

MODELAREA MOLECULARĂ A INTERACȚIUNII LIPOZOMILOR STABILIZAȚI STERIC TRANSPORTORI DE MEDICAMENTE CU OPSONINELE SERICE: II – SIMULAREA ADSORBȚIEI PROTEINELOR OPSONIZANTE

A. Neamțu¹, O. C. Mungiu²

¹ Asist. Drd. – Disciplina de Biofizică și Bioinstrumentație, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

² Prof. Dr. – Disciplina de Farmacologie, Toxicologie și Algeziologie, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

Cuvinte cheie

lipozomi stabilizați steric, opsonine

Fenomenul care joacă un rol central în succesul terapeutic al formulărilor lipozomale de transport și eliberare controlată a substanțelor active medicamentoase administrate i.v. este reprezentat de opsonizarea suprafeței transportorilor lipozomali, cu implicații directe negative asupra timpului de circulație. Cu toate că există un număr mare de date experimentale referitoare la acest subiect, interacția intimă la nivel molecular dintre proteinele opsonizante și suprafețele lipozomilor transportori nu este încă complet descrisă și înțeleasă. Scopul celei de a doua părți a studiului nostru prezentată aici este acela de a analiza utilizând metodele modelării moleculare fenomenul adsorbției proteinelor opsonice la suprafețele lipozomale stabilizate steric (LSS). S-au analizat trei varietăți de lipozomi LSS, cu diferite densități de acoperire și diferite compoziții ale stratului polimeric protectiv, sub aspectul capacității acestuia din urmă de a împiedica opsonizarea. Metoda imaginată și aplicată în acest sens s-a dovedit a fi suficient de sensibilă pentru a indica diferențe semnificative în comportamentul celor trei clase de lipozomi supuse studiului. Rezultatele au indicat predictiv că cele mai eficiente acoperiri sunt cele mixte și cele caracterizate de densități mici de acoperire dar cu lanțuri polimerice de masă moleculară mare.

Keywords

sterically stabilized liposome, opsonin

Molecular modeling interaction of Sterically Stabilized Liposome

The central phenomenon which plays a negative role in the therapeutic success of liposomal drug delivery formulations administered i.v. is the opsonization of transporters surface. This interaction reduces the circulation times of liposomes loaded with drugs by promoting their clearance from blood. Although there is a great amount of experimental results regarding the opsonization effect, there is much less understanding of the intimate molecular mechanisms of protein (opsonin) – liposome surface interactions. The aim of this second part of the study is to develop a methodology for the analysis of Sterically Stabilized Liposome (SSL) – opsonin interactions using molecular modeling techniques. We developed, using the previously validated model for liposomes (Neamțu, 2006), a method for predicting the shielding capabilities of SSL liposomes with respect to their physical and chemical surface properties.. Consequently we applied it to three varieties of pegilated liposomes which differ in the surface coverage densities and in the molecular mass of the polymer used. The method proved itself sensible enough to point out significant differences between the liposomes subjected to analysis. Finally, the liposomes with low coverage densities but with high polyethylenglicol molecular mass and especially mixed coverage liposomes proved the best shielding capabilities.

Introducere

Sistemele Terapeutice, ca strategie modernă de administrare a substanțelor active medicamentoase își extind aria de aplicabilitate în practica medicală, avantajele eliberării continue determinând în condițiile respectării indicațiilor, tendințe preferențiale din partea terapeuților în domeniile pentru care au fost formulate.

De la Sistemele Terapeutice administrate pe cale orală, transcutană, pulmonară, sistemică etc. și până la implantarea intracerebrală de polimeri cu eliberare continuă a diferiților agenți medicamentoși terapeuții dispun deja de o serie de preparări cu eliberare continuă din care unele s-au dovedit de succes.

Un loc aparte în cadrul Sistemelor Terapeutice îl ocupă cele pe bază de nanoparticule. Acestea sunt atractive datorită dimensiunilor mici ale transportorilor și totodată datorită existenței posibilității de "coafare" a suprafeței lor în vederea prelungirii timpului de circulație sau a țintirii active a țesuturilor afectate de diverse procese patologice.

Unii dintre transportorii de medicamente nanoparticulați cu mari speranțe de utilizare în practica medicală curentă sunt lipozomii – vezicule delimitate de una sau mai multe membrane cu structură de bistrat lipidic, similară membranelor celulare. Substanța activă se găsește încărcată fie în mediul apos delimitat de aceste membrane pentru substanțele hidrofile, fie în miezul hidrofob al straturilor lipidice pentru medicamentele hidrofobe.

Succesul terapeutic al formulărilor lipozomale administrate intravenos depinde în cea mai mare măsură de rata de îndepărtare a acestor transportori din circulație, de dorit fiind un timp cât mai lung de circulație pentru ca aceștia să poată elibera lent medicamentul înglobat, conform programului prestabilit. Din păcate, odată introduși în circulație lipozomii interacționează rapid cu o gamă largă de proteine plasmatică (opsonine), care fie destabilizează lipozomul fie facilitează captarea acestuia de către fagocitele Sistemului Reticulo-Endotelial.

Deși există un volum mare de date experimentale privitoare la fenomenul opsonizării suprafețelor biomaterialelor în general și a lipozomilor în special, abordările teoretice evaluare pe baze fizice riguroase (predictive și interpretative) a acestor aspecte sunt încă în faza de început.

Volumul sărac de date și cercetări teoretice, dublat de existența unui bazin important de cercetări experimentale practice, contribuie deocamdată la eficiența

scăzută în practica medicală uzuală a transportorilor nanoparticulați. Problematika interacțiunii suprafeței biomaterialelor cu mediul intern al organismului este adâncită de complexitatea și întrepătrunderea proceselor fizice, chimice și biologice, cu mult peste delimitările tradiționale, în condițiile lipsei unei înțelegeri relativ complete a acestora la nivel molecular.

Scopul prezentului studiu îl constituie aplicarea metodelor de modelare moleculară pentru analiza adsorbției proteinelor opsonizante pe suprafețele transportorilor lipozomali stabilizate steric. Datele prezentate sunt rezultatul continuării studiului de validare a modelelor lipozomale (Neamțu, 2006), cu analiza proprietăților de suprafață a transportorilor. S-au realizat și analizat astfel comparativ trei modele de lipozomi stabilizați steric (LSS) care diferă între ei prin densitatea de acoperire și lungimea lanțurilor polimerului polietilenglicol (PEG) de acoperire. În decursul simulărilor s-a urmărit modul de interacțiune a unei opsonine "de test" cu suprafețele amintite și obținerea prin calcul a forței de repulsie sterică exercitată de stratul polimeric de grefaj asupra proteinei de adsorbție.

Material și metodă

Protocolul de lucru a constat într-o primă etapă în obținerea prin simulare, utilizând modelul validat în prima parte a acestui studiu, a trei varietăți de bistraturi lipidice pegilate, care să reproducă structura peretelui lipozomal pentru următoarele clase de lipozomi pegilați:

LSS(A) – lipozomi stabilizați steric acoperiți cu PEG de masă moleculară mică (lungime scurtă) (PEG750) dar cu densitate mare de acoperire ($\approx 16\%$)

LSS(B) – lipozomi stabilizați steric acoperiți cu PEG de masă moleculară mare (PEG5000) dar cu densitate redusă de acoperire ($\approx 4\%$)

LSS(C) – lipozomi stabilizați steric acoperiți cu un strat heterogen de PEG care conține în diferite fracții molare PEG de diferite lungimi ale lanțului polimeric.

Raționamentul care a stat la baza utilizării lipozomilor pegilați în trei variante a fost aceea că opsonizarea plasmatică și deci îndepărtarea din circulație a lipozomilor transportori de medicamente, este un proces extrem de complex, mediat de o varietate mare de proteine plasmatică, cu dimensiuni și caracteristici diferite, un singur tip de moleculă de PEG nefiind suficient pentru asigura

protecția împotriva tuturor acestor variate clase de proteine.

Astfel, opsoninele cu masă moleculară mică pot difuza printre moleculele de PEG cu lungime mare și densitate de acoperire mică, care însă sunt eficiente în cadrul protecției împotriva opsoninelor de dimensiuni mari. Pe de altă parte, acoperirea cu PEG având lanțuri scurte dar dese ar putea fi eficiente împotriva opsoninelor cu masă moleculară relativ mică (ex. fosfolipazele) dar nu și împotriva aceluia cu masă moleculară mare cum sunt imunoglobulinele.

Din acest motiv am considerat că o acoperire mixtă (LSS(C)) ar putea avea efecte pozitive asupra ameliorării timpilor de circulație a lipozomilor transportori de medicamente. Pentru LSS(C) alegerea numărului de lipide pegilate din fiecare clasă nu s-a făcut aleator ci conform următorului raționament: având în vedere faptul că fenomenul care impune o limită superioară densității superficiale de pegilare este reprezentat de expansiunea ariei/lipid a bistratului lipidic ca urmare a grefării polimerului pe suprafața acestuia, am propus alegerea cantității din fiecare specie pegilată în raport invers cu capacitatea acesteia de a produce expansiunea laterală a ariei mai sus amintită. Se știe că expansiunea ariei/lipid crește proporțional (la o densitate de acoperire dată) cu raza de girație medie a polimerului de grefare care la rândul ei depinde de lungimea lanțului. Prin urmare, s-a scris un sistem de ecuații în care s-a impus condiția ca raportul de concentrație molară dintre oricare două fracții de lipide pegilate să fie egal cu raportul invers al razelor de girație a lanțurilor polimerice corespunzătoare celor două tipuri de lipide. În plus, se impune condiția ca suma concentrațiilor molare corespunzătoare fracțiilor lipidice pegilate, adică fracția totală a lipidelor pegilate, să fie egală cu o anumită valoare procentuală aleasă în mod convenabil.

Razele de girație (R_g) ale lanțurilor polimerice corespunzătoare tipurilor de lipide pegilate utilizate în modelarea LSS(C) au fost calculate cu ajutorul relației (Teraoka, 2002):

$$R_g \cong a \cdot N^{3/5}$$

în care a = dimensiunea unui monomer de PEG, N = numărul de monomeri din lanț. Considerând $a=0,38nm$ (dimensiunea medie a unui segment monomeric $-CH_2-CH_2-O-$) și concentrația totală a lipidelor pegilate = 30%mol s-au obținut următoarele valori pentru concentrațiile fracțiilor de lipide pe-

gilate (Tabel I):

Concentrația diferitelor varietăți de PEG utilizate pentru formularea de tip LSS(C)	
Varietatea de PEG	Concentrația (%mol)
PEG350	7,95
PEG550	5,96
PEG750	5,10
PEG1000	4,26
PEG2000	2,83
PEG3000	2,25
PEG5000	1,66

tabel I

Ca indicatori ai echilibrării sistemului modelat a fost urmărită variația în timp a energiilor potențiale de interacțiune dintre diferitele componente moleculare din sistem. Din momentul în care acești indicatori rămân constanți se poate aprecia că sistemul se află în stare de echilibru.

Odată obținute bistraturile lipidice care modelează pereții lipozomali ai lipozomilor din clasele LSS(A), LSS(B) și LSS(C) s-a trecut la evaluarea propriu-zisă a opsonizării cu ajutorul unui protocol pe care îl descriem în continuare.

La o primă vedere s-ar putea considera că cea mai simplă metodă de evaluare a adsorbției opsoninelor plasmaticice pe suprafețele lipozomale ar fi realizarea unor simulări în care o colecție de molecule proteice (opsonine) s-ar găsi în suspensie la o anumită distanță de bistratul lipidic pegilat de analizat și care ar difuza și adera în decursul evoluției temporale a sistemului, într-o mai mică sau mai mare măsură, la suprafața acestuia. O astfel de abordare nu este însă fezabilă datorită timpului extrem de mare care ar trebui acoperit prin simulare.

În general, în situațiile în care obținerea unor rezultate suficiente de precise este imposibilă prin aplicarea metodelor de simulare de echilibru, se optează pentru metode de modelare moleculară de nonechilibru (NEMD - Nonequilibrium Molecular Dynamics) (Leach, 2001). În cadrul acestor me-

tode se aplică o perturbație asupra sistemului studiat pentru a deplasa starea acestuia către situația dorită a fi cercetată. Rezultatele sunt apoi analizate după caz prin prisma teoriei statistice a stărilor de neechilibru termodinamic. Cel mai adesea perturbarea aplicată sistemului îmbracă forma unor forțe exercitate asupra unei regiuni restrânse a sistemului analizat. Această tehnică poartă denumirea de Dinamică Moleculară Ghidată (Steered Molecular Dynamics).

Concret, în cazul de față al studiului opsonizării am optat pentru codul PMF (Potential of Mean Force) implementat în suita de programe GROMACS (van der Spoel, 2006). Acesta este utilizat la calculul potențialului forței medii folosind simulări

în cadrul cărora poziția moleculelor de cercetat este fixată în locații variabile, conform unui program dinainte stabilit, și în decursul cărora se măsoară forța medie pe care restul sistemului o exercită asupra lor.

Concret, în cazul de față restricțiile poziționale sunt aplicate asupra a două molecule opsoninice a căror distanță față de bistratul lipidic analizat este redusă în mod progresiv și foarte lent. Se înregistrează în timpul simulării forța pe care lanțurile grefate de PEG și solventul o exercită asupra acestor molecule, precum și energiile de interacțiune dintre diversele specii moleculare componente ale sistemului (figura 1).

În acest mod, prin analiza profilului de forță

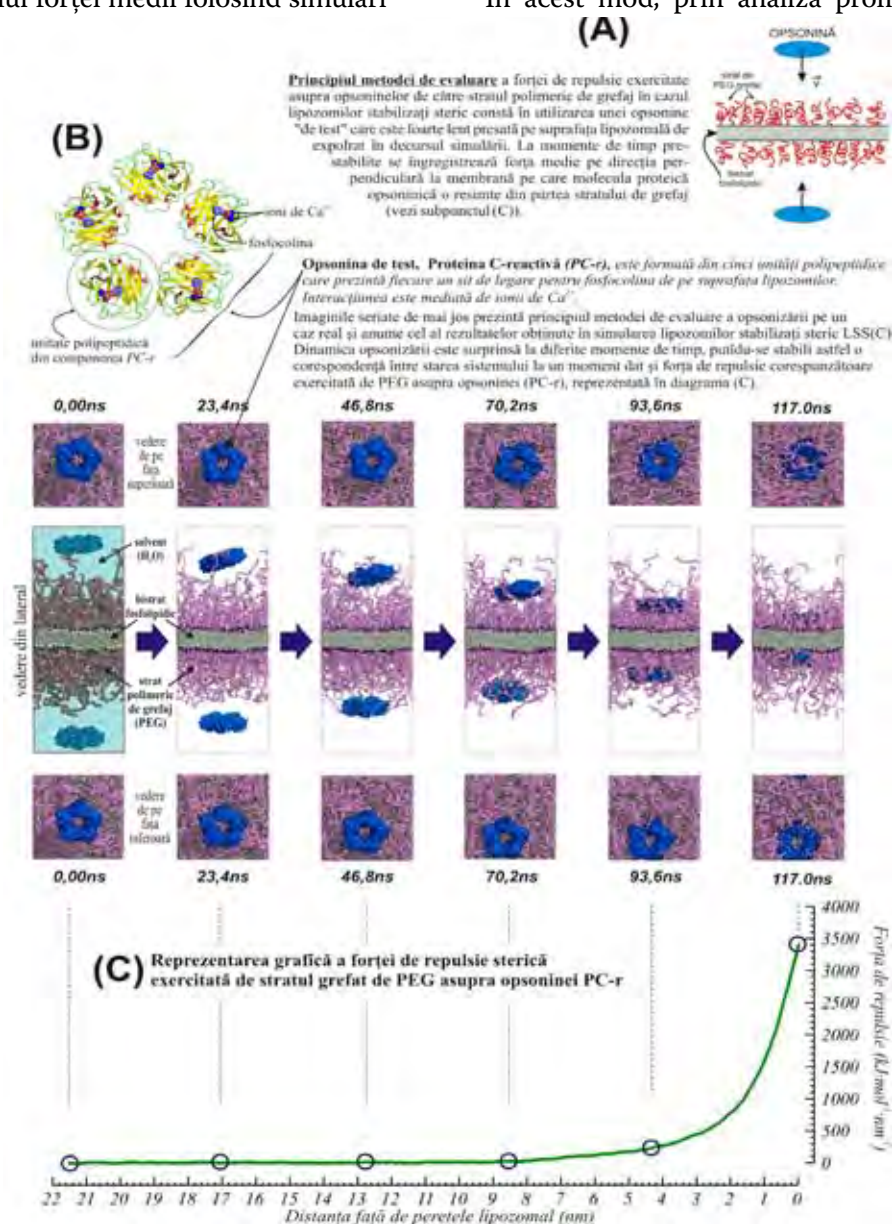


Figura 1 Principiul metodei de evaluare a capacității de rezistență la opsonizare a suprafețelor lipozomale stabilizate steric. (A) – principiul metodei; (B) – exemplul concret al evaluării opsonizării lipozomilor de tip LSS(C); (C) – profilul forței de repulsie obținut pentru LSS(C).

pentru diferite tipuri (varietăți) de bistraturi lipidice pegilate se pot extrage informații în ceea ce privește capacitatea relativă a acestora de a îndepărta opsoninele plasmatiche de suprafețele lipidice lipozomale.

Pentru a avea un profil de referință în cadrul analizei celor trei tipuri de modele lipozomale pegilate LSS(A) LSS(B) și LSS(C) am înregistrat prin metoda descrisă mai sus și profilul de interacțiune a moleculelor opsonice cu suprafața unui lipozom clasic (LC) (bistrat lipidic nepegilat).

Ca moleculă opsonică de test („senzor opsonic”) s-a ales Proteina C-reactivă (PC-r). Alegerea a fost dictată de dorința de a reproduce prin simulare o situație cât mai apropiată de realitate (adică interacția dintre o moleculă proteică opsonizantă reală și un bistrat lipidic pegilat). Proteina C-reactivă este o opsonină plasmatică având dimensiuni medii și totodată se bucură de faptul că are structura determinată cristalografic, prin urmare fiind posibilă construcția unui model detaliat pentru aceasta.

Algoritmul de simulare presupune constrângerea centrului de masă al proteinei opsonizate la distanțe variabile (Constrained Dynamics) față de planul de simetrie a bistratului lipidic urmată de evaluarea și înregistrarea repetitivă, la un anumit număr de pași de integrare, a forței rezultante ce acționează asupra proteinei.

Poziția centrului de masă a proteinei opsonizante este deplasată cu o viteză convenabil aleasă spre bistratul lipidic. În decursul acestei deplasări doar

distanța de-a lungul coordonatei OZ, perpendiculară la planul membranei, a fost ajustată în permanență pentru proteina în cauză, aceasta putându-se însă deplasa liber în planul XOY.

Pentru construcția modelului redus utilizat în descrierea Proteinei C-reactive s-au utilizat parametrii modelului Marrink (2003) care au fost asociați în funcție de tipul lor, grupărilor chimice ale celor 20 de aminoacizi naturali. Asocierea s-a efectuat cu ajutorul programului BilCad v1.1, conceput și realizat în laboratorul nostru.

Toate simulările s-au efectuat cu ajutorul suitei de programe GROMACS v. 3.3.1 (Berendsen, 1995) sub sistemul de operare Linux OpenSuSE (Novell) 10.1 pe un cluster format din 5 noduri de calcul (P4 – 3Ghz, 1GB RAM/nod) interconectate printr-o rețea de mare viteză (Gigabit Ethernet). Graficele au fost realizate cu ajutorul programelor PyMol v. 0.99 (DeLano, 2005), Grace v. 5.19 și Inkscape v. 0.44.

Rezultate și discuții

În urma simulărilor de adsorbție a opsoninei de test pe suprafețele lipozomilor de tip LC, LSS(A), LSS(B) și respectiv LSS(C) s-au înregistrat atât modul de variație a energiei de interacțiune dintre opsonină și suprafața lipozomală cât și profilele forței de repulsie pe care aceasta o resimte la apropierea de suprafață.

Graficele de variație a energiei totale a sistemului în timpul adsorbției Proteinei C-reactive pe suprafețele lipozomilor de tip LC și LSS(C) sunt reprezentate comparativ în figura 2.

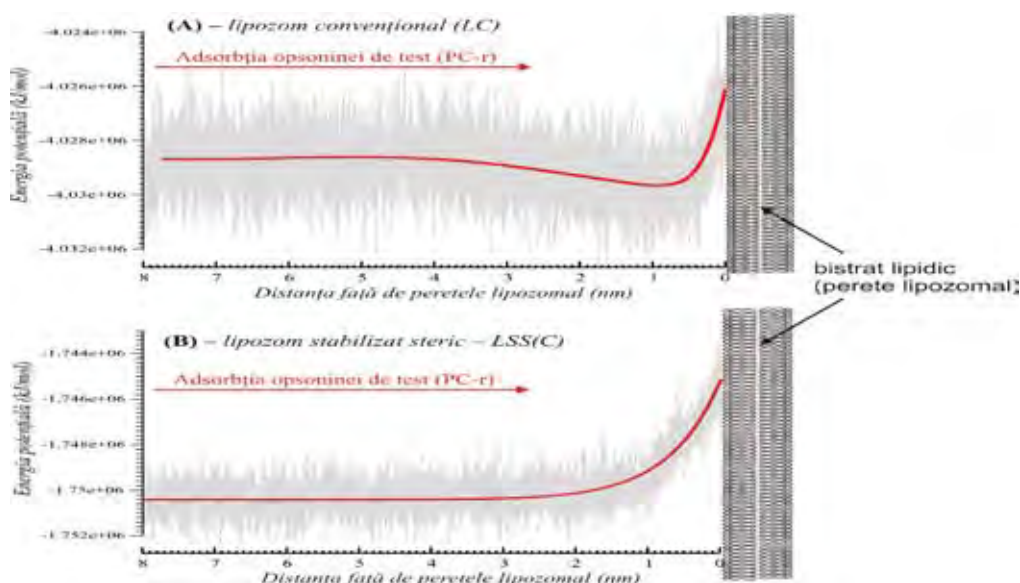


Figura 2 Reprezentarea grafică a variației energiei potențiale totale de interacțiune a Proteinei C-reactive (PC-r) (opsonină de test) obținută în urma simulării adsorbției acesteia pe suprafața lipozomilor convenționali (LC) și stabiliți sterici (LSS(C)).

Se observă în primul rând că pentru lipozomii LC graficul energiei este caracterizat de prezența unui minim situat în apropierea suprafeței lipozomale la distanța de $0,9\text{nm}$, minim care așa cum era de așteptat exprimă tendința proteinelor opsonizante de a se adsorbi pe suprafața transportorilor lipozomali clasici. Trebuie subliniat că în cazul de față adsorbția este specifică deoarece proteina C-reactivă posedă situri de legare specifice pentru fosfatidilcolină, interacțiunea cu lipidele lipozomale având loc în acest caz prin intermediul a 10 ioni de Ca^{2+} (câte 2 pentru fiecare lanț polipeptidic din componența PC-r).

Minimul energetic dispare însă în graficul corespunzător lipozomilor stabilizați steric, ceea ce demonstrează efectul de inhibare a adsorbției proteinelor opsonizante manifestat de acoperirea cu PEG a suprafeței lipozomale.

Pentru o analiză amănunțită a modului de interacțiune a moleculei opsonizante cu suprafața lipozomală am considerat necesară descompunerea profilului energetic în componente și anume energiile de interacțiune: PC-r \leftrightarrow PEG, PC-r \leftrightarrow apă, PC-r \leftrightarrow fosfolipide și PEG \leftrightarrow fosfolipide, rezultate prezentate în figura 3.

Se observă în cazul interacțiunii PC-r de test cu suprafețele stabilizate steric că primul fenomen care se manifestă în timpul adsorbției este cel de pierdere a unei părți din apa de hidratare a proteinei opsonizante. Concomitent, locul apei de hidratare este preluat de interacțiile cu polietilenglicolul. Acest fenomen este evidențiat în graficul energiilor prin scăderea (în valoare absolută) a energiei de interacțiune PC-r \leftrightarrow apă și creșterea energiei de interacțiune CP-r \leftrightarrow PEG.

Interacțiunea directă dintre proteină și fosfolipidele bistratului lipidic începe la distanțe mici față de suprafața acestuia din urmă, iar energiile van der Waals asociate acestor interacții au valori mult reduse față de cele corespunzătoare interacțiunilor proteină-solvent și respectiv proteină-polietilenglicol.

Totodată se observă că variația de energie asociată interacției CP-r \leftrightarrow fosfolipide este mai mică decât cea corespunzătoare interacției PEG \leftrightarrow fosfolipide, ceea ce ne conduce la concluzia că doar anumite porțiuni ale proteinei opsonizante ajung în contact direct cu fosfolipidele lipozomale, între ele fiind interpus un strat subțire de PEG.

Rezultatele obținute asupra forțelor de repulsie

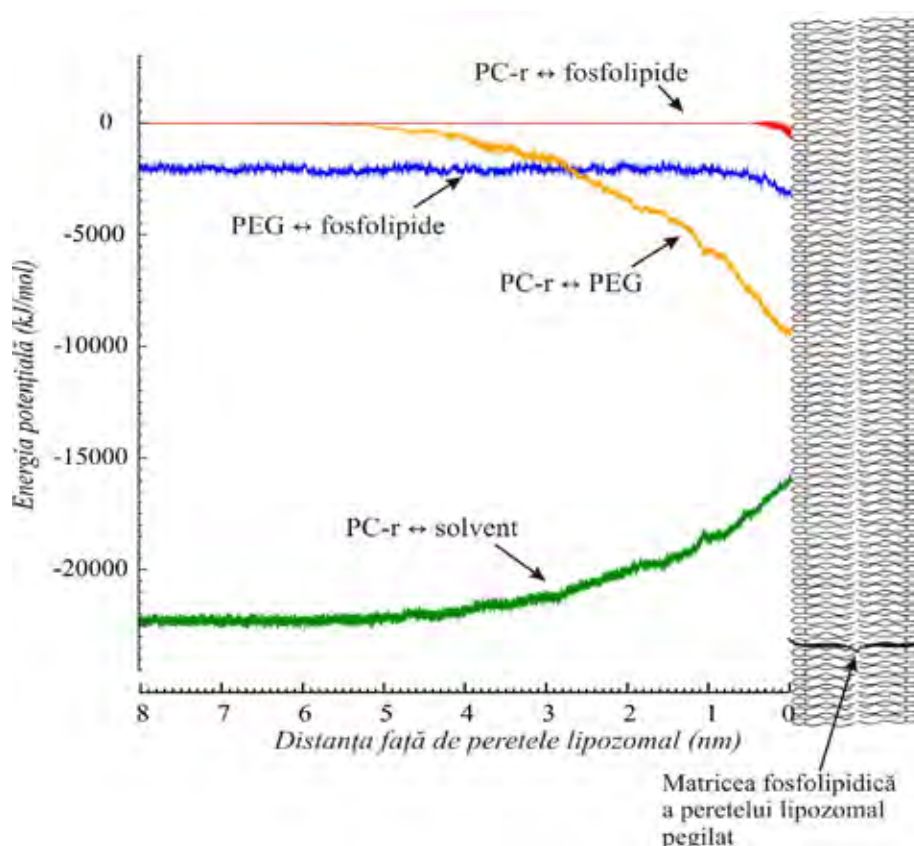


Figura 3 Reprezentarea grafică a variației energiei potențiale de interacțiune a Proteinei C-reactive (PC-r) cu peretele lipozomal, descompusă pe componente, obținută în urma simulării adsorbției acesteia pe suprafața lipozomilor stabilizați steric (LSS(C)).

exercitate de stratul de grefaj polimeric asupra proteinei opsonizante, în timpul adsorbției acesteia, sunt prezentate în figura 4.

pentru distanțe sub 2nm. Rezultă de aici faptul că lipozomii caracterizați de straturi de grefaj având lanțuri polimerice scurte, permit, în ciuda densității

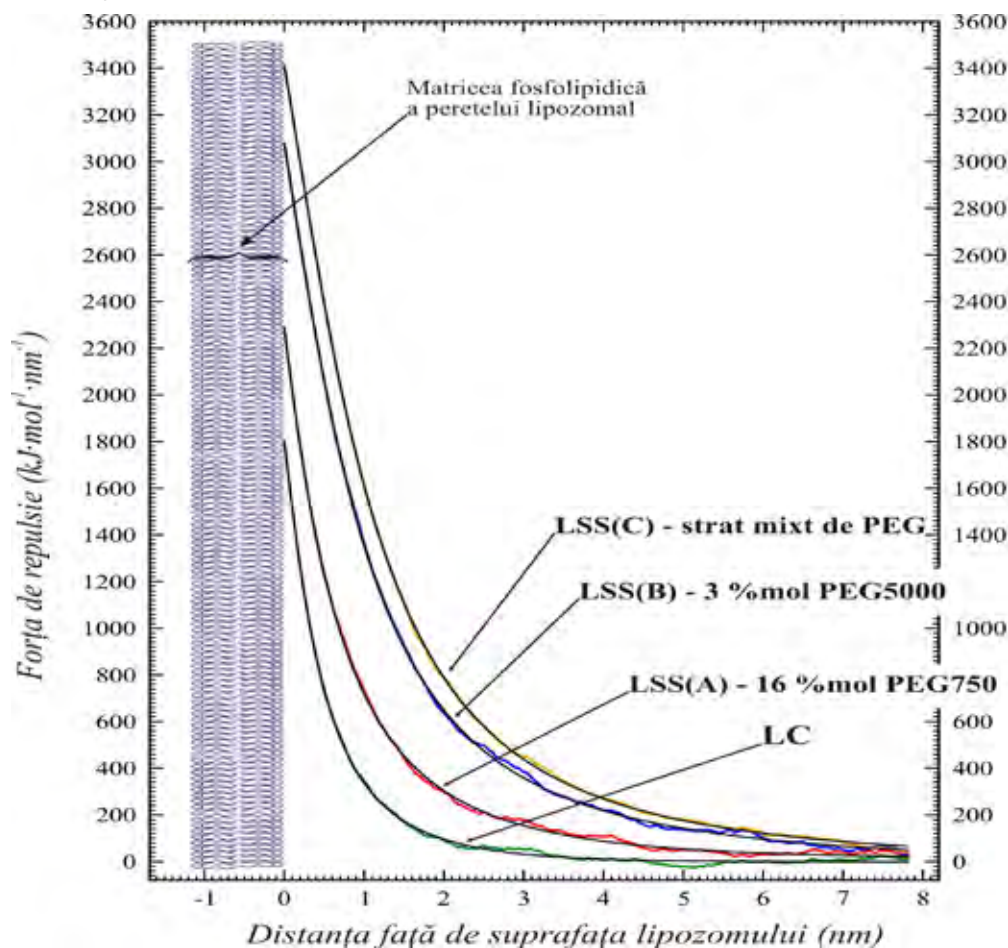


Figura 4 Reprezentarea grafică a profilelor forței de repulsie sterice pentru tipurile de lipozomi analizate. Forțele mai intense conferă lipozomului respectiv o capacitate mai mare de rezistență în fața fenomenului opsonizării.

Un prim fapt care merită remarcat este acela că metoda de simulare aplicată se dovedește a fi destul de sensibilă în decelarea diferențelor privind efectul protectiv sterice ce caracterizează diferite varietăți de lipozomi.

Diagrama din figura 4 trebuie privită sub aspect „relativ” și anume acela că ea ne furnizează informații asupra capacității relative a diferitelor clase de straturi polimerice de excludere a proteinelor opsonizante de la suprafața lipozomilor și nu valori absolute ale acestui fenomen (cum ar fi de exemplu cantitatea de proteine în valoare absolută ce se poate adsorbi la suprafața unei anumite varietăți de lipozomi).

Analizând figura 4 se observă creșterea puternică a forței de repulsie sterice la distanțe sub 5nm de suprafața lipozomală, fapt valabil numai pentru variantele lipozomale LSS(B) și LSS(C), în timp ce pentru LSS(A) și LC forțe respingere mari se obțin

mari de acoperire, apropierea proteinelor opsonizante suficient de mult pentru ca ele să ajungă frecvent în contact direct cu bistratul fosfolipidic, producând o opsonizare îndeajuns de extinsă pentru a declanșa o îndepărtare rapidă din circulație.

În schimb, în cazul lipozomilor de tip LLS(B) și în special a celor de tip LSS(C) forțele mari de repulsie sterice, manifestate încă de la distanța de 5nm față de suprafața lipozomilor, pot să asigure o excludere mai eficientă a eventualelor proteine ce tind să se adsorbă pe lipozomi, puține dintre acestea ajungând să intre în interacțiune directă cu bistratul fosfolipidic al peretelui lipozomal.

Se poate astfel stabili o legătură semicantitativă cu caracter predictiv între profilele forțelor de respingere sterice înregistrate prin metoda descrisă în lucrarea de față și timpul de circulație *in vivo* a lipozomilor stabiliți sterice, cu caracteristici diverse de acoperire. Astfel de predicții, realizate

prin metodele de simulare descrise mai sus, trebuie verificate prin compararea cu rezultate obținute din măsurători farmacocinetice și farmacodinamice în experimente pe animal în care să se utilizeze tipurile de lipozomi supuse modelării.

Concluzii

În lucrarea de față au fost analizate comparativ trei varietăți de lipozomi stabilizați steric transportori de substanțe active în vederea evaluării prin modelare moleculară a capacității acestora de a rezista fenomenului opsonizării, element central în cascada răspunsului imun al organismului la introducerea de materiale artificiale în mediul intern. Cele trei categorii de lipozomi diferă prin densitățile de acoperire și prin lungimea lanțurilor polimerului (PEG) utilizat în acest scop.

Rezultatele demonstrează că lipozomii cu densități mici de acoperire dar caracterizați de lungimi mari ale lanțurilor polimerice de grefaj prezintă avantaje față de cei cu densități mari de acoperire dar având polimeri de masă moleculară mică. Cea mai eficientă s-a dovedit a fi o clasă de lipozomi în care s-a utilizat o acoperire mixtă, populația de polietilenglicol fiind heterogenă conținând subpopulații de lanțuri polimerice caracterizate de diferite mase moleculare și densități de acoperire.

Metoda de modelare propusă s-a dovedit a fi suficient de sensibilă pentru decelarea diferențelor între tipurile de lipozomi studiate, ceea ce face din această cercetare un prim pas în stabilirea de metodologii alternative de analiză a proprietăților fizico-chimice a Sistemelor Terapeutice lipozomale în interrelație cu proprietățile farmacologice ale acestora.

Bibliografie

1. **Berendsen H J C, van der Spoel D, van Drunen R** – GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation, *Comp. Phys. Comm.*, 1995; 91:43 – 56
2. **DeLano WL (2005)** - The Case for Open-Source Software in Drug Discovery, *Drug Discovery Today*, 2005; 10, 213-217
3. **Leach A R** – *Molecular Modelling: Principles and Applications*, Pearson Education Limited England, 2001
4. **Marrink S J, de Vries A H, Mark A E** – Coarse grained model for semiquantitative lipid simulation, *J. Phys. Chem B*, 2004; 108:750-760
5. **Neamțu A, Mungiu OC** – Molecular Modelling of the Sterically Stabilized Liposomes – Serum Opsonin Interactions: I. Model Validation, *Therapeutics: Pharm. Clin. Toxicol.*, 2006; 2:55-60
6. **Teraoka I** – *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*, Wiley Interscience, New York, 2002
7. **van der Spoel D. et al** – *Gromacs User Manual ver. 3.3*, Groningen, 2006