



ЮГОЗАПАДЕН УНИВЕРСИТЕТ
“НЕОФИТ РИЛСКИ” - БЛАГОЕВГРАД
ПРИРОДО-МАТЕМАТИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА “ИНФОРМАТИКА”

Фатима Исмаил Сапунджи

**МАТЕМАТИЧЕСКИ И КОМПЮТЪРНИ МОДЕЛИ
В ЛИГАНД-ТАРГЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИЯ

*за присъждане на образователна и научна степен „доктор” в
област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика.*

Професионално направление 4.6. Информатика и компютърни науки.

Докторска програма “Информатика”

Научни ръководители: проф. д-р Петър Миланов
проф. д-р Невена Пенчева

Благоевград, 2015 г.

Настоящият дисертационен труд съдържа използвани съкращения, въведение, три глави, изводи, цитирана литература и приложения. Общият му обем е 211 страници: от които 14 страници приложения и 20 страници използвана литература. Включени са 54 фигури и 35 таблици. Цитираната литература обхваща 339 заглавия, от които 5 на кирилица и 334 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден на 25.08.2015 г. на заседание на катедрен съвет на катедра „Информатика” към Природо-математически факултет при Югозападен университет „Неофит Рилски” - Благоевград.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 12.10.2015 г. от 11:00 часа в зала 412 на Югозападен университет „Неофит Рилски”- Благоевград, пред научно жури в състав:

Научно жури:

академик Петър Кендеров – външен член
проф. д-р Никола Янев – външен член
проф. д-р Емилия Найденова - външен член
проф. д-р Петър Миланов – вътрешен член
доц. д-р Стоян Везенков – вътрешен член

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в кабинет № 1426 в Учебен корпус-1 към Югозападен Университет „Неофит Рилски” – Благоевград.

Автор: **Фатима Исмаил Сапунджи**

Тема: **МАТЕМАТИЧЕСКИ И КОМПЮТЪРНИ МОДЕЛИ
В ЛИГАНД-ТАРГЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

СЪДЪРЖАНИЕ

	<i>стр.</i>
ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	04
1. Актуалност и мотивировка на темата	04
2. Цели и задачи на дисертацията	06
3. Научна новост	07
4. Аprobация	07
5. Публикации	08
СЪДЪРЖАНИЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	08
ГЛАВА I: ПРОБЛЕМИ И ОБОСНОВКА НА БИОИНФОРМАТИЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ЛИГАНД-ТАРГЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ.....	08
ВТОРА ГЛАВА: МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ	11
ТРЕТА ГЛАВА: РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	17
ИЗВОДИ	37
АВТОРСКА СПРАВКА	38
БИБЛИОГРАФИЯ	42

ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Актуалност и мотивировка на темата

Изследванията в областта на биоинформатиката стават все по актуални. Днес компютърните методи за предсказване на биологична активност, за дизайн на нови биологично активни съединения и за моделиране на структурите на различни молекули са широко използвани в научните изследвания. Чрез тях се постига по-голяма ефективност на финансовите разходи, съкращаване на времето за обработка на тежки оптимизационни задачи и откриване на алтернативи за многобройните тестове с животни.

Математическото и компютърното моделиране са от ключово значение за биоинформатичните изследвания, защото биоинформатиката е прилагането на компютърни технологии за съхранение, организиране и анализиране на биологични данни. Чрез компютърното моделиране се постига интегриране на тези данни под формата на математически обекти и виртуални изображения, което позволява изучаване и моделиране на процесите в биологичните системи, а това допринася за развитието на молекулярната биология. По тази проблематика в България работят различни групи като: Центъра за съвременни биоинформатични изследвания към ЮЗУ „Неофит Рилски”, ИМИ - БАН, Секция „Молекулен дизайн и биохимична фармакология“ - ИМБ-БАН, Секция „QSAR и молекулно моделиране“ към ИББИ - БАН, МУ-София, СУ „Климент Охридски”, ПУ „Паисий Хилендарски” и други. Големи фармацевтични компании и университетски центрове създават нови лекарствени средства с помощта на компютърни методи и модели. Такива центрове са Cambridge Crystallographic Data Centre, CLC bio - водещи разработчици на биоинформатичен софтуер, Център по Биоинформатика в Кьолн, Германия; Катедра по Биотехнологии в Университета в Сиена, Италия; Колеж за наука и технологии във Филаделфия, САЩ; Институт за геномика и биоинформатика в Грац, Австрия; Центъра по Биоинформатика в Университета в Рен 1, Франция и други.

През последните години са публикувани повече от 35 хиляди статии свързани с тази тематика. Съществуват повече от 100 научни списания в тази област. Водещи университети като Харвардски и Оксфордски университет имат специализирани издания по биоинформатика. Актуалността на тези научни изследвания е описана в доклада на Европейския институт за биоинформатични изследвания (Annual Scientific Report 2014, EMBL: <http://www.embl.de>).

Предсказването на свързването на малки молекули (лиганди) с таргетни макромолекули (рецептори) е от особено практическо

значение, тъй като се използва за създаване на виртуални библиотеки за подобни молекули, които компютърно-подпомогнатият лекарствен дизайн може да използва при откриването на лекарства [1]. Той може да се комбинира успешно с експерименталните методи, като дава възможност сложни и скъпи експерименти да се опростяват или да се моделират, и по този начин ние получаваме ценна информация за случващото се в организмите под действие на определени вещества.

Изследванията в настоящия дисертационен труд се базират на QSAR (количествени зависимости структура-активност) и подходи на компютърното и математическото моделиране с цел да се намери връзка между структурата на мю- и делта-опиоидни лиганди [2-6] за мю- и делта-опиоидни рецептори и проявявания от тях биологичен ефект. Опиоидните рецептори са много важен клас рецептори, които привличат вниманието на голям брой учени. Разработване на ефективни и селективни лиганди за всеки опиоиден рецептор е продължителен процес, който включва знания и умения на различни изследователи. Изолирането и кристализирането на тези рецептори е трудна задача, поради тяхното местоположение, защото те са трансмембранны протеини и изолирането им причинява разрушаване на тяхната 3D структурата, като за решаването на този проблем се търсят различни подходи.

На базата на математически модел за фармакологичен агонизъм са изведени експлицитни формули за пресмятане на основните параметри на агонизма. Стойностите на параметрите от биологичните изследвания и резултатите от молекулен докинг проведен с мю- и делта- опиоидни лиганди и мю- и делта-опиоидни рецептори са използвани за намиране на връзка структура-биологична активност за тези съединения [2-6].

Ползата от проведеното компютърно моделиране, в сравнение с дългогодишните изследвания на изолирани тъкани (*in vitro* тестове), е факта, че получаването на данни за структура-активност зависимости на молекулно ниво не изискват средства и човешки ресурс за скъпи и трудоемки органични синтези на големи серии от съединения или скъпи и продължителни фармакологични и физиологични експерименти с изолирани препарати от животни.

Докинг процедурата може да помогне да се обяснят *in vitro* резултатите и успешно да се използва в *in silico* (компютризиран) дизайн на нови потентни вещества за мю-и делта-опиоидни рецептори, като се спестяват много средства, време и най-вече експериментите с животни.

2. Цели и задачи на дисертацията

Цели:

(1) Да се разработи математически модел на фармакологичен агонизъм, обобщаващ Теоретичния Хиперболичен Модел, посредством включване на механизма на del Castillo–Katz. Да се разгледа формирането на лиганд-рецепторен комплекс като Марковски процес с краен брой състояния и непрекъснато време;

(2) Да се приложи компютърно моделиране и молекулен докинг с делта- и мю-опиоидни лиганди с известни *in vitro* ефекти с делта- и мю-опиоидни рецептори;

(3) Да се потърси връзката между структурата на лиганда, структурата на рецептора и биологичния ефект.

Задачи:

(1) Да се изгради аксиоматиката на математическия модел за фармакологичен агонизъм с включване на механизма на Castillo–Katz.

(2) Да се изведат формули за основните параметри на лиганд-рецепторните взаимодействия, като следствия от аксиоматиката на модела и фармакологичната интерпретация на параметрите.

(3) Да се изведат експлицитни формули за основните параметри на действието на агониста афинитет и ефикасност.

(4) Да се построи Марковски процес с краен брой състояния и непрекъснато време, моделиращ лиганд-рецепторните взаимодействия.

(5) Да се изгради модел на делта-опиоиден рецептор чрез подхода за хомоложно моделиране на протеини, който да се използва за молекулен докинг с делта опиоидни енкефалинови аналози.

(6) Да се проведе докинг с мю-опиоиден рецептор и мю-опиоидни аналози, както и да се намери връзка между структурата и активността на лигандите, за да се разработи надежден подход за дизайн на нови активни и селективни съединения спрямо мю-опиоиден рецептор.

(7) Да се проведе докинг с делта-опиоиден рецептор и делта-опиоидни лиганди, както и да се намери връзка между структурата и активността на лигандите, за да се разработи надежден подход за дизайн на нови потентни и селективни съединения спрямо делта-опиоиден рецептор.

(8) Да се намери подходяща скоринг функция, описваща най-добре лиганд-рецепторните взаимодействия на изследваните обекти. Данните от *in vitro* тестовете и резултатите от докинга да се използват

за търсене на корелационна зависимост между биологичната активност и структурата на съединенията.

(9) Да се моделира зависимостта между резултатите от докинга проведен с делта-селективните енкефалинови аналози и моделите на делта-опиоиден рецептор, тоталната енергия, изчислена за формираните при докинга лиганд-рецепторни комплекси и биологичната активност на изследваните съединения.

3. Научна новост

Показано е, че на основата на механизма на Кастило-Катц за лиганд-рецепторното взаимодействие, може да се изгради вариант на Теоретичния Хиперболичен Модел за частичен агонизъм и да се изведат експлицитни формули за афинитета и ефикасността, посредством параметри, имащи ясна фармакологична интерпретация.

Построен е хомоложен модел на делта-опиоиден рецептор, като неговата приложимост е апробирана посредством молекулен докинг с делта-опиоидни енкефалинови аналози.

С компютърно моделиране и молекулен докинг на мю- и делта-опиоидни рецептори с мю- и делта- опиоидни лиганди са потвърдени техни свойства, получени в *in vitro* експерименти. Това е надежден подход за дизайн на нови активни и селективни съединения за мю- и делта- опиоидни рецептори.

Показано е как резултатите от докинга с делта-селективни енкефалинови аналози и модели на делта- опиоиден рецептор, тоталната енергия, изчислена за формираните лиганд-рецепторни комплекси, *in vitro* експерименталните данни за тези лиганди и теоретичния хиперболичен модел, позволяват да се изразят параметрите на биологичната активност като функции на тоталната енергия на комплексите и скоринг функциите от докинга. Това е един начин за определяне на QSAR.

4. Апробация

Резултатите от дисертационния труд са обсъждани и докладвани на следните научни прояви:

- 9th Annual Meeting of the Bioinformatics Italian Society, 2012, Catania, Italy;
- 32nd European Peptide Symposium, 2012, Athens, Greece;
- 5th International Conference – FMNS 2013, Blagoevgrad, Bulgaria;
- ИМИ-БАН, Секция „Изследване на операциите”, 2014, София;

- 33rd European Peptide Symposium, 2014, Sofia, Bulgaria;
- International Conference on BIOMATH 2014, Sofia, Bulgaria;
- International Conference “Enhancement of the competitiveness and restructuring of the food subsectors through benchmarking”, 2014, Blagoevgrad, Bulgaria;
- International Conference on BIOMATH 2015, Blagoevgrad, Bulgaria;
- 6th International Conference – FMNS 2015, Blagoevgrad, Bulgaria.

5. Публикации

Получените резултати са публикувани в 3 статии в списания, 4 в сборници с доклади в пълен текст (2 самостоятелни) от международни конференции, и 5 в сборници с абстракти от международни конференции. 1 статия е подготвена за публикуване (Submitted). Всички публикации са на английски език.

СЪДЪРЖАНИЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

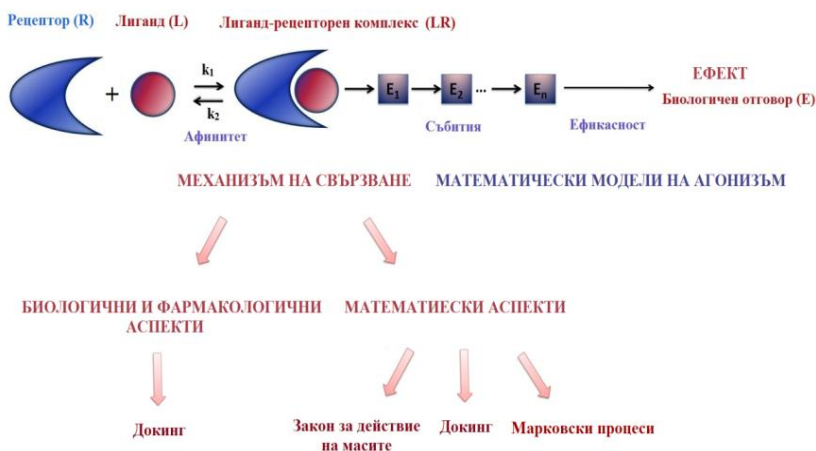
Настоящият дисертационен труд съдържа използвани съкращения, въведение, три глави, изводи, цитирана литература и приложения. Общият му обем е 211 страници: от които 14 страници приложения и 20 страници използвана литература. Включени са 54 фигури и 35 таблици. Цитираната литература обхваща 339 заглавия, от които 5 на кирилица и 334 на латиница.

ГЛАВА I: ПРОБЛЕМИ И ОБОСНОВКА НА БИОИНФОРМАТИЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ЛИГАНД-ТАРГЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

В първа глава на настоящата дисертация са представени проблемите и обосновката на биоинформатичните изследвания - основните биологични и фармакологични аспекти, приложимостта и ролята на математическото и на компютърното моделиране при лиганд-рецепторните взаимодействия. Формулирани са целите и задачите на дисертацията.

Изследванията в дисертацията се базират на количествени зависимости структура-активност (QSAR) и подходи на компютърното и математическото моделиране за установяване на връзка между структурата на химични съединения и проявявания от тях биологичен ефект. Чрез моделиране на лиганд-рецепторните взаимодействия се анализират зависимостите между виртуални данни на аналози на ендогенни опиоидни пептиди и експериментални данни за активността

на същите в експерименти на изолирани тъкани. Експерименталните данни са от изследвания на мю- и делта- опиоидни лиганди за мю- и делта- опиоидни рецептори [2-6]. Изследваните лиганди осъществяват своите действия и ефекти чрез взаимодействие с рецептори, наречени таргетни места. На Фигура 1.1 е представена схема на лиганд-рецепторното взаимодействие, която дава информация за механизма на свързване, биологичния ефект и свързаните с тях биологични, фармакологични и математически аспекти.



Фигура 1.1: Механизми на свързване на лиганд и рецептор.

Биологичните и фармакологичните аспекти на механизма на свързване са разгледани в Раздел 1.1. Математическите аспекти, описващи механизма на свързване на лиганда и рецептора са представени в Раздел 1.2. Те са свързани с прилагане на Закона за действие на масите (ЗДМ), Докинг задачата и Марковските процеси. Представени са математически модели на фармакологичен агонизъм, чрез които се описва ефекта от лиганд-рецепторното взаимодействие - биологичния отговор. На основата на такъв математически модел са изведени експлицитни формули за пресмятане на основните параметри на фармакологичен агонизъм: афинитет и ефикасност, имащи ясна фармакологична интерпретация. Данните от тези параметри и резултатите от молекулярния докинг, проведен с мю- и делта- опиоидни лиганди и мю- и делта-опиоидни рецептори са използвани за търсене на корелационна зависимост между биологичната активност и структурата на съединенията [2-6]. В Разделите 1.1 и 1.2 са въведени

всички необходими понятия и факти, а така също е направен необходимия литературен обзор.

1.1. Биологични и фармакологични аспекти на изследванията

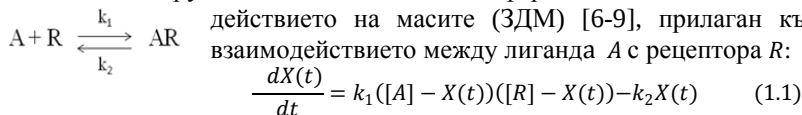
Рецептор - протеинова молекула, разположена едновременно в цитоплазмата и/или включена предимно в клетъчната мембрана, като дава възможност за получаване на сигнали отвън. Когато определени вещества се свързват с рецептора, това предизвиква т. нар. клетъчен или тъканен отговор. Молекулата, която се свързва с рецептора, се нарича *лиганд* и може да бъде пептид или друга малка молекула, например лекарство. Съществуват общоприети термини за описание на свойствата на лиганда като: *афинитет* - количествена мярка за определяне на силата на лиганд-рецепторното взаимодействие и *ефикасност* - свойство, при което една молекула има способността да активира даден рецептор и да се инициират поредица от процеси, които да доведат до отговор и съответен ефект. Лигандите, се разделят на *агонисти* - притежават афинитет за свързване към даден рецептор и при свързване предизвикват фармакологичен ефект и *антагонисти* - имат афинитет за свързване с даден рецептор, но нямат собствен ефект.

Обектите, които представляват интерес на изследване в настоящата дисертация са *опиоидните рецептори* (ОР). Класическите опиоидни рецептори са μ -мю, δ -делта и κ -капа опиоидни рецептори, съответно MOR, DOR и KOR. Веществата със специфична структура, които с по-голям афинитет се свързват с рецепторите се наричат *селективни лиганди*. Те са важна предпоставка за изучаване на механизмите на разпознаването, както и за свързаните с него физиологични, биохимични, фармакологични и други аспекти на рецепторните взаимодействия.

1.2. Математически и компютърни аспекти в лиганд-таргет взаимодействията

Класическа схема на свързване на лиганда A с рецептора R.

Основен инструмент в количествената фармакология е Закон за действието на масите (ЗДМ) [6-9], прилаган към взаимодействието между лиганда A с рецептора R:



където k_1 е скоростна константа на асоциация, k_2 -скоростна константа на дисоциация, $X(t)$ е концентрацията на AR комплексите. От 1.1 за равновесното състояние следва, че

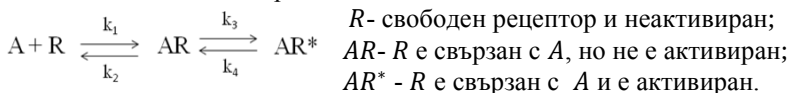
$$([A] - X(A))([R] - X([A])) = k_2X([A]) \quad (1.2)$$

От 1.2 и $X \ll [A]$ следва

$$X(A) = \frac{[A][R]}{[A] + K_A} \quad (1.3)$$

където $K_A = k_2/k_1$ се нарича *равновесна дисоциационна константа*.

Кастило-Катц механизъм. Оригиналната формулировка на модела за двете състояния на рецептора е представена от del Castillo & Katz [10] и е известна като механизъм на Кастило-Катц. Рецепторът в схемата може да се намира в следните състояния:



Механизмът на del Castillo–Katz се състои от два етапа: на първия етап AR комплекса се определя посредством равновесната константа на свързване $K_A = k_2/k_1$, където k_1 -скоростна константа на асоциация, k_2 -скоростна константа на дисоциация, на втория етап AR^* комплекса се определя посредством равновесната константа на изомеризация $E = k_3/k_4$, където k_3 -скоростна константа за преминаване от AR в AR^* , а k_4 -скоростната константа за преминаване от AR^* в AR . Частта от рецепторите, които са заети зависи и от двете равновесни константи K_A и E . Прилагайки ЗДМ за равновесното състояние на системата при концентрация на агониста $[A]$, заетите рецептори се изразяват чрез 1.4, а активираните чрез 1.5:

$$[AR] + [AR^*] = \frac{(1 + E)[A]}{K_A + (1 + E)[A]} \quad (1.4)$$

$$[AR^*] = \frac{E[A]}{K_A + (1 + E)[A]} \quad (1.5)$$

ВТОРА ГЛАВА: МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ

В Глава 2 се съдържа описание на методичните подходи, използвани за решаването на поставените задачи. Представена е методологията на изследванията, математическото и компютърното моделиране на лиганд-таргет взаимодействията, и статистическата обработка на експерименталните резултати.

2.1. *In vitro* експериментални данни за компютърно моделиране на лиганди

В този раздел са разгледани мю- и делта- опиоидни лиганди, които представляват интерес на изследване в дисертацията. Гладкомускулни препарати, изолирани от различни отдели на храносмилателния тракт и препарати от изолиран *vas deferens* от различни биологични видове,

са удобни моделни системи за *in vitro* изследване на потентност, ефективност и селективност на ендогенни и новосинтезирани лиганди. За експериментите, проведени с делта-опиоиден рецептор са използвани 11 делта-селективни енкефалинови аналози, изследвани върху *vas deferens* на мишка от Pencheva et al. [2-6]. Лигандите са изследвани по отношение на тяхната потентност, селективност и ефикасност спрямо делта-опиоидния рецептор, като те са синтезирани и *in vitro* тествани - Таблица 1.1:

Таблица 1.1. Делта селективни енкефалинови аналози.

Лиганди	IC ₅₀ (nM)	K _A (nM)	E _{rel}
DPDPE	6.18±1.17	180±35	30.2±10
[Leu ⁵]-enk	11.45±2.06	54.9±13.1	5.8±1.0
[Met ⁵]-enk	18.91±2.15	48.4±7.5	3.6±0.3
[Cys(Bzl) ² , Leu ⁵]-enk	8.30±1.40	68.5±29.7	9.3±3.2
[Cys(Bzl) ² , Met ⁵]-enk	9.53±1.20	23.8±3.0	3.5±0.3
[Cys(O ₂ NH ₂) ² , Leu ⁵]-enk	1.29±0.31	36.4±16.4	29.2±9.5
[Cys(O ₂ NH ₂) ² , Met ⁵]-enk	2.22±0.45	14.1±5.4	7.3±2.0
[DCys(O ₂ NH ₂) ² , Leu ⁵]-enk	11.40±2.01	73.4±12.7	7.4±1.9
[DCys(O ₂ NH ₂) ² , Met ⁵]-enk	75.96±11.67	463±161	7.1±1.8
[HCys(O ₂ NH ₂) ² , Leu ⁵]-enk	31.92±5.10	76.4±7.1	3.4±0.2
[HCys(O ₂ NH ₂) ² , Met ⁵]-enk	16.09±1.90	55.7±6.1	4.5±0.3

За експериментите, проведени с мю-опиоиден рецептор са използвани 13 аналози на опиоидни пептиди, изследвани върху *ileum* на морско свинче, за да се изследва селективност към мю-опиоиден рецептор с различни структурни модификации. Лигандите са синтезирани и *in vitro* тествани от Pencheva et al. [3,6] – Таблица 1.2.

Таблица 1.2: Инхибиторен ефект (IC₅₀ (nM)) на мю-опиоидни лиганди.

Лиганди	IC ₅₀ (nM)
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	3960±740
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	1378±245
[D-Ala ² ,Leu ⁵]-enkephalyl-Arg	12.3±1.7
[D-Ala ² ,Leu ⁵]-enkephalyl-Arg-NH ₂	5.8±0.7
[D-Ala ² ,Leu ⁵]-enkephalyl-Arg-NHC ₂ H ₅	6.0±0.7
[D-Ala ² ,N-Me-L-Phe ⁴ ,Gly-ol ⁵]-enkephalin	5.8±0.4
[D-Ala ² , D-Phe ⁴ , Leu ⁵]-enkephalyl-Arg-NH ₂	5300±408
[L-Ala ² , Leu ⁵]-enkephalyl-Arg	234±46
[Leu ⁵]-enkephalin	65.3±8.2
[D-Ala ² , Met ⁵]-enkephalyl-Arg	11.9±1.7
[Met ⁵]-enkephalin	28.6±8.4
[D-Ala ² , N-Me-D-Phe ⁴ , Leu ⁵]-enkephalyl-Arg-H ₂	3350±850
[D-Ala ² , N-Me-L-Phe ⁴ , Leu ⁵]-enkephalyl-Arg-NH ₂	0.57±0.08

2.1. Биологични бази от данни

В този раздел са разгледани биологичните бази от данни (ББД), от които са взети структурите на мю-опиоиден рецептор (МОР) и делта-опиоиден рецептор (ДОР). За целите на компютърното моделиране на ДОР е използвана аминокиселинната последователност на човешкия ДОР от БД Uniprot (номер P41143) [11], теоретичен модел на ДОР (ePDBid:1o2c), модел на ДОР с кристална структура (PDBid:4ej4) от БД PDB [12]. За компютърното моделиране на МОР е използвана кристалната структура на МОР (PDBid:4dkl) от PDB [12].

2.3. Хомоложно моделиране

Хомоложното моделиране (ХМ) е изчислителна техника, при която се използва структурата на протеини с близка аминокиселинна последователност и сходна функция, за да се моделират протеини с неизвестна триизмерна структура [13]. В настоящата дисертация ХМ е приложено за изграждане на модел на човешки ДОР (Uniprot P41143), чрез два различни софтуера: Molecular Operating Environmen [14] и UCSF Chimera [15]. За осъществяване на стъпките от ХМ на ДОР са използвани програмите BLAST/ FASTA [16], ClustalW [17], GeneDoc [18], MolProbity [19], Procheck [10], SwissModel [11], Modeller [15] и други, които са описани в Глава 2 на дисертацията.

2.4. Молекулен докинг

Докингът се използва, за да се намери най-подходящата ориентация на две молекули, най-подходящата конформация на всяка молекула в образувания комплекс и да се оцени стабилността на формирания лиганд-рецепторен комплекс. Докингът е извършен в софтуера GOLD 5.2 [27] и се оценява чрез скоринг функциите, вградени в програмата: GoldScore, ChemScore, ASP и ChemPLP. Използван е за разпознаване на активните конформации на мю- и делта- опиоидни лиганди, с които те се свързват към съответните рецептори. За изграждане на 3D структурите на лигандите се използват софтуерите Avogadro [23] и Chimera [15]. За сравняване на сходството между структурите на изследваните модели на ДОР е използван критерия RMSD [24]. При докинг процедурата се избират рецептора и съответните лиганди за свързване. За рецептора се избира мястото на свързване: за ДОР се определя като остатък в рамките на радиус от 10Å от Asp128 [25], а за МОР - като остатък в рамките на радиус от 10Å от Asp147 [26]. Стабилността на лиганд-рецепторните комплекси и тоталната им енергия се изчислява в Molegro Molecular Viewer [28].

2.5. Статистически подходи

В този раздел статистическите подходи са използвани при решаването на някои от поставените задачи и за оценка на достоверността на получените резултати:

1) *корелационен анализ* – приложен е за определяне на зависимостта между структурата на съединенията и биологичната им активност, чрез софтуера GraphPad Prism [29], като е използван корелационен коефициент на Пирсън (Pearson correlation coefficient, R).

2) *нелинейна регресия* – приложена е за представянето на афинитета, потентността и ефикасността на агонисти като функции от стойностите на скоринг функциите от GOLD 5.2 [27] и стойностите на минималната енергия за получените лиганд-рецепторните комплекси.

Функциите на нелинейна регресия са от вида

$$z = f(x, y) = \sum_{0 \leq i+j \leq k} a_{ij} x^i y^j \quad (1.6)$$

т.е. полиноми на две променливи от степен $\leq 2k$. Приложен е метода на най-малките квадрати - решена е следната оптимизационна задача:

$$\underset{(a_{00}, \dots, a_{0k})}{\text{minimize}} F(a_{00}, \dots, a_{0k}) = \sum_{s=1}^t \left(z_s - \sum_{0 \leq i+j \leq k} a_{ij} x_s^i y_s^j \right)^2 \quad (1.7)$$

по отношение на параметрите a_{ij} , където $0 \leq i \leq k, 0 \leq j \leq k$, а t е броя на получените лиганд-рецепторни комплекси при докинга. Стойностите $(z_1, z_2, \dots, z_t)$ на зависимата променлива z представляват стойности на *in vitro* параметрите. Стойностите $(x_1, x_2, \dots, x_t)$ на независимата променлива x представляват стойностите на скоринг функциите от GOLD 5.2. Стойностите $(y_1, y_2, \dots, y_t)$ на независимата променлива y представляват резултатите от изчислената totalната енергия за получените лиганд-рецепторни комплекси. С k е означена степента на полинома, $0 \leq i + j \leq k$. За намиране на връзката между експерименталните данни е използван инструментът *Curve Fitting Toolbox* от софтуерния пакет Matlab [30]. За статистическото оценяване на фитването на експерименталните данни в софтуера се използват следните стандартни обозначения и оценки:

- SSE (Sum of Squares Errors) е сума от квадратите на грешките:

$$SSE = \sum_{i=1}^n \omega_i (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (1.8)$$

където y_i е измерената стойност на данните, $\hat{y}_i$ е предсказаната чрез модела стойност, n - брой на експериментите, ω_i е относително тегло на всяка точка от данните, обикновено $\omega_i = 1$. Колкото SSE е по-близко по стойност до 0, толкова моделът е по-точен

- R^2 - коефициент на множествена детерминация; дефинира се като отношението между сумата от квадратите на регресията SSR (Sum of Squares Regress) и общата сума от квадратите SST (Sum of Squares Total). Ако стойността на R^2 е близка до 1, то в модела се отчита по-голяма част от вариацията. Използват се следните уравнения:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (1.9)$$

$$SSR = \sum_{i=1}^n \omega_i (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2, \quad SST = \sum_{i=1}^n \omega_i (y_i - \bar{y}_i)^2$$

- *Adjusted R^2* (коригиран R^2) е показател за оценяване на фитването, при сравняване на два модела. Стойности по-близки до 1 показват, че фитването на данните е добро и резултата е използваем.

$$adjusted R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (1.10)$$

- *RMSE* (Root Mean Squared Error) е квадратен корен от средната грешка (стандартно отклонение на регресия), ако *MSE* (Mean Squared Error) е по-близка по стойност до 0, то моделът е по-подходящ.

$$RMSE = s = \sqrt{MSE} \quad (1.11)$$

- критерии *AIC* (Akaike's information criteria) и *BIC* (Bayesian information criteria) [31-33] са приложени в дисертацията за избор на модел от полиноми от различна степен, като е използван инструментът "Comparing Models" [34] с цел да бъде определен моделът, който най-добре описва експерименталните данни.

3) Приложена е нелинейна регресия за пресмятане на коефициентите на хиперболата, приближаваща по метода на най-малките квадрати експерименталните данни на доза-отговор зависимости при *in vitro* експерименти с различни агонисти и тъкани. Тези коефициенти се използват в експлицитното пресмятане на *in vitro* параметрите (ефикасност, афинитет и потентност), изведени в ОТХМ, предложен в Раздел 3.1.1 на дисертацията.

2.6. Аксиоматичен подход за изработване на вариант на ТХМ за фармакологичен агонизъм с включен механизъм на del Castillo–Katz

В този раздел е разгледан аксиоматичния подход за изграждане на математически модели за фармакологичен агонизъм. ТХМ на Milanov & Pencheva [35,36], а също така и операционния модел на Black & Leff [37] са изградени по подобен начин. На основата на този подход в дисертацията е предложен вариант на ТХМ, като най-същественото в него е замяната на класическия механизъм на свързване с механизма на del Castillo–Katz [10]. Концентрацията на всички рецептори $[R_0]$ се изразява като:

$$[R_0] = [R] + [AR] + [AR^*] \quad (1.12)$$

където $[R]$, $[AR]$ и $[AR^*]$ са съответно концентрациите на незаетите рецептори, заетите рецептори и заетите и активирани рецептори. Прилагайки ЗДМ за равновесното състояние на системата при концентрация на агониста $[A]$ се получават 1.13 и 1.14 за двата етапа:

$$k_1([A] - [AR])([R_0] - [AR] - [AR^*]) = k_2[AR] \quad (1.13)$$

$$k_3[AR] = k_4[AR^*] \quad (1.14)$$

Тъй като $[AR] < [R] \ll [A]$ уравнението за първия етап придобива вида:

$$k_1[A][R] = k_2[AR] \quad (1.15)$$

Ако обозначим с p_R , p_{AR} и p_{AR^*} съответно $[R]/[R_0]$, $[AR]/[R_0]$ и $[AR^*]/[R_0]$ то е в сила следното равенство

$$p_R + p_{AR} + p_{AR^*} = 1 \quad (1.16)$$

Ако приемем, че $K_A = k_2/k_1$ и $E = k_3/k_4$, от горните уравнения следват:

$$[A]p_R = K_A p_{AR} \quad (1.17)$$

$$p_{AR^*} = E p_{AR} \quad (1.18)$$

От 2.18 - 2.20 следва

$$\frac{K_A}{E[A]} p_{AR^*} + \frac{1}{E} p_{AR^*} + p_{AR^*} = 1 \quad (1.19)$$

Ако $K_{eff} = \frac{K_A}{1+E}$, то за броя на заетите рецептори получаваме:

$$p_{AR} + p_{AR^*} = \frac{(1+E)[A]}{K_A + (1+E)[A]} = \frac{[A]}{K_{eff} + [A]} \quad (1.20)$$

и за броя на активираните рецептори получаваме:

$$p_{AR^*} = \frac{E[A]}{K_A + (1+E)[A]} \quad (1.21)$$

Последните равенства са в основата на предложения ОТХМ в Глава 3.

2.7. Лиганд-рецепторните взаимодействия като Марковски процеси с краен брой състояния и непрекъснато време

Случайните процеси на асоциация и дисоциация на лиганда и рецептора може да се разглеждат и като Марковски процес с краен брой състояния и непрекъснато време. Класическият механизъм на свързване на лиганда A към рецептора R може да се представи като система за масово обслужване (СМО) с два канала, при която каналите представляват рецепторите. Системата S е с дискретни състояния: S_0 - рецептора е свободен; S_1 - рецептора е зает; λ - интензивността на потока от молекули; μ - производителност на канала.

ТРЕТА ГЛАВА: РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

В Глава 3 са представени и обсъдени получените резултати от: математическото моделиране на фармакологичен агонизъм; компютърното моделиране на лиганд-таргет взаимодействията – хомоложно моделиране на човешкия ДОР; молекулен докинг с мю- и делта-опиоидни лиганди и мю- и делта-опиоидни рецептори и установяване на връзката структура-биологична активност за изследваните обекти.

3.1.Обобщен теоретичен хиперболичен модел за фармакологичен агонизъм

В този раздел са представени и обсъдени резултатите от обобщения хиперболичен модел, фармакологичната интерпретация на параметрите на модела и лиганд-рецепторните взаимодействия като Марковски процеси с краен брой състояния и непрекъснато време.

3.1.1. Резултати за обобщен теоретичен хиперболичен модел

В този раздел е представен вариант на математически модел за фармакологичен агонизъм, който надгражда и съвместява ТХМ от Milanov & Pencheva [35,36] към механизма на del Castillo–Katz [10]. Този вариант на ТХМ по нататък в дисертацията ще се нарича Обобщен Теоретичен Хиперболичен Модел (ОТХМ). Този модел се базира главно на аксиоматиката на ТХМ приложена към схемата на del Castillo–Katz, модела на Stephenson [15] за концентрация-окупация-стимул-отговор механизма и някои подходи от статиите на Agneter [38], Barlow [39], Black & Leff [37], Colquhoun [40-42], Kenakin [43], Mackay [44], Furchgott [45], Foreman & Johansen [46] и други.

Аксиоматика на ОТХМ:

(а) взаимодействието между лекарството (лиганда) и рецептора е биомолекулна реакция, която съгласно ЗДМ, приложен към механизма на del Castillo & Katz [10] се изразява по следния начин:

(1) за активираните рецептори (p_{AR^*}):

$$Y = \frac{X(A^*)}{[R^0]} = p_{AR^*} = \frac{E[A]}{K_A + (1 + E)[A]} \quad (1.22)$$

(2) за всички заети рецептори ($p_{AR} + p_{AR^*}$):

$$Y = \frac{X(A)}{[R^0]} = p_{AR} + p_{AR^*} = \frac{[A]}{K_{eff} + [A]} \quad (1.23)$$

$$K_{eff} = \frac{K_A}{1 + E}$$

където с K_{eff} се означава ефективната равновесна дисоциационна константа, която се прилага към схемата на del Castillo–Katz и включва

повече от едно равновесно състояние и се различава от константите K_A - равновесна константа на свързване и E -равновесна константа на конформационни изменения.

(б) Разглежда се ефикасността, формулирана от Stephenson [15] спрямо механизма на del Castillo–Katz за активираните и заетите рецептори съответно:

$$S = e_A^* \cdot p_{AR^*} = e_A^* \cdot \frac{E[A]}{K_A + (1 + E)[A]} \quad (1.24)$$

$$S = e_A^* \cdot (p_{AR} + p_{AR^*}) = e_A^* \cdot \frac{[A]}{K_{eff} + [A]} \quad (1.25)$$

Тази модификация на схемата на Stephenson се различава съществено от неговата първоначална идея, при която ефикасността и афинитета се разглеждат като отделни и потенциално независими свойства. Тук се използва символа e_A^* вместо e , за да бъде изразена ефикасността спрямо механизма на del Castillo - Katz.

(в) Най-добрата апроксимираща функция на експерименталните данни концентрация-отговор е функция от следния вид:

$$E^A = \frac{L_1^A \cdot [A]}{[A] + L_2^A} \quad (1.26)$$

където L_1^A и L_2^A са числени константи, които имат ключово значение.

(г) максималният отговор на тъканта (E_m^T) зависи само от дадена тъкан; има лекарства, които произвеждат максимален отговор или близък до него;

(д) връзката между стимула и реакцията е свойство на тъканта, а не на лекарството;

(е) еднаквите стимули водят до еднакви по сила отговори на тъканите.

Като се използва предположение (б) и след прости математически операции могат да се изразят:

1) активираните рецептори (p_{AR^*}) за механизма на del Castillo-Katz:

$$p_{AR^*} = \frac{E[A]}{K_A + (1 + E)[A]} \quad (1.27)$$

2) заетите рецептори ($p_{AR} + p_{AR^*}$) за механизма на del Castillo-Katz:

$$p_{AR} + p_{AR^*} = \frac{(1 + E)[A]}{K_A + (1 + E)[A]} \quad (1.28)$$

В първия случай, за параметрите K_{eff} и e_A^* , изразени чрез константите C_1^A и C_2^A са в сила 1.29 и 1.30:

$$K_{eff} = \frac{C_1^A \cdot L_2^A}{C_1^A - L_1^A} \quad (1.29)$$

$$e_A^* = \frac{C_2^A \cdot L_1^A}{(C_1^A - L_1^A)(1 + E)} \quad (1.30)$$

Във втория случай за параметрите K_{eff} и e_A^* и за всеки агонист A са в сила 1.31 и 1.32:

$$K_{eff} = \frac{C_1^A \cdot L_2^A}{C_1^A - L_1^A} \quad (1.31)$$

$$e_A^* = \frac{C_2^A \cdot L_1^A}{C_1^A - L_1^A} \quad (1.32)$$

3.1.1.1. Фармакологична интерпретация на параметрите и техните пресмятания

За представните по-горе експлицитни формули за L_1^A и L_2^A като функции на експерименталните данни от предположение (в) следва, че $L_1^A \approx E_m^A$ и $L_2^A = [A_{50}]$. Стойностите на E_m^A и $[A_{50}]$ се изчисляват от най-подходящите експериментални данни. Фармакологичният смисъл на E_m^A и $[A_{50}]$ е резултат от тяхната дефиниция. От предположение (г) следва че $C_1 \approx E_m^T$ (максималният възможен ефект на тъканта) и ефекта E^A може да бъде представен като функция на S чрез 1.33:

$$E_*^A = \frac{E_m^T S}{S + C_2} \quad \text{или} \quad E^A = \frac{E_m^T S}{S + C_2} \quad (1.33)$$

а неизвестната функция на Stephenson, $f(S) = \frac{S}{S+C_2}$ като функция на S .

Може да се определи максималния ефект на тъканта- E_m^T (предположение (г)). Има случаи, когато E_m^T може да се определи от контролните реакции на тестваните системи. Например при *in vitro* методите за биологична активност на новосинтезирани съединения се тества ефекта на опиоидни съединения на *ileum* на морско свинче и *vas deferens* на мишки. При използването на стандартна експериментална процедура, параметрите електрическа полева симулация, размер на изолираните препарати и други са неизменими. При тези експерименти [4] се предизвикват контролни отговори под формата на съкращения на изолираните гладкомускулни препарати, които в последствие са частично или напълно инхибирани от опиоидите. В тези случаи изходните контракции преди действието на тестваното вещество, могат да се разглеждат функционално като E_m^T .

От 1.33 следва, че параметърът C_2 може да се разглежда като стимул S , който предизвиква $0.5E_m^T$, защото ако $S = C_2$, тогава $E^A = \frac{E_m^T C_2}{2C_2} = 0.5E_m^T$. Така C_2 може да се използва за мярка за стимула S в дадена тъкан. Стимулът S може да бъде представен чрез мярката C_2 и количествения параметър t чрез 1.34:

$$S = t \cdot C_2, \quad t \in [0; +\infty)$$

$$E_*^A = \frac{E_m^T}{t+1} \text{ или } E^A = \frac{E_m^T t}{t+1} \quad (1.34)$$

След заместване на коефициентите L_1^A , L_2^A и C_1 с E_m^A , $[A_{50}]$ и E_m^T се получават следните експлицитни записи за двата случая:

1) за активираните рецептори са в сила 1.35 и 1.36:

$$K_{eff} = \frac{[A_{50}] E_m^T}{E_m^T - E_m^A} \quad (1.35)$$

$$\frac{e_A^*}{C_2} = \frac{E_m^A}{E_m^T - E_m^A} \cdot \frac{E}{(E+1)} \quad (1.36)$$

Константите C_2 за двата случая: за активираните и за заетите рецептори се различават по това, че в случая с активираните рецептори C_2 зависи не само от E_m^A и E_m^T , но и от $E/(E+1)$. Следователно e_A^* зависи от E_m^A , E_m^T , константата C_2 и $E/(E+1)$.

2) когато всички рецептори са заети в сила са 1.37 и 1.38:

$$K_{eff} = \frac{[A_{50}] E_m^T}{E_m^T - E_m^A} \quad (1.37)$$

$$\frac{e_A^*}{C_2} = \frac{E_m^A}{E_m^T - E_m^A}, \quad e_A^* = \frac{E_m^A C_2}{E_m^T - E_m^A} \quad (1.38)$$

Тези формули са коректни само когато $E_m^A < E_m^T$ или $E_m^A \approx E_m^T$. Това означава, че A е частичен агонист или почти пълен агонист. Тъй като A е частичен или почти пълен агонист, то в сила са 1.39 и 1.40:

$$\lambda_A = \frac{E_m^A}{E_m^T} \lambda_A < 1 \quad (1.39)$$

$$\mu_A = \frac{\lambda_A}{1-\lambda_A} \text{ и } \mu_A^* = \frac{\lambda_A}{(1-\lambda_A)} \frac{E}{(1+E)} \quad (1.40)$$

където μ_{A^*} се отнася за случая с активираните рецептори, а μ_A за случая със заетите рецептори съгласно механизмът на del Castillo-Katz. Ефективната равновесна дисоциационна константа K_{eff} и относителната ефикасност $e_{rel} = e_A^*/C_2$ за активираните рецептори се изразяват с 1.41:

$$\left. \begin{aligned} K_{eff} &= \frac{[A_{50}]}{1-\lambda_A}, & \frac{e_A^*}{C_2} &= \frac{\lambda_A}{(1-\lambda_A)} \cdot \frac{E}{(1+E)} = \mu_A^* \\ K_{eff} &= \frac{\mu_A^*}{\lambda_A} [A_{50}] \\ \lambda_A &= \frac{\mu_A^*}{\mu_A^* + 1} \\ K_{eff} &= (\mu_A^* + 1) [A_{50}] \end{aligned} \right\} \quad (1.41)$$

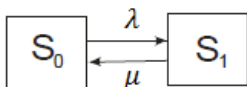
Константата K_{eff} и относителната ефикасност $e_{rel} = e_A^*/C_2$ за заетите рецептори се изразяват чрез 1.42:

$$\left. \begin{aligned} K_{eff} &= \frac{[A_{50}]}{1 - \lambda_A}, & \frac{e_A^*}{C_2} &= \frac{\lambda_A}{1 - \lambda_A} = \mu_A \\ K_{eff} &= \frac{\mu_A}{\lambda_A} [A_{50}] \\ \lambda_A &= \frac{\mu_A}{\mu_A + 1} \\ K_{eff} &= (\mu_A + 1) [A_{50}] \end{aligned} \right\} \quad (1.42)$$

Параметрите E_m^A и $[A_{50}]$ могат да бъдат изчислени от експерименталните данни, като E_m^T (съответно λ_A , μ_A и μ_A^*) могат да се изчислят от експерименталните данни за някой пълен агонист. Параметрите λ_A , μ_A и μ_A^* са важни за обяснението на С-R-R механизма и позволяват прецизен анализ на поведението на агониста в дадена тъкан. Параметрите μ_A и μ_A^* не зависят от мярката C_2 , а дават абсолютна количествена характеристика на способността на агониста A да произведе биологичен отговор. Типът на измерения биологичен ефект (отговорът на тъканта от действието на агониста върху рецептора) зависи от характера на експеримента и от тъканта, което определя биологичната страна на E_m^A и E_m^T . Параметърът K_{eff} характеризира не само процеса на свързване на лиганда и рецептора, но и конформационните изменения на рецептора. Параметърът $[A_{50}]$ представлява концентрацията на A , която е 0.5 от максималния ефект на тъканта и описва това, което виждаме, но не ни показва какво се случва по-нататък. K_{eff} изразен чрез μ_A или μ_A^* ни показва какво се случва. Високите стойности на K_{eff} означават, че дисоциацията доминира над асоциацията и следователно по-голяма част от общия брой рецептори и молекули, които участват в процеса на свързване предоставят необходимото ниво на окупирани X за всеки един момент от равновесното състояние.

3.1.1.2. Лиганд-рецепторните взаимодействия като Марковски процес с краен брой състояния и непрекъснато време

В този раздел са пресметнати пределните вероятности p_0 и p_1 за СМО с две състояния, моделираща, лиганд-рецепторното взаимодействие, а именно: рецептора е свободен или рецептора е зает (свързан с лиганда). Графът на състоянията на тази СМО е:



С интензивност $\lambda = k_1[A]$ и производителност $\mu = k_2$, съгласно класическата схема на лиганд-рецепторното свързване, където $[A]$ представлява концентрацията на молекулите, а k_1 и k_2 са скоростните константи на асоциация и дисоциация, съответно. За пределните вероятности са в сила следните формули

$$p_0 = \frac{[A_{50}]}{[A](1 - \lambda_A) + [A_{50}]}$$

$$p_1 = \frac{X(A)}{[R]} = \frac{[A_{50}](1 - \lambda_A)}{[A](1 - \lambda_A) + [A_{50}]} \quad (1.43)$$

От 1.43 следва, че относителната пропускателна способност е

$$q = \frac{k_2}{[A]k_1 + k_2} = \frac{K_A}{[A] + K_A} = \frac{[A_{50}]}{[A](1 - \lambda_A) + [A_{50}]} = p_0 \quad (1.44)$$

абсолютната пропускателна способност е

$$A_{\text{абс}} = \lambda \cdot \frac{\mu}{\lambda + \mu} = k_1[A] \cdot \frac{k_2}{[A]k_1 + k_2} = \frac{[A]k_2}{[A] + K_A} = k_2 \frac{X(A)}{[R]} = k_2 p_1 \quad (1.45)$$

3.1.2. Дискусия

В този раздел се дискутира ОТХМ като цяло, предположения (а) - (е) и границите на неговата приложимост. Получените резултати показват, че на основата на механизма на Кастило-Катц за лиганд-рецепторното взаимодействие, може да се изгради вариант на Теоретичния Хиперболичен Модел за частичен агонизъм и да се изведат експлицитни формули за афинитета и ефикасността, посредством параметри, имащи ясна фармакологична интерпретация, които описват и интерпретират по-пълно поведението на частичните агонисти и връзката между структурата на лиганда и биологичния му ефект. Построен е Марковски процес за моделиране на взаимодействието лиганд-рецептор. Чрез СМО като Марковски процес са пресметнати пределните вероятности, чийто експлицитни значения показват, че такава система адекватно моделира лиганд-рецепторното взаимодействие, дори при един рецептор и един лиганд.

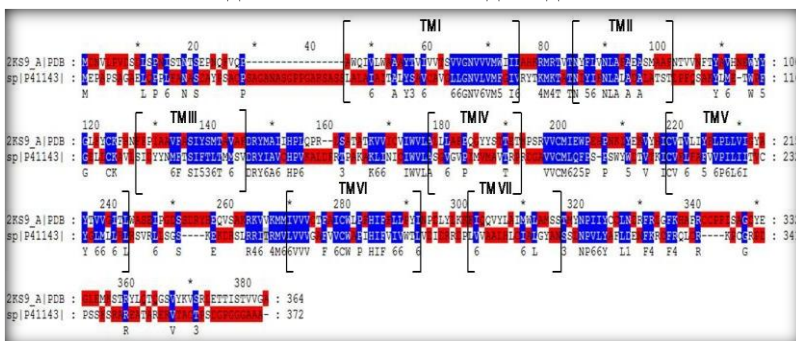
3.2. Компютърно моделиране на лиганд-таргет взаимодействия

3.2.1. Резултати от хомоложно моделиране

При компютърното моделиране на лиганд-таргет взаимодействията се вземат под внимание биологичните и фармакологичните аспекти на свързването на лиганда към рецептора. Данните за структурите на лигандите, използвани за верифициране на моделирането и за разработване на математическите аспекти на лиганд-рецепторните взаимодействия са взети от *in vitro* изследвания на Pencheva et al. [2-6].

3.2.1.1. Хомоложно моделиране на ДОР чрез софтуера МОЕ

ХМ на ДОР на базата на неговата аминокиселинна последователност е извършено чрез софтуерния пакет МОЕ [14]. Процедурата стартира с идентифициране на подходящи хомолози спрямо вече известната структура на шаблона, които са достатъчно подобни на целевата последователност, за да бъдат моделирани. Установено е, че конформациите на субстанция Р във вода с NK1R (PDBid:2ks9) имат голямо подобие с последователността на ДОР. Подравняването на структурите е извършено в МОЕ (Фигура 1.2). Процентът на идентичност на аминокиселинните остатъци в 7 трансмембрани (TM) региони е: TM I-100%, TM II-87%, TM III-83%, TM IV-67%, TM V-73%, TM VI-93%, TM VII-33%. От получените резултати, може да се направи извода, че моделите, изградени на базата на тази последователност се очаква да бъдат точни.



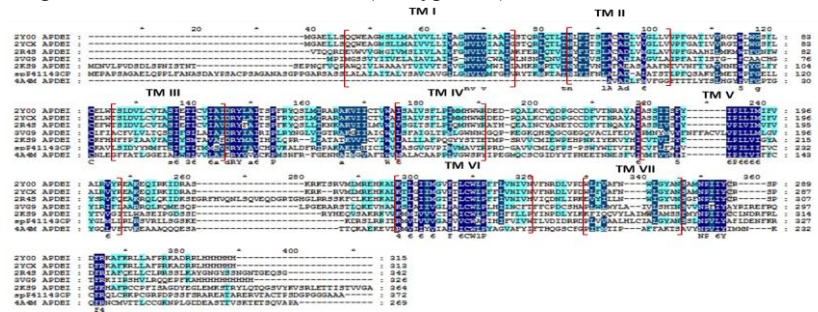
Фигура 1.2. Подравняване на последователността на ДОР (номер P41143) с NK1R (PDBid: 2ks9) в МОЕ. Цветови код на модела: червен цвят-заменени остатъци във всички шаблони; син цвят-идентични остатъци в шаблоните.

При изграждането на ДОР, в софтуера МОЕ се генерират 10 независими модели на базата на разположението на страничните вериги, оценени с функцията на контактната енергия и чрез използване на стандартното силово поле Amber 99. Сред тези модели е избран *Модел номер 6*, който е с най-ниската енергия -219.4733, изчислена в МОЕ [14] за контакти в регион от 6Å. Стереохимичните качества на моделите се оценяват чрез диаграмата на Рамачандран за благоприятните и за разрешените регионите [47]. При ХМ на ДОР се получи процент на идентичност 99.6%, което показва, че генерираният модел е с добри стереохимични качества. Структурното сходство между модела и реалната структура от PDB [12] се оценява чрез критерия RMSD [24]. Когато стойността му е по-малка от 3Å се

предполага доста добро сходство между структурите. Изграденият модел е със стойност на RMSD 0.5555Å, което е индикация за добро сходство между моделите.

3.2.1.2.Хомоложно моделиране на ДОР чрез софтуера Chimera

Процесът на ХМ на човешкия ДОР е извършен и посредством софтуера Chimera и инструмента Modeller [15]. Търсенето на шаблони за ДОР е осъществено в БД RCSB [12]. Добри попадения се получават за следните кристалографски структури: 2Y00, 2YCX, 2R4S, 3VG9, 3KS9 и 2A4M от RCSB [12]. Подравняването на структурите е извършено в програмата ClustalW [17], като е използван алгоритъм за множествоно подравняване на структури и матрица на подравняванията GONNET 250 (Фигура 1.3).



Фигура 1.3: Множествоно подравняване на структурите с тази на ДОР (P41143). Цветови код на модела: тъмно син цвят - идентични с всички шаблони, син цвят – запазва заместените остатъци във всички шаблоните, светло син цвят – полузапазени замествания за всички шаблони.

Процентът на идентичност на остатъците и сходството с последователността на ДОР и различните шаблони за всеки домейн са представени в Таблица 1.3.

Таблица 1.3: Процент на идентичност на остатъците и сходство между структурите в трансмембранните региони.

Структури	Процент на идентичност на остатъците и сходство в ТМ региони						
	TM I	TM II	TM III	TM IV	TM V	TM VI	TM VII
2Y00	68	67	80	60	65	73	75
2YCX	68	67	80	60	65	73	75
2R4S	68	67	80	60	61	73	75
3VG9	81	67	83	100	68	87	83
2KS9	100	87	83	67	73	93	33
4A4M	0	62	75	67	85	85	67

3D модела на ДОР е моделиран чрез използване на инструмента Modeller на Chimera [15] със стандартни параметри, зададени от програмата. Процедурата на моделиране в Modeller започва с подравняване на аминокиселинната последователност на рецептора спрямо избраните последователности. След това се избира този модел, който има най-висока GA34 оценка (повече от 95%). Валидирането на качеството на структурата на генерираните модели е извършено в Modeller [15] и SwissModel [11]. Оценяването на 3D моделите е направено за различни нива на структурната организация и се основава на *in vitro* изследванията за делта-опиоидните лиганди. Генерирани са 30 модели чрез използване на инструмента Modeller а [15]. Шест от тях получават най-добри стойности за GA341 (повече от 0,95) [331] и са избрани за по-нататъшна оценка: Модел А, Модел В, Модел С, Модел D, Модел Е, Модел F (Модел А-F)



Фигура 1.4: 3D модел на Модел В, генериран в Modeller.

Резултатите за стереохимичната проверка на скелета на протеина са валидирани в Procheck [10] и MolProbity [19]. Най-добри резултати от Procheck се получават за т.нар. *Модел В*, който има добри стойности за GA341 (0.99) от Modeller, добри стойности от Procheck (92.6% за най-благоприятните региони) и MolProbity (99.5% за благоприятните региони). На Фигура 1.4 е представен 3D модел на ДОР-Модел В, получен чрез хомоложно моделиране в Chimera [15].

Хомоложните модели са създадени с цел да се получат подходящи 3D модели за докинг изследвания и за *in silico* експерименти при отсъствието на кристалографски структури.

3.2.2. Резултати от молекулния докинг

При първоначалните изследвания, извършени с ДОР и МОР в достъпните БД липсват данни за кристалната им структура. Поради това за провеждането на експериментите се извърши търсене в литературата за теоретични модели на рецепторите, с цел да се намери връзка между структурата и активността на изследваните лиганди при взаимодействието им с рецепторите. Ето защо първите опити за докинг се провеждат с публикуваните теоретични модели на тези рецептори.

Молекулният докинг е извършен в софтуера GOLD 5.2 [27] като са използвани следните модели:

- (1) модел на ДОР, генериран чрез ХМ в софтуера MOE;

- (2) модел на ДОР, генериран чрез ХМ в софтуера Chimera
- (3) теоретичен модел на ДОР (ePDBid:1ozc);
- (4) модел на ДОР с кристална структура (PDBid:4ej4);
- (5) модел на МОР с кристална структура (PDBid:4dkl).

За намиране на корелация между резултатите от докинга (стойностите на скоринг функциите) и данните от *in vitro* изследванията (IC_{50} , K_A , e_{rel}) е използван софтуера GraphPad Prism 3.0 [29]. В хода на изследванията бяха публикувани кристалографски данни (юни 2012) за МОР и ДОР, което значително облекчи докинга, тъй като могат да се използват модели на рецептори с кристалографски данни.

3.2.2.1. Резултати от докинга с ДОР

3.2.2.1.1. Резултати от докинга с ДОР, получен чрез ХМ в МОЕ

Молекулният докинг с 11 делта-опиоидни лиганди (Таблица 1.1) и модела на ДОР, хомоложно моделиран в МОЕ [14] е извършен чрез софтуера за докинг GOLD 5.2 [27]. Експериментите са проведени с всички четири скоринг функции, налични в софтуера. Установени са отрицателни стойности на скоринг функциите, което показва, че свързването на моделирания рецептор на ДОР в МОЕ [14] и делта-опиоидните лиганди е много слабо. От получените резултати може да се заключи, че така изградения модел на ДОР чрез метода на ХМ в МОЕ не е подходящ за бъдещи QSAR изследвания с тези лиганди.

3.2.2.1.2. Резултати от докинга с ДОР, получен чрез ХМ в Chimera

Проведен е докинг с шестте модела на ДОР, получени като добри при ХМ в Chimera [15] и 11 делта-опиоидни лиганди в GOLD. **Таблица 1.4:** Стойности на GoldScore функцията за всички модели на ДОР.

Лиганди	Стойности на функцията GoldScore за A-F моделите					
	Модел А	Модел В	Модел С	Модел D	Модел Е	Модел F
[Cys(Bzl) ² , Leu ⁵]-enk	99,28	65,81	96,29	69	45,75	44,5
[Cys(Bzl) ² , Met ⁵]-enk	95,71	57,63	99	25,2	30,48	30,59
[Cys(O ₂ NH ₂) ² , Leu ⁵]-enk	92,02	57,46	94,29	21,39	19,94	38,33
[Cys(O ₂ NH ₂) ² , Met ⁵]-enk	89,99	65,34	98,81	7,11	15,28	34,47
[DCys(O ₂ NH ₂) ² , Leu ⁵]-enk	88,15	35,61	94,99	21,15	36,2	85,47
[DCys(O ₂ NH ₂) ² , Met ⁵]-enk	97,41	61,39	90,17	36,6	60,98	51,49
DPDPE	32,14	-22,15	16,74	-94,64	-141,06	0
[HCys(O ₂ NH ₂) ² , Leu ⁵]-enk	79,84	67,42	86,5	45,69	41,12	29,1
[HCys(O ₂ NH ₂) ² , Met ⁵]-enk	104,79	53,49	97,34	1,1	63,43	46,03
[Leu ⁵]-enk	91,61	59,72	88,69	77,27	85,78	75,07
[Met ⁵]-enk	98,44	66,34	90,28	83,52	78,47	85,6

Използвана е скоринг функцията по подразбиране – GoldScore. Резултатите са представени в Таблица 1.4. Използвайки данните от стойностите на *in vitro* параметрите за делта-опиоидни лиганди и резултатите от стойностите на скоринг функцията GoldScore е направен опит да се намери корелация между ефикасността на лигандите и резултатите от докинга за всички Модели А-F. Установено е, че параметъра e_{rel} корелира добре с GoldScore скоринг функцията и моделите на ДОР (А-F), (Таблица 1.5).

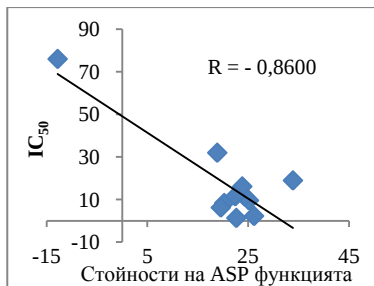
Таблица 1.5: Корелации между GoldScore функцията и e_{rel} , за Модели А-F.

Модели	Модел А	Модел В	Модел С	Модел D	Модел Е	Модел F
Коефициент на Пирсън	-0.6491	-0,6586	-0.6479	-0.6420	-0.7495	-0.5156

След извършеното оценяване на моделите с различни софтуери (Раздел 3.2.1.2) се стигна до извода, че *Модел В* е по-подходящ за използване в *in silico* изследвания за установяване на връзката структура-биологична активност. Той е най-приемлив модел за по-нататъшни изследвания, защото дава най-добри резултати при оценяването с Procheck и MolProbity. Също така показва значителна корелация между ефикасността на съединенията и GoldScore скоринг функцията от докинг изследванията ($r = -0,6586$). Ето защо с Модел В и делта-опиоидните лиганди (Таблица 1.1) е проведен докинг и с останалите скоринг функции от GOLD 5.2 [27], (Таблица 1.6).

Таблица 1.6: Резултати от докинга на Модел В и 11 делта-опиоидни лиганди.

Лиганди	ASP	ChemPLP	ChemScore	GoldScore
[Cys(Bzl) ² -Leu ⁵]-enk	20,26	59,93	2,61	65,81
[Cys(Bzl) ² -Met ⁵]-enk	25,16	76,95	9,85	57,63
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	22,66	53,74	-2,9	57,46
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	26,18	18,21	-11,18	65,34
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	24,31	3,26	-1,93	35,61
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	-12,82	29,35	-13,51	61,39
DPDPE	19,58	59,6	11,1	-22,15
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	18,87	23,69	-6,39	67,42
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	23,84	8,7	-2,2	53,49
[Leu ⁵]-enkephalin	22,45	62,75	7,66	59,72
[Met ⁵]-enkephalin	33,9	26,99	13,79	66,34



Фигура 1.5: Корелация между стойностите на ASP функцията и IC_{50} .

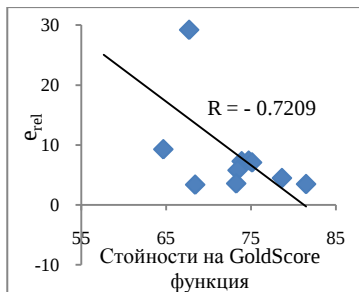
активност. Отрицателната корелация в този случай показва, че колкото по-високи са стойностите на скоринг функцията, толкова по-ниски са стойностите на IC_{50} , и следователно активността на съединенията е по-висока. Използвайки тази връзка докинга се провежда още 10 пъти в подобни условия за Модел В с ASP скоринг функцията. Установено е, че средната стойност на оценъчната функция корелира добре с IC_{50} за серията тествани съединения (Фигура 1.5).

3.2.2.1.3. Резултати от докинга с модел на ДОР (ePDBid:1ozc)

Проведен е молекулен докинг между теоретичния модел на ДОР (ePDBid:1ozc) и 11 делта-селективни енкефалинови аналози (Таблица 1.1), посредством GOLD 5.2 [27], при който са използвани и четирите оценъчни функции заложи в него, (Таблица 1.7).

Таблица 1.7: Резултати от докинга с ДОР (ePDBid:1ozc) и 11 опиоидни лиганди

Лиганди	ASP	ChemPLP	ChemScore	GoldScore
[Cys(Bzl) ² -Leu ⁵]-enk	43,99	91,06	32,99	64,68
[Cys(Bzl) ² -Met ⁵]-enk	42,3	96,49	39,09	81,49
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	41,72	85,52	26,37	67,72
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	40,43	78,97	22,52	73,91
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	38,85	86,76	25,61	74,73
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	40	79,5	24,26	75,13
DPDPE	37,11	65,17	29,14	57,67
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	39,24	89,18	25,58	68,43
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	46,21	80,5	27,27	78,65
[Leu ⁵]-enkephalin	37,54	81,75	27,53	73,42
[Met ⁵]-enkephalin	41,01	78,21	28,97	73,26



Фигура 1.6: Корелация между стойностите на функцията GoldScore и *in vitro* параметъра IC_{50} .

Направен е опит да се намери корелация между резултатите от докинга и данните от *in vitro* изследванията (IC_{50} , K_A , e_{rel}) за изследваните съединения. Установена е значителна корелация между скоринг функцията GoldScore и *in vitro* параметъра e_{rel} , $r = -0.7209$ (Фигура 1.6). Това показва, че модела на ДОР (ePDBid:1ozc) се свързва добре с делта-селективните енкефалинови аналози.

3.2.2.1.3. Резултати от докинга с модел на ДОР (PDBid:4ej4)

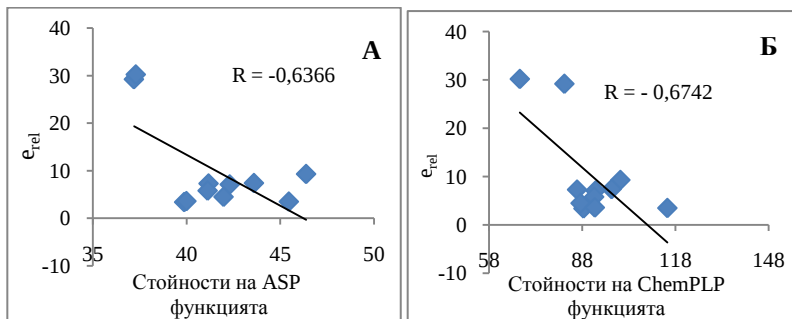
Проведен е молекулен докинг с 11 делта-опиоидни лиганди (Таблица 1.1) и модела на ДОР с кристална структура (PDBid: 4ej4) в GOLD 5.2 [27], посредством четирите скоринг функции заложи в него. Резултатите са представени в Таблица 1.8.

Таблица 1.8: Резултати от докинга с ДОР(PDBid4ej4) и 11 опиоидни лиганди

Лиганди	ASP	ChemPLP	ChemScore	GoldScore
[Cys(Bzl) ² -Leu ⁵]-enk	46,37	100,27	38,91	105,87
[Cys(Bzl) ² -Met ⁵]-enk	45,45	115,41	35,19	110,88
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	37,19	82,23	28,48	92,51
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	41,17	86,32	25,82	88,73
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	43,59	97,44	31,84	80,42
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	42,3	92,25	31,55	96,14
DPDPE	37,29	67,87	32,75	74,07
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	39,87	88,37	26,55	93,09
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	41,97	87,44	29,23	100,61
[Leu ⁵]-enkephalin	41,12	91,81	31,62	90,69
[Met ⁵]-enkephalin	39,99	92,04	38,91	85,33

Установени са значителни корелации между две скоринг функции: (А) между ASP функцията и *in vitro* параметъра e_{rel} с корелационен коефициент на Пирсън $r = -0.6366$, (Б) между ChemPLP и *in vitro* параметъра e_{rel} , $r = -0.6742$, (Фигура 1.7). Това е индикация, че

формираните комплекси са стабилни и че, софтуера за докинг дава надеждни резултати за изследваните лиганди и модела на ДОР.



Фигура 1.7: Корелации между стойностите на: (А) ASP скоринг функцията и e_{rel} и (Б) ChemPLP скоринг функцията и e_{rel} .

След анализ на резултатите от корелационните зависимости между докинг резултатите от трите модела на ДОР и стойностите на *in vitro* параметрите, се вижда, че значителни корелации се установяват за:

- ДОР (Модел В): $ASP\ Score/IC_{50} = -0.86$, $ASP\ Score/K_A = -0.9381$, и $GoldScore/e_{rel} = -0.6589$.
- ДОР (ePDBid: 1ozc): $GoldScore/e_{rel} = -0.7209$;
- ДОР (PDBid:4ej4) $ASP\ Score/e_{rel} = -0.6366$ и $ChemPLP/e_{rel} = -0.6742$.

Делта-селективните енкефалинови аналози бяха последователно използвани при докинга за всеки от моделите на ДОР и с всички скоринг функции. Сравнени са четирите скоринг функции, налични в GOLD 5.2 при докинга на делта-опиоидните лиганди с трите модела на ДОР. Анализът на получените данни показва, че след докинг с Модел В, стойностите на скоринг функциите корелират най-добре с данните от *in vitro* тестовете и получената корелация има биологичен смисъл. Колкото е по-висока стойността на скоринг функцията и е по-ниска стойността на концентрацията, то толкова потентността на съединенията е по-голяма.

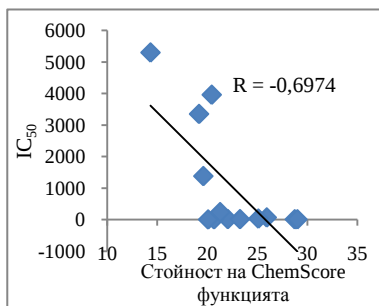
3.2.2.2. Резултати от докинга за МОР (PDBid:4dkl)

Определянето на кристалната структура на мю-опиоидния рецептор (МОР), даде възможност за по-прецизни изследвания на лиганд-рецепторните взаимодействия и QSAR. Проведен е молекулен докинг с 13 мю-опиоидни лиганди (Таблица 1.2) и МОР (PDBid: 4dkl) чрез софтуера GOLD 5.2 [27] и всички скоринг функции в него. Получените резултатите са представени в Таблица 1.9, като те са използвани за намиране на корелации между резултатите от докинга и

in vitro параметрите с цел установяване на връзка между структурата на съединенията и биологичната им активност.

Таблица 1.9: Резултати от докинга с МОР (PDBid4dkl) и мю-опиоидни лиганди

Лиганди	ASP	ChemPLP	ChemScore	GoldScore
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	46.89	88.38	20.44	86.71
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	42.64	85.24	19.6	94.39
Dalargin	45.69	89.17	22.05	76.01
Dalarginamide	48.04	100.41	20.67	81.75
Dalarginethylamide	49.94	97.06	28.75	95.40
DAMGO	45.97	92.08	29.02	100.37
[D-Phe ⁴]-Dalarginamide	45.48	80.67	14.31	75.37
[L-Ala ²]-Dalargin	46.93	84.69	21.28	53.13
[Leu ⁵]-enkephalin	41.59	85.89	25.95	95.27
[Met ⁵]-dalargin	48.95	98.60	23.27	95.43
[Met ⁵]-enkephalin	46.98	87.64	25.11	89.48
N-Me-[D-Phe ⁴]-Dalarginamide	53.22	88.91	19.17	85.02
N-Me-[L-Phe ⁴]-Dalarginamide	42.61	79.34	20.08	77.04



Фигура 1.8: Корелация между ChemScore функцията и IC₅₀.

Установена е значителна корелация, $r = -0,6974$ между ChemScore функцията и стойностите на IC₅₀ в миентричен плексус на морско свинче (Фигура 1.8). Докингът може да помогне да се обяснят *in vitro* резултатите и успешно да се използва в *in silico* дизайна на нови потентни агонисти на мю-опиоидния рецептор като се спестяват много средства, време и експериментите с животни.

3.2.3.Резултати от тримерното фитване на експерименталните данни с ДОР

В този раздел целта е да се намери връзка между (1) резултатите от докинга, извършен чрез GOLD 5.2 [27] за трите модела на ДОР (ePDBid:1ozc, PDBid:4ej4 и Модел B); (2) резултатите за тоталната енергия, за лиганд-рецепторните комплекси, формирани след докинга и (3) стойностите на количествените параметри от *in vitro* тестовите

(IC₅₀, K_A, e_{rel}) за всички делта-селективни енкефалинови аналози от Таблица 1.1, които са изчислени посредством ТХМ на Milanov & Pencheva [35,36].

3.2.3.1. Резултати с ДОР (ePDBid:1ozc)

В този раздел е използван теоретичен модел на ДОР (ePDBid:1ozc) и 11 делта-опиодни лиганди. Тоталната енергия на комплексите е изчислена чрез софтуера MMV [28] и MolDock скоринг функцията [329]. Тук е приложен методичния подход, описан в Глава 2 (Раздел 2.5) и полиномен модел за фитване на експерименталните данни, посредством инструмента *Surface Fitting Tool* в Matlab [30]. Експерименталните данни за зависимата променлива z - стойностите на параметъра e_{rel} и независимите променливи x -стойности на GoldScore функцията и y - стойности за тоталната енергия на лиганд-рецепторните комплекси са представени в Таблица 1.10.

Таблица 1.10: Резултатите от стойностите на: функцията GoldScore, тоталната енергия на комплексите и на *in vitro* параметъра e_{rel} .

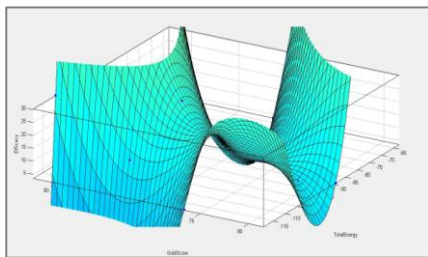
Лиганди	Стойности на GoldScore	Стойности на тотална енергия	e_{rel}
[Cys(Bzl) ² -Leu ⁵]-enk	64,68	-107.022	9.3
[Cys(Bzl) ² -Met ⁵]-enk	81,49	-89.091	3.5
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	67,72	-97.619	29.2
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	73,91	-91.246	7.3
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	74,73	-84.852	7.4
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	75,13	-86.221	7.1
DPDPE	57,67	-109.709	30.2
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	68,43	-62.774	3.4
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	78,65	-93.301	4.5
[Leu ⁵]-enkephalin	73,42	-81.869	5.8
[Met ⁵]-enkephalin	73,26	-118.971	3.6

Тествани са полиноми от първа до трета степен за фитване на експерименталните данни по метода на най-малките квадрати. Използвани са следните статистически критерии за оценка в Matlab: *SSE*, *R-square*, *Adj r-square* и *RMSE* (Раздел 2.5). Най-добри стойности се получават за полином от трета степен (Poly33): $R^2 = 1.0$, $SSE = 0.009207$, $adj R^2 = 0.9999$, $RMSE = 0.0960$, който има следния вид:

$$f(x, y) = a_{00} + a_{10} * x + a_{01} * y + a_{20} * x^2 + a_{11} * x * y + a_{02} * y^2 + a_{30} * x^3 + a_{21} * x^2 * y + a_{12} * x * y^2 + a_{03} * y^3 \quad (1.46)$$

Таблица 1.11: Средни стойности на коефициентите на полинома от трета степен, избран за оптимален.

Коефициенти	Средна стойност (95% доверителни граници)
a_{00}	11.51 (9.823, 13.19)
a_{10}	-11.07 (-16.13, -6.008)
a_{01}	-22.37 (-33.1, -11.64)
a_{20}	16.71 (14.65, 18.78)
a_{11}	3.451 (-6.742, 13.64)
a_{02}	-0.6185 (-3.866, 2.629)
a_{30}	-12.15 (-14.89, -9.411)
a_{21}	19.03 (11.96, 26.11)
a_{12}	44.7 (29.97, 59.43)
a_{03}	14 (7.377, 20.62)



Фигура 1.9: 3D графика на фитването на експерименталните данни за модел на ДОР (ePDBid: 1ozc) чрез полином от трета степен.

3.2.3.2. Резултати с ДОР (PDBid: 4ej4)

В този раздел е използван модел на ДОР с кристална структура (PDBid: 4ej4) и 11 делта-опиоидни лиганди от Таблица 1.1. Тествани са всички стойности на скоринг функциите от докинга, всички стойности от totalната енергия за съответните лиганд-рецепторни комплекси за всички стойности на *in vitro* параметрите (IC_{50} , K_A , e_{rel}). При фитването, най-добри резултати са установени за ChemScore скоринг функцията. Резултатите от докинга, стойностите на totalната енергия, изчислена за формираните лиганд-рецепторни комплекси и стойностите на e_{rel} от *in vitro* тестове са представени в Таблица 1.12.

И в този раздел е приложен методичния подход, описан в Глава 2 (Раздел 2.5) и полиномен модел 1.46 за фитване на експерименталните данни, посредством инструмента *Surface Fitting Tool* в Matlab [30]. Експерименталните данни за зависимата променлива z (стойностите на

Стойностите на коефициентите на полинома са представени в Таблица 1.11. За полиномите от първа, втора и трета степен са приложени критериите за оптималност на модели AIC [31] и BIC [32] от инструмента “Comparing Models” [34]. Получените резултати показват, че полинома от трета степен е оптимален.

Графика на ефикасността като функция от стойностите на GoldScore скоринг функцията от докинга и стойностите на totalната енергия на формираните лиганд-рецепторни комплекси в MMV [28] е представена на Фигура 1.9 чрез фитване на експерименталните данни с полином от трета степен в Matlab [30].

in vitro параметъра e_{rel}) и независимите променливи x (стойности на ChemScore скоринг функцията) и y (стойности за тоталната енергия на лиганд-рецепторните комплекси) в Таблица 1.13.

Таблица 1.12: Резултатите от стойностите на ChemScore функцията, стойностите на тоталната енергия на лиганд-рецепторните комплекси и стойностите на параметъра e_{rel} от in vitro тестовете.

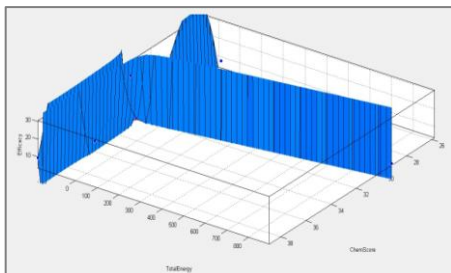
Лиганди	Стойности на ChemScore	Стойности на тотална енергия	e_{rel}
[Cys(Bzl) ² -Leu ⁵]-enk	38.91	-170.657	9.3
[Cys(Bzl) ² -Met ⁵]-enk	35.19	-125.108	3.5
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	28.48	-118.805	29.2
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	25.82	-87.343	7.3
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	31.84	-136.187	7.4
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	31.55	-139.449	7.1
DPDPE	32.75	-100.702	30.2
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	26.55	-112.164	3.4
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	29.23	896.877	4.5
[Leu ⁵]-enkephalin	31.62	-119.009	5.8
[Met ⁵]-enkephalin	32.22	-106.792	3.6

Получените модели са оценени чрез статистически критерии за оценка на фитването на експерименталните данни (Глава 2), като най-добри стойности се получават за полином от трета степен: $R^2 = 0.9990$, $SSE = 0.9631$, $adjusted R^2 = 0.9901$, $RMSE = 0.9814$, което показва, че модела от трета степен фитва добре експерименталните данните.

Таблица 1.13: Средни стойности на коефициентите на получения полином от трета степен, избран като оптимален:

Коефициенти	Средна стойност (95% доверителни граници)
a_{00}	-188.4 (-705.4; 373.7)
a_{10}	1855 (-17.99; 3279)
a_{01}	-828.1 (-4019; 2363)
a_{20}	740.8 (48.93; 1433)
a_{11}	1.3 (-397.5; 2.639)
a_{02}	839.8 (-1929; 3609)
a_{30}	83.1 (29.72; -136.5)
a_{21}	2506 (119.9, 4892)
a_{12}	2.3 (-1630; 4.563)
a_{03}	4556 (-1526; 1.065)

Коефициентите на полинома са представени в Таблица 1.13. За полиномите от първа, втора и трета степен са приложени критериите за оптималност на модели AIC [31] и BIC [32], прилагайки инструмента за сравняване на модели “Comparing Models” [34]. Получените резултати показват, че полинома от трета степен е оптимален.



Фигура 1.10: 3D графика на фитването на експерименталните данни за модел на ДОР (PDBid: 4ej4) чрез полином от трета степен.

Графика на ефикасността като функция от стойностите на ChemScore скоринг функцията от докинга и стойностите на тоталната енергия на формираните комплекси в MMV [28] е представена на Фигура 1.10 чрез фитване на експерименталните данни с полином от трета степен в Matlab [30].

3.2.3.3. Резултати от тримерното фитване за ДОР (Model B)

В този раздел е използван модела на ДОР, получен чрез ХМ в Chimera (Модел В) и 11 делта-опиоидни лиганди от Таблица 1.1. При фитването на експерименталните данни в Matlab [30] за ДОР (Модел В), отново както и при фитването за ДОР (PDBid: 4ej4) и ДОР (ePDBid:1ozc), са тествани всички стойности на скоринг функциите от докинга, всички стойности от тоталната енергия за съответните лиганд-рецепторни комплекси и стойностите на всички параметри от *in vitro* тестовите (IC_{50} , K_A , e_{rel}). Най-добри резултати са установени за ASP скоринг функцията и параметъра IC_{50} от *in vitro* тестовите. И тук е приложен методичния подход, описан в Глава 2 (Раздел 2.5) и полиномен модел за фитване на експерименталните данни, посредством инструмента *Surface Fitting Tool* в Matlab [30]. Експерименталните данни за зависимата променлива z (стойностите на *in vitro* параметъра IC_{50}) и независимите променливи x (стойности на ASP скоринг функцията) и y (стойности за тоталната енергия на лиганд-рецепторните комплекси) в Таблица 1.14.

Таблица 1.14: Резултатите от стойностите на ASP скоринг функцията, стойностите на тоталната енергия на лиганд-рецепторните комплекси и стойностите на параметъра IC_{50} от *in vitro* тестовите.

Лиганди	Стойности на ASP функцията	Стойности на тотална енергия	IC_{50}
[Cys(Bzl) ² -Leu ⁵]-enk	20.26	-77.135	8.3
[Cys(Bzl) ² -Met ⁵]-enk	25.16	-98.91	9.53
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	22.66	-99.678	1.29
[Cys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	26.18	-88.498	2.22
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	24.31	-66.115	11.4
[DCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	-12.82	897.265	75.96

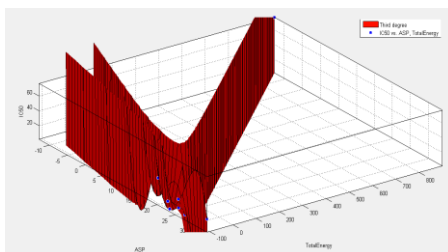
DPDPE	19.58	-75.943	6.18
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Leu ⁵]-enk	18.87	-90.567	31.92
[HCys(O ₂ NH ₂) ² -Met ⁵]-enk	23.84	-80.137	16.09
[Leu ⁵]-enkephalin	22.45	-104.149	11.45
[Met ⁵]-enkephalin	33.9	-112.752	18.91

Получените модели са оценени за това колко добре фитват експерименталните данни чрез статистическите критерии SSE , R^2 , $adjusted R^2$ и $RMSE$ (Глава 2), като най-добри резултати отново се получават за полином от трета степен (Poly33): $R^2 = 1.0$, $SSE = 0.2460$, $adjusted R^2 = 0.9999$, $RMSE = 0.1568$. Това е индикация, че полученият полином от трета степен за фитване експерименталните данни в тримерното пространство е добър. Този модел може да бъде записан отново чрез Уравнение 1.46. Коефициентите на полинома са представени в Таблица 1.15.

Таблица 1.15: Средни стойности на коефициентите на полинома от 3 степен:

Коефициенти	Средна стойност	(95% доверителни граници)
a_{00}	416.5	(319.1; 514)
a_{10}	-2420	(-3089; -1751)
a_{01}	111.7	(-248.9; 472.4)
a_{20}	-3299	(-3796; -2801)
a_{11}	-2.164	(-2.687; -1.639)
a_{02}	-1.439	(-1.829; -1.049)
a_{30}	-864.7	(-989.5; -739.8)
a_{21}	-1.301	(-1.493; -1.109)
a_{12}	-4.613	(-5.623; -3.602)
a_{03}	-3.382	(-4.211; -2.552)

За полиномите от първа, втора и трета степен са приложени критериите за оптималност на модели AIC [31] и BIC [32], изчислени в чрез инструмента “Comparing Models” [34]. От получените резултатите за стойностите на тези критерии за експерименталните данни за модел Модел В се установи, че полинома от трета степен е оптимален.



Фигура 1.11: 3D графика на фитването на експерименталните данни за модел В с полином от трета степен.

Графика на потентността като функция от стойностите на ASP скоринг функцията от докинга и стойностите на тоталната енергия на формираните комплекси в MMV [28] е представена на Фигура 1.11 чрез фитване на експерименталните данни с полином от трета степен в Matlab [30].

3.2.4. Дискусия

В този раздел са обсъдени резултатите от хомоложното моделиране на ДОР, молекулния докинг проведен с мю- и делта-опиоидни лиганди с МОР и ДОР и резултатите от тримерното фитване на експерименталните данни за ДОР.

Проведен е сравнителен анализ, който доказва качествата на генерирания модел на човешки ДОР чрез хомоложно моделиране в софтуера Chimera - *Модел В* в сравнение с теоретичния модел и модела с кристална структура на ДОР, чрез използване на потентни активни и селективни делта-опиоидни лиганди.

Анализът на получените данни показва, че след докинг с *Модел В*, стойностите на скоринг функциите корелират най-добре с данните от *in vitro* тестовите. Освен това използването на ASP скоринг функцията позволява по-прецизен докинг с тестваните лиганди, защото е установена значителна корелация между ASP скоринг функцията и потентността, $r = -0.86$. Получената корелация има биологичен смисъл, защото колкото е по-висока стойността на скоринг функцията и е по-ниска стойността на концентрацията, то толкова потентността на съединенията е по-голяма.

Описана е биологичната активност на делта-селективните енкефалинови аналози (Таблица 1.1) чрез тримерно моделиране с полином на две променливи от трета степен, при което *in vitro* параметрите афинитет, ефикасност и потентност са представени като функции от стойностите на скоринг функцията от докинга и тоталната енергия на формираните лиганд-рецепторни комплекси. Това е един начин за определяне на QSAR.

След анализ на получените резултати се вижда, че докинг процедурата може да помогне да се обяснят *in vitro* резултатите за изследваната серия от мю- и делта- опиоидни аналози и успешно да се използва в *in silico* дизайн на нови потентни агонисти за мю- и делта-опиоидни рецептори, като по този начин се спестяват много средства и време и най-вече експериментите с животни. Компютърното моделиране и QSAR подходите са ключов инструмент при търсене и прогнозиране на нови биологично активни вещества на база свойствата на вече известните такива.

ИЗВОДИ

1. Разработен е вариант на теоретичния хиперболичен модел на фармакологичен агонизъм, посредством включване на механизма на del Castillo–Katz за активиране на рецептора.
2. Изведени са експлицитни формули за пресмятане на основните параметри на фармакологичен агонизъм: афинитет и ефикасност.
3. Разработеният вариант на теоретичния хиперболичен модел и изведените експлицитни формули за пресмятане на параметрите на фармакологичен агонизъм, описват и интерпретират по-пълно поведението на частичните агонисти и връзката между структурата на лиганда и биологичния му ефект, за което са представени доказателства.
4. Построен е Марковски процес, за моделиране на лиганд-рецепторни взаимодействия.
5. С апарата на системите за масово обслужване като Марковски процес са пресметнати пределните вероятности. Експлицитните значения на тези вероятности показват, че такава СМО адекватно моделира лиганд-рецепторното взаимодействие, дори в случая на един рецептор и един лиганд.
6. За първи път в България е генериран модел на делта-опиоиден рецептор на базата на хомоложно моделиране, приложим за решение на докинг задачи. Проведен е сравнителен анализ, който доказва качествата на генерирания модел в сравнение с теоретичния модел и модела с кристална структура на делта-опиоидния рецептор, чрез използване на потентни активни и селективни делта-опиоидни лиганди.
7. Разработеният модел на делта-опиоидния рецептор чрез хомоложно моделиране позволява оптимално да се определи афинитета на свързване чрез така наречената ASP скоринг функция.
8. Представени са доказателства, че стойностите на скоринг функцията ASP позволяват да се определи потентността и ефикасността на агонисти.
9. Чрез решаване на задачата за молекулен докинг е проведена биоинформатична и фармакологична оценка на активността и

селективността на серия от делта- и мю-опиоидни лиганди с модели на делта- и мю-опиоидни рецептори.

10. Представени са доказателства, за наличие на корелация между докинг резултати с делта- и мю-опиоидни рецептори и параметри на селективните лиганди, установени *in vitro*.
11. Създадените *in silico* модели на делта- и мю-опиоидни рецептори могат да се прилагат за идентифициране и оценка на активност и селективност на мю- и делта-опиоидни лиганди.
12. Описана е биологичната активност на лигандите чрез тримерно моделиране, при което *in vitro* параметри афинитет, ефикасност и потентност са представени като функции на значението на скоринг функцията от докинга и тоталната енергия, изчислена за лиганд-рецепторните комплекси. Това е направено за всяка от четирите скоринг функции в GOLD.

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. Dzimbova T., Sapundzhi F., Pencheva N., Milanov P. (2013). *Computer modeling of human delta opioid receptor*. Int. J. Bioautomation, 17(1), 5-16, Online ISSN: 1314-2321, 1314-1902.
2. Sapundzhi F., Dzimbova T., Pencheva N., Milanov P. (2015). *Exploring the interactions of enkephalin and dalargin analogues with the mu-opioid receptor*, Jurnal of Bulgarian Chemical Communications, 47 (2), 613-618, (IF=0.349).
3. Sapundzhi F., Dzimbova T., Pencheva N., Milanov P. (2015). *Determination of the relationship between the docking studies and the biological activity of δ -selective enkephalin analogues*, Journal of Computational Methods in Molecular Design, Volume 5 (1), 98-108, Online ISSN:2231-3176.
4. Sapundzhi F., Dzimbova T., Pencheva N., Milanov P. (2015). *Comparative evaluation of four scoring functions with three models of delta opioid receptor using molecular docking*, Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, Springer, (submitted).

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА В СБОРНИЦИ ОТ НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

1. Dzimbova T., Sapundzhi F., Pencheva N., Milanov P. (2012). *Computer modeling of human μ -opioid receptor*. Peptides 2012: Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium, George Kokotos, Violetta Constantinou-Kokotou, John Matsoukas (Editors), 2-7 September 2012, Athens, Greece, 232-233, ISBN 978-960-466-121-3.
2. Sapundzhi F. (2013). *Optimization of Homology modeling of δ -opioid receptor by Molecular Operating Environment*, Proceedings of the Fifth International Scientific Conference - FMNS 2013, 12 – 16 June 2013, Volume 1, 193, Online ISSN 1314-0272.
3. Sapundzhi F. (2014). *Queueing systems–some basic theory*, Proceedings of the Scientific Conference, F.IND.CONSULTING/ Enhancement of the competitiveness and restructuring of the food subsectors through benchmarking, 15 May 2014, Blagoevgrad, Bulgaria, Volume 1, 59-70.
4. Sapundzhi F., Dzimbova T., Pencheva N., Milanov P. (2015). *GOLD scoring functions comparison to establish the relationship structure-biological action*, Peptides 2014: Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho

Danalev (Eds). 31 August-5 September 2014, Sofia, Bulgaria, Volume 1, 376-377, Online ISBN 978-619-90427-2-4.

5. Sapundzhi F., Dzimbova T., Pencheva N., Milanov P. (2015). *Surface Fitting of the Results of Molecular Docking and the Biological Activity of Delta Opioid Selective Enkephalin Analogues*. Proceedings of the Sixth International Scientific Conference–FMNS 2015, 10 – 14 June, Volume 1, 104-112, Online ISSN 1314-0272.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ С ДОКЛАДИ

1. Sapundzhi F. (2013). *Optimization of Homology modeling of δ -opioid receptor by Molecular Operating Environment*, Fifth International Scientific Conference-FMNS2013, 12-16 June, Blagoevgrad, Bulgaria.
2. Sapundzhi F. (2013). *Queueing systems-some basic theory*, International Conference-F.IND.CONSULTING/Enhancement of the competitiveness and restructuring of the food subsectors through benchmarking, 15 May, Blagoevgrad, Bulgaria.
3. Sapundzhi F. (2014). *Mathematical models in quantitative pharmacology: modelling of pharmacological agonism*, Institute of Mathematics and Informatics, Bulgarian Academy of Science, 4 November, Sofia, Bulgaria.
4. Sapundzhi F., Dzimbova T., Pencheva N., Milanov P. (2015). *Surface Fitting of the Results of Molecular Docking and the Biological Activity of Delta Opioid Selective Enkephalin Analogues*, Sixth International Scientific Conference – FMNS2015, 10-14 June, Blagoevgrad, Bulgaria.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ С ПОСТЕРИ

5. Dzimbova T., Sapundzhi F., Pencheva N., Milanov P. (2012). *Computer modeling of human delta opioid receptor*, Ninth Annual Meeting of the Bioinformatics Italian Society, 2- 4 May 2012, p. 122, Catania, Italy.
6. Dzimbova T., Sapundzhi F., Pencheva N., Milanov P. (2012). *Computer modeling of human μ -opioid receptor*. Journal of Peptide Science, Volume 18 (S1), S84, (**IF =1.546**).
7. Sapundzhi F., Dzimbova T., Pencheva N., Milanov P. (2014). *GOLD scoring functions comparison to establish the relationship structure-biological action*, Journal of Peptide Science, Volume 20 (S1), September 2014, 294-295, Online ISSN: 1099-1387, (**IF=1.862**).
8. Sapundzhi F., Dzimbova T., Pencheva N., Milanov P. (2014). *Comparative Evolution of four Scoring Functions with Three Models of Delta Opioid Receptor Using Molecular Docking*, Biomath Communications, June 2014, Volume 1 (1), 84, ISSN 2367-5241.

9. Sapundzhi F., Dzimbova T., Pencheva N., Milanov P. (2015). *Modeling the Relationship between Biological Activity of Delta-selective Enkephalin Analogues and Docking Results by Polynomials*, Biomath Communications, Volume 2 (1), 81, Online ISSN 2367-5241.

УЧАСТИЕ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

1. "Bioinformatics research: protein folding, docking and prediction of biological activity", NSF I02/16, 12.12.14, фонд "Научни изследвания", ръководител доц. д-р Иван Тренчев.
2. "Enhancement of the competitiveness and restructuring of the food subsectors through benchmarking F.IND. CONSULTING" (Повишаване на конкурентоспособността в хранително-вкусовата промишленост) по програмата European Territorial Cooperation Programme "Greece-Bulgaria 2007-2013", ръководител доц. д-р Борислав Юруков.
3. "Математически модели и статистически методи за изследване на предприемачеството и конкурентоспособността на бизнеса в Югозападна България", ЮЗУ "Неофит Рилски" по Наредба 9, ръководител доц. д-р Иван Тренчев.

УЧАСТИЕ В СПЕЦИАЛИЗАЦИИ

1. Едномесечна специализация по DAAD, ИМИ-БАН:15.10-15.11.2014
2. Едномесечна специализация в Университета в Рен 1, Франция: 01.10-30.10.2013 г. при проф. д-р Румен Андонв (IRISA) по проект BG051PO001-3.3.05-0001 „Наука и бизнес“;
3. DAAD Интензивен курс "Numerical Optimization and Applications", 28.05-02.02.2012 г. Нови Сад, Сърбия.
4. DAAD Интензивен курс "Applied Dynamic Programming" 20-26.08.2013 г., Охрид, Македония.
5. Training School „In silico tools for drug discovery”, 15-20.10.2012 г. Сиена, Италия, COST Action CM0801.
6. Участие в ежеседмични семинари по проект „Биоинформатични изследвания върху структурата и активността на протеини и лекарствено-рецепторни взаимодействия ДВУ 01/197”.
7. Участие в практически курсове по проект-ICoSCIS, 2013 г. в ЮЗУ „Н. Рилски”: Programming in C, C++, C#; Introduction to Linux.
8. Участие в Експертната група за програмна акредитация на ОНС „Доктор“ към ПН 4.6.”Информатика и компютърни науки“ при БАН, 12-17.10.2014;

- Институт по математика и информатика;

- Институт по информационни и комуникационни технологии;
 - Институт по биофизика и биомедицинско инженерство.
9. Участие в организационния комитет на Международна конференция „БИОМАТ 2015”, 14-19.06.2015г. УЦ „Бачиново”, Благоевград, България.

ЧЛЕНСТВО В НАУЧНИ ОРГАНИЗАЦИИ:

Членство в Съюза на математиците в България (СМБ)

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящият дисертационен труд е разработен с помощта на специалисти от Центъра за съвременни биоинформатични изследвания и Центъра за функционални изследвания в спорта и кинезитерапията, към ЮЗУ "Н. Рилски" в Благоевград. Тези центрове са създадени и финансирани по проекти DVU 01/197/2008г. от НФ "Научни изследвания" и DOO2-135/2009г. (COST ACTION 0801), ICoSCIS, УМС(Н)А - проекти по ПТС „България-Гърция 2007-2013”.

Издавам своята благодарност на научните ми ръководители проф. д-р Невена Пенчева и проф. д-р Петър Миланов за помощта и подкрепата при разработването и оформянето на настоящия дисертационен труд, както и за съветите, конструктивната критика и търпението, без които този труд ни би бил възможен.

Издавам своята благодарност и на д-р Татяна Дзимбова от ИМБ-БАН, за съдействието ѝ при извършване на експерименталните изследвания и съвместната ни работа при изготвянето на публикации.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Baldi A. (2010). Computational Approaches for Drug Design and Discovery: An Overview, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1, 99-105.
2. Pencheva N., D. Itzev, P. Milanov (1999). Comparison of γ -aminobutyric acid effects in different parts of the cat ileum, *Europ. J. Pharmacol.*, 368, 49-57.
3. Pencheva N., J. Pospisec, L. Nauzerova, T. Barth, P. Milanov (1999). Activity profiles of dalargin and its analogues in μ -, δ - and κ -opioid receptor selective bioassays, *Br. J. Pharmacol.*, 128, 569–576.
4. Pencheva N., Milanov P., Vezenkov L., Pajpanova T., Naydenova E. (2004) Opioid Profiles of Cys2-containing Enkephalin Analogues, *Eur. J. Pharmacol.*, 498, 249-256.
5. Pencheva N., Vezenkov L., Pajpanova T., Naydenova E., Milanov P., (2003) Effects of enkephalin analogues containing modified cysteine in position 2 in hamster vas deferens, *Collect. Czech. Chem., Symp. Series* (Ed.J.Slaninova), 6, 77-80.
6. Pencheva N., Vezenkov L., Naydenova E., Milanov P., Pajpanova T., Malamov S., Bojkova L. (2001). Cys2-containing enkephalin analogues, *Bulgarian Chemical Communications*, 33, 47-58.
7. http://en.wikipedia.org/wiki/John_Newport_Langley.
8. Hill A. (1909). The mode of action of nicotine and curari determined by the form of the contraction curve and the method of temperature coefficients, *J.Physiol*, 39, 361-373.
9. https://en.wikipedia.org/wiki/Riccati_equation.
10. Del Castillo J., B. Katz. (1957). Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives, *Proc. of the Royal Society of London B, Series B*, 146, 369–381.
11. Bairocha A., Apweiler R. (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000, *Nucleic Acids Res*, 28, 45-48.
12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
13. Sanchez R., Sali A. (1997). Advances in comparative protein-structure modelling. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 7, 206–214.
14. <http://www.chemcomp.com/Molecular-Operating-Environment.htm>
15. Sali A. et al. (2014). Modeller: A program for Protein Structure Modelling, Release 9.14, 10167 <https://salilab.org/modeller/9.14>
16. Altschul S., Madden T., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*, 25, 3389–3402.
17. Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.

18. Nicholas H., Graves S. (1983). Clustering of transfer RNA by cell type and amino acid specificity, *Journal of Molecular Biology*, 171, 111-118
19. Chen B., Arendall W., Headd J., Keedy D., Immormino R., Kapral G., Murray L., Richardson J., Richardson D. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallographica*, 1, 12-21
20. Laskowski R., MacArthur M., Moss D., Thornton J. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.*, 26, 283-291.
21. <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>.
22. Sali A., Blundell T. (1993). Comparative Protein Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints, *J. Mol. Biol.*, 234, 779-815.
23. <http://avogadro.openmolecules.net>
24. <https://en.wikipedia.org/wiki/Root-mean-square-deviation-of-atomic-positions>
25. Befort K., Tabbara L., Bausch S., Chavkin C., Evans C., Kieffer B. (1996). The Conserved Aspartate Residue in the Third Putative Transmembrane Domain of the Delta-opioid Receptor is Not the Anionic Counterpart for Cationic Opiate Binding but is a Constituent of the Receptor Binding Site, *Mol Pharmacol*, 49, 216-223.
26. Manglik A., Kruse A., Kobilka T., Thian F., Mathiesen J., Sunahara R., Pardo L., Weis W., Kobilka B., Granier S. (2012). Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist, *Nature*, 485, 321-326.
27. Makino S., Kuntz I. (1997). Automated flexible ligand docking method and its application for database search, *J Comput Chem*, 18, 1812-1825.
28. http://www.clcbio.com/files/usermanuals/MMV_Manual.pdf.
29. <http://www.graphpad.com/scientific-software/prism>
30. <http://www.mathworks.com/help/curvefit/evaluating-goodness-of-fit.html>
31. Akaike H. (1947). A new look at the statistical model identification, *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19, 716-723.
32. Acquah De-Graft H. (2010). Comparison of Akaike information criterion (AIC) and Bayesian information criterion (BIC) in selection of an asymmetric price relationship, *Journal of Development and Agricultural Economics*, 2, 1-6.
33. Zucchini W. (2000). An Introduction to Model Selection, *Journal of Mathematical Psychology*, 44, 41-61.
34. Mavrevski R. (2014). Selection and comparison of regression models: estimation of torque-angle relationships. *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, 67, 1345-1354
35. Milanov P., Pencheva N. (2011). Hyperbolic Model of a Partial Agonism: Explicit Formulas for Affinity, Efficacy and Amplification of Partial Agonists, *Serdica Journal of Computing*, 5, 333-358.

36. Milanov P., Pencheva N. (1999). Pharmacological agonism: mathematical model and explicit approximation of the efficacy and the affinity of agonists. *Proceedings of IV ECMIB Meeting, Theory and Mathematics in Biology and Medicine*, Amsterdam 29 June - 3 July, 348.
37. Black J., Leff P. (1983). Operational models of pharmacological agonist, *Proc R Soc Lond*, 220, 141–162.
38. Agneter E., Singer E., Sanermann W., Fenerstein T. (1998). The Operational model does not reflect the possibility of asymmetrical concentration-response curves, *Trends Pharmacol. Sci.*, 19, 445–446.
39. Barlow R., Bond S., Bream E., Macfarlane L., Mc-Queen D. (1997). Antagonist inhibition curves and the measurement of dissociation constants, *Br. J. Pharmacol.*, 120, 13–18.
40. Colquhoun D. (2006). The quantitative analysis of drug-receptor interactions: a short history. *Trends Pharmacol. Sci.*, 27, 149–57.
41. Colquhoun D. (1998). Binding, gating, affinity and efficacy: The interpretation of structure-activity relationships for agonists and the effects of mutating receptors, *Br. J. Pharmacol.*, 125, 923–947.
42. Colquhoun D., Hawkes A. (1977). Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channel, *Proc. of the Royal Society of London B, Series B*, 199, 231–262.
43. Kenakin T., Watson C., Muniz-Medina V., Christopoulos A., Novick S. (2012). A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci*, 3, 193–203.
44. Mackay D. (1988). Concentration-response curve and receptor classification: null method or operational model? *Trends Pharmacol. Sci.*, 9, 202–205.
45. Furchgott F. (1996). The use of 6-Haloalkylamines in the differentiation of dissociation constants of receptor-agonist complexes, *Adv. Drug Res.*, 3, 21–55.
46. Johansen J., Gibb A. (2010). Textbook of Receptor Pharmacology. *CRC Press*, Thrrd Edition.
47. Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M. (2003). CSWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3381–3385.

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРГИНАЛНОСТ

Декларирам, че настоящата дисертация съдържа оригинални резултати, получени при проведени от мен научни изследвания (с подкрепата и съдействието на научните ми ръководители). Резултатите, които са получени, описани и/или публикувани са описани в раздел „Библиография”.

Настоящата дисертация не е прилагана за придобиване на научна степен в друго висше училище, университет или научен институт.

Подпис:

/Фатима Сапунджи/