie rysują się wysokie
 maxima w odległości bliskiej warstwie azotku boru, co świadczy o przesunięciu masy
 w kierunku warstwy. Wyniki prezentowane tutaj są zbieżne z wynikami omówionymi
 w [9], gdzie dwuwarstwa fosfolipidowa również doświadczała ugięcia w procesie in-
 dentacji. Z rys. 4.6 wynika, że deformacja nHDL jest dosyć duża. Aby ją zmniejszyć,
 można obniżyć prędkość indentera, ponieważ z [9], rys. 8, wynika, że mniejsza prę-
 dkość indentera oznacza mniejsze ugięcie membrany, a także mniejszą ilość wyrwanych
 molekuł (Tabela 1), ponieważ w większym stopniu niweluje zmiany spowodowane
 przez CNT.

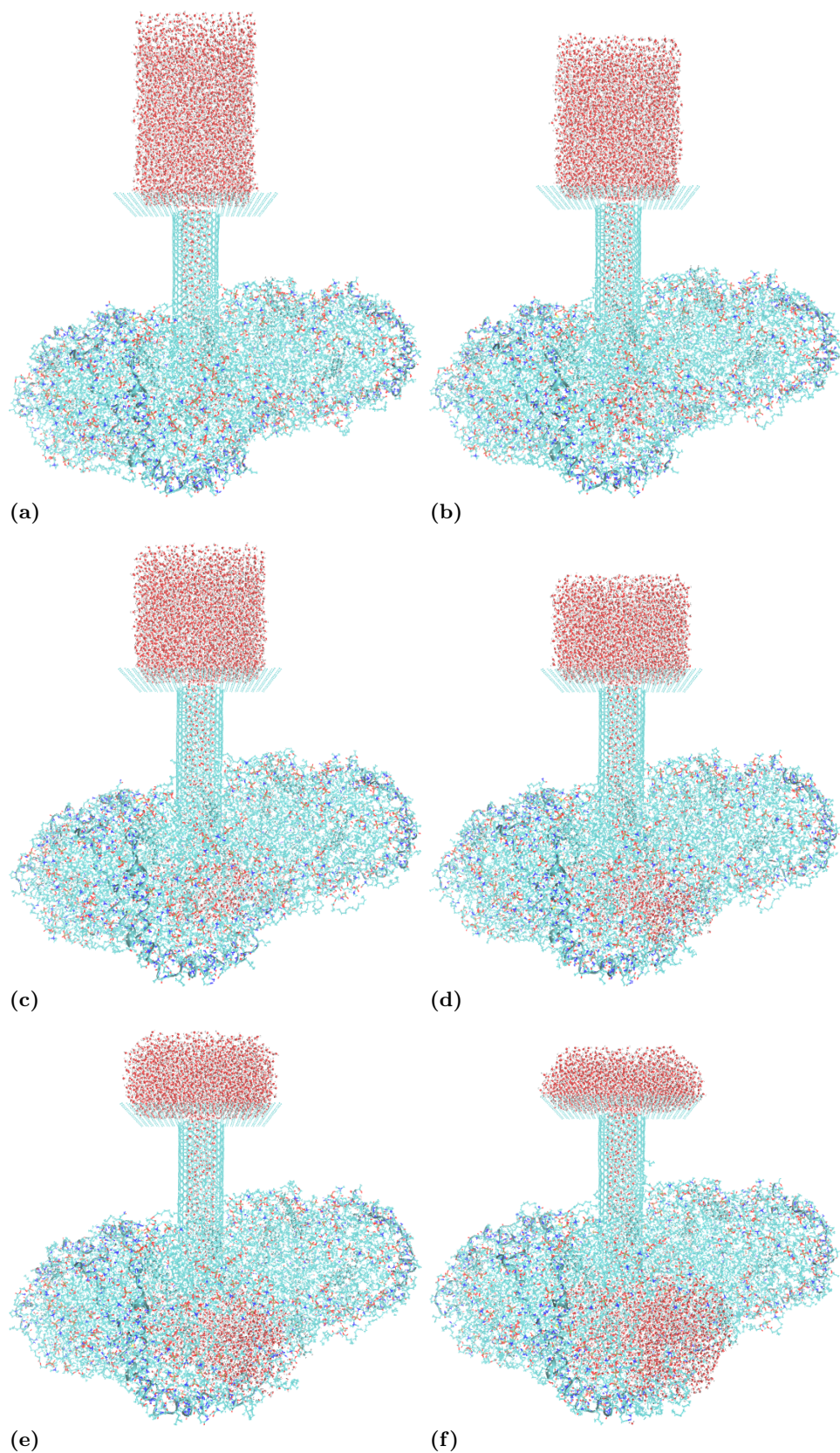
4.3 Symulacje wypełniania nHDL molekułami wody bądź atomami argonu w środowisku bezwodnym

4.3.1 Ładowanie nHDL cząsteczkami wody

W tej części dysertacji opisany zostanie proces ładowania agregatu nHDL cząsteczkami wody.

Rys. 4.7 pokazuje kolejne etapy wypełniania. Pokazane na rysunku chwilowe konfiguracje uzyskano w wyniku symulacji dla $T = 310\text{ K}$ i średniej szybkości tłoczenia $0.00001\text{ \AA}\Delta t^{-1}$. Początkowy etap procesu ładowania, kiedy pierwsze cząsteczki wody docierają do wewnętrznej wnęki nHDL, przedstawiono na rys. 4.7a, natomiast na rys. 4.7b widać pierwszy etap powstawania klastra wody wewnątrz struktury nHDL. Rys. 4.7c przedstawia w pełni rozwinięty klaster wody, a rys. 4.7d uwidacznia sytuację, w której pierwsze cząsteczki wody naruszają zewnętrzną powierzchnię nHDL. Ostatnie dwa podrysunki (4.7e i 4.7f) pokazują końcowe etapy rozkładu struktury nHDL, kiedy to zbyt duża ilość cząsteczek wody wtłoczonych do środka bioagregatu rozrywa powłokę lipidową struktury nHDL. Dla opisywanego przebiegu symulacyjnego zaobserwowano, że pierwsza cząsteczka wody wchodzi w zewnętrzny hydrofilowy obszar głowy powłoki POPC po około 740 ps trwania symulacji. Ten moment można potraktować jako początek rozpadu makromolekuły.

Rysunek 4.8 ilustruje wyniki dwóch niezależnych przebiegów ładowania wody. Przedstawiono na nim liczbę cząsteczek wody, które wpłynęły do wnętrza nHDL (czerwone krzywe), opuściły nHDL (zielone krzywe) lub nie miały bezpośredniego kontaktu z nHDL (nie opuściły ładującego nanourządzenia - niebieskie krzywe). Pokazano także szacunkowy przepływ cząsteczek wody i wartości połowy długości (a , b , c) głównych osi elipsoidy dopasowanej do struktury nHDL. Liczbę cząsteczek wewnątrz struktury nHDL ustalono obliczając przy pomocy programu VMD ilość cząsteczek znajdujących się w obszarze wnęki wewnętrznej nHDL (program VMD pozwala na stosunkowo łatwą separację takich cząsteczek). Liczbę molekuł wody bez kontaktu z nHDL oszacowano zliczając te, które znajdowały się wewnątrz nanorurki lub pozostawały nad powierzchnią grafenu. Ilość cząstek, które wypłynęły ze struktury nHDL, oszacowano obliczając liczbę molekuł, które dotarły do hydrofilowych



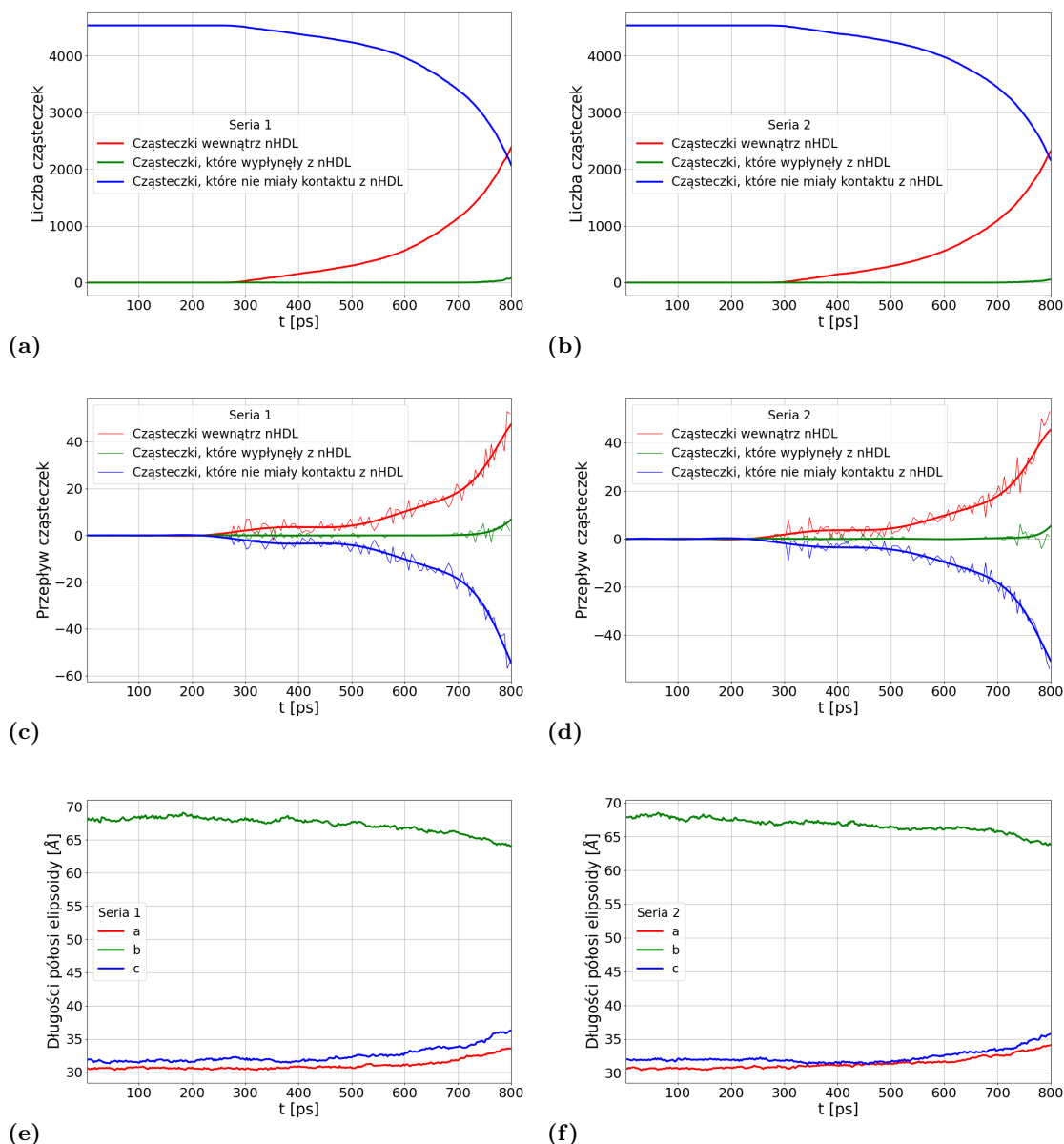
Rysunek 4.7: Chwilowe konfiguracje układu nHDL załadowanego cząsteczkami wody w $T = 310\text{K}$ dla średniej szybkości pompowania $0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ w chwilach: (a) $t = 375 \text{ ps}$, (b) $t = 625 \text{ ps}$, (c) $t = 875 \text{ ps}$, (d) $t = 1125 \text{ ps}$, (e) $t = 1375 \text{ ps}$, (f) $t = 1625 \text{ ps}$.

”głów” fosfolipidów lub całkowicie opuściły strukturę nHDL. Wykres przepływu, rys. 4.8c i 4.8d, otrzymano różniczkując liczbę cząsteczek określonego typu (np. tych wewnątrz nHDL) po czasie. Liniowa część wykresu przepływu cząsteczek wody (od 270 do 500 ps) ma średnią wartość 1.33 ± 0.5 cząsteczka ps^{-1} , czyli stosunkowo dobrze zgadza się z przewidywaną szybkością ładowania 0.87 molekula ps^{-1} .

Dla obu przeprowadzonych symulacji z szybkością ładowania $0.00001 \text{ \AA ps}^{-1}$, proces napełniania przebiega bez przeszkód przez około 740 – 760 ps (rys. 4.8a i rys. 4.8b), to znaczy do momentu, kiedy pierwsze cząsteczki wody naruszają zewnętrzną powierzchnię agregatu nHDL. W każdym z obu przeprowadzonych przebiegów symulacyjnych i w tym czasie, około 1400 cząsteczek wody zostało wprowadzonych do nHDL, co odpowiada efektywnej objętości 41.7 nm^3 . W przypadku najszybszego ładowania, z szybkością $0.00005 \text{ \AA ps}^{-1}$, szybko zwiększająca się ilość cząsteczek wody wewnątrz nHDL skutkuje niemożnością zaabsorbowania zmian przez agregat i niemal natychmiastowym uszkodzeniem struktury kontenera - wpływem cząsteczek wody z nHDL.

Proces ładowania cząsteczek wody do wnętrza nHDL można podzielić na dwie odrębne fazy. Te dwie fazy znajdują odzwierciedlenie w kształcie struktury nHDL. Wartości półosi elipsoidy dopasowanej do nHDL przedstawiono odpowiednio na rys. 4.8e i rys. 4.8f dla dwóch niezależnych przebiegów symulacyjnych. Pierwszy etap procesu ładowania trwa od 0 ps do około 550 ps - w tym czasie nHDL pozostaje stabilny. Cząsteczki wody wypełniają wewnętrzną wnękę nHDL bez znaczącego wpływu na jej ogólny kształt i strukturę. Druga faza, która rozpoczyna się po około 550 ps i trwa do momentu rozerwania przez wodę agregatu, prowadzi do zmiany kształtu nHDL z dyskoidalnego na bardziej kulisty. Najdłuższa półoś elipsoidy (półoś *b*) maleje, podczas gdy wartości dwóch drugorzędnych półosi rosną. Podczas wszystkich przeprowadzonych symulacji (również dla innych szybkości ładowania) nie zaobserwowano przejścia od kształtu dyskoidalnego do pełnego kształtu kulistego - dopływ cząsteczek wody wcześniej doprowadzał do rozerwania nHDL.

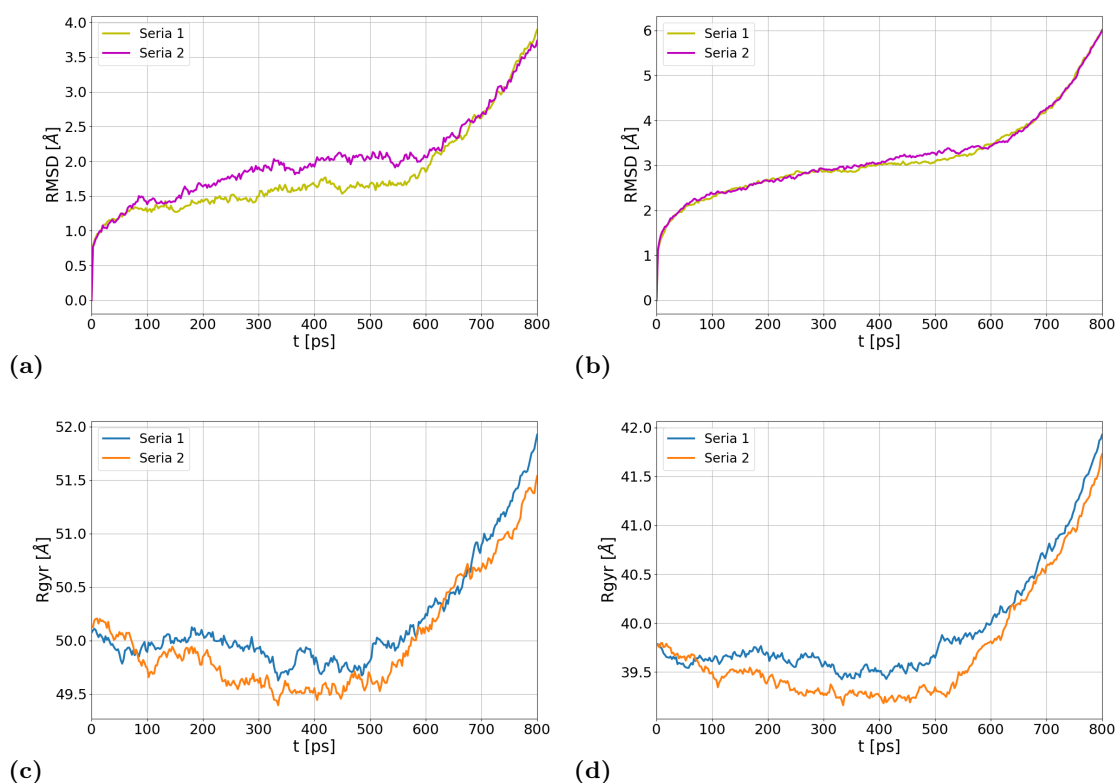
Omówione wcześniej dwie oddzielne fazy modyfikacji struktury nHDL podczas napełniania są jeszcze wyraźniej rozróżnialne na rys. 4.9. Na pokazanych wykresach RMSD dla apoA-I (rys. 4.9a) i POPC (rys. 4.9b) można również wyraźnie



Rysunek 4.8: Parametry ładowania cząsteczek wody do nHDL w temperaturze $T = 310$ K i szybkości ładowania $v = 0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ jako funkcja czasu symulacji, dla dwóch niezależnych przebiegów symulacji: liczba cząsteczek wody załadowanych do nHDL/na zewnątrz nHDL/bez kontaktu z nHDL (a) oraz (b), strumień cząstek wody (c) i (d), oraz długości półosi dopasowanej elipsoidy a , b i c (e) i (f). Lewy panel pokazuje wyniki dla przebiegu numer 1, prawy panel pokazuje wyniki dla przebiegu numer 2.

rozróżnić dwie oddzielne fazy. W czasie od 0 ps do około 550–600 ps kształty wykresów RMSD dla apolipoproteiny i fosfolipidów są podobne zarówno pod względem przebiegu, jak i wartości do pokazanych dla samego nHDL (rys. 4.3a i rys. 4.3c). W drugiej fazie, od około 600 ps nachylenie krzywych RMSD zaczyna znacząco rosnąć, odzwierciedlając przemieszczanie fosfolipidów i apoA-I spowodowane zmianą kształtu struktury nHDL z elipsoidalnej na sferyczną. Ten sam trend można również

zaobserwować w wartościach RG dla apolipoproteiny (rys. 4.9c) i cząsteczek POPC (rys. 4.9d). Podobnie jak w przypadku wykresów RMSD, w pierwszej fazie ładowania cząsteczek wody (do 500 ps) wartości RG są bardzo zbliżone do tych otrzymanych wcześniej dla samego nHDL (rys. 4.4a oraz 4.4c, odpowiednio dla apoA-I i POPC). Należy jednak zauważyć, że wzrost wartości RG następuje około 100 ps wcześniej, co wskazuje, że promień bezwładności RG jest nieco bardziej wrażliwy na zmiany początkowego kształtu w strukturze nHDL. Zmiana kształtu struktury nHDL przy tej szybkości ładowania zaczyna być widoczna, gdy liczba cząsteczek wody załadowanych do nHDL dochodzi do około 300. Ta liczba cząsteczek odpowiada objętości efektywnej $\sim 8.9 \text{ nm}^3$.



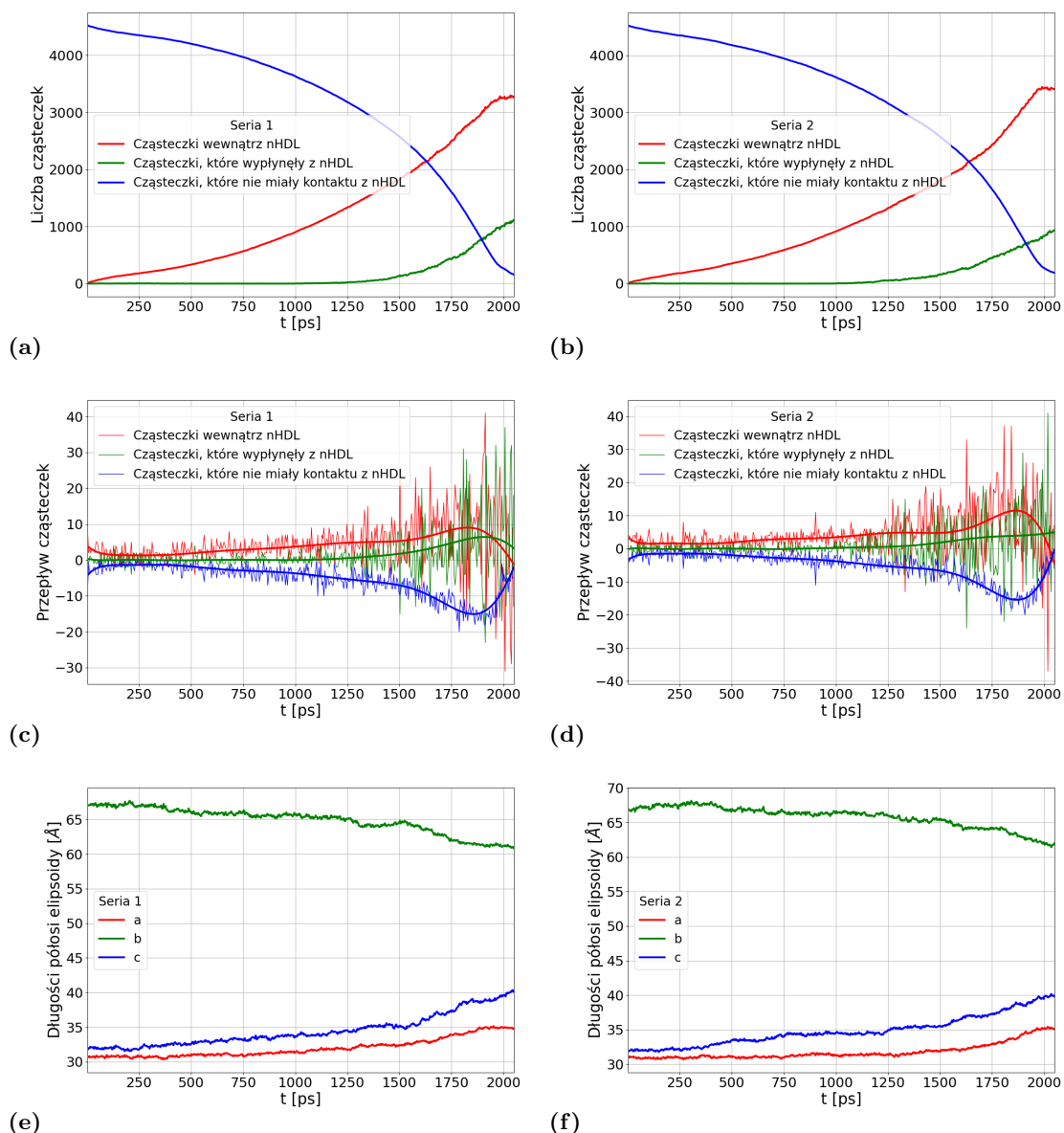
Rysunek 4.9: Parametry opisujące zachowanie elementów struktury nHDL podczas procesu ładowania w temperaturze $T = 310 \text{ K}$ i szybkości ładowania $v = 0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) proteiny apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla (c) proteiny apoA-I i (d) fosfolipidów POPC.

Celem dalszego pogłębienia badań ładowania cząsteczek wody do wnętrza struktury nHDL, postanowiono powtórzyć symulacje wyraźnie obniżając szybkość ładowania do $v = 0.0000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ aby sprawdzić, jaki to ma wpływ na proces. W celu skrócenia czasu obliczeń, wykorzystano konfigurację uzyskaną poprzednio, gdy na-

norurka węglowa była już częściowo wypełniona cząsteczkami wody i potraktowano ją jako punkt wyjścia do procedury ładowania. Skala czasowa na rys. 4.10 jest przedstawiona w odniesieniu do punktu startowego ładowania ze zmniejszoną szybkością, a nie do początku całego procesu ładowania. Liczbę cząsteczek wody załadowanych do nHDL i liczbę cząsteczek wody, które opuściły wnętrze nHDL, przedstawiono na podrysunkach rys. 4.10a i rys. 4.10b. Proces ładowania zachodzi aż do blisko 1500ps, kiedy to pierwsze cząsteczki wody zaczynają opuszczać strukturę nHDL. Podobnie jak w przypadku wyższej szybkości ładowania, liczba cząsteczek załadowanych do nHDL przed przebiciem jest w przybliżeniu równa 1400. Wynik ten jest praktycznie identyczny z liczbą odnotowaną dla wyższej szybkości ładowania, co sugeruje, że jest to maksymalna liczba cząsteczek wody, które można załadować do nHDL bez trwałego zaburzenia jego struktury. Przepływ cząsteczek wody przedstawiono na rys. 4.10c i 4.10d.

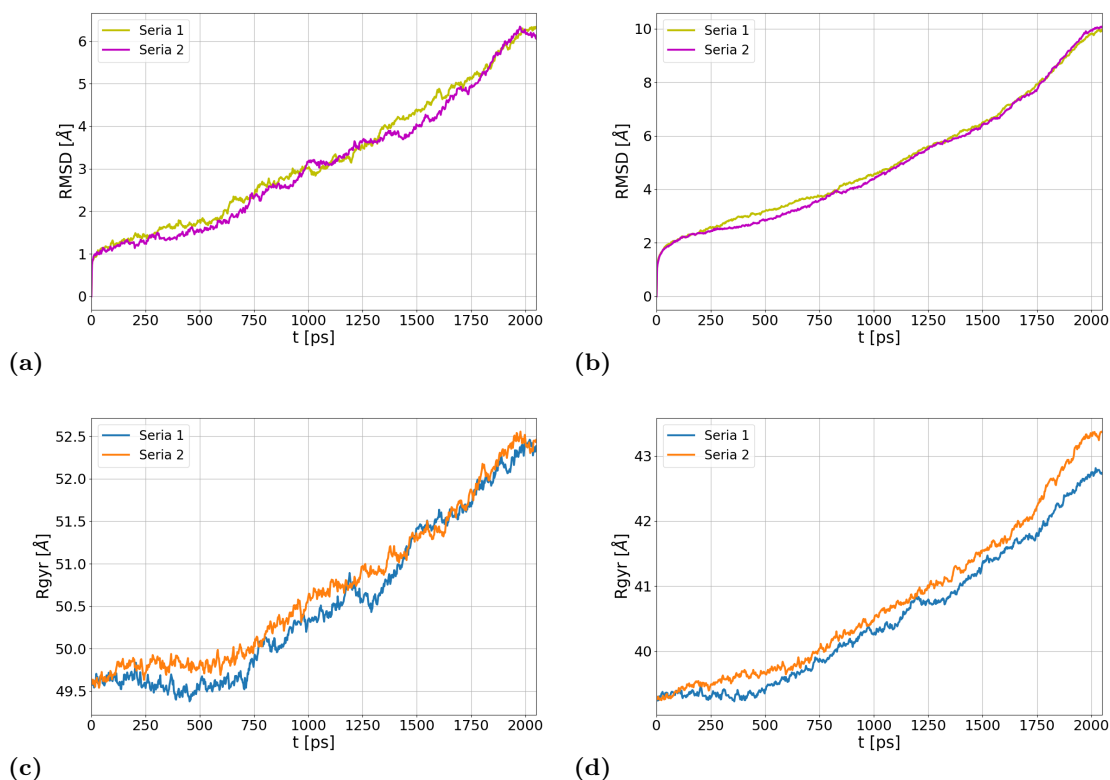
Po początkowym względnie stałym przepływie równym około 0.6 ± 0.4 molekula \cdot ps⁻¹ (do 500 ps) zaczyna on powoli rosnać, stabilizując się między 1200 a 1600 ps przy wartości 2 molekuly \cdot ps⁻¹. Druga stabilizacja następuje na krótko przed zerwaniem struktury nHDL przez wtłaczany strumień cząsteczek wody (pomiędzy 1250 a 1500 ps). Również zachowanie dopasowanej półosi elipsoidalnej jest bardzo podobne do wcześniej opisanego. Wartości półosi pozostają względnie stabilne przez pierwsze 400ps, jak pokazano na rys. 4.10e i rys. 4.10f. Liczba cząsteczek wody załadowanych do nHDL, zanim jego kształt zacznie się zmieniać, jest w tym przypadku nieco mniejsza w porównaniu do średniej szybkości ładowania. Około 270 cząsteczek (~ 8 nm³) może zostać wprowadzonych do nHDL bez zmiany jego kształtu, przy większej liczbie kształt nHDL zaczyna się powoli zmieniać. Podobnie jak w przypadku większej szybkości ładowania, zmiana kształtu następuje z dyskooidalnego na sferyczny. Najdłuższa półoś (*b*) ulega zmniejszeniu, podczas gdy dwie krótkie (*a*, *c*) ulegają powolnemu wydłużaniu.

To zachowanie jest również widoczne w obliczonych wartościach RMSD dla apolipoproteiny apoA-I i fosfolipidów POPC (rys. 4.11). W ciągu pierwszych 400 ps charakter krzywych RMSD jest bardzo podobny do tych pokazanych dla samego nHDL.



Rysunek 4.10: Parametry ładowania cząsteczek wody do nHDL w temperaturze $T = 310$ K i szybkości ładowania $v = 0.0000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ jako funkcja czasu symulacji dla dwóch niezależnych przebiegów symulacji: liczba cząstek wtłoczonych do struktury (a) oraz (b), strumień cząstek wody (c) i (d), oraz długość pólki dopasowanej elipsoidy a , b i c (e) i (f).

Następnie nachylenie krzywych RMSD zaczyna znacząco wzrastać, szczególnie w przypadku RMSD dla cząsteczek POPC, odbiegając od trendu widocznego w symulacjach samego nHDL. Ten wzrost RMSD odzwierciedla dyslokacje molekuł apolipoproteiny i POPC, indukowane przez zmianę struktury nHDL spowodowanej przez cząsteczki wody wprowadzane do wnętrza agregatu molekularnego. To samo zachowanie można zaobserwować w przebiegu współczynnika RG, który zaczyna narastać w trakcie ładowania. Należy zauważyć, że RG dla fosfolipidów POPC zaczyna wzrastać po około 400 - 500 ps (rys. 4.11d), natomiast w przypadku apoA-I (rys. 4.11c),



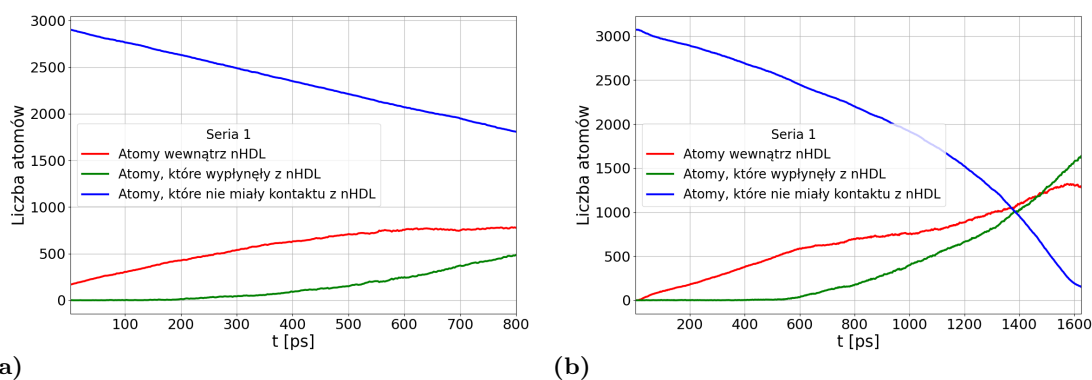
Rysunek 4.11: Parametry opisujące zachowanie elementów struktury nHDL podczas procesu ładowania w temperaturze $T = 310$ K i szybkości ładowania $v = 0.000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) apolipoproteiny apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla (c) apolipoproteina apoA-I oraz (d) fosfolipidy POPC.

wzrost uwidacznia się wyraźnie po około 700 ps. Sugeruje to, że ładowanie cząsteczek wody do wnętrza nHDL zaczyna zmieniać strukturę nHDL poprzez wypchnięcie na zewnątrz fosfolipidów POPC. Następnie kształt apolipoproteiny oplatającej agregat dostosowuje się do zmiany rozkładu fosfolipidów. W przypadku zwiększenia szybkości ładowania, proces ten wydaje się nie występować, ponieważ zmiany wartości RG zachodzą w przybliżeniu w tym samym czasie dla cząsteczek apoA-I i POPC, a szybkość ładowania jest czterokrotnie szybsza. Systematyczny niemalże od samego początku przyrost RG świadczy o tym, że makromolekuła, w przypadku najwolniejszej szybkości ładowania, jest w stanie w sposób ciągły przystosowywać się do zmian spowodowanych wtłaczaniem wody do jej wnętrza.

4.3.2 Ładowanie nHDL atomami argonu

Wyniki badań dyskutowane w poprzedniej sekcji dotyczyły wypełnienia hydrofobowego środka agregatu nHDL polarnymi molekułami wody. Aby odpowiedzieć na pytanie dotyczące tego, jak zachowa się substancja hydrofobowa w niepolarnym wnętrzu biomolekuły, wykonano symulacje ładowania hydrofobowymi atomami argonu. Atutem pierwiastka jest łatwość obliczenia objętości atomów załadowanych do nHDL i tych, które po załadowaniu opuściły strukturę. Ponieważ atomy gazów szlachetnych mają charakter hydrofobowy i prosty, kulisty kształt ułatwiający ładowanie, zdecydowano się na użycie argonu jako wypełniacza. Ponieważ struktura nHDL jest łatwo przepuszczalna dla atomów argonu w temperaturze fizjologicznej, zdecydowano się przeprowadzić symulację w $T = 310\text{ K}$, powtarzając ją także w bardzo niskiej temperaturze $T = 10\text{ K}$.

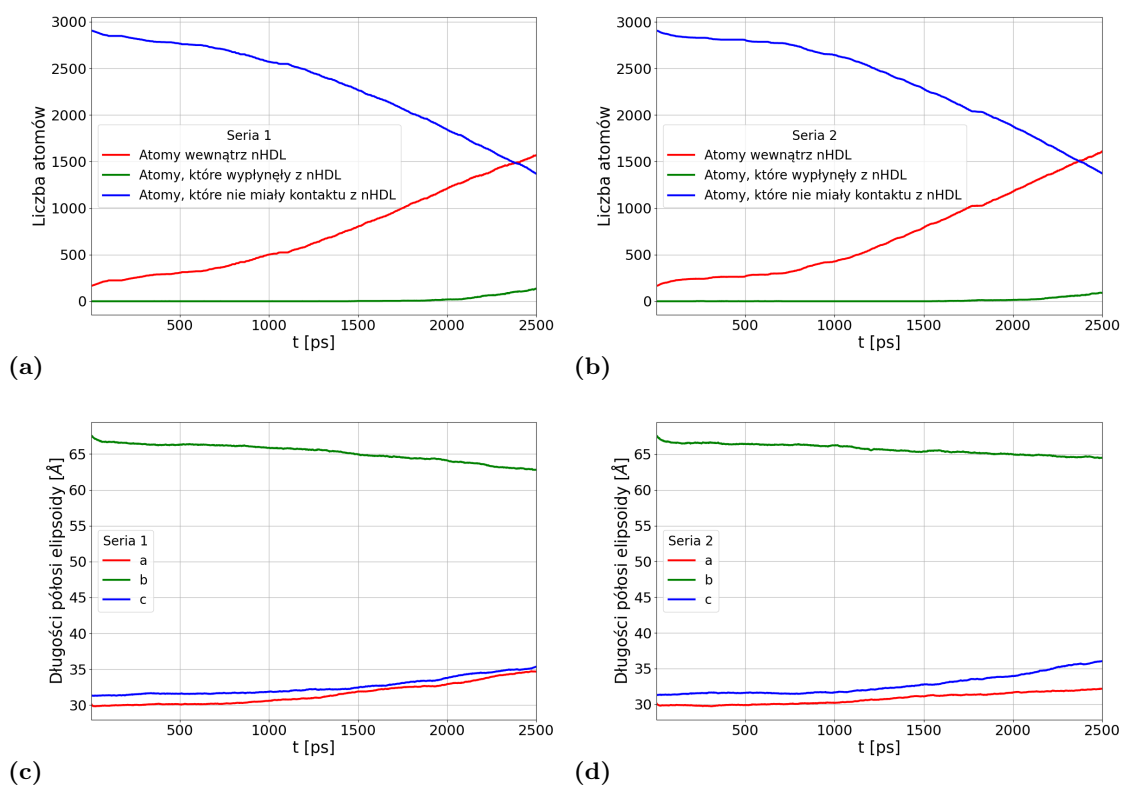
Liczbę atomów argonu, które zostały załadowane do lipoproteiny nHDL lub opuściły wewnętrzną wnękę nHDL, przedstawiono na rys. 4.12. Dla najwyższej szybkości ładowania $v = 0.00005\text{ \AA } \Delta t^{-1}$ atomy argonu opuszczają nHDL praktycznie od razu. W przypadku średniej i najniższej szybkości ładowania, atomy argonu są zatrzymane we wnętrzu agregatu nieco dłużej, jednak i tak ten czas jest relatywnie krótki w porównaniu do czasu, przez który utrzymują się tam cząsteczki wody. Przy szybkości ładowania $v = 0.00001\text{ \AA } \Delta t^{-1}$ pierwsze atomy argonu zaczynają opuszczać nHDL już po 200 ps, podczas gdy w przypadku najmniejszej szybkości ładowania po około 450 ps.



Rysunek 4.12: Liczba atomów argonu załadowanych do nHDL w $T = 310\text{ K}$ przy szybkości ładowania (a) $v = 0.00001\text{ \AA } \Delta t^{-1}$ i (b) $v = 0.0000025\text{ \AA } \Delta t^{-1}$

Liczba atomów, które można załadować do wewnętrznej wnęki nHDL, wynosi

~ 450 i ~ 500 , odpowiednio dla średniej i najniższej szybkości ładowania. Odpowiada to znacznie niższym objętościom 11.1 i 13.9 nm^3 , niż w przypadku wypełniania cząsteczkami wody. Jednak w tym przypadku stosunkowo mała objętość atomów, które można załadować do nHDL, nie wynika z tego, że kończy się dostępna wewnętrzna objętość nHDL, ale z faktu, że w tak wysokiej temperaturze struktura nHDL nie jest w stanie zatrzymać atomów argonu, które dyfundują z jej środka na zewnątrz. Struktura nHDL składająca się głównie z alifatycznych fosfolipidów POPC jest niemalże przezroczysta dla atomów argonu w temperaturze $T = 310 \text{ K}$. W związku z tym potrzebna była kolejna seria symulacji, aby móc oszacować takie parametry ładowania, jak dostępna objętość wewnątrz nHDL i zmiana kształtu ze struktury dyskoidalnej do sferycznej.

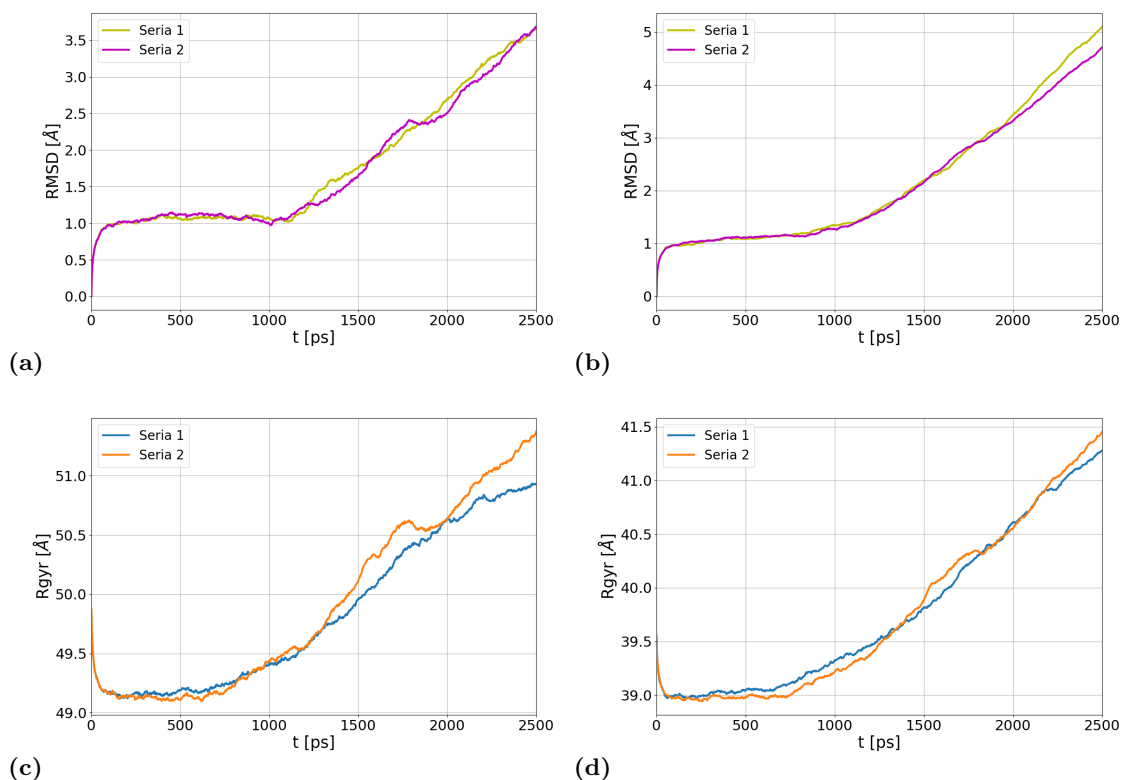


Rysunek 4.13: Parametry ładowania atomów argonu do nHDL w temperaturze $T = 10 \text{ K}$ dla szybkości ładowania $v = 0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ versus czas symulacji, dla dwóch niezależnych przebiegów: (a) i (b) liczba atomów wypełniających strukturę, (c) i (d) półosie dopasowanej elipsoidy a , b i c .

Liczbę atomów argonu wypełniających i opuszczających wewnętrzną wnękę nHDL dla średniej szybkości ładowania w $T = 10 \text{ K}$ pokazano na rys. 4.13. Dane przedstawiono dla dwóch niezależnych przebiegów symulacyjnych i uzupełniono o parametry

try półosi elipsoidy dopasowanej do kształtu nHDL. Proces ładowania trwa około 1900ps, kiedy to do wewnętrznej wnęki nHDL dostało się około 1100 atomów argonu. Po tym czasie atomy argonu zaczynają przenikać przez strukturę nHDL. Liczba załadowanych atomów argonu, zanim nastąpi ich znaczna ucieczka z nHDL, odpowiada objętości $\sim 30.6 \text{ nm}^3$. Jest to wartość znacznie niższa niż w przypadku wody, którą można wypełnić nawet 41.7 nm^3 wewnętrznej przestrzeni agregatu. Rozbieżność tę można częściowo uzasadnić, biorąc pod uwagę znaczną różnicę temperatur pomiędzy układem ładowanym wodą, a układem ładowanym argonem. Przy temperaturze równej 10 K, elastyczność struktury nHDL jest wyraźnie mniejsza niż w przypadku procesu ładowania cząsteczkami polarnymi. Wartości półosi elipsoidy dopasowanej do nHDL podczas procedury napełniania argonem pozostają stabilne przez pierwsze 1000 ps symulacji dla obydwóch przebiegów. Następnie można zaobserwować pierwsze oznaki zmiany kształtu elipsoidalnego na kulisty. Należy zauważyć, że zmiana kształtu jest wolniejsza niż podczas napełniania wodą, gdzie zmiany w półosiach były w przybliżeniu równe 5 \AA tuż przed rozerwaniem struktury nHDL. W tym przypadku wartości półosi są równe 3 \AA zanim proces ładowania doprowadzi do uszkodzenia struktury nHDL. Ta obserwacja potwierdza wniosek, zgodnie z którym elastyczność i zdolność nHDL do akomodacji w swoim wnętrzu atomów lub molekuł w widocznym stopniu zależy od temperatury, w której przeprowadzony jest proces ładowania.

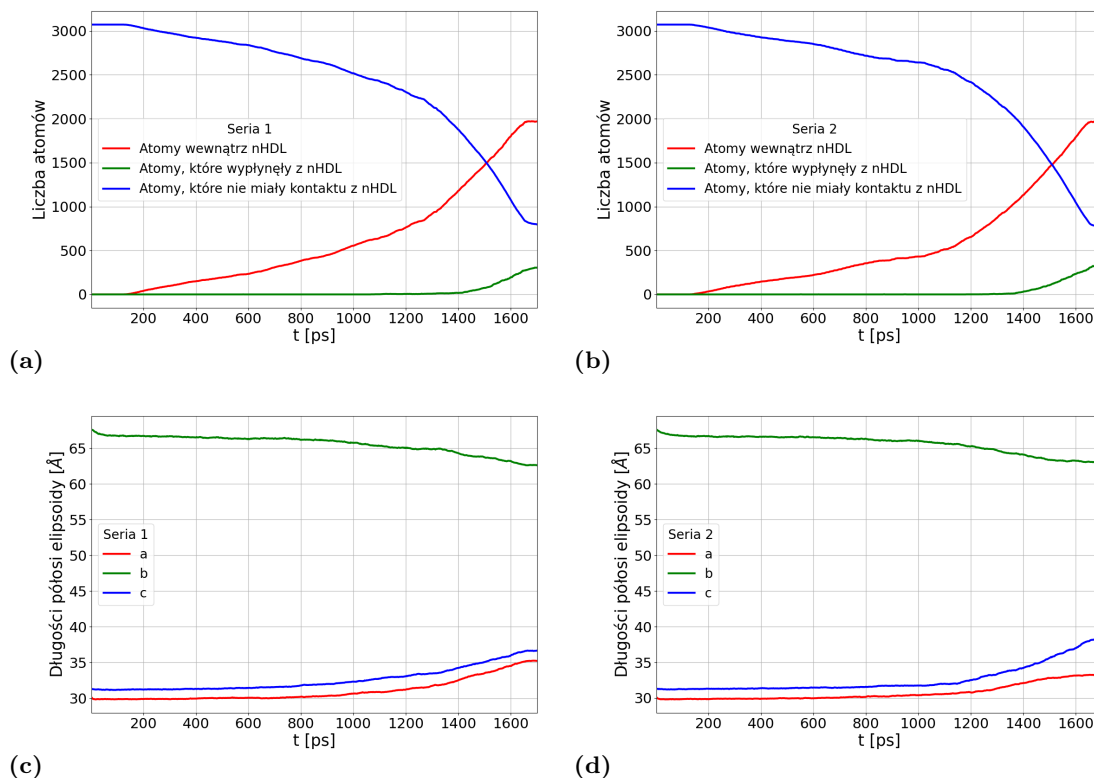
Aby pogłębić analizę dotyczącą zmniejszonej ruchliwości struktury nHDL podczas procesu napełniania jej atomami argonu w niskiej temperaturze, obliczono wartości RMSD i RG w funkcji czasu symulacji (rys. 4.14). Wartości RMSD dla apoA-I (rys. 4.14a) i POPC (rys. 4.14b) nHDL podczas pierwszych 1000 ps ładowania argonem w niskiej temperaturze są wyraźnie mniejsze niż dla samego nHDL (rys. 4.3a i 4.3c). Średnia wartość RMSD dla ładowania w niskiej temperaturze zarówno dla apoA-I, jak i POPC wynosi 1 \AA , podczas gdy w przypadku samego nHDL oraz podczas ładowania agregatu cząsteczkami wody, RMSD osiąga wartości około 2 \AA i 3.5 \AA dla, odpowiednio, apoA-I i POPC. Wykresy RG, zarówno dla cząsteczek apoA-I jak i POPC, pozostają względnie stałe w ciągu pierwszych 600 ps symulacji, a następnie zmienia się ich nachylenie - zaczynają znacząco rosnać. Wzrost ten występuje nieco



Rysunek 4.14: Parametry opisujące zachowanie się składników struktury nHDL podczas wypełniania atomami argonu w temperaturze $T = 10\text{ K}$ i szybkości ładowania $v = 0.00001\text{Å} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) białka apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla proteiny apoA-I (c) i (d) cząsteczek POPC.

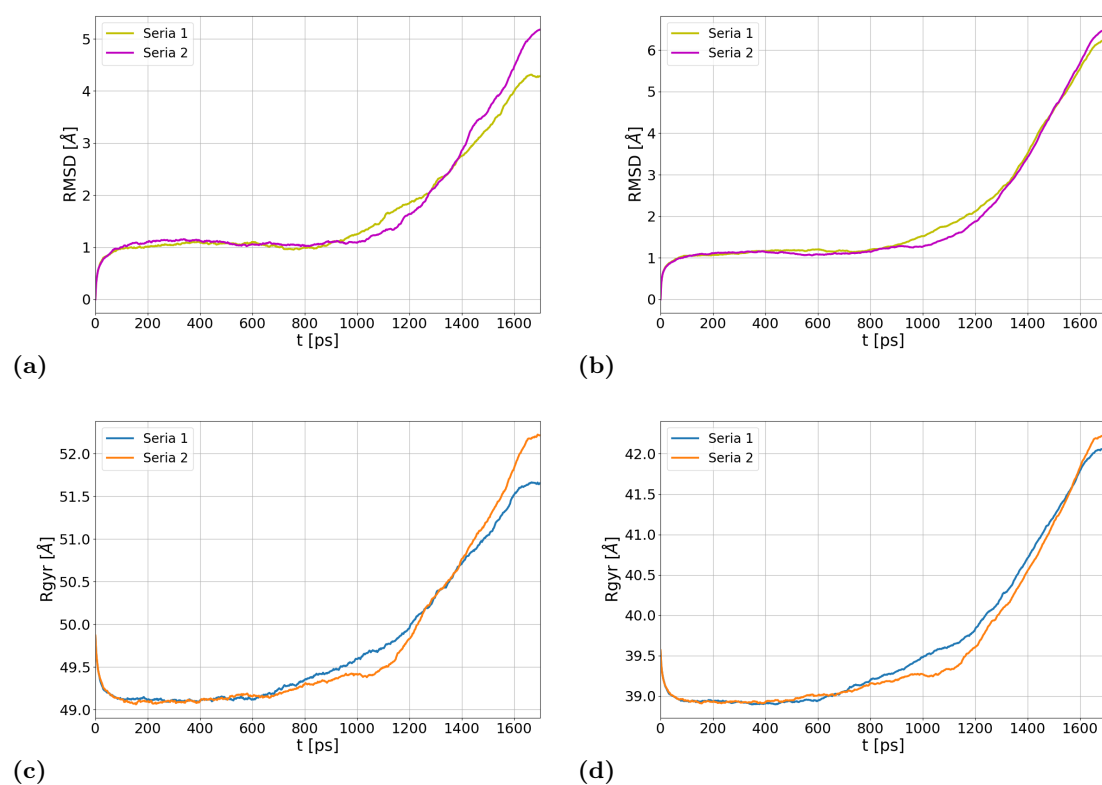
szybciej niż w przypadku RMSD (górny panel) i dopasowanych półosi elipsoidalnych (rys. 4.13c i 4.13d), co potwierdza wniosek, że promień bezwładności jest najbardziej spośród diskutowanych tutaj wielkości fizycznych wrażliwy na zmianę nHDL z kształtu dyskoidalnego na sferyczny.

Na rys. 4.16 przedstawiono zachowanie apoA-I i POPC podczas napełniania argonem w temperaturze $T = 10\text{ K}$ i dla szybkości ładowania $v = 0.0000025\text{Å} \Delta t^{-1}$. Podobnie jak w przypadku analizy poprzednich układów, badano RMSD i promień bezwładności RG. Podczas najwolniejszego ładowania przy temperaturze $T = 10\text{ K}$ mobilność apoA-I i POPC jest w przybliżeniu taka sama w pierwszych 1000 ps symulacji, jak w przypadku pierwszych 700 ps ładowania ze średnią szybkością i wynosi 1Å . Wzrost RMSD pojawia się mniej więcej w tym samym czasie co zmiana wartości półosi elipsoidy (rys. 4.15c i 4.15d). Promień bezwładności po wstępnej stabilizacji zaczyna rosnąć, chociaż należy zauważyć, że wzrost RG wyprzedza wzrost RMSD o około 350 ps. Zmiana RG zaczyna występować w przedziale czasowym pomię-



Rysunek 4.15: Parametry ładowania atomów argonu do nHDL w temperaturze $T = 10$ K dla tempa ładowania $v = 0.0000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ jako funkcja czasu symulacji t dla dwóch niezależnych przebiegów symulacji: (a), (b) liczba atomów wypełniających strukturę i (c), (d) półosie dopasowanej elipsoidy a , b i c .

dzy 600 – 700 ps czasu symulacji. Wzrost wartości RG dla fosfolipidów POPC i dla proteiny apoA-I następuje w tym przypadku w tym samym czasie.



Rysunek 4.16: Parametry opisujące zachowanie się składników struktury nHDL podczas wypełniania atomami argonu w temperaturze $T = 10$ K i szybkości ładowania $v = 0.0000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) białka apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla (c) proteiny apoA-I i (d) cząsteczek POPC.

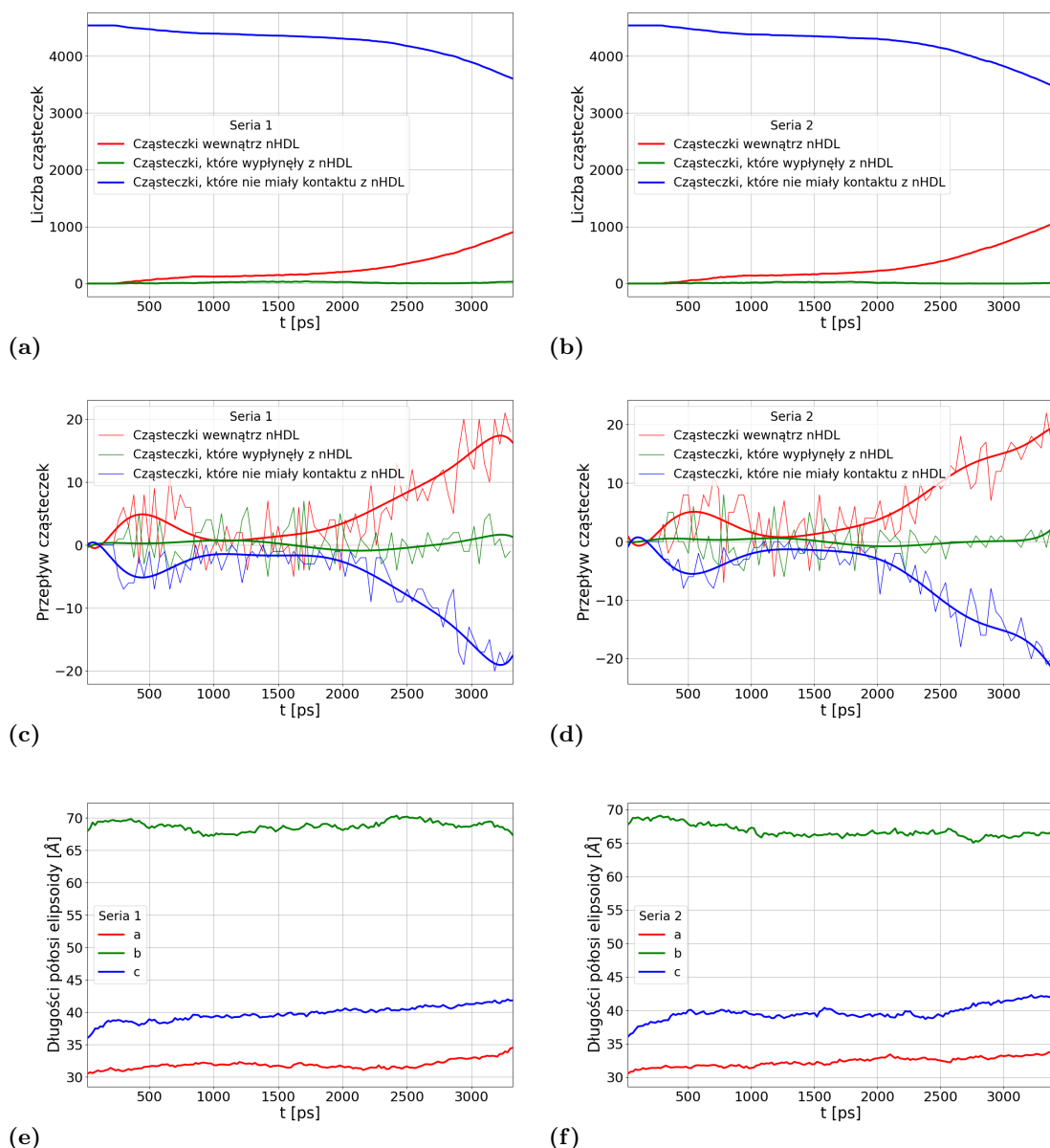
4.4 Symulacje wypełniania nHDL cząsteczkami polarnymi w środowisku wodnym.

Ta dodatkowa seria symulacji ładowania bioagregatu nHDL zanurzonego w polarnym rozpuszczalniku ma dać odpowiedź na ile wyniki ładowania nHDL w próżni są zbliżone do tych, gdy bioagregat jest zanurzony w polarnym rozpuszczalniku. Układ w środowisku wodnym jest pokazany na rys. 3.4, gdzie bioagregat znajduje się w dużej komórce wypełnionej wodą. Uwzględnienie obecności wody otaczającej bioagregat jest o tyle istotne, że procesy formowania agregatów HDL w rzeczywistości odbywają się w środowisku wodnym. Opisane poniżej wyniki służą przetestowaniu, czy zastosowany, uproszczony model, w którym ładowanie bioagregatu cząstkami lub atomami odbywa się w próżni, jest wystarczający.

Dla obu przeprowadzonych symulacji z szybkością ładowania $0.00001 \text{ \AA ps}^{-1}$, proces napełniania przebiega bez przeszkód przez około 740 – 760 ps (rys. 4.17a i rys. 4.17b), to znaczy do momentu, kiedy pierwsze cząsteczki wody naruszają zewnętrzną powierzchnię agregatu nHDL.

Na rys. 4.18 pokazano parametry ładowania cząsteczek wody do nHDL w obecności polarnego rozpuszczalnika. Pokazane wykresy należy porównać z tymi z rys. 4.8, charakteryzującymi układ bezwodny.

Jedną z najbardziej widocznych różnic są dysproporcje w skali czasowej obu rysunków. Pomimo, że prędkości ładowania w obu przypadkach były identyczne, czas tego procesu w obecności wody otaczającej nHDL jest kilkukrotnie dłuższy. Wynika to z faktu, że bioagregat umieszczony w wodzie nie jest w stanie w równie łatwy sposób dokonywać zmian w swoim kształcie związanych z ładowaną do jego wnętrza wodą w porównaniu do sytuacji gdy nie jest niczym otoczony. W przypadku bez otaczającej go wody może swobodnie zmieniać swoje ułożenie, natomiast otaczająca nHDL woda w naturalny sposób ogranicza tę ekspansję. Bioagregat, zmieniając swój kształt, musi najpierw odepchnąć wodę. Z tego powodu nie jest w stanie tak efektywnie przyjmować wodę wtłaczaną do jego wnętrza, jak jego bezwodny odpowiednik. Proces ładowania wody (liczony od momentu, w którym pierwsze molekuly znalazły się wewnątrz nHDL) trwa około 1700 ps, w porównaniu do 400 ps na rys. 4.8 a i b.



Rysunek 4.17: Parametry ładowania cząsteczek wody do nHDL w środowisku wodnym w temperaturze $T = 310\text{K}$ i szybkości ładowania $v = 0.00001\text{Å} \Delta t^{-1}$ jako funkcja czasu symulacji, dla dwóch niezależnych przebiegów symulacji: liczba cząsteczek wody załadowanych do nHDL/na zewnątrz nHDL/bez kontaktu z nHDL (a) oraz (b), strumień cząstek wody (c) i (d), oraz długości półosi dopasowanej elipsoidy a , b i c (e) i (f). Lewy panel pokazuje wyniki dla przebiegu numer 1, prawy panel pokazuje wyniki dla przebiegu numer 2.

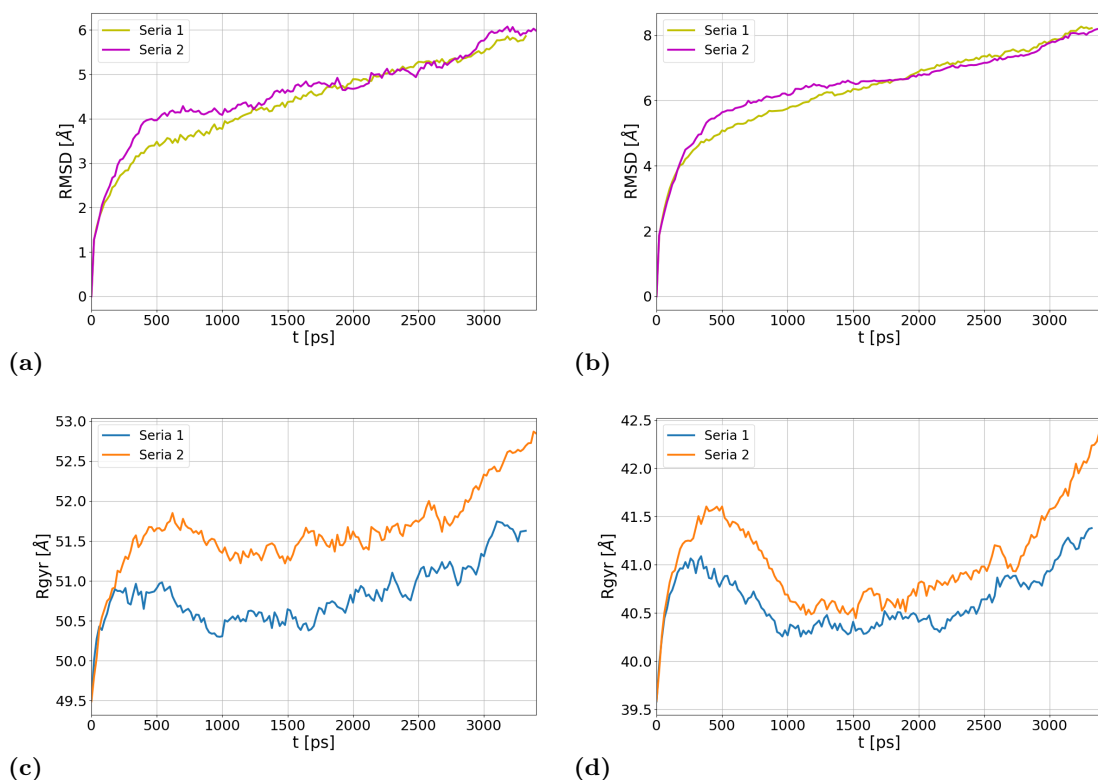
Proces napełniania bioagregatu wodą, jak wspomniano wcześniej, trwa kilkakrotnie dłużej w przypadku układów z wodą otaczającą nHDL i rozpoczyna się on około 1700 ps. Nie jest możliwe bezpośrednio odczytanie tej wartości z wykresów rys. 4.18 a i b, ponieważ wymagałoby to znaczącej i długotrwałej modyfikacji skryptów, które zostały przygotowane dla przypadku układów bez otaczającej wody. W przypadkach z otaczającą wodą wykazują one kilkuprocentowy błąd. Stąd można odnieść wra-

żenie, że pierwsze molekuly wody znajdują się wewnątrz nHDL już około 300 ps, podczas gdy w rzeczywistości, co potwierdza wizualna analiza trajektorii symulacji, jest to czas odpowiadający około 1700 ps (od tego momentu rozpoczyna się kolejny wzrost wartości czerwonych krzywych na rys. 4.18). Proces napełniania trwa do około 3500 ps, kiedy to pierwsze molekuly wody zaczynają opuszczać bioagregat - szczególnie na rys. 4.18 a widać delikatne załamanie zielonej krzywej w końcowej fazie symulacji.

Z porównania rys. 4.18 oraz 4.8, a i b wynika, że nHDL zanurzony w wodzie potrafi przyjąć dwukrotnie mniej wody, niż jego bezwodny odpowiednik. Można to wytłumaczyć faktem wnikania otaczającej agregat wody pomiędzy hydrofobowe części fosfolipidów. Napełniany nHDL powiększa swoją objętość, podczas gdy ilość fosfolipidów się nie zmienia. Prowadzi to do lokalnych zmian gęstości nHDL - pojawiają się miejsca, w których warstwa lipidów staje rzadsza, co sprzyja wnikaniu wody otaczającej agregat pomiędzy fosfolipidy. nHDL nie jest w stanie zniwelować powstałych zmian co prowadzi do jego szybszego uszkodzenia. Nawet opisywana w naszych wcześniejszych pracach [56, 57] wysoka zdolność membran lipidowych do samoregeneracji nie jest w stanie zatrzymać procesu rozerwania nHDL gdyż proces samoregeneracji badano po ustaniu siły zmieniającej strukturę błony. W obecnym przypadku proces napełniania cały czas trwa - siła odkształcająca staje się coraz większa.

Różnice pomiędzy układem z wodą a bezwodnym pojawiają się także, jeżeli weźmiemy pod uwagę wartości długości półosi dopasowanej elipsoidy. O ile wartości długości krótszych półosi elipsoidy zachowują się podobnie, jak w przypadku bezwodnym (4.8 e, f) i systematycznie wzrastają, o tyle długość najdłuższej półosi pozostaje w przybliżeniu stała w trakcie całej symulacji. Przyczyną tego jest obecność wody i konieczność pokonania dodatkowego oporu ośrodka. Zauważyć należy, że stabilność wymiarów agregatu wzdłuż jednej z półosi będzie potęgowała efekt opisany w poprzednim akapicie, związany z lokalnymi zmianami gęstości lipidów tworzących nHDL.

Rys. 4.18 przedstawia wykresy RMSD (górne panele) oraz promienia bezwładności (dolne panele) dla proteiny apoA-I (lewe panele) i fosfolipidów POPC (prawe



Rysunek 4.18: Parametry opisujące zachowanie elementów struktury nHDL podczas procesu ładowania w środowisku wodnym w temperaturze $T = 310\text{K}$ i szybkości ładowania $v = 0.00001 \text{Å} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) proteiny apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla (c) proteiny apoA-I i (d) fosfolipidów POPC.

panelem). Układ rysunku jest taki sam, jak rys. 4.9, aby ułatwić porównanie pomiędzy układem z wodą otaczającą nHDL a układem bezwodnym.

Charakter wykresów RMSD pokazanych na wykresach 4.18 a i b jest zupełnie inny niż w przypadku bezwodnym. W obszarze odpowiadającym 500 ps wartości RMSD są dwukrotnie wyższe niż dla przypadku bez otaczającej wody zarówno dla białka, jak i lipidów. Oznacza to, że obecność wody zwiększa mobilność molekuł tworzących agregat, co skutkuje większą podatnością nHDL na czynniki zmieniające jego strukturę. Ta konkluzja jest zgodna z wcześniejszymi postulatami dotyczącymi szybszego rozpadu nHDL w obecności wody.

Wartości promienia bezwładności zarówno w przypadku z otaczającą wodą, jak i bezwodnym są zbliżone. Również charakterystyki obydwu wykresów są zbliżone. Po początkowym okresie wzrostu promienia bezwładności (zarówno dla apoA-I, jak i POPC) następuje jego spadek, po czym od momentu wypełniania wodą ponowny wzrost, który trwa aż do rozerwania bioagregatu.

Przeprowadzone symulacje procesu ładowania nHDL zanurzonego w wodzie sugerują, że pomimo występowania pewnych różnic, model w którym nHDL jest otoczony próżnią, pozwala oszacować ilość molekuł/atomów, którą można wprowadzić do bioagregatu przed jego uszkodzeniem, oraz oszacować dopuszczalną prędkość przepływu ładowanej substancji. Uzyskane wyniki sugerują również, że o ile tempo zmian zachodzących w nHDL jest ograniczone w środowisku wodnym, to jakościowo są one zbliżone do procesów zachodzących w przypadku umieszczenia bioagregatu w próżni.

Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach posłużono się zaawansowaną metodą symulacji komputerowych MD, dzięki której można uzyskać wgląd w dynamikę poszczególnych cząsteczek tworzących badany układ. Metodę MD oraz jej najistotniejsze aspekty techniczne (algorytmy, specjalistyczne programy) przedstawiono w części teoretycznej rozprawy. Jako przedmiot badań wybrano lipoproteiny HDL i nHDL, które są składnikami osocza i „wędrują” w organizmie człowieka wraz ze strumieniem krwi. Zaproponowano utworzenie kanału transportowego do wnętrza bioagregatów HDL i nHDL poprzez indentację ich powierzchni nanorurką węglową.

W początkowym etapie prac zostały przygotowane, a następnie przebadane modele agregatów HDL i nHDL. Symulacje pokazały, że HDL jest stabilny w najwyższej badanej temperaturze, natomiast dla nHDL średnie kwadratowe odchylenia RMSD przyjmują wysokie wartości, co świadczy o mniejszej stabilności termicznej agregatu nHDL w porównaniu do HDL. W trakcie symulacji równowagowych, agregaty przyjęły kształt opisywany w literaturze - HDL kulisty a nHDL - spłaszczony, dyskoidalny.

Dalsza część badań koncentrowała się tylko na kontenerze nHDL - podjęto próbę ładowania agregatu dwiema odmiennymi substancjami, dipolową wodą oraz niepolarnymi atomami argonu. W tym celu przeprowadzona została seria eksperymentów komputerowych nanoindentacji nHDL nanorurką węglową, która docelowo miała stać się stabilnym kanałem transportowym dla wody i argonu. Dzięki zastosowaniu techniki Steered Molecular Dynamics udało się przebić warstwę lipidową otaczającą bioagregat i wprowadzić koniec nanorurki do jego wnętrza tworząc tym samym zaczątek urządzenia do ładowania.

Otworzyło to drogę do następnego etapu (druga seria eksperymentów kompute-

rowych) tj. badania dynamiki struktury nHDL podczas napełniania zewnętrznymi substancjami. Dokończono modelowanie urządzenia do ładowania, stabilizując drugi koniec wbitej nanorurki i tłocząc przez niego wodę lub argon z różnymi prędkościami. Wykazano, że niezależnie od prędkości ładowania ilość molekuł wody załadowanych do nHDL przed rozerwaniem jego struktury wynosi 1400, co odpowiada w przybliżeniu objętości 42 nm^3 . Ponadto, w początkowej fazie ładowania nie widać znaczących zmian kształtu nHDL z dyskoidalnego na kulisty. Te pojawiają się dopiero po załadowaniu około 300 molekuł wody, co odpowiada objętości 9 nm^3 . Warto zauważyć, że spośród analizowanych wielkości fizycznych opisujących zmiany kształtu bioagregatu, promień bezwładności okazał się być najczulszym.

Lipoproteina nHDL nie jest w stanie zatrzymać hydrofobowych atomów argonu w swoim wnętrzu, w temperaturze fizjologicznej. Dla wysokiej prędkości ładowania atomy opuszczały agregat praktycznie natychmiast. Z kolei niższa prędkość ładowania, $v = 0.0000025\text{ \AA } \Delta t^{-1}$, pozwalała umieścić argon w objętości czterokrotnie mniejszej, niż w przypadku z wodą. Z powodu dużej ruchliwości argonu w temperaturze fizjologicznej obniżono ją do 10 K, dzięki czemu udało się załadować do nHDL ilość atomów odpowiadającą objętości około 30 nm^3 .

Ostatnim etapem badań było przeprowadzenie symulacji ładowania cząsteczek wody do wnętrza nHDL, umieszczając ten bioagregat w środowisku wodnym. W tym przypadku udało się załadować do nHDL mniej molekuł wody, niż w przypadku z próżnią. Wynika to z faktu, iż zarówno wewnątrz bioagregatu, jak i na zewnątrz istniało środowisko hydrofilowe. W naturze wewnątrz agregatu wypełniają silnie niepolarne molekuly, dodatkowo go stabilizując. Niemniej, pomimo wystąpienia pewnych różnic, symulacje ładowania w wodzie oraz w próżni są jakościowo do siebie zbliżone i pozwalają na oszacowanie ilości molekuł (lub atomów), które można wprowadzić do bioagregatu oraz oszacować dopuszczalną prędkość przepływu.

Zaobserwowana elastyczność struktury lipoprotein, dynamiczna zmiana ich kształtu podczas procesu napełniania, stanowi nową, nieznaną wcześniej wiedzę, pozyskaną dzięki eksperymentom komputerowym. Udowodniona możliwość ładowania cząsteczek do wnętrza bioagregatów, np. nHDL, to pierwszy etap tworzenia na ich podstawie nowych, nanoskalowych systemów transportu, np. leków lub biomarkerów.

Dalsze badania w tym kierunku mogą doprowadzić do praktycznego opracowania nowatorskich, liposomalnych systemów dostarczania leków.

Conclusion

In the conducted research, the advanced method of MD computer simulations was used, thanks to which it is possible to gain insight into the dynamics of individual molecules that make up the system under study. The MD method and its "technological" details (algorithms, specialized programs) are presented in the initial part of the dissertation. As the subject of research, HDL and nHDL lipoproteins were selected, which are plasma components and "wander" in the human body along with the blood stream. It was proposed to create a transport channel to the interior of HDL and nHDL bio-aggregates by indenting their surface with a carbon nanotube. The first series of computer experiments performed concerned the implementation and testing of this idea. It has been shown that a stable transport channel can be established as a result of nanoindentation of said lipoproteins. It allows access to the interior of HDL and nHDL with a carbon nanotube-based device, as demonstrated by MD simulations. This opened the way to the next stage (the second series of computer experiments), i.e. the study of the dynamics of nHDL structure during its filling with external substances. Two very different substances were chosen for filling, non-polar argon and strongly dipole water. It has been estimated that approximately 9 nm^3 of volume can be filled inside nHDL without disturbing the structure of this lipoprotein. In addition, up to 32 nm^3 of internal volume can fill the introduced particles, without breaking the nHDL, but causing a gradual change in the shape of nHDL from discoidal to spherical. The observed elasticity of the lipoprotein structure and the dynamic change of their shape during the filling process constitute a new, previously unknown knowledge obtained thanks to computer experiments. The proven possibility of loading molecules inside bio-aggregates, e.g. nHDL, is the first stage of creating new, nanoscale transport systems for drugs or bio-markers. Fur-

ther research in this direction may lead to the practical development of innovative, liposomal drug delivery devices.

Bibliografia

- [1] D. J. Rader, E. T. Alexander, G. L. Weibel, J. Billheimer i G. H. Rothblat. “The Role of Reverse Cholesterol Transport in Animals and Humans and Relationship to Atherosclerosis”. W: *Journal of Lipid Research* 50 (kw. 2009), S189–S194. ISSN: 00222275. DOI: [10.1194/jlr.R800088-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R800088-JLR200). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520306106> (term. wiz. 02.10.2022).
- [2] A. J. Lusis. “Atherosclerosis”. W: *Nature* 407.6801 (wrz. 2000), s. 233–241. ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: [10.1038/35025203](https://doi.org/10.1038/35025203). URL: <http://www.nature.com/articles/35025203> (term. wiz. 02.10.2022).
- [3] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf i W. M. Shih. “Self-Assembly of DNA into Nanoscale Three-Dimensional Shapes”. W: *Nature* 459.7245 (21 maj. 2009), s. 414–418. ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: [10.1038/nature08016](https://doi.org/10.1038/nature08016). URL: <http://www.nature.com/articles/nature08016> (term. wiz. 02.10.2022).
- [4] Q. Zhang, Q. Jiang, N. Li, L. Dai, Q. Liu, L. Song, J. Wang, Y. Li, J. Tian, B. Ding i Y. Du. “DNA Origami as an *In Vivo* Drug Delivery Vehicle for Cancer Therapy”. W: *ACS Nano* 8.7 (22 lip. 2014), s. 6633–6643. ISSN: 1936-0851, 1936-086X. DOI: [10.1021/nn502058j](https://doi.org/10.1021/nn502058j). URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn502058j> (term. wiz. 02.10.2022).
- [5] W. B. Liechty, D. R. Kryscio, B. V. Slaughter i N. A. Peppas. “Polymers for Drug Delivery Systems”. W: *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 1.1 (15 czer. 2010), s. 149–173. ISSN: 1947-5438, 1947-5446. DOI: [10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847](https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847). URL: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847> (term. wiz. 02.10.2022).
- [6] Y. K. Sung i S. W. Kim. “Recent Advances in Polymeric Drug Delivery Systems”. W: *Biomaterials Research* 24.1 (grud. 2020), s. 12. ISSN: 2055-7124. DOI: [10.1186/](https://doi.org/10.1186/)

- s40824-020-00190-7. URL: <https://biomaterialsres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40824-020-00190-7> (term. wiz. 02.10.2022).
- [7] S. Borandeh, B. van Bochove, A. Teotia i J. Seppälä. “Polymeric Drug Delivery Systems by Additive Manufacturing”. W: *Advanced Drug Delivery Reviews* 173 (czer. 2021), s. 349–373. ISSN: 0169409X. DOI: [10.1016/j.addr.2021.03.022](https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.022). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X21001010> (term. wiz. 02.10.2022).
- [8] T. M. Allen i P. R. Cullis. “Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications”. W: *Advanced Drug Delivery Reviews* 65.1 (sty. 2013), s. 36–48. ISSN: 0169409X. DOI: [10.1016/j.addr.2012.09.037](https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002980> (term. wiz. 02.10.2022).
- [9] P. Raczyński, K. Górny, V. Raczyńska, M. Pabiszczak, Z. Dendzik i Z. Gburski. “On the Impact of Nanotube Diameter on Biomembrane Indentation – Computer Simulations Study”. W: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860.2 (lut. 2018), s. 310–318. ISSN: 00052736. DOI: [10.1016/j.bbamem.2017.10.030](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.030). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273617303486> (term. wiz. 02.10.2022).
- [10] E. Bańkowski. *Biochemia: podręcznik dla studentów uczelni medycznych*. Wydanie czwarte. Wrocław: Edra Urban & Partner, 2020. ISBN: 978-83-66548-05-3.
- [11] R. Muray, D. Graner i V. Rodwell. *Biochemia Harpera. Ilustrowana*. pl. Wydanie szóste. Warszawa: PZWL, 2015. ISBN: 978-83-200-4554-3.
- [12] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto i L. Stryer. *Biochemistry*. Ninth edition. New York: W.H. Freeman/Macmillan Learning, 2019. 1096 s. ISBN: 978-1-319-11467-1.
- [13] X. Su, Y. Kong i D. Peng. “Evidence for Changing Lipid Management Strategy to Focus on Non-High Density Lipoprotein Cholesterol”. W: *Lipids in Health and Disease* 18.1 (grud. 2019), s. 134. ISSN: 1476-511X. DOI: [10.1186/s12944-019-1080-x](https://doi.org/10.1186/s12944-019-1080-x). URL: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-019-1080-x> (term. wiz. 21.02.2023).
- [14] P. G. Frank i Y. L. Marcel. “Apolipoprotein A-I: Structure–Function Relationships”. W: *Journal of Lipid Research* 41.6 (czer. 2000), s. 853–872. ISSN: 00222275. DOI:

- [10.1016/S0022-2275\(20\)32028-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32028-9). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520320289> (term. wiz. 14. 03. 2023).
- [15] R. W. Mahley, T. L. Innerarity, S. C. Rall i K. H. Weisgraber. “Plasma Lipoproteins: Apolipoprotein Structure and Function.” W: *Journal of Lipid Research* 25.12 (grud. 1984), s. 1277–1294. ISSN: 00222275. DOI: [10.1016/S0022-2275\(20\)34443-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34443-6). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520344436> (term. wiz. 14. 03. 2023).
- [16] L. Zhou, C. Li, L. Gao i A. Wang. “High-Density Lipoprotein Synthesis and Metabolism (Review)”. W: *Molecular Medicine Reports* 12.3 (wrz. 2015), s. 4015–4021. ISSN: 1791-2997, 1791-3004. DOI: [10.3892/mmr.2015.3930](https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3930). URL: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2015.3930> (term. wiz. 07. 03. 2023).
- [17] A. Dawid. *Przetwarzanie Współbieżne w Symulacjach Komputerowych z Wykorzystaniem Architektury CUDA*. Wydawnictwo Naukowe Akademii WSB, 2018.
- [18] P. A. Gagniuć. *Markov Chains: From Theory to Implementation and Experimentation*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2017. 1 s. ISBN: 978-1-119-38757-2 978-1-119-38758-9.
- [19] D. D. Humphreys, R. A. Friesner i B. J. Berne. “A Multiple-Time-Step Molecular Dynamics Algorithm for Macromolecules”. W: *The Journal of Physical Chemistry* 98.27 (lip. 1994), s. 6885–6892. ISSN: 0022-3654, 1541-5740. DOI: [10.1021/j100078a035](https://doi.org/10.1021/j100078a035). URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100078a035> (term. wiz. 28. 12. 2022).
- [20] M. Paterlini i D. M. Ferguson. “Constant Temperature Simulations Using the Langevin Equation with Velocity Verlet Integration”. W: *Chemical Physics* 236.1-3 (wrz. 1998), s. 243–252. ISSN: 03010104. DOI: [10.1016/S0301-0104\(98\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(98)00214-6). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301010498002146> (term. wiz. 29. 12. 2022).
- [21] B. Dünweg. “Langevin Methods”. W: *Computer Simulations of Surfaces and Interfaces*. Red. B. Dünweg, D. P. Landau i A. I. Milchev. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003, s. 77–92. ISBN: 978-1-4020-1464-2 978-94-010-0173-1. DOI: [10.1007/978-94-010-0173-1_4](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0173-1_4). URL: http://link.springer.com/10.1007/978-94-010-0173-1_4 (term. wiz. 26. 12. 2022).

- [22] S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balsera, Y. Oono i K. Schulten. “Molecular Dynamics Study of Unbinding of the Avidin-Biotin Complex”. W: *Biophysical Journal* 72.4 (kw. 1997), s. 1568–1581. ISSN: 00063495. DOI: [10.1016/S0006-3495\(97\)78804-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78804-0). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349597788040> (term. wiz. 18.02.2023).
- [23] E. Paci i M. Karplus. “Forced Unfolding of Fibronectin Type 3 Modules: An Analysis by Biased Molecular Dynamics Simulations”. W: *Journal of Molecular Biology* 288.3 (maj 1999), s. 441–459. ISSN: 00222836. DOI: [10.1006/jmbi.1999.2670](https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2670). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283699926700> (term. wiz. 18.02.2023).
- [24] P. E. Marszalek, H. Lu, H. Li, M. Carrion-Vazquez, A. F. Oberhauser, K. Schulten i J. M. Fernandez. “Mechanical Unfolding Intermediates in Titin Modules”. W: *Nature* 402.6757 (list. 1999), s. 100–103. ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: [10.1038/47083](https://doi.org/10.1038/47083). URL: <http://www.nature.com/articles/47083> (term. wiz. 18.02.2023).
- [25] H. Lu i K. Schulten. “The Key Event in Force-Induced Unfolding of Titin’s Immunoglobulin Domains”. W: *Biophysical Journal* 79.1 (lip. 2000), s. 51–65. ISSN: 00063495. DOI: [10.1016/S0006-3495\(00\)76273-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76273-4). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349500762734> (term. wiz. 18.02.2023).
- [26] D. J. Brockwell, G. S. Beddard, E. Paci, D. K. West, P. D. Olmsted, D. A. Smith i S. E. Radford. “Mechanically Unfolding the Small, Topologically Simple Protein L”. W: *Biophysical Journal* 89.1 (lip. 2005), s. 506–519. ISSN: 00063495. DOI: [10.1529/biophysj.105.061465](https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061465). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349505726990> (term. wiz. 18.02.2023).
- [27] Z. Gburski, K. Górny i P. Raczyński. “The Impact of a Carbon Nanotube on the Cholesterol Domain Localized on a Protein Surface”. W: *Solid State Communications* 150.9-10 (mar. 2010), s. 415–418. ISSN: 00381098. DOI: [10.1016/j.ssc.2009.12.005](https://doi.org/10.1016/j.ssc.2009.12.005). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038109809007509> (term. wiz. 18.02.2023).
- [28] P. Raczyński, K. Górny, J. Samios i Z. Gburski. “Interaction Between Silicon–Carbide Nanotube and Cholesterol Domain. A Molecular Dynamics Simulation Study.” W: *The Journal of Physical Chemistry C* 118.51 (26 grud. 2014), s. 30115–30119. ISSN:

- 1932-7447, 1932-7455. DOI: [10.1021/jp505532f](https://doi.org/10.1021/jp505532f). URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp505532f> (term. wiz. 18.02.2023).
- [29] L. Zhang, B. Xu i X. Wang. “Cholesterol Extraction from Cell Membrane by Graphene Nanosheets: A Computational Study”. W: *The Journal of Physical Chemistry B* 120.5 (11 lut. 2016), s. 957–964. ISSN: 1520-6106, 1520-5207. DOI: [10.1021/acs.jpccb.5b10330](https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.5b10330). URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpccb.5b10330> (term. wiz. 18.02.2023).
- [30] P. Raczyński, K. Górny, M. Pabiszczak i Z. Gburski. “Nanoindentation of Biomembrane by Carbon Nanotubes – MD Simulation”. W: *Computational Materials Science* 70 (kw. 2013), s. 13–18. ISSN: 09270256. DOI: [10.1016/j.commatsci.2012.12.031](https://doi.org/10.1016/j.commatsci.2012.12.031). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927025612007690> (term. wiz. 18.02.2023).
- [31] V. Raczyńska, P. Raczyński, K. Górny i Z. Gburski. “Nanoindentation of DMPC Layer by Nanotubes of Various Diameters”. W: *Nanophysics, Nanophotonics, Surface Studies, and Applications*. Red. O. Fesenko i L. Yatsenko. T. 183. Springer Proceedings in Physics. Cham: Springer International Publishing, 2016, s. 23–31. ISBN: 978-3-319-30736-7 978-3-319-30737-4. DOI: [10.1007/978-3-319-30737-4_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30737-4_3). URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-30737-4_3 (term. wiz. 18.02.2023).
- [32] P. Raczyński, K. Górny, V. Raczyńska, M. Pabiszczak, Z. Dendzik i Z. Gburski. “On the Impact of Nanotube Diameter on Biomembrane Indentation – Computer Simulations Study”. W: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860.2 (lut. 2018), s. 310–318. ISSN: 00052736. DOI: [10.1016/j.bbamem.2017.10.030](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.030). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273617303486> (term. wiz. 18.02.2023).
- [33] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin i M. Karplus. “All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins”. W: *The Journal of Phy-*

- sical Chemistry B* 102.18 (1 kw. 1998), s. 3586–3616. ISSN: 1520-6106, 1520-5207. DOI: [10.1021/jp973084f](https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp973084f). URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp973084f> (term. wiz. 02.10.2022).
- [34] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov i A. D. Mackerell. “CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields”. W: *Journal of Computational Chemistry* (2009), NA–NA. ISSN: 01928651, 1096987X. DOI: [10.1002/jcc.21367](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21367). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21367> (term. wiz. 19.12.2022).
- [35] A. D. MacKerell, N. Banavali i N. Foloppe. “Development and Current Status of the CHARMM Force Field for Nucleic Acids”. W: *Biopolymers* 56.4 (2000), s. 257–265. ISSN: 0006-3525, 1097-0282. DOI: [10.1002/1097-0282\(2000\)56:4<257::AID-BIP10029>3.0.CO;2-W](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0282(2000)56:4<257::AID-BIP10029>3.0.CO;2-W). URL: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0282\(2000\)56:4%3C257::AID-BIP10029%3E3.0.CO;2-W](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0282(2000)56:4%3C257::AID-BIP10029%3E3.0.CO;2-W) (term. wiz. 19.12.2022).
- [36] Z. Dendzik, K. Górny i Z. Gburski. “Cooperative Dipolar Relaxation of a Glycerol Molecular Cluster in Nanoscale Confinement—a Computer Simulation Study”. W: *Journal of Physics: Condensed Matter* 21.42 (21 paź. 2009), s. 425101. ISSN: 0953-8984, 1361-648X. DOI: [10.1088/0953-8984/21/42/425101](https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-8984/21/42/425101). URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-8984/21/42/425101> (term. wiz. 19.12.2022).
- [37] Z. Gburski, K. Górny i P. Raczyński. “The Impact of a Carbon Nanotube on the Cholesterol Domain Localized on a Protein Surface”. W: *Solid State Communications* 150.9-10 (mar. 2010), s. 415–418. ISSN: 00381098. DOI: [10.1016/j.ssc.2009.12.005](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038109809007509). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038109809007509> (term. wiz. 19.12.2022).
- [38] Z. Dendzik, K. Górny, W. Gwizdała i Z. Gburski. “Dipolar Relaxation of Propylene Glycol Molecular Cluster Confined in Carbon Nanotubes of Different Chiralities—Computer Simulation Study”. W: *Journal of Non-Crystalline Solids* 357.2 (sty. 2011), s. 575–579. ISSN: 00223093. DOI: [10.1016/j.jnoncrysol.2010.06.068](https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.06.068).

- URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022309310005223> (term. wiz. 19.12.2022).
- [39] A. D. Mackerell, M. Feig i C. L. Brooks. “Extending the Treatment of Backbone Energetics in Protein Force Fields: Limitations of Gas-Phase Quantum Mechanics in Reproducing Protein Conformational Distributions in Molecular Dynamics Simulations”. W: *Journal of Computational Chemistry* 25.11 (sierp. 2004), s. 1400–1415. ISSN: 01928651, 1096987X. DOI: [10.1002/jcc.20065](https://doi.org/10.1002/jcc.20065). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.20065> (term. wiz. 30.12.2022).
- [40] “On the Determination of Molecular Fields.—I. From the Variation of the Viscosity of a Gas with Temperature”. W: *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* 106.738 (paź. 1924), s. 441–462. ISSN: 0950-1207, 2053-9150. DOI: [10.1098/rspa.1924.0081](https://doi.org/10.1098/rspa.1924.0081). URL: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspa.1924.0081> (term. wiz. 30.12.2022).
- [41] A. Y. Toukmaji i J. A. Board. “Ewald Summation Techniques in Perspective: A Survey”. W: *Computer Physics Communications* 95.2-3 (czer. 1996), s. 73–92. ISSN: 00104655. DOI: [10.1016/0010-4655\(96\)00016-1](https://doi.org/10.1016/0010-4655(96)00016-1). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0010465596000161> (term. wiz. 30.12.2022).
- [42] P. P. Ewald. “Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale”. W: *Annalen der Physik* 369.3 (1921), s. 253–287. ISSN: 00033804, 15213889. DOI: [10.1002/andp.19213690304](https://doi.org/10.1002/andp.19213690304). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/andp.19213690304> (term. wiz. 30.12.2022).
- [43] T. Darden, D. York i L. Pedersen. “Particle Mesh Ewald: An $N \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems”. W: *The Journal of Chemical Physics* 98.12 (15 czer. 1993), s. 10089–10092. ISSN: 0021-9606, 1089-7690. DOI: [10.1063/1.464397](https://doi.org/10.1063/1.464397). URL: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.464397> (term. wiz. 30.12.2022).
- [44] P. Raczyński, K. Górny, V. Raczyńska, M. Pabiszczak, Z. Dendzik i Z. Gburski. “On the Impact of Nanotube Diameter on Biomembrane Indentation – Computer Simulations Study”. W: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860.2 (lut. 2018), s. 310–318. ISSN: 00052736. DOI: [10.1016/j.bbamem.2017.10.030](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.030).

- URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273617303486> (term. wiz. 14.03.2023).
- [45] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé i K. Schulten. “Scalable Molecular Dynamics with NAMD”. W: *Journal of Computational Chemistry* 26.16 (grud. 2005), s. 1781–1802. ISSN: 0192-8651, 1096-987X. DOI: [10.1002/jcc.20289](https://doi.org/10.1002/jcc.20289). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.20289> (term. wiz. 02.10.2022).
- [46] W. Humphrey, A. Dalke i K. Schulten. “VMD: Visual Molecular Dynamics”. W: *Journal of Molecular Graphics* 14.1 (lut. 1996), s. 33–38. ISSN: 02637855. DOI: [10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0263785596000185> (term. wiz. 02.10.2022).
- [47] A. A. Patankar i H. Moon. *Automatic Radish Wilt Detection Using Image Processing Based Techniques and Machine Learning Algorithm*. 31 sierp. 2020. arXiv: [arXiv: 2009.0173](https://arxiv.org/abs/2009.0173). URL: <http://arxiv.org/abs/2009.0173> (term. wiz. 14.03.2023). preprint.
- [48] F. Gu, M. K. Jones, J. Chen, J. C. Patterson, A. Catte, W. G. Jerome, L. Li i J. P. Segrest. “Structures of Discoidal High Density Lipoproteins”. W: *Journal of Biological Chemistry* 285.7 (lut. 2010), s. 4652–4665. ISSN: 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M109.069914](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.069914). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820809727> (term. wiz. 14.03.2023).
- [49] J. B. Klauda, R. M. Venable, J. A. Freites, J. W. O’Connor, D. J. Tobias, C. Mondragon-Ramirez, I. Vorobyov, A. D. MacKerell i R. W. Pastor. “Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types”. W: *The Journal of Physical Chemistry B* 114.23 (17 czer. 2010), s. 7830–7843. ISSN: 1520-6106, 1520-5207. DOI: [10.1021/jp101759q](https://doi.org/10.1021/jp101759q). URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp101759q> (term. wiz. 02.10.2022).
- [50] V. Zoete, M. A. Cuendet, A. Grosdidier i O. Michielin. “SwissParam: A Fast Force Field Generation Tool for Small Organic Molecules”. W: *Journal of Computational Chemistry* 32.11 (sierp. 2011), s. 2359–2368. ISSN: 01928651. DOI: [10.1002/jcc.21816](https://doi.org/10.1002/jcc.21816). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21816> (term. wiz. 02.10.2022).

- [51] L. Rowley, D. Nicholson i N. Parsonage. “Monte Carlo Grand Canonical Ensemble Calculation in a Gas-Liquid Transition Region for 12-6 Argon”. W: *Journal of Computational Physics* 17.4 (kw. 1975), s. 401–414. ISSN: 00219991. DOI: [10.1016/0021-9991\(75\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0021-9991(75)90042-X). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002199917590042X> (term. wiz. 02.10.2022).
- [52] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey i M. L. Klein. “Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water”. W: *The Journal of Chemical Physics* 79.2 (15 lip. 1983), s. 926–935. ISSN: 0021-9606, 1089-7690. DOI: [10.1063/1.445869](https://doi.org/10.1063/1.445869). URL: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.445869> (term. wiz. 02.10.2022).
- [53] A. Brünger, C. L. Brooks i M. Karplus. “Stochastic Boundary Conditions for Molecular Dynamics Simulations of ST2 Water”. W: *Chemical Physics Letters* 105.5 (mar. 1984), s. 495–500. ISSN: 00092614. DOI: [10.1016/0009-2614\(84\)80098-6](https://doi.org/10.1016/0009-2614(84)80098-6). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009261484800986> (term. wiz. 02.10.2022).
- [54] L. Kalé, R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan i K. Schulten. “NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics”. W: *Journal of Computational Physics* 151.1 (maj 1999), s. 283–312. ISSN: 00219991. DOI: [10.1006/jcph.1999.6201](https://doi.org/10.1006/jcph.1999.6201). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021999199962010> (term. wiz. 06.01.2023).
- [55] I. Daidone, A. Amadei, D. Roccatano i A. D. Nola. “Molecular Dynamics Simulation of Protein Folding by Essential Dynamics Sampling: Folding Landscape of Horse Heart Cytochrome c”. W: *Biophysical Journal* 85.5 (list. 2003), s. 2865–2871. ISSN: 00063495. DOI: [10.1016/S0006-3495\(03\)74709-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74709-2). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349503747092> (term. wiz. 02.10.2022).
- [56] P. Raczyński, K. Górny, P. Beldowski, S. Yuwan, B. Marciniak i Z. Dendzik. “Steered Molecular Dynamics of Lipid Membrane Indentation by Carbon and Silicon-Carbide Nanotubes—The Impact of Indenting Angle Uncertainty”. W: *Sensors* 21.21 (22 paź. 2021), s. 7011. ISSN: 1424-8220. DOI: [10.3390/s21217011](https://doi.org/10.3390/s21217011). URL: <https://www.mdpi.com/1424-8220/21/21/7011> (term. wiz. 22.02.2023).

- [57] P. Raczyński, K. Górny, P. Beldowski, S. Yuwan i Z. Dendzik. “Application of Graphene as a Nanoindenter Interacting with Phospholipid Membranes—Computer Simulation Study”. W: *The Journal of Physical Chemistry B* 124.30 (30 lip. 2020), s. 6592–6602. ISSN: 1520-6106, 1520-5207. DOI: [10.1021/acs.jpccb.0c02319](https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.0c02319). URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpccb.0c02319> (term. wiz. 22. 02. 2023).

Spis rysunków

1.1	Wzór chemiczny i schemat struktury przestrzennej fosfolipidu. Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.	10
1.2	Rdzeń steroidowy.	11
1.3	Cholesterol.	11
1.4	Budowa kompleksu lipoproteinowego transportowanego w osoczu. Źródło [10].	13
1.5	Ważne lipidy w ludzkim osoczu. Źródło [13].	13
1.6	Metabolizm HDL w odwróconym transporcie cholesterolu. Wyjaśnienie skrótów: LCAT - acylotransferaza lecytyna:cholesterol; C - cholesterol; CE - estry cholesterolu; PL - fosfolipid; A-I alipoproteina A-I; SR-B1 - receptor oczyszczający B1; ABCA1 - kasetowy receptor A1 wiążący ATP (adenozynotrójfosforan)[11].	16
3.1	Modele biomolekuł używane w symulacjach: (a) nHDL i (b) HDL.	33
3.2	Początkowa konfiguracja układu wykorzystanego w symulacjach nanoindentacji nHDL nanorurką węglową.	35
3.3	Konfiguracja początkowa układu ładowania nHDL wodą. Nanorurka została pokolorowana na niebiesko celem wyraźnego zwizualizowania jej końca znajdującego się wewnątrz nHDL.	38
3.4	Konfiguracja początkowa układu ładowania nHDL wodą, w obecności wody. Aby lepiej unaocznić badany układ, nie cała woda rozmieszczona pomiędzy warstwami grafenowymi została pokazana.	39

4.1	Średnia wartość RMSD w funkcji temperatury dla proteiny apoA-I w (a) nHDL i (b) HDL oraz dla fosfolipidów POPC w (c) nHDL i (d) struktury HDL. Na wykresie pokazane są również słupki błędów odchylenia standardowego.	42
4.2	Średnia liczba wiązań wodorowych w funkcji temperatury dla (a) nHDL i (b) HDL.	43
4.3	Zależność czasowa RMSD w temperaturze $T = 310\text{ K}$ dla proteiny apoA-I w (a) nHDL i (b) HDL oraz dla fosfolipidów POPC w (c) nHDL i (d) HDL.	44
4.4	Promień bezwładności w funkcji czasu w temperaturze $T = 310\text{ K}$ dla proteiny apoA-I w (a) nHDL i (b) HDL, oraz dla fosfolipidów POPC w (c) nHDL i (d) HDL.	45
4.5	Siła konieczna do wbicia nanorurki do agregatu nHDL.	46
4.6	Zmiana profilu gęstości w kolejnych stadiach indentacji nHDL nanorurką.	47
4.7	Chwilowe konfiguracje układu nHDL załadowanego cząsteczkami wody w $T = 310\text{ K}$ dla średniej szybkości pompowania $0.00001\text{Å}\Delta t^{-1}$ w chwilach: (a) $t = 375\text{ ps}$, (b) $t = 625\text{ ps}$, (c) $t = 875\text{ ps}$, (d) $t = 1125\text{ ps}$, (e) $t = 1375\text{ ps}$, (f) $t = 1625\text{ ps}$	49
4.8	Parametry ładowania cząsteczek wody do nHDL w temperaturze $T = 310\text{ K}$ i szybkości ładowania $v = 0.00001\text{Å}\Delta t^{-1}$ jako funkcja czasu symulacji, dla dwóch niezależnych przebiegów symulacji: liczba cząsteczek wody załadowanych do nHDL/na zewnątrz nHDL/bez kontaktu z nHDL (a) oraz (b), strumień cząstek wody (c) i (d), oraz długości półosi dopasowanej elipsoidy a , b i c (e) i (f). Lewy panel pokazuje wyniki dla przebiegu numer 1, prawy panel pokazuje wyniki dla przebiegu numer 2.	51

4.9	Parametry opisujące zachowanie elementów struktury nHDL podczas procesu ładowania w temperaturze $T = 310$ K i szybkości ładowania $v = 0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) proteiny apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla (c) proteiny apoA-I i (d) fosfolipidów POPC.	52
4.10	Parametry ładowania cząsteczek wody do nHDL w temperaturze $T = 310$ K i szybkości ładowania $v = 0.0000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ jako funkcja czasu symulacji dla dwóch niezależnych przebiegów symulacji: liczba cząstek wtłoczonych do struktury (a) oraz (b), strumień cząstek wody (c) i (d), oraz długość półosi dopasowanej elipsoidy a , b i c (e) i (f).	54
4.11	Parametry opisujące zachowanie elementów struktury nHDL podczas procesu ładowania w temperaturze $T = 310$ K i szybkości ładowania $v = 0.000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) apolipoproteiny apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla (c) apolipoproteina apoA-I oraz (d) fosfolipidy POPC.	55
4.12	Liczba atomów argonu załadowanych do nHDL w $T = 310$ K przy szybkości ładowania (a) $v = 0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ i (b) $v = 0.0000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$	56
4.13	Parametry ładowania atomów argonu do nHDL w temperaturze $T = 10$ K dla szybkości ładowania $v = 0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ versus czas symulacji, dla dwóch niezależnych przebiegów: (a) i (b) liczba atomów wypełniających strukturę, (c) i (d) półosie dopasowanej elipsoidy a , b i c	57
4.14	Parametry opisujące zachowanie się składników struktury nHDL podczas wypełniania atomami argonu w temperaturze $T = 10$ K i szybkości ładowania $v = 0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) białka apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla proteiny apoA-I (c) i (d) cząsteczek POPC.	59

4.15	Parametry ładowania atomów argonu do nHDL w temperaturze $T = 10$ K dla tempa ładowania $v = 0.0000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ jako funkcja czasu symulacji f dla dwóch niezależnych przebiegów symulacji: (a), (b) liczba atomów wypełniających strukturę i (c), (d) półosie dopasowanej elipsoidy a , b i c	60
4.16	Parametry opisujące zachowanie się składników struktury nHDL podczas wypełniania atomami argonu w temperaturze $T = 10$ K i szybkości ładowania $v = 0.0000025 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) białka apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla (c) proteiny apoA-I i (d) cząsteczek POPC.	61
4.17	Parametry ładowania cząsteczek wody do nHDL w środowisku wodnym w temperaturze $T = 310$ K i szybkości ładowania $v = 0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$ jako funkcja czasu symulacji, dla dwóch niezależnych przebiegów symulacji: liczba cząsteczek wody załadowanych do nHDL/na zewnątrz nHDL/bez kontaktu z nHDL (a) oraz (b), strumień cząstek wody (c) i (d), oraz długości półosi dopasowanej elipsoidy a , b i c (e) i (f). Lewy panel pokazuje wyniki dla przebiegu numer 1, prawy panel pokazuje wyniki dla przebiegu numer 2.	63
4.18	Parametry opisujące zachowanie elementów struktury nHDL podczas procesu ładowania w środowisku wodnym w temperaturze $T = 310$ K i szybkości ładowania $v = 0.00001 \text{ \AA} \Delta t^{-1}$: RMSD dla (a) proteiny apoA-I i (b) fosfolipidów POPC, oraz promień bezwładności dla (c) proteiny apoA-I i (d) fosfolipidów POPC.	65