

طراحی ساختار نانودیسک از فسفولیپید اسفنگومیلین جنین جوجه (DPSM) و کلسترول (CHOL) و مطالعه شکل گیری آن: شبیه سازی دینامیک مولکولی دانه درشت

جلیل پرچکانی چوزکی و مجید تقدیر*

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۱۹

چکیده

نانودیسکهای دولایه ساختارهایی هستند که از دولایه غشایی فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند و بین دولایه محتویات یا مولکولهای آبی وجود ندارد. نانودیسکهای چهارلایه در واقع شبیه سلول طبیعی هستند که از دو طرف بر آن فشار وارد شده است مثل ساختار گلبول قرمز خون که از دوطرف فرو رفتگی دارد. ساختار نانودیسک قادر است داروهای محلول در آب را در بخش سطحی آبدوست خود و داروهای محلول در چربی را در داخل دو لایه خود که محیط آبگریز است، پوشش دهد. سنتز نانودیسکها در محیط آزمایشگاهی و تجربی بسیار زمان‌بر و هزینه‌بر است. لذا در این تحقیق ساختار نانودیسکی با ترکیبی از مولکولهای اسفنگومیلین جنین جوجه (DPSM) و کلسترول (CHOL) طراحی و ساخته شد. که برای انجام این کار از رویکرد شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. بعد از انجام فرآیند شبیه سازی، نتایج و آنالیزهای به دست آمده از مطالعه شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان داد که مولکولهای انتخابی ساختار نانودیسکی ایجاد کردند که ناشی از خواص شیمی-فیزیکی فسفولیپید اسفنگومیلین جنین جوجه و مولکول کلسترول است. لازم به ذکر است که فسفولیپید اسفنگومیلین جنین جوجه ساختار هندسی مخروطی و همچنین گروه سری بزرگتری نسبت به لیپیدهای دیگر داشته که موجب می‌شود که تمایل این مولکول به ایجاد ساختار نانودیسکی زیاد شود. مولکول کلسترول در بین فسفولیپیدهای اسفنگومیلین جنین جوجه قرار می‌گیرد و با آنها میانکنش برقرار می‌کند. این ویژگی مولکول کلسترول باعث افزایش پایداری ساختار نانودیسک می‌شود. آنالیزهای انرژی شامل انرژی کل، انرژی میانکنشهای واندروالس و الکترواستاتیک نشان دادند که ساختار نانودیسک ایجاد شده به ثبات و پایداری مناسبی رسیده است.

واژه های کلیدی: شبیه سازی دینامیک مولکولی، نانودیسک، شکل گیری نانودیسکها، کلسترول، اسفنگومیلین جنین جوجه

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

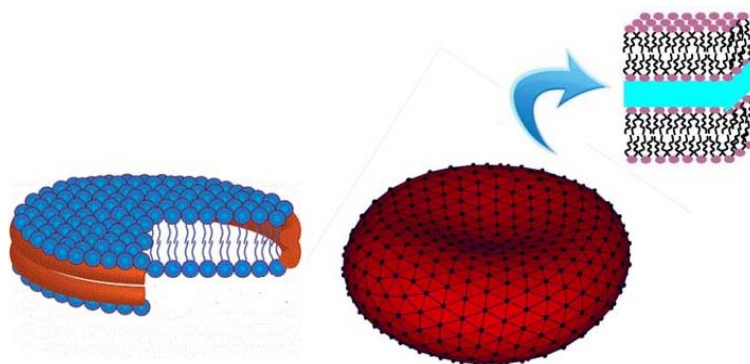
مقدمه

هستند که کارهای متنوعی در سلول انجام می دهند که شامل شرکت در ساختار و کار غشای سلولی، شرکت در انعقاد خون و ایجاد اسید آراشیدونیک که پروستا گلاندینها را می سازد. به طور کلی دو نوع فسفولیپید وجود دارد (۵۰). اگر در ساختار آنها گلیسرول وجود داشته باشد به آنها گلیسروفسفولیپیدها یا فسفولیپید می گویند که مهمترین نوع فسفولیپیدهاست. اگر در ساختار آنها اسفنگوزین باشد به آنها اسفنگوفسفولیپید می گویند. هر دو

لیپیدها زیست مولکولهای متنوعی هستند که از نظر خواص فیزیکی به ویژه حلالیت با هم مشابهت دارند. خاصیت اصلی آنها نامحلول بودنشان در آب است. این مولکولها در ساختار غشای سلول وجود دارند، در داخل میتوکندریها یافت می شوند، در ساختمان لیپوپروتئینها وجود دارند و حتی وظیفه نقل و انتقال چربیها را به عهده دارند. لیپیدها به انواع مختلفی تقسیم بندی می شوند (۱، ۲ و ۱۷). فسفولیپیدها گروه ویژه و تخصص یافته‌ای از چربیها

ساختارها را می‌توان در بحث انتقال دارو و مهندسی طراحی دارو استفاده کرد (۱۰). به طوری که امروزه خیلی از داروها را بر روی ساختارهای نانودیسک تثبیت می‌کنند و آنها را داخل بدن بیمار می‌فرستند (۳۲). نانودیسکهای کروی را می‌توان به دو نوع عمده تقسیم کرد: ۱- نانودیسکهای کروی دولایه ۲- نانودیسکهای کروی چهارلایه غشایی. نانودیسکهای دولایه ساختارهایی هستند که دولایه غشایی فسفولیپیدی بر روی هم قرار گرفته‌اند و بین دولایه محتویات یا مولکولهای آبی وجود ندارد. نانودیسکهای چهارلایه در واقع شبیه سلول طبیعی هستند که از دو طرف دارای فرورفتگی هستند. مثل ساختار گلبول قرمز خون که از دو طرف فرورفتگی دارد. داخل لومن ساختار نانودیسک چهارلایه‌ای می‌تواند محتویات یا مولکولهای آب وجود داشته باشد (۴۳، ۴۶ و ۵۱). شکل ۱ ساختار نانودیسک کروی دولایه‌ای و چهارلایه‌ای را نشان می‌دهد.

نوع اجزاء ساختاری غشاها هستند و در تولید سیگنالهای عصبی و داخل سلولی نقش دارند (۸). گلیسرو فسفولیپیدها متشکل از یک مولکول گلیسرول و دو اسید چرب و یک گروه فسفات بر روی کربن ۳ می‌باشد که به این مجموعه اسید فسفاتیدیک یا فسفاتیدیل گویند که پایه ای برای بیوسنتز فسفولیپیدها می‌باشد. به عبارت دیگر ساده ترین نوع فسفولیپیدها اسید فسفاتیدیک می‌باشد (۴۵). وقتی فسفولیپیدها در محیط آبی در کنار هم جمع می‌شوند، می‌توانند انواع ساختارها مثل ساختارهای دولایه‌ای، لیپوزوم کروی، ساختار میسلی، نانودیسک و ... را ایجاد کنند (۳۹). علاوه بر این برای تشکیل یکسری از این ساختارها مثل میسل نیاز است که لیپیدها ابتدا به یک غلظت خاصی (غلظت بحرانی میسل) برسند تا ساختار تشکیل شود. یکی از ساختارهایی که از تجمع فسفولیپیدها حاصل می‌شود ساختارهای نانودیسک دایره‌ای است (۱۲). ساختارهای نانودیسک رفتاری شبیه به غشای سلول دارند. همچنین این



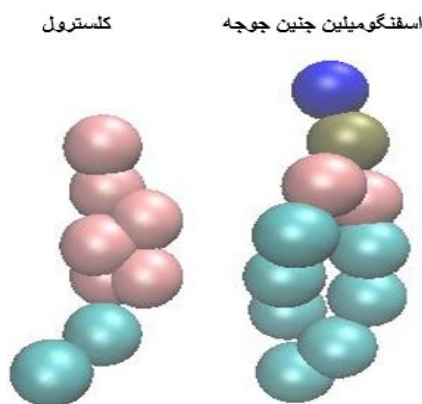
شکل ۱- ساختار شماتیک نانودیسک کروی دولایه‌ای و چهارلایه‌ای (۱۱)

است داروهای محلول در آب را در بخش سطحی آبدوست خود و داروهای محلول در چربی را در داخل دولایه خود که محیط آبگریز است، پوشش دهد. به طور کلی اهمیت نانودیسکها در پزشکی و داروسازی را می‌توان به دو حیطه درمان و تشخیص بیماریها تقسیم کرد. از نانودیسکها به عنوان یک ابزار، یک مدل و یا یک معرف در مطالعات پایه از قبیل فعل و انفعالات سلول، فرآیندهای شناخت و نحوه عمل مواد خاص استفاده می‌شود. در تهیه

نانودیسکها می‌توانند از اجزای مختلفی تولید شوند. مهمترین اجزاء تشکیل دهنده ساختار نانودیسکها شامل لیپیدها (به ویژه فسفولیپیدها) و کلسترول است. که معمولاً تعداد یا غلظت فسفولیپیدها بیشتر از تعداد یا غلظت کلسترول در ساختار نانودیسکها مورد استفاده قرار می‌گیرد. فرمولاسیون نانودیسکها را از نظر محتوای مواد دارویی، پایداری و جذب سلولی می‌توان از طریق تغییر پارامترهای فیزیکوشیمیایی بهینه سازی کرد. ساختار نانودیسک قادر

مواد و روشها

شبیه سازی سیستمهای زیستی پیچیده مثل ساختارهای تشکیل شوندهایی چون غشای دولایه، لیپوزوم، میسلها، نانوفیبرها و سایر ساختارهای بزرگ بسیار طولانی و زمان-بر است. در این تحقیق نیز چون قرار بود ساختار نانودیسک ایجاد شود و مشکل طولانی بودن زمان شبیه سازی وجود داشت، از رویکرد شبیه سازی دینامیک مولکولی دانه درشت استفاده شد. شبیه سازی دانه درشت این امکان را فراهم می کند که اتمهای مشابه نزدیک هم را به صورت یک کره در نظر گرفت. چالش اولیه در این تحقیق انتخاب فسفولیپیدهای مناسب بود. لازم بود که فسفولیپیدهایی انتخاب شوند که گزینه مناسبی برای انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی باشند. یعنی فسفولیپیدهایی انتخاب می شدند که دارای میدانهای نیروی مشخص بودند و قابلیت شبیه سازی آنها نیز در نرم افزار گرومکس فراهم می شد. به همین خاطر مولکولهای اسفنگومیلین جنین جوجه و کلاسترول انتخاب شدند. مختصات داده اولیه این مولکولها به صورت حالت دانه درشت از سایت چارم (<http://www.charmm-gui.org>) دریافت شد (شکل ۲) (۱۱، ۱۳، ۱۴).



شکل ۲- ساختار دانه درشت مولکولهای اسفنگومیلین جنین جوجه و کلاسترول

مولکول اسفنگومیلین جنین جوجه دارای گروهها یا دانه هایی شامل: NC3 (به رنگ آبی)، PO4 (به رنگ

نانوندیسکها معمولاً از فسفولیپیدهای با منشاء زیستی استفاده می شود. در فسفولیپیدهای حاصل از منابع طبیعی، زنجیره های آسیل بسته به منبع استخراج متفاوت است که این امر موجب می شود بتوان که ساختارهای متنوعی را طراحی کرد. به علاوه ذخایر فسفولیپیدی که در ساختار نانوندیسکها استفاده می شوند به مرور زمان دچار هیدرولیز استری می شوند، که در طی آن یکی از زنجیره های آسیل از فسفولیپید جدا شده و به لیئوفسولیپید تبدیل می شود. همچنین اگر در زنجیره های آسیل پیوند غیراشباع وجود داشته باشد پراکسیداسیون رخ می دهد. به دلایلی که در بالا ذکر شد مواد خامی که در ساختار نانوندیسکها استفاده می شوند کیفیت بالایی ندارند. همچنین سنتز نانوندیسکها در محیط آزمایشگاهی و تجربی بسیار زمان بر و هزینه بر است. علاوه بر این اصلی ترین مانع در تکنولوژی نانوندیسکها به خصوص در استفاده از آنها به عنوان حامل دارو، عدم پایداری آنها به مدت طولانی می باشد. پایداری فیزیکی و شیمیایی نانوندیسکها تحت تأثیر عوامل مختلفی است که می توانند بر روی میزان پایداری نانوندیسکها و کارایی نفوذ دارو در آنها اثر بگذارند. به همین خاطر نیاز است که شرایط پایداری نانوندیسکها برای مدت طولانی فراهم شود. با محدودیتهایی که در روشهای تجربی وجود دارد و در بالا به آنها اشاره شد، از روشهای تئوری به عنوان روشهای تکمیلی برای مطالعه نانوندیسکها می توان استفاده کرد. در این تحقیق هدف دستیابی به یک ساختار نانوندیسک بهینه است. با توجه به اینکه ساختارهای نانوندیسک رفتاری شبیه به غشای سلول دارند، از آنها در مهندسی سلولی و زیست فناوری استفاده می شود (۴، ۹، ۴۲ و ۵۴). لذا در این تحقیق از رویکرد شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد و ساختارهای نانوندیسک طراحی و ایجاد گردیدند. مولکولهایی که در ساختار نانوندیسک مورد استفاده قرار گرفتند شامل مولکولهای اسفنگومیلین جنین جوجه و کلاسترول هستند.

دوره‌ای برای سیستم در نظر گرفته شد و مولکولهایی که از یک سمت جعبه خارج می‌شوند دوباره از سمت دیگر وارد جعبه شبیه‌سازی می‌شوند. سپس به ترتیب مولکولهای اسفنگومیلین جنین جوجه و کلسترول به داخل جعبه اضافه شدند. تعداد مولکولهای اضافه شده برابر ۸۱۱ مولکول اسفنگومیلین جنین جوجه و ۵۳۹ مولکول کلسترول است. در نهایت مولکولهای آب به تعداد ۵۹۵۶۰ مولکول، به منظور آب‌پوشی سیستم اضافه شدند. (شکل ۳). نوع آب مورد استفاده در این تحقیق آب حالت دانه درشت و قطبی است (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۱ و ۲۸).

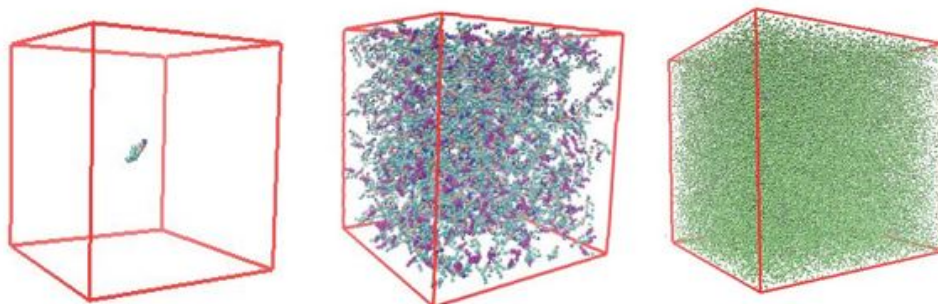
خاکستری)، AM1 و AM2 (به رنگ صورتی)، T1A، C2A، C3A، C1B، C2B، C3B و C4B (به رنگ فیروزه‌ای) است. مولکول کلسترول هم دارای دانه‌هایی شامل: R4، R3، R2، R1، ROH و R5 (به رنگ صورتی)، C1 و C2 (به رنگ فیروزه‌ای) است.

نرم افزار گرومکس نسخه ۵,۰,۱ برای این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا از یک مولکول اسفنگومیلین جنین جوجه برای ساخت جعبه استفاده شد. جعبه شبیه سازی به شکل مکعبی و در ابعاد ۲۰*۲۰*۲۰ نانومتر تعریف شد. فاصله ساختار ایجاد شده از کناره های جعبه ۰/۳ نانومتر در نظر گرفته شد. همچنین حالت شرایط مرزی

تعریف جعبه

اضافه کردن مولکول های لیپید

اضافه کردن مولکول های آب



شکل ۳- مراحل تعریف جعبه (مولکول اسفنگومیلین جنین جوجه در وسط جعبه است)، اضافه کردن مولکولهای لیپید و اضافه کردن مولکولهای آب

در نظر گرفته شد. پارامترهای vdw_type و coulombtype به صورت cut-off تعریف شدند و الگوریتمهای تعریف شده برای پارامترهای pcoupl، tcoupl و cutoff-scheme به ترتیب شامل الگوریتمهای v-rescale، berendsen و verlet است (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵ و ۲۷).

نتایج و بحث

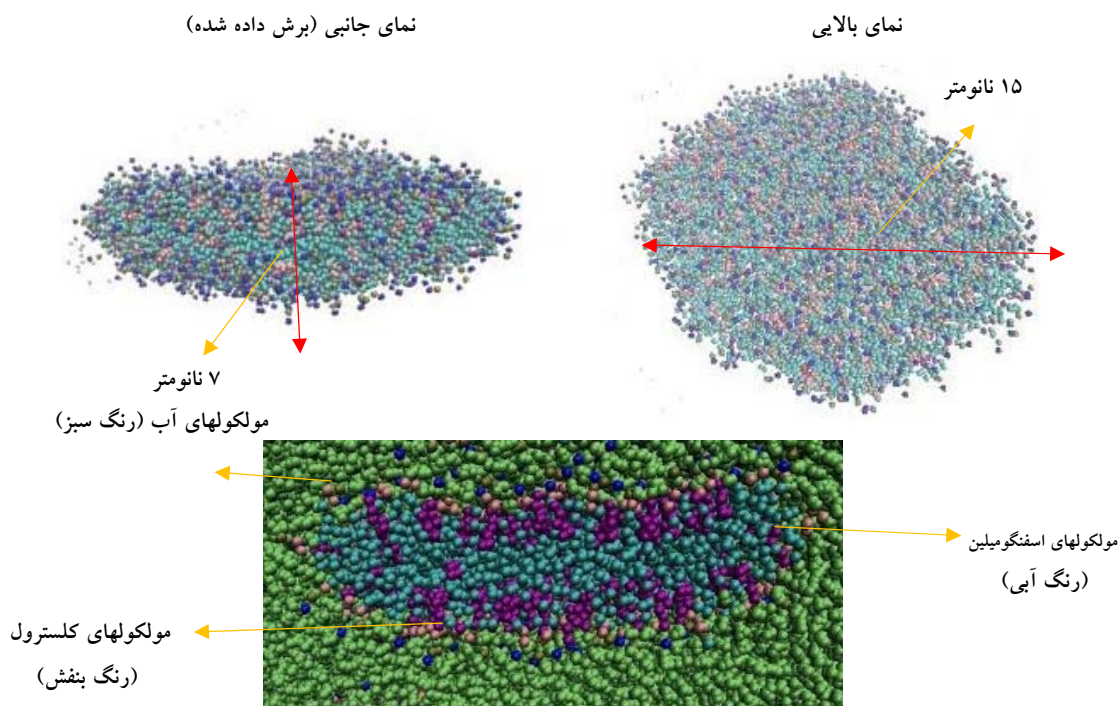
نتایج حاصل از شبیه‌سازی، با رویکرد بررسی شکل گیری ساختار نانودیسک صورت گرفت. آنالیزها به منظور بررسی شکل گیری ساختار نانودیسک مورد استفاده قرار گرفتند که شامل آنالیزهای شعاع زیراسیون، خطای جذر میانگین مربعات، تابع توزیع شعاعی، ناحیه سطح در دسترس

در این مطالعه یک فرآیند شبیه سازی دینامیک مولکولی به مدت ۱۰۰۰ نانوثانیه (۱ میکروثانیه) انجام شد. تمام شبیه-سازیه با نرم افزار گرومکس نسخه ۵,۰,۱ و میدان نیروی مارتینی انجام شد. مرحله بهینه‌سازی انرژی، ۵۰۰۰ گام و به روش شدیدترین نزول صورت گرفت. تعادل‌رسانی در حجم ثابت برای تنظیم دما روی ۴۰۰ درجه کلوین و تعادل‌رسانی در فشار ثابت برای تنظیم فشار روی یک اتمسفر، به مدت ۲ نانوثانیه صورت گرفت. در نهایت مرحله شبیه‌سازی اصلی (مرحله تولید) به مدت ۱ میکروثانیه انجام شد. ورودی فایل اصلی mdp نیز تنظیم گردید. مقدار تایم استپ در مرحله تولید و در فایل mdp بر روی ۲۰ فمتو ثانیه تنظیم شد. پارامتر nstlist مقدارش ۱۰

حلال، انرژی میانکنشهای واندروالسی، انرژی میانکنشهای الکترواستاتیک و انرژی کل می‌باشند.

امروزه نیاز روزافزون وجود دارد تا ساخت نانودیسکها در آزمایشگاهها پیشرفت داده شود و بهبود یابد. این نیاز باعث شده است که استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی در حیطه طراحی و ساخت نانودیسکها بسیار مهم باشد. شبیه سازی دینامیک مولکولی به عنوان یک ابزار اولیه کمک می‌کند تا روند شکل گیری نانودیسکها و عوامل مؤثر در پایداری و شکل گیری آنها مورد مطالعه قرار گیرد. با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی می‌توان سهم هر کدام از میانکنشهای پیوندی و غیرپیوندی در تشکیل نانودیسکها را به دست آورد و در نهایت با کسب چنین نتایجی می‌توان نانودیسکهایی با ساختار و عملکرد بهینه سنتز نمود. که این عامل باعث صرفه جویی در هزینه و زمان می‌شود.

شکل گیری ساختار نانودیسک: در این مطالعه هدف اصلی طراحی و ساخت ساختار نانودیسک از فسفولیپید اسفنگومیلین و مولکول کلسترول و بررسی شکل گیری آن است. که به این منظور از رویکرد شبیه سازی دینامیک مولکولی دانه درشت استفاده شد. با استفاده از فایل‌های حاصل از فایل مسیر شبیه سازی، پارامترهایی در شکل-گیری ساختار و همچنین انرژیها استخراج شدند. و نتایج به دست آمده نشان داد که نانودیسک طراحی شده به خوبی در محیط شبیه سازی تشکیل شده است. شکل ۴ ساختار نهایی ایجاد شده بعد از ۱ میکروثانیه شبیه سازی را نشان می‌دهد. علاوه بر این موقعیت مولکولهای اسفنگومیلین، کلسترول و آب و همچنین ابعاد نانودیسک ایجاد شده در شکل آمده است.

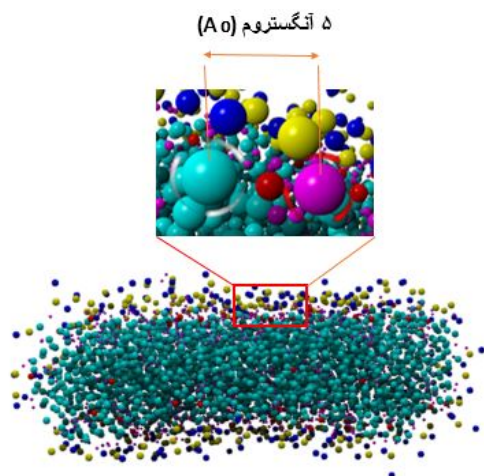


شکل ۴- ساختار نهایی نانودیسک ایجاد شده در محیط شبیه سازی گرومکس

و غشای دولایه را دارد. همچنین این فسفولیپید به خاطر وجود ریشه اسفنگوزین در گروه سری دارای سر قطبی

فسفولیپید DPSM چون دارای ساختار هندسی مخروطی شکل است، تمایل به ایجاد ساختارهای نانودیسکی دولایه

ساختار نانودیسک انجام شد (۳۷-۳۳). در این آنالیز اتمهای فسفر در فسفولیپید اسفنگومیلین جنین جوجه به عنوان اتمهای رفرنس در نظر گرفته شدند (۴۳ - ۳۳). ساختار نانودیسک ایجاد شده دارای ساختار همگن است که موجب می‌شود RDF این ساختار در یک فاصله خاص (۵ نانومتر یا ۵ آنگستروم) افزایش یافته و بعد از این فاصله مشخص، افت چشم‌گیری داشته است (۴۰، ۴۱، ۴۴ و ۴۷). آنالیز به خوبی نشان می‌دهد که نانودیسک شکل گرفته و ساختار نهایی آن به صورت یک نانودیسک دایره-ای دولایه است. (۵۲، ۵۳ و ۵۵) (شکل ۵).

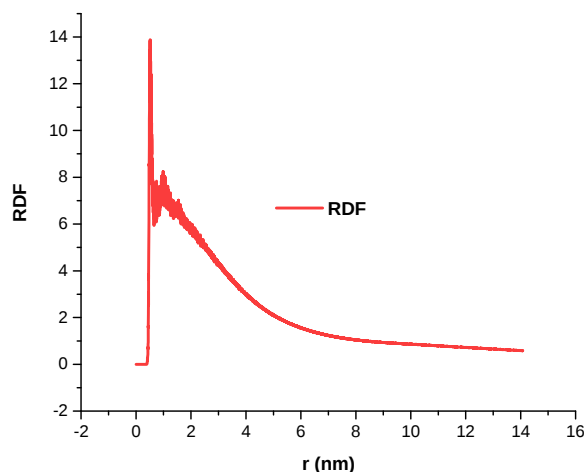


شکل ۵- آنالیز تابع توزیع شعاعی که نشان دهنده شکل‌گیری ساختار نانودیسک دایره‌ای دولایه در محیط شبیه‌سازی است

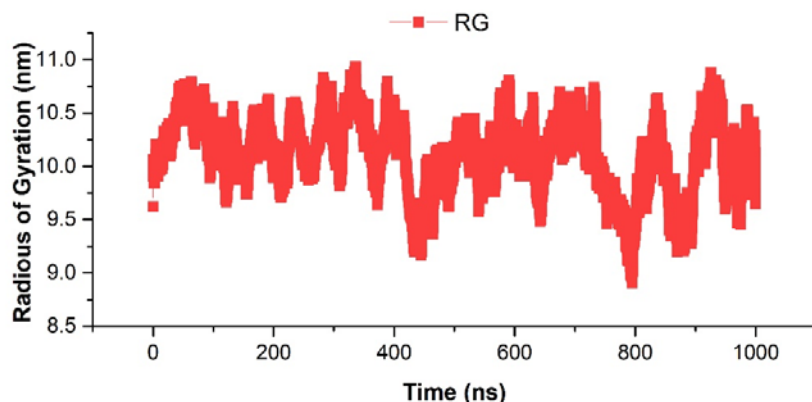
ساختار در مرحله تعادل‌سازی صورت می‌گیرد و در مرحله شبیه‌سازی اصلی تغییر چندانی در شعاع ژیراسیون مشاهده نمی‌شود. در این مرحله تغییرات زیادی در شعاع ژیراسیون دیده نمی‌شود و شعاع ژیراسیون در یک آستانه تقریباً ثابت است که همین امر تأیید‌کننده شکل‌گیری ساختار مورد نظر است (شکل ۶) (۲۰ و ۵۶).

بزرگ است که از تمایل این لیپید برای ایجاد ساختار لیپوزومی می‌کاهد. نکته دیگر این است که استفاده کلسترویل در ساختار نانودیسک باعث افزایش پایداری می‌شود. در واقع طبق مقالات ارائه شده، کلسترویل موجود در ساختار نانودیسک توانایی این را دارد که با لیپید مجاور خود پیوند هیدروژنی برقرار کند و این عامل باعث افزایش پایداری نانودیسک می‌شود. وجود کلسترویل در ساختار نانودیسک نقش کمتری در شروع شکل‌گیری ساختار دارد، اما بعد از شکل‌گیری اولیه نانودیسکها، وجود کلسترویل باعث پایداری ساختار می‌شود (۳ و ۳۰).

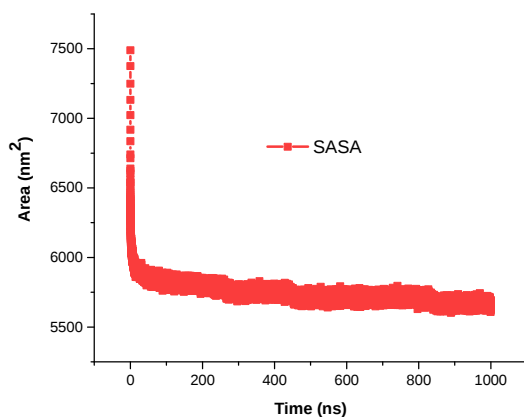
آنالیز تابع توزیع شعاعی radial distribution function (RDF) برای بررسی شکل‌گیری و توزیع لیپیدها در



آنالیز شعاع ژیراسیون نیز به منظور بررسی میزان فشردگی ساختار صورت گرفت. طبق نمودار شعاع ژیراسیون، مقدار شعاع ژیراسیون در طول زمان شبیه‌سازی تقریباً ثابت است و تغییر چندانی نکرده است. دلیل چنین اتفاقی این است که در شبیه‌سازی سیستمهای مونتاژ شونده مثل غشاهای لیپوزوم، نانودیسکها و سایر ساختارها، جمع‌شدگی اصلی



شکل ۶- آنالیز شعاع ژیراسیون که به منظور بررسی شکل گیری و میزان فشردگی ساختار انجام شد و نمودار مقدار ثابتی را از شعاع ژیراسیون نشان می دهد که بیانگر این موضوع است که ساختار نانودیسک ایجاد شده، فشرده شده است.



شکل ۷- آنالیز ناحیه سطح در دسترس حلال که با یک روند نزولی آغاز می شود و بیانگر این است که ساختار نانودیسکی در محیط شبیه سازی شکل گرفته است.

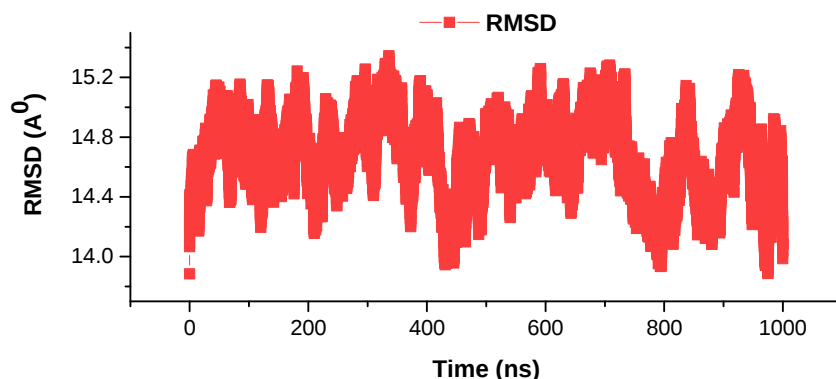
این پارامتر مقیاسی است که تفاوت های بین مقادیر پیش بینی شده توسط یک مدل یا تخمین را نسبت به یک مقدار واقعی برای یک متغیر خاص بیان می کند. RMSD هر ساختار نسبت به ساختار قبل آن در نظر گرفته می شود. شکل ۸ آنالیز این پارامتر را برای نانودیسک ایجاد شده نشان می دهد. همان طور که در شکل ۸ مشخص است این مقدار بعد از حدود ۶۰ نانوثانیه از زمان شبیه سازی پایدار شده اند و به ثبات ساختاری رسیده اند. افت و خیزهایی که بعد از زمان ۶۰ نانوثانیه و ثبات سیستم مشاهده می شود به این علت است که سیستم های تجمع شونده مثل نانودیسکها

ناحیه سطح در دسترس حلال Solvent-accessible surface area (SASA) یکی از آنالیزهایی است که برای شکل گیری ساختارهای غشایی و نانودیسکی استفاده می شود. ناحیه سطح در دسترس یا ناحیه سطح در دسترس حلال، سطح یک بیومولکول یا ترکیب شیمیایی است که به حلال دسترسی دارد. اندازه گیری ناحیه سطح در دسترس معمولاً در واحد مربع آنگستروم تعریف می شود (۷ و ۴۹). طبق مقالات ارائه شده با شکل گیری نانودیسکها و ساختارهای غشایی از میزان ناحیه سطح در دسترس حلال کاسته می شود. در این تحقیق نیز با نزدیک شدن مولکولهای لیپید در کنار همدیگر از میزان ناحیه سطح در دسترس حلال نسبت به مولکولهای آب کاسته شد و در نتیجه در نمودار مربوطه از میزان ناحیه سطح در دسترس حلال کاسته شد. در شکل ۷ آنالیز ناحیه سطح در دسترس حلال در طول زمان شبیه سازی کاهش یافته است که نشان می دهد که ساختار نانودیسک شکل گرفته است (۶ و ۴۸).

انحراف جذر میانگین مربعات (root-mean-square deviation (RMSD)) تفاوت میان مقدار پیش بینی شده توسط مدل یا برآوردگر آماری و مقدار واقعی می باشد. پارامتر RMSD برای بررسی پایداری و ثبات مولکولهای زیستی شبیه سازی شده مورد استفاده قرار می گیرد.

دارای پایدار ساختاری مناسب در نظر گرفت که میزان RMSD با انحرافات کمتر داشته باشد (۵ و ۳۱).

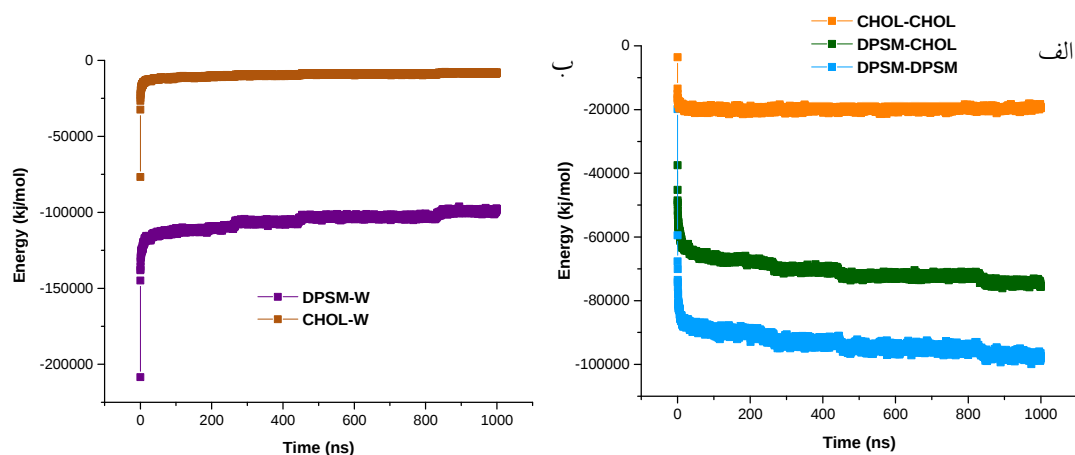
ساختارهایی بسیار منعطف هستند و موجب تغییر لحظه‌ای نمودار RMSD می‌شوند. در واقع ساختاری را می‌توان



شکل ۸- آنالیز پارامتر RMSD برای ساختار نانودیسک ایجاد شده، که بیانگر میزان پایداری و ثبات مناسب برای ساختار است.

واندروالسی افزوده می‌شود و در نمودار منفی‌تر می‌شوند. فسفولیپ‌های DPSM-DPSM در ابتدای شبیه‌سازی ۲۰۰۰۰ کیلوژول بر مول و در انتهای شبیه‌سازی ۹۰۰۰۰ کیلوژول بر مول، جفت لیپیدهای DPSM-CHOL به ترتیب ۳۷۰۰۰ و ۶۵۰۰۰ کیلوژول بر مول و جفت لیپیدهای CHOL-CHOL به ترتیب ۵۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ کیلوژول بر مول انرژی در ابتدا و انتهای شبیه‌سازی دارند. همان‌طور که در شکل ۹-الف نیز مشخص است جفت فسفولیپ‌های DPSM-DPSM بیشترین میزان میانکنشهای واندروالسی را بین خود برقرار کرده‌اند و دارای بیشترین انرژی هستند (۹۰۰۰۰ کیلوژول بر مول) و در نتیجه بیشترین نقش را در پایداری نانودیسک در حیطه میانکنشهای واندروالسی دارند. بعد از جفت فسفولیپ‌های DPSM-DPSM، به ترتیب جفت لیپیدهای DPSM-CHOL (۶۵۰۰۰ کیلوژول بر مول) و جفت لیپیدهای CHOL-CHOL (۲۰۰۰۰ کیلوژول بر مول) بیشترین میزان میانکنشهای واندروالسی را بین همدیگر برقرار می‌کنند. شکل ۹-ب انرژی میانکنشهای واندروالسی بین مولکولهای DPSM و CHOL و مولکولهای آب را نشان می‌دهد. که میزان انرژی میانکنشهای واندروالسی مولکول DPSM با مولکولهای آب (DPSM-W) بیشتر از مولکولهای کلسترول (CHOL-W) است (۷ و ۳۸).

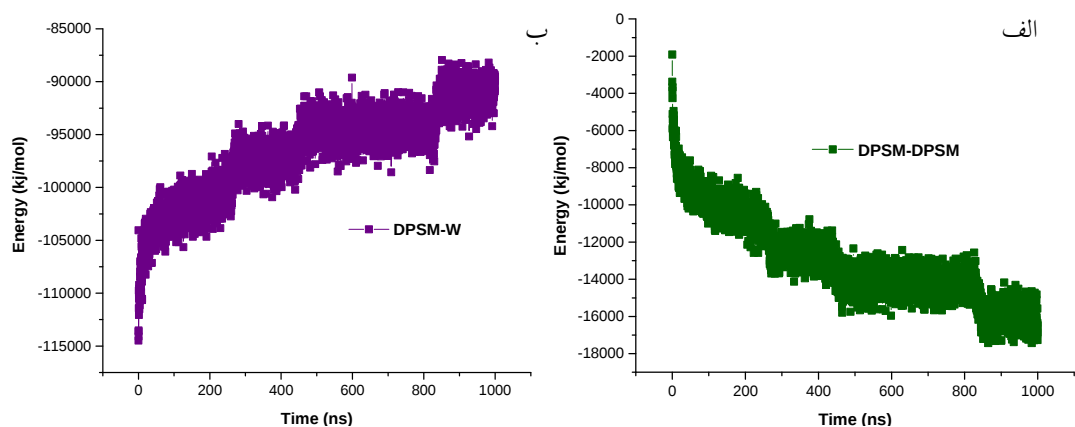
آنالیز انرژی میانکنشها در شکل‌گیری نانودیسک: علاوه بر آنالیزهای بیان شده آنالیزهای انرژی نیز انجام شدند تا ثبات و پایداری ساختار ایجاد شده بررسی شود. همه آنالیزهای به دست آمده نشان می‌دهند که ساختار مورد نظر دارای میزان پایداری نهایی مناسبی است. چون همه آنالیزهای انرژی انجام شده نشان دادند که بعد از سپری شدن ۳۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی سیستم به ثبات رسیده است. ابتدا انرژی میانکنشهای واندروالسی برای هر کدام از جفت لیپیدها به دست آمد تا سهم هر کدام از آنها در شکل‌گیری ساختار نانودیسک به دست آید. فسفولیپد اسفنگومیلین جنین جوجه و مولکول کلسترول دارای بخش هیدروفوبیک در ساختار خود هستند. این مولکولها در این مناطق از ساختارهای خود می‌توانند میانکنشهای واندروالسی را ایجاد کنند. در واقع زمانی که ساختار نانودیسک ایجاد می‌شود این مولکولها در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند و چون در فاصله واندروالسی یکدیگر قرار دارند می‌توانند میانکنشهای واندروالسی را ایجاد کنند. فاصله واندروالسی می‌تواند بین ۱ تا ۱۰ آنگستروم باشد. همان‌طور که در شکل ۹-الف مشخص است در ابتدای شبیه‌سازی انرژی میانکنشهای واندروالسی کم است ولی بعد از سپری شدن زمان در محیط شبیه‌سازی، با تشکیل میانکنشهای واندروالسی، به میزان انرژی میانکنشهای



شکل ۹- نمودار مقایسه‌ای انرژی میانکنشهای واندروالسی مولکولهای DPSM و CHOL (الف) انرژی میانکنشهای واندروالسی بین لیپیدهای DPSM-DPSM، DPSM-CHOL و CHOL-CHOL در نانودیسک ساخته شده (ب) انرژی میانکنشهای واندروالسی بین مولکولهای DPSM و CHOL و مولکولهای آب

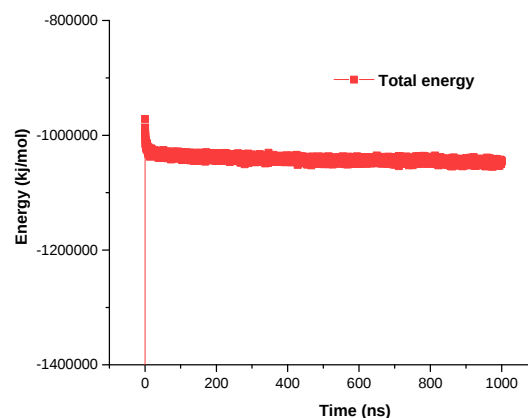
نیامد که این امر به خاطر عدم درگیر شدن کلسترول در تشکیل میانکنشهای الکترواستاتیک است و انرژی الکترواستاتیک کلی در ساختار نانودیسک فقط حاصل فسفولیپید DPSM است. در شکل گیری نانودیسکها میانکنشهای الکترواستاتیک بعد از میانکنشهای واندروالسی ایجاد می‌شوند. شکل ۱۰-الف انرژی میانکنشهای الکترواستاتیک بین جفت فسفولیپیدهای DPSM-DPSM و شکل ۱۰-ب بین فسفولیپیدهای DPSM و مولکولهای آب را نشان می‌دهد (۱۰، ۲۶ و ۲۹).

علاوه بر انرژی میانکنشهای واندروالسی انرژی میانکنشهای الکترواستاتیک نیز برای نانودیسک ساخته شده به دست آمد. همان طور که در شکل ۱۰ مشخص است ابتدا انرژی الکترواستاتیک بین جفت فسفولیپیدهای DPSM-DPSM برای ساختار نانودیسک کم و به مقدار ۲۰۰۰ کیلوژول بر مول است. ولی با سپری شدن زمان شبیه سازی، با تشکیل میانکنشهای الکترواستاتیک، به میزان انرژی میانکنشهای الکترواستاتیک افزوده می‌شود که برابر ۱۷۲۰۰ کیلوژول بر مول شده است. در ساختار نانودیسک ساخته شده میانکنشهای الکترواستاتیک مرتبط با کلسترول به دست



شکل ۱۰- نمودار انرژی میانکنشهای واندروالسی (الف) بین جفت فسفولیپیدهای DPSM-DPSM (ب) بین فسفولیپیدهای DPSM و مولکولهای آب

در نهایت آنالیز انرژی کل برای ساختار نانودیسک ساخته شده به دست آمد. همان طور که در شکل ۱۱ مشخص است ساختار نانودیسک بعد از ۲۰ نانوثانیه سپری شدن از زمان شبیه سازی به پایداری مناسبی رسیده است. که بعد از رسیدن به ثبات و پایداری دارای انرژی معادل ۱۰۵۰۰۰۰ کیلوژول بر مول است.



شکل ۱۱- آنالیز انرژی کل ساختار نانودیسک ساخته شده، که نشان می دهد ساختار مورد نظر به پایداری ثابتی رسیده است و شکل گیری تمام شده است.

نتیجه گیری

در این تحقیق ساختار نانودیسک طراحی و ساخته شد. که برای انجام این کار از رویکرد شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. برای انجام شبیه سازی مولکولهای اسفنگومیلین جنین جوجه (DPSM) و کلسترول (CHOL) انتخاب شدند. شبیه سازی به مدت ۱ میکروثانیه با استفاده از نرم افزار گرومکس نسخه ۵,۰,۱ صورت گرفت. نتایج و آنالیزهای به دست آمده از مطالعه شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان داد که مولکولهای لیپیدی انتخابی ساختار نانودیسکی ایجاد کردند. آنالیز شعاع ژیراسیون و تابع توزیع شعاعی به منظور بررسی شکل گیری و توزیع لیپیدها انجام شدند و این آنالیزها به خوبی نشان دادند که ساختار

نانودیسکی متراکم و واحدی شکل گرفته است و فسفولیپیدها با توزیع همگنی در کنار یکدیگر تجمع یافته اند. آنالیز ناحیه سطح در دسترس حلال دارای نمودار با روند نزولی است که بیانگر تجمع فسفولیپیدها در کنار همدیگر و ایجاد ساختار نانودیسک است. آنالیزهای انرژی شامل انرژی کل، انرژی میانکنشهای واندروالس و الکترواستاتیک نشان دادند که ساختار نانودیسک ایجاد شده به ثبات و پایداری مناسبی رسیده است. تشکیل ساختارهای نانودیسک دایره ای ناشی از خواص شیمی- فیزیکی فسفولیپید اسفنگومیلین جنین جوجه و مولکول کلسترول است. لازم به ذکر است که در ساختار نانودیسک ایجاد شده از فسفولیپید اسفنگومیلین جنین جوجه استفاده گردید که این فسفولیپید ساختار هندسی مخروطی شکل و همچنین گروه سری بزرگتری نسبت به لیپیدهای دیگر داشته که موجب می شود که تمایل این مولکول به ایجاد ساختار نانودیسکی زیاد شود. فسفولیپیدهای اسفنگومیلین جنین جوجه و مولکول کلسترول (حلقه های آروماتیک) که در همسایگی یکدیگر در ساختار نانودیسک هستند، با یکدیگر میانکنشهای واندروالسی برقرار می کنند. همچنین فسفولیپیدهای اسفنگومیلین جنین جوجه با همدیگر نیز میانکنشهای واندروالسی و الکترواستاتیک برقرار می کنند. که این میانکنشهای ایجاد شده، روند شکل گیری ساختار نانودیسک دایره ای را تسهیل می نمایند. هدف در این تحقیق دستیابی به یک ساختار نانودیسک بهینه بود که امروزه در حیطه های مختلف کاربرد دارد. با توجه به اینکه ساختارهای نانودیسک رفتاری شبیه به غشای سلول دارند، از آنها در مهندسی سلولی و زیست فناوری استفاده می- شود. همچنین این ساختارها را می توان در بحث انتقال دارو و مهندسی طراحی دارو استفاده کرد. به طوری که امروزه خیلی از داروها را بر روی ساختارهای نانودیسک تثبیت می کنند و آنها را داخل بدن بیمار می فرستند.

منابع

- ۱- مریم کته شمشیری، مهوش خداینده و همکاران، تابستان ۱۳۹۵،
تأثیر سونیکاسیون برابعد ترانسفرزوم حاوی هورمون رشد، مجله
پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران)، مقاله
۷، دوره ۲۹، شماره ۲، صفحه ۲۰۹-۲۱۷
- ۲- غلامحسین صدیقیان، حسین رضایی مارنانی، فریبا رزمی منش،
"Influence of membrane lipid composition on the structure and activity of γ -secretase." *Physical Chemistry Chemical Physics* **20**(43): 27294-27304.
- 3- Aguayo-Ortiz, R., J. E. Straub, et al. (2018). "Influence of membrane lipid composition on the structure and activity of γ -secretase." *Physical Chemistry Chemical Physics* **20**(43): 27294-27304.
- 4- Bayburt, T. H., Y. V. Grinkova, et al. (2002). "Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins." *Nano Letters* **2**(8): 853-856.
- 5- Bayburt, T. H., Y. V. Grinkova, et al. (2006). "Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs." *Archives of biochemistry and biophysics* **450**(2): 215-222.
- 6- Camargo, D. C. R., K. J. Korshavn, et al. (2017). "Stabilization and structural analysis of a membrane-associated hIAPP aggregation intermediate." *elife* **6**: e31226.
- 7- Camargo, D. C. R., K. J. Korshavn, et al. (2017). "Stabilization and structural analysis of a membrane-associated hIAPP aggregation intermediate." *elife* **6**: e31226.
- 8- Collaboration, E. R. F. (2009). "Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease." *JAMA: the journal of the American Medical Association* **302**(18): 1993.
- 9- Denisov, I., Y. Grinkova, et al. (2004). "Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size." *Journal of the American Chemical Society* **126**(11): 3477-3487.
- 10- Dietschy, J. M. and S. D. Turley (2004). "Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal." *Journal of lipid research* **45**(8): 1375-1397.
- 11- 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.
- 12- Feingold, K. R. (2007). "Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids
- 13- Emeje, M.O., et al. . 2012, Nanotechnology in drug delivery: INTECH Open Access Publisher
- 14- Flaminio, M.J.B., et al. 2007, Journal of immune based therapies and vaccines Volume: 5 ISSN: p. 1476-8518 ISO Abbreviation: J Immune Based Ther Vaccines Publication Date.
- 15- Gao, H., et al., 2014, Cell-penetrating peptide-based intelligent liposomal systems for enhanced drug delivery. *Current pharmaceutical biotechnology*. **15**(3): p. 210-219.
- 16- Gabizon, A., et al., 1998, Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applications. *Journal of controlled release*. **53**(1): p. 275-279.
- 17- Geers, B., et al, 2013, Targeted liposome-loaded microbubbles for cell-specific ultrasound-triggered drug delivery. *Small*, p. 4027-4035.
- 18- Geers, B., et al., Targeted liposome-loaded microbubbles for cell-specific ultrasound-triggered drug delivery. *Small*, **2**, ۰۱۳ : (۲۳)۹p. 4027-4035.
- 19- 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.
- 20- Hagn, F., M. Etzkorn, et al. (2013). "Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins." *Journal of the American Chemical Society* **135**(5): 1919-1925.
- 21- Heurtault, B., et al., 2003, Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*. **24**(23): p. 4283-4300.
- 22- Hong, J.S., et al., 2010, Microfluidic Directed Self-Assembly of Liposome- Hydrogel Hybrid

- Nanoparticles. *Langmuir*. **26**(13): p. 11581-11588.
- 23- 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.
 - 24- Je, D., G. Dm, and A. Ew. 2001, Prospects for gene therapy in lung disease.: p. 272-277.
 - 25- 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
 - 26- 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.
 - 27- 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.
 - 28- Kloesch, B., et al., 2016, In Vitro Study of a Liposomal Curcumin Formulation (Lipocur™): Toxicity and Biological Activity in Synovial Fibroblasts and Macrophages. *In Vivo*. **30**(4): p. 413-419.
 - 29- Kong, X., et al., 2016, Spreading of a Unilamellar Liposome on Charged Substrates: A Coarse-Grained Molecular Simulation. *Langmuir*. **32**(15): p. 3785-3793.
 - 30- Miller, A.D. 1998, Cationic liposomes for gene therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. **37**(13-14): p. 1768-1785.
 - 31- Mazhab-Jafari, et al. (2013). "Membrane-dependent modulation of the mTOR activator Rheb: NMR observations of a GTPase tethered to a lipid-bilayer nanodisc." *Journal of the American Chemical Society* **135**(9): 3367-3370.
 - 32- Meyer, J. M. and C. E. Koro (2004). "The effects of antipsychotic therapy on serum lipids: a comprehensive review." *Schizophrenia research* **70**(1): 1-17.
 - 33- 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.
 - 34- 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.
 - 35- Pathak, S.K., et al., 2013, Effect of cholesterol concentration on size of liposome. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. **1**: p. 50-53.
 - 36- 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. 585-593.
 - 37- Petruzielo, R. S., F. A. Heberle, et al. (2013). "Phase behavior and domain size in sphingomyelin-containing lipid bilayers." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1828**(4): 1302-1313.
 - 38- Prakash, P., Y. Zhou, et al. (2016). "Oncogenic K-Ras binds to an anionic membrane in two distinct orientations: a molecular dynamics analysis." *Biophysical journal* **110**(5): 1125-1138.
 - 39- Rainuzzo, J. R., K. I. Reitan, et al. (1997). "The significance of lipids at early stages of marine fish: a review." *Aquaculture* **155**(1-4): 103-115.
 - 40- Reddy, M. J., H. S. Shetty, et al. (1992). "Role of seed lipids in *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **59**(2): 177-181.
 - 41- 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.
 - 42- Ritchie, T., Y. Grinkova, et al. (2009). "Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs." *Methods in enzymology* **464**: 211-231.
 - 43- Ritchie, T., Y. Grinkova, et al. (2009). "Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs." *Methods in enzymology* **464**: 211-231.
 - 44- Sahoo, S.K. and V. Labhasetwar, 2003, Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug discovery today*. **8**(24): p. 1112-1120.
 - 45- Sato, K. (2001). "Crystallization behaviour of fats and lipids—a review." *Chemical Engineering Science* **56**(7): 2255-2265.

- 46- Schouten, S., E. C. Hopmans, et al. (2013). "The organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids: a review." *Organic geochemistry* **54**: 19-61.
- 47- Seydel, J.K. and M. Wiese. 2009:, Drug-membrane interactions: analysis, drug distribution, modeling. . John Wiley & Sons. Vol. 15
- 48- Shih, A. Y., I. G. Denisov, et al. (2005). "Molecular dynamics simulations of discoidal bilayers assembled from truncated human lipoproteins." *Biophysical journal* **88**(1): 548-556.
- 49- Shih, A. Y., I. G. Denisov, et al. (2005). "Molecular dynamics simulations of discoidal bilayers assembled from truncated human lipoproteins." *Biophysical journal* **88**(1): 553-556.
- 50- Van Meer, G., D. R. Voelker, et al. (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." *Nature reviews Molecular cell biology* **9**(2): 112.
- 51- Vestergaard, M., J. F. Kraft, et al. (2015). "Bicelles and other membrane mimics: comparison of structure, properties, and dynamics from MD simulations." *The Journal of Physical Chemistry B* **119**(52): 15831-15843.
- 52- Wagner, A., K. Vorauer-Uhl, and H. Katinger, 2002, Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. **54**(2): p. 213-219.
- 53- 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
- 54- Xue, M., L. Cheng, et al. (2018). "Molecular Mechanism of Lipid Nanodisc Formation by Styrene Maleic Acid Copolymers." *Biophysical Journal*.
- 55- 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.
- 56- 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

A nanodisc structure design from sphingomyelin of chicken egg phospholipid (DPSM) and cholesterol (CHOL) and its formation study: a coarse-grained molecular dynamics simulation

Parcekani Choozaki J. and Taghdir M.

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

Abstract

Double-layer nanodiscs are structures made up of phospholipids double-layer membrane and do not exist between the double-layer of any contents or water molecules. Quadruple nanodiscs are actually like a normal cell that pushes on both sides of the body, such as the red blood cell structure that is pushing on both sides. The structure of nanodisc can cover water-soluble drugs in its hydrophilic superficial and fat-soluble drugs within its two layers, which is a hydrophobic environment. Synthesis of nanodiscs in experimental environments is time-consuming and costly. Therefore, in this research, the nanodisc structures from Egg sphingomyelin (DPSM) and Cholesterol (CHOL) molecules were designed and constructed. In order to do this goal, a molecular dynamics simulation approach was used. The results and analyses obtained from the simulations showed that selective molecules created a nanodiscs structure that resulted from the physicochemical properties of the DSPC and cholesterol molecules. It should be noted that the DSPC molecule has a cone-shaped geometric structure as well as a larger group than other lipids, which makes the molecule's tendency increase to create a nanodisc structure. The cholesterol molecule is located in the DPSM phospholipids and interacts with them. This feature of the cholesterol molecule increases the stability of the nanodiscs structures. Energy analyzes including total energy, van der Waals and electrostatic interactions energy showed that the created nanodisc structures, suitably reached to final structural stability.

Key words: molecular dynamics simulation, nanodisc, the formation of nanodiscs, cholesterol, phospholipid