بررسی تأثیر نوع حلال بر روی شکل گیری لیپوزوم دوناگزومه (DSPC-CHOL) با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی دانه درشت

جلیل پرچکانی چوزکی و مجید تقدیر*

ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۹

چکیده

لیپوزومها به طور گسترده به عنوان حامل برای تعداد زیادی از مولکولها در مطالعات دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پایداری و شکل‌گیری لیپوزومی، در دارو رسانی، بسیار حیاتی و مهم است و می‌تواند متأثر از ترکیب فسفولیپیدی غشای لیپوزوم باشد. در این تحقیق اثر نوع حلال بر روی شکل‌گیری لیپوزوم دوناگزومه(DSPC-CHOL) بررسی گردید. به این منظور از روش شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. آنالیز تابع توزیع شعاعی که به منظور بررسی شکل‌گیری و توزیع لیپیدها انجام شد، به خوبی نشان داد که لیپورزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی ساختار نانودیسکی متراکم و در محیط آب غیرقطبی ساختار کروی لیپوزومی را ایجاد کرده و فسسفولیپدها با توزیع همگنی در کنار یکدیگر تجمع یافته‌اند. آنالیز ناحیه سطح در دسترس حلال دارای نمودار با روند نزولی است که بیانگر تجمع فسفولیپیدها در کنار همدیگر و ایجاد ساختار نهایی است. آنالیز چگالی و شعاع ژیراسیون نیز به خوبی نشان دادند که ساختارهای نهایی لیپوزوم دوناگزومه در هر دو محیط تشکیل شده است. به دلیل خواص شیمی-فیزیکی فسفولیپید ۱و۲-دی استئارویل-اس ان-گلیسرو۳--فسفوکولین، این فسفولیپید تمایل به ایجاد ساختار لیپوزوم کروی دارد. ولی نوع حلال (محیط آب قطبی) باعث شد که این لیپید در محیط آب قطبی ساختار نانودیسک دایره‌ای ایجاد کند. طبق مقالات ارائه شده قبلی و یافته های این تحقیق، آب قطبی نسبت به آب غیرقطبی با نیروی بیشتری مولکولهای لیپید را مجبور می‌کند تا کنار هم تجمع یابند و همین عامل باعث می‌شود که مولکولهای لیپید در آب قطبی ساختار نانودیسک دایره‌ای ایجاد کنند.

واژه های کلیدی: شبیه سازی دینامیک مولکولی، تجمع لیپوزوم، فسفولیپیدها، شکل گیری لیپوزومها

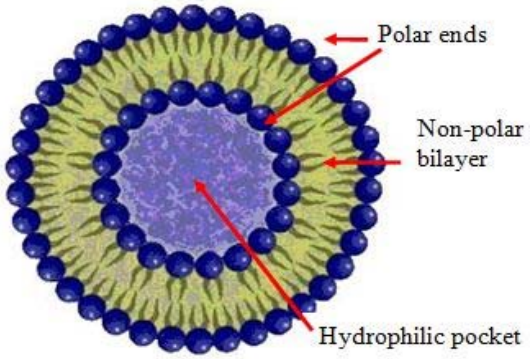
* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۱۷ ، پست الکترونیکی: taghdir@modares.ac.ir

مقدمه

لیپوزومها، ذرات کلوئیدی فسفولیپیدی هستند که بیش از ۴۵ سال زمینه تحقیقات گسترده‌ای برای محققان علاقه مند به این حوزه بوده است. امکان حضور ساختارهای وزیکول مانند، در سیستمهای آبی حاوی مولکولهای آمفی پاتیک اولین بار به وسیله Bernard هنگام مطالعات میکروسکوپی اشکال میلین تشکیل شده با آمونیوم اولئات در آب در سال ۱۹۴۷ فرض گردید (۱). در سال ۱۹۶۲، A.D.Bangham و همکارش R.W.Home با استفاده از میکروسکوپ الکترونی در کمبریج، پراکندگی فسفولیپیدها را در آب به وسیله رنگ آمیزی منفی با استفاده از سدیم فسفوتنگستات و آمونیوم مولیبدات بررسی کردند (۲) و شواهد آزمایشات نهایی‌اشان نشان می‌داد که فسفولیپید به طریق خود مونتاژی تشکیل ساختار کروی مانندی می‌دهد که آنها را بنگوزوم نامیدند.که زنجیره‌های اسید چرب آبگریز به سمت داخل و محیط آبگریز قرار می‌گیرند و سرهای قطبی به سمت محیط آبدوست در بیرون قرار می‌گیرند. سپس Gregory محقق یونانی پیشنهاد کرد که از لیپوزومها می توان به عنوان حامل‌های مواد دارویی استفاده کرد (۳). سپس به

تدریج لیپوزومهایی طراحی شدند که قادر بودند مقدار بیشتری از مواد دارویی را در خود ذخیره کرده و حمل کنند و قادر بودند که مواد دارویی را به صورت همگن و مداوم در بافت هدف آزاد کنند. سپس گزارشهایی از کاربرد لیپوزومها در حمل داروهای ضد سرطانی و همچنین کاربرد آنها در تشخیص سرطان ارائه شد. بعد به زودی مشخص شد که در نسل اول لیپوزومهای طراحی شده، وقتی لیپوزوم مورد نظر در معرض پروتئینهای سرمی قرار می گیرد به علت پایداری کم باعث نشت مواد دارویی از لیپوزوم به بیرون می شود، که طی گزارشی که ارائه شد با وارد کردن کلسترول و اسفنگومیلین در ساختار لیپوزوم می توان از نشت مواد دارویی به بیرون لیپوزوم جلوگیری کرد. سپس مقالاتی ارائه شدند که بیان می‌داشتند که با افزایش پایداری لیپوزومها می توان کارآیی لیپوزومها در انتقال دارو را افزایش داد. ولی اینکه آیا پایداری لیپوزومی مقدار بیشینه دارد یا هرچه بیشتر باشد بهتر است و اینکه این پایداری چگونه تحت تأثیر ترکیبات مختلف فسفولیپیدی قرار می گیرد در این تحقیق مورد مطالعه است. این تحقیق قصد دارد مفهوم دیگر نفوذ داروها در لیپوزومها را که مشابه غشاهای زیستی غشاء لیپوزومی است و نیز نفوذ پذیری کمتری نسبت به داروهای آبدوست دارند را مورد بررسی قرار دهد. در سالهای اخیر مقالاتی منتشر شدند که مشخص می‌کردند که با استفاده از شیب تغییرات PH در داخل غشای لیپوزوم که در پاسخ به بافر اسیدی داخل لیپوزوم تولید می‌شود، می توان بارگذاری داروهای آبدوست به داخل لیپوزوم را انجام داد. نکته ای که وجود دارد این است که با افزایش سیالیت غشاء می‌توان تا حدودی نفوذپذیری داروها را در لیپوزوم افزایش داد. از آنجایی که سیالیت یا به طور کلی خواص فیزیکی غشای لیپوزوم وابسته به ترکیب فسفولیپیدی لیپوزوم است، در این تحقیق تأثیر ترکیبات مختلف فسفولیپیدی بر روی نفوذ دارو در لیپوزوم مورد مطالعه است و سعی می شود از این تأثیر در جهت انتقال داروی کارآمد استفاده شود (۳، ۴، ۵، ۶ و ۷).

لیپوزوم عبارت است از یک وزیکول میکروسکوپی شامل دو لایه فسفولیپیدی که یک فضای آب را احاطه نموده است. ضخامت این لیپید دولایه به طور معمول بین ۳ تا ۶ نانومتر است و لیپوزومهای تشکیل شده از آنها می توانند قطری بین ۲۰ میکرومتر تا ۵۰ نانومتر داشته باشند. لیپوزومها به دلیل خاصیت آمفی پاتیک (دوگانه دوست) عناصر سازنده آن، امکان دارورسانی داروهای آبدوست و یا چربی دوست را فراهم می نمایند. این ساختارهای ریز و کیسه مانند، شبیه بستها یا کپسولهایی هستند که می‌توانند با به دام انداختن دارو در درونشان (انکپسولاسیون) برای حمل دارو به نقاط مختلف بدن مورد استفاده قرار گیرند (۸ و ۹).



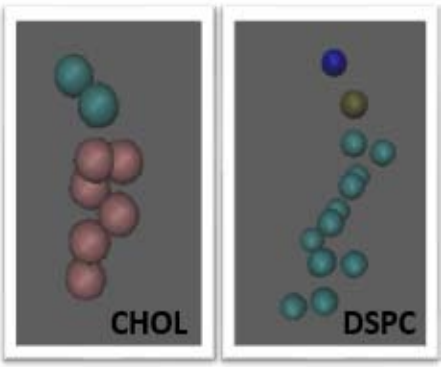
شکل ۱- ساختار کروی لیپوزوم (۱۳)

اجزای اصلی تشکیل دهنده ساختار لیپوزومها فسفولیپیدها و کلسترول هستند. معمولاً در ساختار لیپوزومها میزان فسفولیپیدها بیشتر از کلسترول در نظر گرفته می شوند. فسفولیپیدها مولکولهای اصلی تشکیل دهنده ساختار لیپوزومها می باشند و بدنه اصلی لیپوزومها را تشکیل می دهند. فسفولیپیدها با توجه به ماهیت وساختار دوگانه دوستی که دارند، زمانی که به یک غلظت خاصی برسند تشکیل ساختارهای کروی مانندی را می‌دهند که لیپوزوم نامیده می‌شوند. در واقع نقش اصلی فسفولیپیدها شروع فرایند شکل گیری لیپوزومهاست. ماهیت دوگانه دوستی

لیپوزومها ساختار اولیه حاصل از آرایش لیپیدها را به سوی تشکیل لیپوزوم کروی سوق می‌دهد. جزء دوم تشکیل دهنده ساختار لیپوزومها مولکول کلسترول است که باعث استحکام ساختار لیپوزومهای تشکیل شده می‌گردد. در واقع کلسترول به خاطر ساختار مولکولی و با استفاده از حلقه‌های آبگریز خود بین غشای دو لایه لیپوزوم قرار می گیرد و با میانکنشهایی که با مولکولهای فسفولیپید مجاور برقرار می‌کند، یک اثر تثبیتی بر روی لیپوزوم ایجاد شده دارد. یکی از عواملی که بر روی شکل‌گیری و پایداری لیپوزوم مؤثر است نوع فسفولیپید به کار رفته درساختار آن می‌باشد. با توجه به اینکه هر یک از فسفولیپیدها خواص شیمی–فیزیکی خاص خود را دارند، تأثیر آنها در شکل گیری و پایداری لیپوزومی نیز متفاوت است. لذا برای ساخت لیپوزومی با پایداری مناسب، باید فسفولیپید (های) خاصی استفاده شود. همچنین در ساخت لیپوزومها باید غلظت خاصی از فسفولیپیدهای مناسب استفاده شوند تا در نهایت لیپوزومی با شکل مناسب و پایداری بهینه به دست آید. به علاوه ویژگیهای حلال مورد استفاده نیز از عوامل مؤثر که بر روی شکل گیری لیپوزومهای خاص است که در سیستم شبیه‌سازی نیز مد نظر قرار می گیرد. لذا در این مطالعه تأثیر نوع حلال بر شکل گیری لیپوزم دوناگزومه بررسی گردید. به این منظور شکل گیری لیپوزوم دوناگزومه یکبار در محیط آب غیرقطبی و بار دیگر در بستر آب قطبی مورد شبیه سازی قرار گرفت. روش مورد استفاده در این مطالعه شبیه سازی دینامیک مولکولی دانه درشت است که با استفاده از نرم افزار شبیه سازی گرومکس ورژن ۵,۱ صورت گرفت (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶).

مواد و روشها

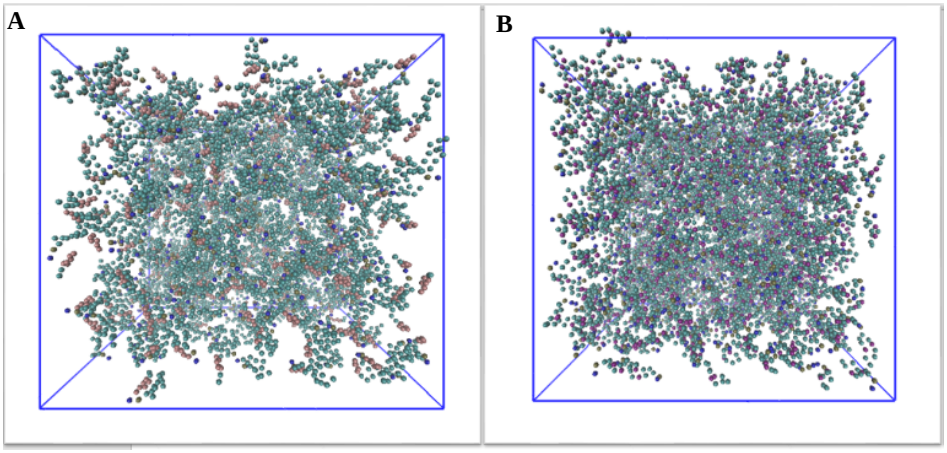
دریافت داده ساختاری: مختصات داده اولیه اجزاء لیپیدی لیپوزوم دوناگزومه (شامل لیپید ۱و۲–دی استئارویل–اس ان–گلیسرو۳––فسفوکولین و مولکول کلسترول) به صورت حالت دانه درشت از وب سرور CHARMM-gui دریافت شد (شکل۱). در واقع ساختار اولیه از لیپوزوم مورد نظر در این وب سرور ساخته شد ولی فقط یک عدد از ساختار هر کدام از لیپید DSPC و مولکول کلسترول در اول شبیه سازی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین از این سایت فایلهای پارامتر(شامل فایلهای ITP و TOP) دریافت شد که برای شبیه سازی اصلی در محیط گرومکس نیاز بودند (۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰).



شکل ۲– ساختار دانه درشت مولکولهای ۱و۲–دی استئارویل–اس ان–گلیسرو۳––فسفوکولین و کلسترول که از سایت CHARMM به دست آمده است.

ایجاد جعبه و آب پوشی ساختار لیپوزومی: با استفاده از نرم افزار گرومکس برای لیپوزوم دوناگزومه در هر دو محیط شبیه سازی با آب قطبی و غیرقطبی جعبه شبیه سازی تعریف شد. نوع جعبه ایجاد شده در هر محیط به صورت مکعبی و در ابعاد۲۰*۲۰*۲۰ نانومتر تعریف شد. البته در محیط شبیه سازی آب غیرقطبی بعد عرضی جعبه (محور x) به اندازه ۶۰ نانومتر تعریف شد. فاصله غشاء یا ساختار ایجاد شده از کناره های جعبه ۰/۳ نانومتر در نظر گرفته شد. تعداد ۶۰۱ مولکول ۱و۲–دی استئارویل–اس ان–گلیسرو۳––فسفوکولین ، ۳۰۰ مولکول کلسترول و۶۰۳۱۱ مولکول آب، برای لیپوزوم دوناگزومه در هر دو محیط اضافه شد. (شکل۲). این پارامترها بر اساس مقاله-های تجربی است که لیپوزومهای مذکور را با نسبت و غلظت بیان شده، در آزمایشگاه سنتز می‌کنند. (۲۱، ۲۲، ۲۳،

۲۴، ۲۵ و ۲۶) مولکولهای آب به منظور آب‌پوشی سیستم اضافه شدند. نوع آب مورد استفاده در این تحقیق آب حالت دانه درشت و از نوع قطبی و غیرقطبی است. لازم به ذکر است برای شبیه سازی آب قطبی از میدان نیروی martini_v2.xPاستفاده می شود که متفاوت از میدان نیروی مورد استفاده برای آب غیر قطبی است (۲۶-۳۲).



شکل ۳- جعبه شبیه سازی تعریف شده برای لیپوزوم دوناگزومه: مولکولهای ۱و۲-دی استئارویل-اس ان-گلیسرو۳--فسفوکولین و کلسترول اضافه شده در داخل جعبه شبیه‌سازی A) لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی و B) لیپوزوم دوناگزومه در محیط اب غیرقطبی نشان داده شده‌اند.

مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: در این تحقیق دو فرایند شبیه سازی دینامیک مولکولی انجام شد. هر دو شبیه سازی بر روی لیپوزوم دوناگزومه صورت گرفت. شبیه سازی اول در محیط آب قطبی و شبیه سازی دوم در کنار آب غیر قطبی صورت گرفت و مدت شبیه سازی در هر کدام از محیطها برابر ۱۰۰۰ نانوثانیه (۱میکروثانیه) است. تمام شبیه‌سازی‌ها با نرم افزار گرومکس(Gromacs) و میدان نیروی Martini نسخه ۲/۲ انجام شد. مرحله بهینه-سازی انرژی،۳۰۰۰ گام و همین‌طور تعادل‌رسانی در حجم ثابت برای تنظیم دما در ۴۰۰ درجه کلوین و تعادل‌رسانی در فشار ثابت برای تنظیم فشار، در فشار یک اتمسفر، و هر کدام به مدت ۱ نانوثانیه صورت گرفت. بعد از این مراحل، مرحله شبیه‌سازی اصلی (مرحله تولید) به مدت ۱ میکروثانیه انجام شد. همچنین مقدار هر گام زمانی (تایم استپ) در مرحله تولید ۲۰ فمتو ثانیه تنظیم شد (شکل ۳).

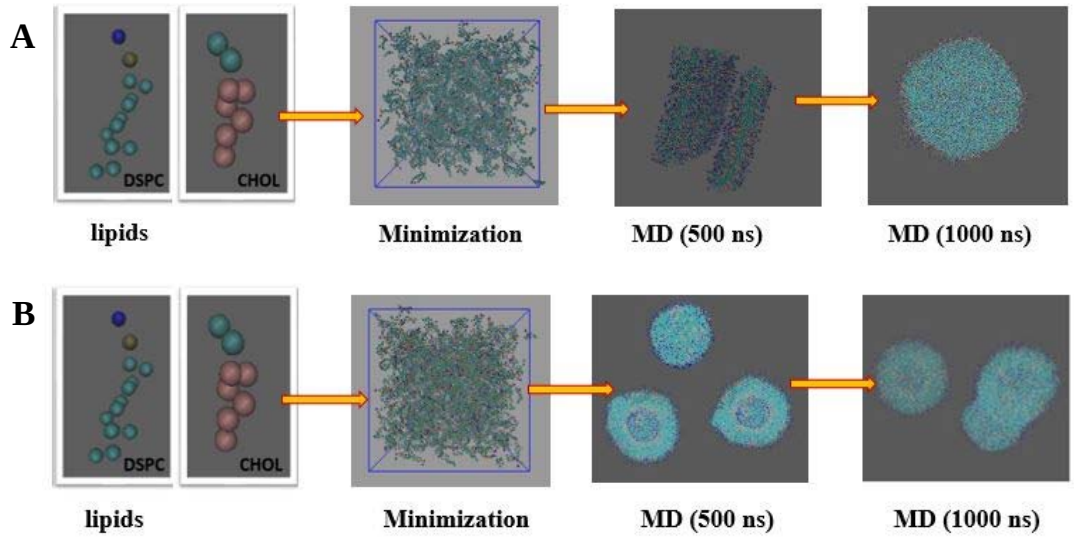
آنالیز نتایج حاصل از شبیه سازی دینامیک مولکولی: بعد از اتمام مراحل شبیه سازی، نتایج حاصل در فایلهای خروجی (فایلهای EDR,TPR,XTC,GRO و ...) به دست آمدند. نتایج حاصل به منظور بررسی شکل گیری ساختارهای لیپوزمی مورد استفاده قرار گرفتند که شامل آنالیزهای غلظت، شعاع ژیراسیون، تابع توزیع شعاعی و ناحیه سطح در دسترس حلال می‌باشند. همچنین آنالیز انرژی کل نیز صورت گرفت.

نتایج و بحث

امروزه مطالعات و پژوهشهای تئوری و تجربی زیادی به بررسی شکل گیری لیپوزومها می‌پردازند. لیپوزومها به صورت تجربی در آزمایشگاهها سنتز می‌شوند، با این حال سنتز این حاملها که هزینه سنتزشان بالا بوده و موادی که در تکنولوژی لیپوزومها مورد استفاده قرار می‌گیرند، موادی با قیمت بالا هستند نیاز به تعریف کم و کیف ساخت لیپوزومها با ساختار، پایداری و کارآییهای خاص را ضروری می نماید. از طرف دیگر نیاز روز افزونی به استفاده از لیپوزومهای بهینه و پایدار و با اطلاعات کاملی از آرایش مولکولی درآنها به وجود آمده است. این نیاز باعث شده است که استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی در این حیطه بسیار اهمیت یابد. در واقع شبیه سازی دینامیک

مولکولی به عنوان یک مطالعه اولیه و تکمیلی کمک می‌کند تا روند شکل گیری لیپوزومها مورد بررسی قرار گیرد. با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی می‌توان تأثیر عوامل مختلف بر روی شکل گیری لیپوزومها را مورد بررسی قرار داد تا در نهایت بتوان یک لیپوزوم ایده آل را سنتز کرد. همچنین با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی می‌توان سهم هر یک از میانکنشهای پیوندی و غیرپیوندی در تشکیل لیپوزومها را به دست آورد. و در نهایت با کسب چنین نتایجی می‌توان لیپوزومها را با هزینه کمتر و صرفه جویی در مواد، سنتز کرد.

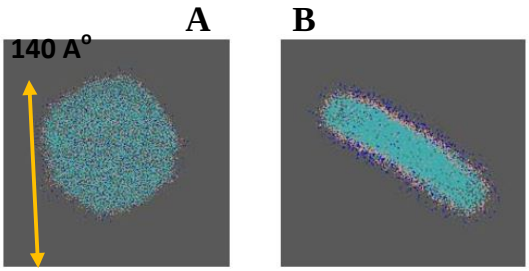
در این تحقیق هدف اصلی بررسی اثر حلال بر روی شکل گیری ساختارهای لیپوزومی به صورت شبیه سازی است که به این منظور از شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد و برای انجام این رویکرد از لیپوزوم دوناگزومه انتخاب شدند. لیپوزوم دوناگزومه به صورت تجربی سنتز می‌شود و یکی از حاملهای مهم دارویی است که برای حمل انواع داروها، به خصوص داروهای ضد سرطانی مورد استفاده قرار می گیرد. در این تحقیق مبحث اصلی مورد بررسی، مطالعات ساختاری و شکل‌گیری لیپوزومهاست. با استفاده از دادهای حاصل از فایل مسیر شبیه سازی، پارامترهای مؤثر در شکل‌گیری و ساختار استخراج شدند و نتایج به دست آمده حاکی از تفاوتهایی در شکل گیری لیپوزوم دوناگزومه در دو محیط نسبت به یکدیگر بود (۱ و ۲). شکل ۴ مراحل شکل گیری لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی و غیرقطبی را نشان می‌دهد. در شکل ۴-A مشخص است لیپوزوم دوناگزومه در آب قطبی بعد از ۵۰۰ نانوثانیه دو ساختار دولایه غشاء مانند و بعد از ۱۰۰۰ نانوثانیه یک نانودیسک کروی ایجاد کرده است. در محیط آب غیرقطبی بعد از ۵۰۰ نانوثانیه ۳ لیپوزوم کروی ایجاد کرده که بعد از سپری شدن زمان شبیه سازی (۱۰۰۰ نانوثانیه)، لیپوزومها با هم ادغام شده و در نهایت دو لیپوزوم کروی ایجاد شده است.



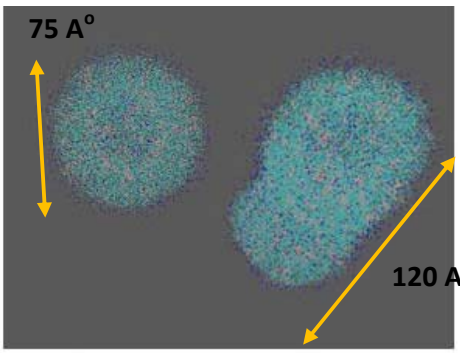
شکل ۴- مراحل شکل گیری لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب A) قطبی و B) غیرقطبی

شکلهای ۵ و ۶ ساختارهای نهایی ایجاد شده بعد از ۱ میکروثانیه شبیه سازی، در هر دو محیط را نشان می‌دهد. همان طور که در شکل ۵ و ۶ مشخص است لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی ایجاد یک ساختار دایره‌ای نانودیسکی و در محیط آب غیرقطبی دو ساختار لیپوزومی کروی ایجاد کرده است. اندازه نانودیسک ایجاد شده در آب قطبی حدود ۱۴۰ آنگستروم (۹ نانومتر) و اندازه دو لیپوزوم کروی ایجاد شده در آب غیرقطبی برابر ۱۲۰ و ۷۵

آنگستروم است. همچنین با استفاده از نرم افزار YASARA تعداد مولکولهای لیپید در هر یک از ساختارهای ایجاد شده به دست آمد. ساختار نانودیسک در محیط قطبی، ۵۶۲ مولکول ۱و۲-دی استئارویل-اس ان-گلیسرو۳--فسفوکولین و ۲۸۷ کلسترول دارد و مابقی مولکولها در محیط پخش هستند. در محیط غیرقطبی لیپوزوم کروی کوچک ۲۳۰ مولکول ۱و۲-دی استئارویل-اس ان-گلیسرو۳--فسفوکولین و ۱۲۳ کلسترول و لیپوزوم بزرگ ۳۶۷ مولکول ۱و۲-دی استئارویل-اس ان-گلیسرو-۳-فسفوکولین و ۱۶۶ کلسترول دارد.



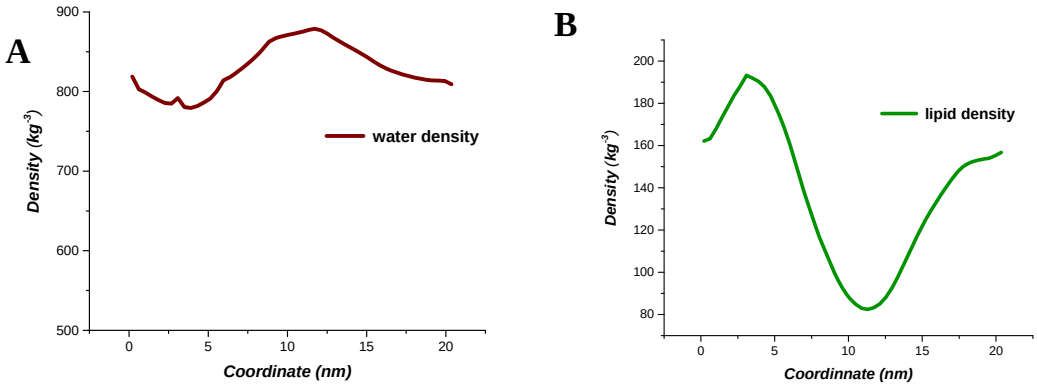
شکل ۵- ساختار نهایی لیپوزوم دوناگزومه در محیط شبیه-سازی آب قطبی،لیپوزوم ساختار نانودیسک دایره ای به صورت A) نمای بالایی B) نمای جانبی نشان داده شده است



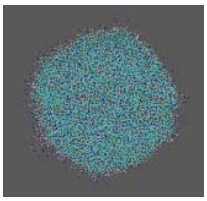
شکل ۶- ساختار نهایی لیپوزوم دوناگزومه در محیط شبیه-سازی آب غیرقطبی، دو ساختار لیپوزومی کروی ایجاد شده نشان داده شده است.

لیپوزوم دوناگزومه دارای لیپید DSPC است که ساختار هندسی استوانه‌ای داشته و دارای گروه سری قطبی با اندازه کوچک بوده، و باعث می شود لیپوزوم دوناگزومه تمایل به ایجاد ساختار نانودیسکی دایره ای داشته باشد. لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی ساختار نانودیسک دایره‌ای ایجاد کرد، در حالی که در محیط آب غیر قطبی ساختار لیپوزومی کروی بوجود آورد. طبق نتایج مشاهده شده و مقالات ارائه شده قبلی (۳۳-۳۷)، آب غیرقطبی با تأثیر بر مولکولهای ۱و۲-دی استئارویل-اس ان-گلیسرو-۳فسفوکولین و کلسترول، این مولکولها را به سمت تشکیل لیپوزوم کروی سوق می‌دهد. در هر دو محیط آب قطبی و غیر قطبی ساختار لیپوزومی که مورد شبیه سازی قرار گرفت، مولکولهای کلسترول نیز حضور داشتند. مولکولهای کلسترول بعد از شکل‌گیری ساختارهای نهایی نانودیسکی دایره‌ای و لیپوزوم کروی، بین مولکولهای ۱و۲-دی استئارویل-اس ان-گلیسرو۳--فسفوکولین قرار گرفته و موجب پایداری و تثبیت ساختارهای ایجاد شده می‌شوند. همچنین طبق مقالات ارائه شده، کلسترول موجود در ساختارهای ایجاد شده توانایی ایجاد پیوند هیدروژنی با لیپید مجاور خود را داشته و از این طریق باعث افزایش پایداری ساختار مورد نظر می شود (۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴ و ۴۵).

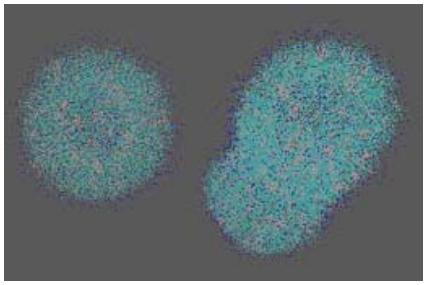
آنالیز چگالی برای بررسی تشکیل ساختارهای ایجاد شده در داخل جعبه برای بررسی چگالی مولکول زیستی مورد نظر و همچنین مولکولهای آب انجام گرفت. در نمودارهای تعیین چگالی، محور عمودی بیانگر چگالی مولکول زیستی مورد نظر و محور افقی بیانگر ابعاد جعبه شبیه سازی است. شکل ۷ آنالیز چگالی برای لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی را نشان می‌دهد و همان طور که مشخص است آنالیز چگالی برای مولکولهای لیپید و آب کاملاً مطابق ساختار نانودیسکی دایره‌ای ایجاد شده توسط لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی است(۴۶، ۴۷، ۴۸ و ۴۹).

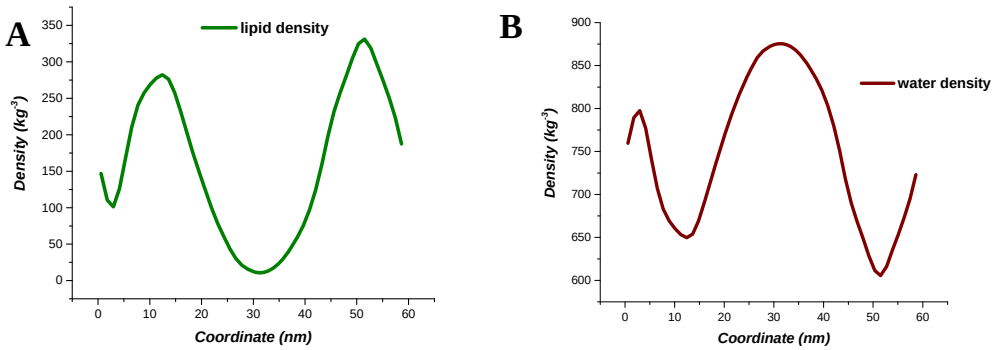


شکل ۷- آنالیز چگالی برای بررسی شکل گیری ساختارهای ایجاد شده لیپوزوم دوناگزومه و با هدف به دست آوردن غلظت مولکولهای آب و لیپید . نتایج آنالیز چگالی در محیط آب قطبی A) غلظت مولکولهای لیپید B) غلظت مولکولهای آب نشان داده شده است.



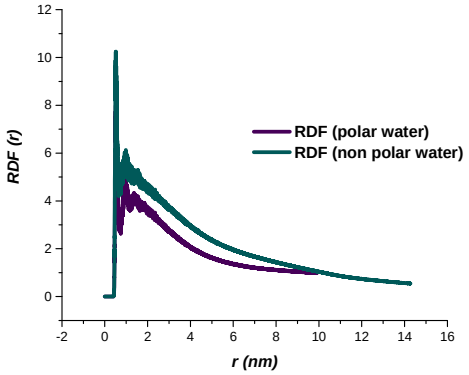
آنالیز چگالی برای لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب غیر قطبی نیز انجام شد. آنالیز چگالی به خوبی بیانگر این است که لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب غیر قطبی ساختارهای لیپوزومی کروی ایجاد کرده است. در شکل ۸ چگالی مولکولهای لیپید و آب غیر قطبی نشان داده شده است.





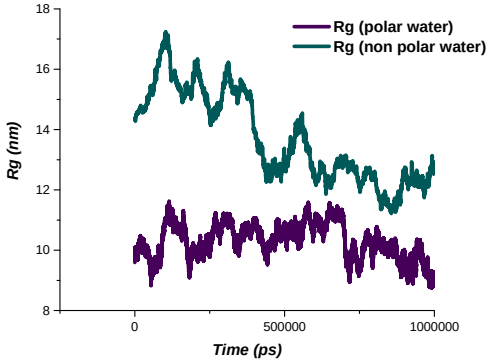
شکل ۸- آنالیز چگالی برای بررسی شکل گیری ساختارهای ایجاد شده لیپوزوم دوناگزومه و با هدف به دست آوردن غلظت مولکولهای آب و لیپید. نتایج آنالیز چگالی در محیط آب غیرقطبی A) غلظت مولکولهای لیپید B) غلظت مولکولهای آب نشان داده شده اند.

آنالیز تابع توزیع شعاعی برای توصیف ساختار متوسط از یک مولکول دینامیک به کار می‌رود. تابع توزیع شعاعی یک روش اصلی برای اندازه گیری ساختار یک ماده چگال است. آنالیز تابع توزیع شعاعی برای بررسی شکل‌گیری و توزیع لیپیدها انجام شد. این آنالیز نشان داد لیپوزوم دوناگزومه در هر یک از محیطهای آب قطبی و غیر قطبی ساختار نهایی (در محیط آب قطبی نانودیسک دایره‌ای و محیط غیر قطبی لیپوزوم کروی) را ایجاد کرده است (شکل ۹).



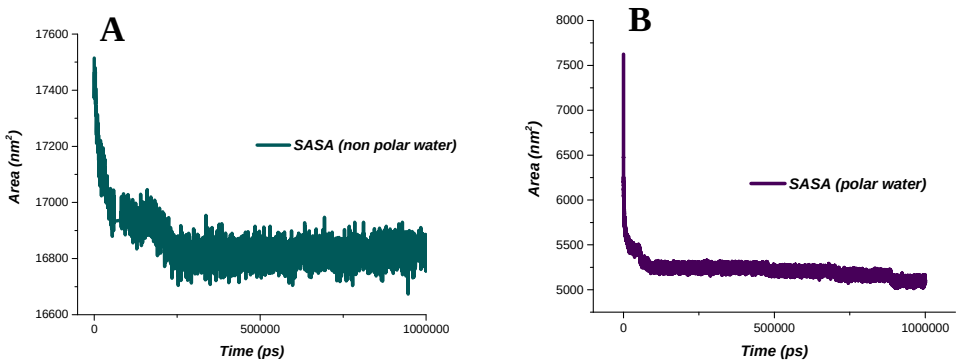
شکل ۹- آنالیز تابع توزیع شعاعی برای لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی و آب غیر قطبی که بیانگر شکل‌گیری ساختارهای نانودیسک دایره‌ای و لیپوزوم کروی است.

نمودار شعاع ژیراسیون برای هر کدام از ساختارهای لیپوزومی به دست آمد تا تغییرات فشردگی ساختار در طی زمان شبیه سازی مورد بررسی قرار گیرد. همان طور که در شکل ۱۰ مشخص است آنالیز شعاع ژیراسیون نشان می‌دهد که لیپوزوم دوناگزومه در هر دو محیط آب قطبی و غیر قطبی دچار فشردگی شده است. نکته‌ای که باید در نظر داشت این است که میزان شعاع ژیراسیون لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب غیر قطبی بیشتر از آب قطبی است. همچنین در آب غیرقطبی کاهش چشم‌گیری در میزان شعاع ژیراسیون در طی زمان شبیه سازی دیده می‌شود. به نظر می‌رسد ساختارهای لیپوزومی کروی ایجاد شده در محیط آب غیر قطبی فشرده‌تر از ساختارهای نانودیسکی دایره‌ای در محیط آب قطبی است (۵۰ و ۵۱)



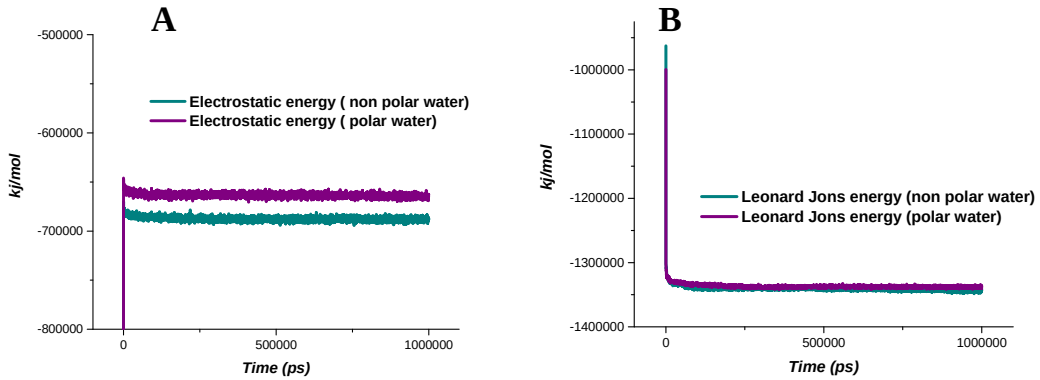
شکل ۱۰- آنالیز شعاع ژیراسیون برای لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی و آب غیر قطبی

ناحیه سطح در دسترس حلال یا SASA (Solvent accessible surface area) ، سطح یک بیومولکول یا ترکیب شیمیایی است که به حلال دسترسی دارد. اندازه‌گیری ناحیه سطح در دسترس معمولاً در واحد آنگستروم مربع یا نانومتر مربع تعریف می‌شود. طبق مقالات ارائه شده با شکل‌گیری لیپوزومها و ساختارهای غشایی از میزان ناحیه سطح در دسترس حلال کاسته می‌شود (۵۲). در واقع با نزدیک شدن لیپیدها به یکدیگر از میزان سطح در دسترس لیپیدها برای مولکولهای آب کاسته شده و در نتیجه در نمودار مربوطه از میزان ناحیه سطح در دسترس حلال کاسته می‌شود. شکل ۱۱ آنالیز ناحیه سطح در دسترس حلال برای لیپوزوم دوناگزومه در هر دو محیط آب قطبی و غیر قطبی را نشان می‌دهد. برای لیپوزوم دوناگزومه در هر دو محیط آب قطبی و غیرقطبی در طی روند شبیه سازی از میزان سطح در دسترس حلال کاسته می‌شود که بیانگر این مطلب است که هر کدام از ساختارهای نانودیسک دایره‌ای و لیپوزوم کروی تشکیل شده‌اند (۵۲ و ۵۳).

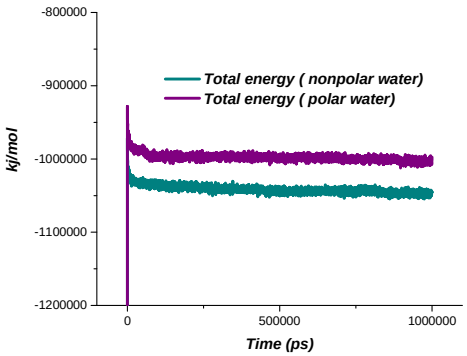


شکل ۱۱-آنالیز ناحیه سطح در دسترس حلال برای لیپوزوم دوناگزومه در A) محیط آب قطبی و B) آب غیر قطبی

در رابطه با بحث انرژیها و نقش آنها در شکل گیری و پایداری لیپوزوم دوناگزومه، آنالیزهای انرژی صورت گرفت. انرژی کل، انرژی واندروالسی و انرژی الکترواستاتیک نشان دادند که لیپوزوم دوناگزومه در هر یک از محیطهای آب قطبی و غیرقطبی به ساختار پایداری رسیده است. در هر یک از این انرژیها ابتدا میزان انرژی کم است و سپس با تشکیل میانکنشها به میزان انرژیها افزوده می‌شود. (شکل ۱۲ و ۱۳)



شکل ۱۲- انرژی میانکنشهای A) لئونارد-جونز(واندروالسی) B) الکترواستاتیک(کولومبی). نشان دهنده تشکیل و پایداری ساختارهای لیپوزومی و نانودیکسی است.



شکل ۱۳- انرژی کل لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی و غیرقطبی. نشان دهنده تشکیل و پایداری ساختارهای لیپوزومی و نانودیکسی است.

نتیجه‌گیری

لیپوزومها حاملهایی هستند که در زیست شناسی و پزشکی کاربردهای زیادی دارند و به عنوان حامل برای خیلی از داروها و مولکولهای زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند و برای این منظور لیپوزومها باید دارای شکل مناسبی باشند. لذا امروزه مطالعات و پژوهشهای تئوری و تجربی زیادی به بررسی شکل گیری و حتی به پایداری لیپوزومها می‌پردازند. شبیه سازی دینامیک مولکولی به عنوان روشی که از اصول کمی ریاضی بهره می‌گیرد، روشی تکمیلی برای بررسی دینامیک و مکانیسم ماکرومولکولها و پدیده‌های زیستی است. در این تحقیق اثر نوع حلال شبیه سازی(آب قطبی و غیرقطبی) بر روی شکل‌گیری لیپوزوم دوناگزومه مورد مطالعه قرار گرفت. لیپوزوم دوناگزومه دارای مولکولهای کلسترول و ۱و۲-دی استئارویل-اس ان-گلیسرو۳--فسفوکولین است. آنالیز تابع توزیع شعاعی که به منظور بررسی شکل‌گیری و توزیع لیپیدها انجام شد، به خوبی نشان داد که لیپورزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی ساختار نانودیسکی متراکم و واحد و در محیط آب غیرقطبی ساختار کروی لیپوزومی را ایجاد کرده و فسسفولیپیدها با توزیع همگنی در کنار یکدیگر تجمع یافتند. آنالیز ناحیه سطح در دسترس حلال نموداری با روند نزولی به دست داد که بیانگر تجمع فسفولیپیدها در کنار همدیگر و ایجاد ساختار نهایی است. همچنین آنالیز چگالی و شعاع ژیراسیون نیز به خوبی نشان دادند که ساختارهای نهایی لیپوزوم دوناگزومه در هر دو محیط تشکیل شده است. نتایج و آنالیزهای به دست آمده از مطالعه شبیه سازی دینامیک شکل گیری لیپوزوم دوناگزومه نشان داد که لیپوزوم دوناگزومه در محیط آب قطبی ساختار نانودیسک کروی و در محیط آب غیرقطبی ساختار کروی لیپوزومی ایجاد کرده است. به دلیل خواص شیمی-فیزیکی فسفولیپید ۱و۲-دی استئارویل-اس ان-گلیسرو۳--فسفوکولین، این فسفولیپید تمایل به ایجاد ساختار لیپوزوم کروی دارد. ولی نوع حلال (محیط آب قطبی) باعث شد که این لیپید در محیط آب قطبی ساختار نانودیسک دایره‌ای ایجاد کند. طبق مقالات ارائه شده قبلی و یافته های این تحقیق، آب قطبی نسبت به آب غیرقطبی با نیروی بیشتری مولکولهای لیپید را مجبور می‌کند تا کنار هم تجمع یابند و همین عامل باعث می‌شود که مولکولهای لیپید در آب قطبی ساختار نانودیسک دایره‌ای ایجاد کنند. به نظر می‌رسد که ساختارهای نانودیسک دایره‌ای نسبت به ساختارهای لیپوزمی کروی در یک حجم معین دارای مولکولهای فسفولیپید بیشتری بوده و در نتیجه چگال تر هستند. آنالیزهای انرژی شامل انرژی کل، انرژی میانکنشهای واندروالس و الکترواستاتیک نشان دادند لیپوزوم دوناگزومه در هر یک از محیطهای آب قطبی و غیر قطبی به خوبی تشکیل ساختار داده است و پایدار شده است. به علاوه مولکول کلسترول (حلقه‌های آروماتیک) با فسفولیپیدهای مجاور میانکنشهای واندروالسی برقرار می‌کند که توزیع و جهت‌گیری مناسب میانکنشهای آبگریز بین مولکولهای فسفولیپید و کلسترول نیز سهم عمده‌ای در پایداری ساختار مورد نظر دارد.

منابع

۱- مریم کته شمشیری، مهوش خدابنده و همکاران، تابستان ۱۳۹۵، تأثیر سونیکاسیون برابعاد ترانسفرزوم حاوی هورمون رشد، مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران) ، مقاله ۷، دوره ۲۹، شماره ۲، صفحه ۲۰۹-۲۱۷

۲- غلامحسین صدیفیان ، حسین رضایی مارنانی، فریبا رزمی منش، خرداد ۱۳۹۶ ، بررسی نفوذ داروهای آسپیرین و ایبوپروفن در غشاء دولایه لیپیدی به کمک شبیه سازی دینامیک مولکولی، مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران) ، انتشار آنلاین از تاریخ ۲۳ خرداد ۱۳۹۶

3- Allen, T.M. and P.R. Cullis, 2013, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical

applications. Advanced drug delivery reviews. 65(1): p. 36-48.

4- Allen, T. and C. Hansen, 1991, Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1068(2): p. 133-141.

5- Akbarzadeh, A., et al. , 2013, Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Res Lett. 8(1): p. 102.

6- Arasteh, S. and M. Bagheri, 2017, Molecular Dynamics Simulation and Analysis of the Antimicrobial Peptide–Lipid Bilayer Interactions. Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols. : p. 103-118.

7- Bhandari, N.S., et al. , 1997, Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. Nature biotechnology. 15(7): p. 647-652.

8- Bhattacharya, S. and S. Haldar, 2000, Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain–backbone linkage. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1467(1): p. 39-53.

9- Bochicchio, D. and G.M. Pavan,2016, From Cooperative Self-Assembly to Water-Soluble Supramolecular Polymers Using Coarse-Grained Simulations. ACS nano. 11 (1), pp 1000–1011

10- Briuglia, M.-L., et al.,2015, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. Drug delivery and translational research. 5(3): p. 231-242.

11- Butts, C., et al. , 2005, Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non–small-cell lung cancer. Journal of Clinical Oncology. 23(27): p. 6674-6681.

12- Cattel, L., M. Ceruti, and F. Dosio, 2002, From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. Tumori. 89(3): p. 237-249.

13- Chng, C.-P.,2015, Effect of simulation temperature on phospholipid bilayer–vesicle transition studied by coarse-grained molecular dynamics simulations. Soft Matter ;(۳۰)۹ ،۳p. 7294-7301.

14- Chan, P.H., S. Longar, and R.A. Fishman, 1987, Protective effects of liposome-entrapped superoxide dismutase on posttraumatic brain edema. Annals of neurology. 21(6): p. 540-547.

15- Ding, W., et al., 2015, Effects of Lipid Composition on Bilayer Membranes Quantified by All-Atom Molecular Dynamics. The Journal of Physical Chemistry B. 119(49): p. 15263-15274.

16- El Maghraby, G.M., A.C. Williams, and B.W. Barry, 2000, Skin delivery of oestradiol from lipid vesicles: importance of liposome structure. International journal of pharmaceutics. 204(1): p. 159-169.

17- Emeje, M.O., et al. . 2012, Nanotechnology in drug delivery: INTECH Open Access Publisher

18- Fan, Y. and Q. Zhang, 2013, Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 8(2): p. 81-87.

19- Flaminio, M.J.B., et al. 2007, Journal of immune based therapies and vaccines Volume: 5 ISSN: 1476-8518 ISO Abbreviation: J Immune Based Ther Vaccines Publication Date.

20- Gao, H., et al., 2014, Cell-penetrating peptide-based intelligent liposomal systems for enhanced drug delivery. Current pharmaceutical biotechnology. 15(3): p. 210-219.

21- Gabizon, A., et al., 1998, Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applications. Journal of controlled release. 53(1): p. 275-279.

22- Ghadamgahi, M. and D. Ajloo, 2015, Molecular dynamics insight into the urea effect on Tretinoin encapsulation into carbon nanotube. Journal of the Brazilian Chemical Society. 26(1): p. 185-195.

23- Geers, B., et al, 2013, Targeted liposome-loaded microbubbles for cell-specific ultrasound-triggered drug delivery. Small, :p. 4027-4035.

24- Heurtault, B., et al., 2003, Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. Biomaterials. 24(23): p. 4283-4300.

25- Hong, J.S., et al., 2010, Microfluidic Directed Self-Assembly of Liposome− Hydrogel Hybrid Nanoparticles. Langmuir. 26(13): p. 11581-11588.

26- Ingram, T., et al.,2013, Prediction of micelle/water and liposome/water partition coefficients based on molecular dynamics

simulations, COSMO-RS, and COSMOmic. Langmuir. 29(11): p. 3527-3537.

27- Jc, D., G. Dm, and A. Ew. 2001, Prospects for gene theraphy in lung disease.: p. 272-277.

28- Kanaoka, E., et al., 2001, A novel and simple type of liposome carrier for recombinant interleukin-2. Journal of pharmacy and pharmacology. 53(3): p. 295-302.

29- Kemmerer, S., J.C. Voss, and R. Faller, 2013. Molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidylcholine modified with a MTSL nitroxide spin label in a lipid membrane. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1828(11): p. 2770-2777.

30- Kanaoka, E., et al., 2001, A novel and simple type of liposome carrier for recombinant interleukin-2. Journal of pharmacy and pharmacology. 53(3): p. 295-302

31- Kong, X., et al., 2016, Spreading of a Unilamellar Liposome on Charged Substrates: A Coarse-Grained Molecular Simulation. Langmuir. 32(15): p. 3785-3793.

32- Kloesch, B., et al., 2016, In Vitro Study of a Liposomal Curcumin Formulation (Lipocurc™): Toxicity and Biological Activity in Synovial Fibroblasts and Macrophages. In Vivo. 30(4): p. 413-419.

33- Li, J., et al. 2015, A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 10(2): p. 81-98.

34- Leekumjorn, S., et al., 2009, The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1788(7): p. 1508-1516.

35- Liao, K.-l. and M.-c. Yin, 2000, Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. Journal of agricultural and food chemistry. 48(6): p. 2266-2270.

36- Lukyanov, A.N., et al., 2004, Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody. Journal of Controlled Release. 100(1): p. 135-144.

37- Metselaar, J.M., etal., 2003, Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes. Arthritis & Rheumatism. 48(7): p. 2059-2066.

38- Miller, A.D. 1998, Cationic liposomes for gene therapy. Angewandte Chemie International Edition. 37(13-14): p. 1768-1785.

39- Moghimi, S.M. and J. Szebeni, 2003, Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. Progress in lipid research. 42(6): p. 463-478.

40- Noël, J., et al., 2009, The mechano-activated K+ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. The EMBO journal. 28(9): p. 1308-1318.

41- Pathak, S.K., et al., 2013, Effect of cholesterol concentration on size of liposome. Journal o Pharmacy and Biological Sciences. 1: p. 50-53.

42- Pelisek, J., S. Armeanu, and S. Nikol, 2001, Evaluation of β-galactosidase activity in tissue in the presence of blood. Journal of vascular research. 37(6): p. 5 585-593.

43- Rigacci, L., et al., 2007, Liposome-encapsulated doxorubicin in combination with cyclophosphamide, vincristine, prednisone and rituximab in patients with lymphoma and concurrent cardiac diseases or pre-treated with anthracyclines. Hematological oncology. 25(4): p. 198-203.

44- Sahoo, S.K. and V. Labhasetwar, 2003, Nanotech approaches to drug delivery and imaging. Drug discovery today. 8(24): p. 1112-1120.

45- Seydel, J.K. and M. Wiese. 2009:, Drug-membrane interactions: analysis, drug distribution, modeling. . John Wiley & Sons.Vol. 15

46- Sharma, A., et al., 1997, Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts. International journal of cancer. 7 :(١)١p. 103-107.

47- Sharma Vijay, K., et al., 2010, Liposomes: Present prospective and future challenges. International Journal of Current Pharmaceutical Review & Research. 1(2): p. 6-16.

48- Uemura, A., S. Kimura, and Y. Imanishi, 1983, Investigation on the interactions of peptides in

the assembly of liposome and peptide by fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 729(1): p. 28-34.

49- von Otte, S., et al., 2006, Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. Journal of Biological Chemistry. 281(9): p. 5398-5405.

50- Wagner, A., K. Vorauer-Uhl, and H. Katinger, 2002, Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 54(2): p. 213-219.

51- Wengler, G., et al. 2003, Entry of alphaviruses at the plasma membrane converts the viral surface proteins into an ion-permeable pore that can be detected by electrophysiological analyses of whole-cell membrane currents. Journal of general virology, 1:(84) p. 173-181

52- Xiang, T.-X. and B.D. Anderson, Liposomal drug transport: a molecular perspective from molecular dynamics simulations in lipid bilayers. Advanced drug delivery reviews, 2006. 58(12): p. 1357-1378.

53- Zhang, M., et al., 2015., HDL surface lipids mediate CETP binding as revealed by electron microscopy and molecular dynamics simulation. Scientific reports. 5: p. 8741

Investigating the effect of solvent type on the formation of daunoxome liposome (DSPC-CHOL) using coarse-grained molecular dynamics simulation

Parchekani Choozaki J. and Taghdir M.

Dept. of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Liposomes are widely used as carriers for a large number of molecules in pharmaceutical studies. The stability and formation of liposomes is important in the drug delivery, and can be influenced by the phospholipid composition of the liposomal membrane. In this study, we are trying to investigate the effect of solvent type on the formation of daunoxome liposome (DSPC-CHOL). For this purpose, a molecular dynamics simulation method was used. The analysis of the radial distribution function that was performed to determine the formation and distribution of lipids, properly demonstrated that daunoxome liposome created dense nano-disk structure in a polar water environment and a spherical liposome in a non-polar water environment, and that the phospholipids have accumulated with homogeneous distribution. The solvent accessible surface area analysis showed a downward trend which indicates the accumulation of phospholipids alongside each other and the creation of the final structure. The analysis of the density and radius of gyration well showed that the final structures of the daunoxome liposome were formed in both environments. Due to the physio-chemical properties of 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine phospholipid, it tends to create a spherical liposome structure. However, the type of solvent (ie., polar water environment) made the phospholipids to create a circular nano-disk structure in the polar water environment. According to other studies and our findings, polar water relatively to non-polar water with more force, pushing the lipid molecules to accumulate together, and making the lipid molecules in polar water to create a circular nano-disk structure.

Key words: molecular dynamics simulation, liposome assembly, phospholipids, the formation of liposomes