



شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دانه‌درشت عبور حامل دارو از غشا سلول

بهزاد دمیرچی¹، میلاد ریسمانیان¹، محمدسعید سعیدی^{2*}، بهار فیروزآبادی²

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

2- استاد، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

* تهران، کد پستی 1458889694، mssaidi@sharif.edu

اطلاعات مقاله

مقاله پژوهشی کامل

دریافت: 30 فروردین 1393

پذیرش: 23 تیر 1393

ارائه در سایت: 04 آبان 1393

کلید واژگان:

انتقال دارو

دینامیک مولکولی دانه‌درشت

دینامیک مولکولی هدفمند

محاسبه سد انرژی

چکیده

با گسترش روزافزون صنعت داروسازی و ساخت داروهایی با عملکرد مشخص، انتقال آن به داخل سلول نیز از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. غشا سلول در برابر ترکیبات آب‌دوست غیر قابل نفوذ است و مکانیزم‌های انتقال اختصاصی برای نفوذ آن‌ها مورد نیاز است. بنابراین لزوم پیدا کردن راهی برای تسهیل عبور این داروها از غشا سلول مطرح است. در این بین پپتیدهای با قابلیت نفوذ به سلول نشان دادند که می‌توانند به عنوان حامل دارو مورد استفاده قرار گیرند چراکه توانایی عبور از غشا بدون نیاز به انرژی یا ریسپتور را دارا می‌باشند. در این پروژه به بررسی عبور یکی از این پپتیدها به نام پنتراتین از غشا سلول توسط شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدفمند با سرعت ثابت و با استفاده از روش دانه‌درشت مارتنی پرداخته شده است. ابتدا در یک شبیه‌سازی تعادلی جهت گیری پپتاید طی نزدیک شدن و نشست بر روی غشا بررسی و نشان داده شد که برای بررسی فرایند نفوذ آن به داخل سلول، نیاز به استفاده از دینامیک مولکولی هدفمند است. سد انرژی پیش‌روی این پپتاید برای نفوذ به داخل سلول و انتشار آن در داخل غشا بررسی شده است. در این پژوهش نشان داده می‌شود که تشکیل حفره آب برای نفوذ این پپتاید به داخل سلول باعث شکسته شدن سد انرژی و عبور آسان آن از غشا سلول می‌شود که با نتایج پژوهش‌های پیشین همخوانی دارد. همچنین میزان سد انرژی برای عبور این پپتاید از غشا 110 کیلوژول بر مول بدست آمد.

Coarse grain molecular dynamics simulation of drug carrier penetration into cell membrane

Behzad Damirchi, Milad Rismanian, Mohammad Said Saidi*, Bahar Firoozabadi

Department of Mechanical Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

* P. O.B. 1458889694, Tehran, Iran, mssaidi@sharif.edu

ARTICLE INFORMATION

Original Research Paper
Received 19 April 2014
Accepted 14 July 2014
Available Online 26 October 2014

Keywords:
Drug Delivery
Coarse Grain Molecular Dynamics
Steered Molecular Dynamics
Energy Barrier Calculation

ABSTRACT

With the increasing development of the pharmaceutical industry and producing drugs with specific performance, its transfer into cells is also of great importance. Cell membranes are effectively impermeable to hydrophilic compounds unless the permeation is facilitated by dedicated transport systems. As a consequence, there is much interest in finding ways to facilitate the transport of molecules across cell membranes. Cell-penetrating peptides (CPPs) in particular have shown much promise as potential delivery agents. That have been claimed to penetrate cell membranes in an energy- and receptor-independent manner. In the present investigation, the translocation of PENETRATIN into the cell membrane is carried out applying constant velocity steered molecular dynamics via MARTINI coarse grain approach. In order to study the orientation of peptide as it get closer to the membrane, equilibrium simulation is carried out and it is shown that to investigate the penetration process, steered molecular dynamics simulation must be applied. Energy barrier upon the insertion is calculated and its diffusion in the membrane is considered. It is shown that pore formation phenomenon breaks down the energy barrier and facilitates the translocation process which is in agreement with previous researches. Furthermore, 110 kJ/mol energy barrier is obtained from simulations for this peptide.

1- مقدمه

امروزه، انتقال دارو یکی از مهم‌ترین مسائل در مطالعات دارویی است که منجر به ایجاد علمی به نام طراحی دارو به منظور به دست آوردن بهترین ساختار برای جذب سلولی است. همچنین از روش‌های جانبی برای انتقال دارو به داخل سلول نیز استفاده می‌شود. برخی از این روش‌ها به منظور تسهیل این

جذب عبارتند از: الکتروپوریشن¹، تزریق²، و استفاده از کپسول لیپوزومی³ [1]. با آن‌که این روش‌ها به صورت گسترده‌ای استفاده می‌شوند، ولی راندمان بسیار بالایی ندارند [2]. بیشتر تلاش‌های صورت گرفته برای جذب مؤثر دارو

- 1- Electroporation
- 2- Injection
- 3- Liposome Encapsulation

Please cite this article using:

B. Damirchi, M. Rismanian, M. S. Saidi, B. Firoozabadi, Coarse grain molecular dynamics simulation of drug carrier penetration into cell membrane, *Modares Mechanical Engineering*, Vol. 14, No. 15, pp. 316-322, 2015 (In Persian)

برای ارجاع به این مقاله از عبارت ذیل استفاده نمایید:

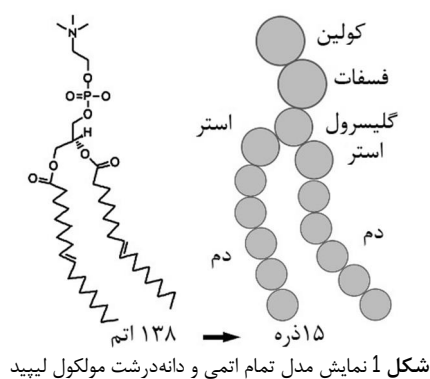
هنگام نزدیک شدن به غشا در یک شبیه‌سازی تعادلی مورد بررسی قرار گرفته است و پس از ادامه شبیه‌سازی تا 1 میکروثانیه، لزوم استفاده از شبیه‌سازی هدفمند تبیین خواهد شد. برای بررسی پدیده نفوذ پنتراتین از دینامیک مولکولی هدفمند با سرعت ثابت رفت و برگشتی استفاده شده است. بنا بر مطالعات پیشین صورت گرفته، همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، نفوذ برخی از این پپتایدها همراه با تشکیل حفره بر روی غشا است. پنتراتین نیز جزء این دسته پپتایدها است.

2- مدل‌سازی

استفاده از مدل‌های دانه‌درشت در انواع مختلفی از تکنیک‌های شبیه‌سازی، ثابت کرده است که ابزاری ارزشمند برای بررسی پدیده‌ها در زمان و مقیاسی فراتر از سیستم‌های تمام اتم است. تنوع زیادی در استفاده از مدل دینامیک مولکولی دانه‌درشت وجود دارد. مدل‌های کیفی و مدل‌های عاری از حلال تا مدل‌های شامل ویژگی‌های شیمیایی مواد در محدوده‌ی استفاده از این روش به حساب می‌آیند. به جای تمرکز بر تولید جزئیات ریز و دقیق یک حالت در یک سیستم خاص، هدف در نظر گرفتن محدوده وسیع‌تری از کاربرد سیستم بدون تعریف پارامترهای سیستم برای هر بار مدل‌سازی است. لذا فرایندهای در نظر گرفته شده در این نوع مدل‌سازی جنبه عمومی‌تری نسبت به حالت تمام اتمی دارد که در آن قاعداً جزئیاتی که در حالت تمام اتمی در نظر گرفته می‌شوند، مشاهده نمی‌شوند. فرایندهایی مانند خود تشکیل لیپیدها، اتصال غشا پپتایدی و شناخت اتصال پروتئین- پروتئین را می‌توان با استفاده از این روش مدل‌سازی و شبیه‌سازی کرد. هدف کلی روش‌های دانه‌درشت، به‌وجود آوردن مدل ساده‌ای است که حل آن بسیار سریع و استفاده آن آسان است، همچنین انعطاف‌پذیری بالایی برای استفاده در محدوده وسیعی از سیستم‌های زیست- مولکولی⁹ را دارد.

اساس محاسبات بر اساس دینامیک مولکولی دانه‌درشت نگاشتی است که تعدادی اتم یا مولکول در مدل تمام اتمی را به یک ذره تبدیل می‌کند و هندسه‌ای جدید تولید می‌کند که در آن برهم‌کنش بین ذرات باید مشخص شوند و پس از بدست آوردن قوانین حاکم کار شبیه‌سازی و جلو بردن سیستم به منظور دستیابی به هدف مورد نظر آغاز می‌شود. شکل 1، نمونه‌ای از این نگاشت را نشان می‌دهد که تعداد معینی از اتم‌های موجود در مولکول اصلی (لیپید) به صورت ذره در نظر گرفته شده‌اند.

در تبدیل مقیاس از تمام اتمی به دانه‌درشت روش‌های گوناگونی ارائه شده است. روشی که در این مدل‌سازی از آن استفاده شده، روش مارتینی



شکل 1 نمایش مدل تمام اتمی و دانه‌درشت مولکول لیپید

و انتقال بهینه آن به داخل سلول معطوف به پیدا کردن راهی برای عبور آن‌ها از اولین سد مقابل آن‌ها، یعنی غشا سلول است. بسیاری از داروهایی که توانایی مهار بیماری را دارند، قادر به عبور از غشا سلول نیستند [3]. در پژوهش‌ها و مطالعات صورت گرفته برای تسهیل در انتقال دارو به داخل سلول، برخی پپتایدها با توانایی نفوذ خودبخودی به سلول، کاندیداهای بسیار مناسبی برای کمک به عبور داروهایی که غشا اجازه نفوذ به سلول را به آن‌ها نمی‌دهد، مطرح شده‌اند. آزمایش‌های بسیاری نیز صحت این امر را نشان داده‌اند و مشخص شده است که راه‌های بسیاری برای نفوذ آن‌ها به داخل سلول وجود دارد که همگی آن‌ها به صورت غیر اندوسیتوزی¹ و بدون نیاز به انرژی صورت می‌گیرند [4].

این پپتایدها معمولاً شامل کمتر از 30 آمینواسید هستند. بیشتر آن‌ها بار مثبت دارند و از این رو به آن‌ها پپتایدهای کاتیونی نیز گفته می‌شود. تعداد بسیار زیادی از این پپتایدهای کاتیونی شناسایی شده‌اند ولی پژوهش‌های مختصری بر روی آن‌ها صورت گرفته و کمتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند [3]. معروف‌ترین این پپتایدها شامل پنتراتین² [5,3]، اچ آی وی-1³ [7,6]، ترنسپورتان⁴ [8] و پلی آرژینین⁵ [2] می‌شود.

مکانیزم‌های متفاوتی برای نفوذ این پپتایدها به داخل سلول گزارش شده است که از بین آن‌ها می‌توان به مکانیزم‌هایی مانند تشکیل خودبخودی حفره [4]، مدل کارپت [9] و تشکیل میسل معکوس [10] اشاره کرد. از آن‌جا که مشاهده و بررسی پدیده نفوذ این پپتایدها به داخل سلول بسیار مشکل و درک جزئیات آن تقریباً غیرممکن است، بسیاری از پژوهشگران استقبال زیادی از روش‌های محاسباتی و مدل‌سازی دینامیک مولکولی به عمل آورده‌اند. شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی در بسیاری از پدیده‌های زیستی کمک شایانی به پژوهشگران برای درک جزئیات آن کرده‌اند. دو رویکرد عمده در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی وجود دارد که شامل شبیه‌سازی‌های تمام اتمی و شبیه‌سازی‌های دانه‌درشت⁶ می‌شود. در مواردی که جزئیات زیادی از یک پدیده مد نظر است، بسته به توان محاسباتی در اختیار پژوهشگر و ابعاد نسبتاً کوچک مسأله، استفاده از شبیه‌سازی تمام اتمی موخه و دقیق است. در مسائلی که ابعاد آن بسیار بزرگ و کلیات آن مدنظر است، اغلب از شبیه‌سازی دانه‌درشت استفاده می‌شود.

پنتراتین دارای 16 آمینواسید است که برگرفته از مولکول دروسوفیلا آنتنپدیا⁷ آمینواسیدهای 43 تا 58 است (RQIKIWFEQNRRMKWKK). 7 عدد از این آمینواسیدها که شامل آرژینین و لایزین⁸ می‌باشند دارای بار مثبت هستند که خاصیت کاتیونی بودن این پپتاید به دلیل وجود این دو آمینواسید است. آرژینین در مقایسه با لایزین دارای زنجیره بلندتری است و سریع‌تر از لایزین نفوذ می‌کند. در مولکول‌های حاوی این دو آمینواسید اغلب نفوذ از سری که دارای آمینواسید آرژینین است، آغاز می‌شود.

در این پژوهش، نفوذ خودبخودی پنتراتین به داخل سلول با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دانه‌درشت مورد بررسی قرار گرفته است. شبیه‌سازی تمام اتمی این فرایند در پژوهش‌های پیشین صورت گرفته است [4,3]. استفاده از شبیه‌سازی دانه‌درشت امکان دستیابی به مقیاس‌های زمانی بسیار بالاتر را در اختیار ما قرار می‌دهد. ابتدا جهت گیری این پپتاید

- 1- Non-Endocytotic
- 2- Penetratin
- 3- HIV-1 TAT
- 4- Transportan
- 5- Poly-Arginines
- 6- Coarse Grain
- 7- Drosophila Antennapedia
- 8- Lysine

برهم‌کنش‌های پیوندی: برهم‌کنش‌های پیوندی توسط فرمول‌های (3) تا (6) بیان می‌شوند:

$$V_b = \frac{1}{2} K_b (d_{ij} - d_b)^2 \quad (3)$$

$$V_a = \frac{1}{2} K_a [\cos \varphi_{ijk} - \cos \varphi_a]^2 \quad (4)$$

$$V_d = K_d [1 + \cos(\theta_{ijkl} - \theta_d)] \quad (5)$$

$$V_{id} = K_{id} (\theta_{ijkl} - \theta_{id})^2 \quad (6)$$

روابط بالا تقابل پیوندی بین مکان i, j, k, l را با فاصله تعادلی d_a ، زاویه تعادلی φ_a و زوایای دو سطحی θ_d و θ_{id} را نشان می‌دهند. ثابت‌های پتانسیل‌ها اغلب بسیار کوچک هستند که این مهم از تطابق ضرایب در مدل دانه‌درشت با مدل تمام اتمی بدست می‌آیند. پتانسیل پیوندی V_b برای پیوندهای شیمیایی، و پتانسیل زاویه‌ای V_a به منظور نشان دادن چگرمگی زنجیره استفاده می‌شوند. پتانسیل مناسب دوسطحی V_d تنها به منظور اعمال استواری ساختار پیتایدی و پتانسیل ثانویه دوسطحی V_{id} برای جلوگیری از جابجایی‌های خارج از صفحه‌ای برای گروه‌های هم صفحه اعمال می‌شوند.

3- دینامیک مولکولی هدفمند

در این پژوهش از روش دینامیک مولکولی هدفمند با سرعت رفت و برگشتی ثابت استفاده شده است [12]. در این روش با اتصال یک فنر سخت به اتم هدف، که بدست آوردن ضریب پخش و انرژی پتانسیل مؤثر آن در یک مسیر مورد نظر است، اتم در راستای مورد نظر، که در این مسئله در جهت رو به داخل به سمت سلول است، به حرکت در می‌آید. سپس انتهای فنر با سرعت ثابت کشیده خواهد شد. شکل 3 بیانگر چگونگی اتصال فنر به اتم هدف و کشیده شدن اتم هدف در پی حرکت با سرعت ثابت نقطه مرجع است.

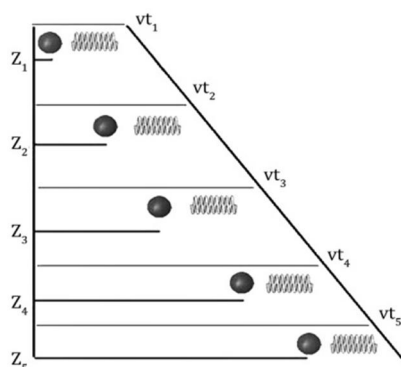
در این حالت انرژی فنر و کار انجام شده در مکان z از کانال، با استفاده از روابط (7) و (8) بدست خواهند آمد:

$$V(t) = \frac{k}{2} (z - z_0 - vt)^2 \quad (7)$$

$$W(t) = \int_0^t \frac{\partial V}{\partial t'} dt' = -kv \int_0^t (z - z_0 - vt') dt' \quad (8)$$

در این روابط z_0 مکان اولیه اتم هدف، v سرعت حرکت انتهای فنر و t زمان است. لازم به ذکر است که در زمان $t=0$ طول اولیه فنر و همچنین طول تعادلی فنر نیز صفر در نظر گرفته می‌شود.

فرض کنید در مسیر رفت، کار انجام شده برای حرکت اتم هدف W_f ، تغییر انرژی فنر V_f ، کار نیروی استهلاکی W_{aff} و تغییر در انرژی پتانسیل



شکل 3 حرکت با سرعت ثابت نقطه‌ی مرجع و اعمال نیرو به اتم هدف توسط فنر

است. نگاشت مارتینی بر پایه تبدیل 4 به 1 بنا شده است، بدین معنی که به طور متوسط هر 4 اتم سنگین را به صورت یک ذره در نظر می‌گیرد [11]. در مورد مولکول‌های حلقوی روش دیگری اتخاذ می‌شود. برای مدل‌سازی مولکول‌های حلقوی (مانند بنزن، کلسترول و برخی از آمینواسیدها) مدل 4 به 1 کافی نیست. به این دلیل مولکول‌های حلقوی به صورت دقیق‌تری مدل می‌شوند (2 به 1). مدل مارتینی شامل 4 نوع منطقه واکنشی است: قطبی (P)، غیرقطبی (توانایی برقراری پیوند هیدروژنی) (N)، غیرقطبی (عدم توانایی برقراری پیوند هیدروژنی) (C) و باردار (Q). ما بین این چهار نوع اصلی، زیرگروه‌هایی بر اساس قابلیت برقرار کردن پیوند هیدروژنی بیان شده‌اند که به صورت: دهنده (d)، گیرنده (a)، هر دو (da) و هیچکدام (0) و یا توسط اعداد از 1= پلاریته کم تا 5= پلاریته زیاد درجه‌بندی شده‌اند. نقشه برخی از مولکول‌های زیستی در شکل 2 نشان داده شده است.

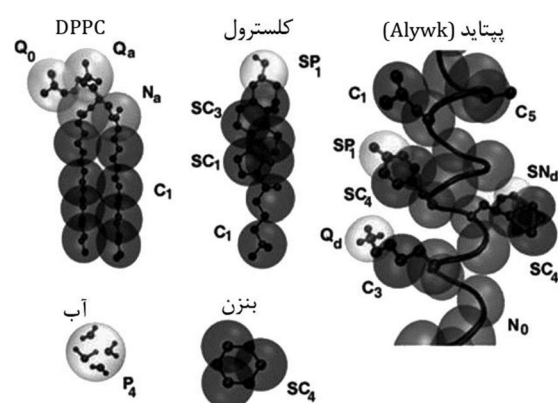
برهم‌کنش‌های غیرپیوندی: تمام زوج ذرات i و j که در فاصله r_{ij} از یکدیگر قرار گرفته‌اند با هم بر اثر نیروی لنارد جونز¹ برهم‌کنش دارند (رابطه 1):

$$V_{LJ} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (1)$$

قدرت این برهم‌کنش توسط چهار انرژی ϵ_{ij} ، بر اساس نوع ذرات معین می‌شود. مقدار ϵ_{ij} از مقدار $\epsilon_{ij} = 5.6 \text{ kJ/mol}$ برای برهم‌کنش‌های قطبی تا $\epsilon_{ij} = 2.3 \text{ kJ/mol}$ برای برهم‌کنش‌های بین گروه‌های قطبی و غیرقطبی با در نظر گرفتن خاصیت آب‌گریزی تغییر می‌کند. اندازه مؤثر ذرات توسط پارامتر لنارد-جونز $\sigma = 0.47 \text{ nm}$ برای تمام انواع ذرات در نظر گرفته می‌شود. برای کلاس خاص ذرات با مولکول‌های حلقوی، این مقدار برای در نظر گرفتن تقابل ذرات در مدل حلقوی به $\sigma = 0.43 \text{ nm}$ کاهش می‌یابد. همچنین ϵ_{ij} نیز 75% مقدار استاندارد در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر برهم‌کنش لنارد-جونز، مولکول‌های قطبی (نوع Q) که دارای بار q می‌باشند به میزان نیروی کولمب با ضریب دی‌الکتریک نسبی $\epsilon_{rel} = 15$ به هم نیرو وارد می‌کنند که پتانسیل آن با رابطه (2) محاسبه می‌شود:

$$V_{el} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_{rel} r_{ij}} \quad (2)$$

به منظور کاهش حجم محاسبات غیر مؤثر، برای برهم‌کنش‌های غیر پیوندی شعاع برشی $1/2 \text{ nm}$ در نظر گرفته می‌شود.



شکل 2 مدل شیمیایی و دانه‌درشت برای DPPC²، کلسترول، آب، بنزن و قسمتی از پیتاید (با پنج آمینواسید مشخص شده). نوع ذره‌های دانه‌درشت بر اساس آب دوست بودن با گروه‌های قطبی دیگر با رنگ روشنتر مشخص گردیده است.

2- Dipalmitoylphosphatidylcholine

1- Lenard-Jones

پس از در اختیار داشتن ساختار حامل دارو و غشا سلول، پنتراتین در فاصله 20 آنگسترومی از سطح غشا قرار داده شد. سپس تمام مجموعه داخل جعبه محاسباتی به ابعاد $80 \times 80 \times 107 \text{ \AA}^3$ قرار داده شده و محلول آب و یون به آن اضافه شده است. شکل 5، نحوه قرارگیری پنتراتین بالای غشا و جعبه محاسباتی را نشان می‌دهد.

در این پژوهش همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد، ابتدا شبیه‌سازی تعادلی به منظور به‌دست آوردن جهت‌گیری و نحوه نزدیک شدن پنتراتین به غشاسلول صورت گرفته‌است. برای بررسی نفوذ آن به داخل غشا، پنتاید در فاصله 2 آنگسترومی از غشا قرار داده شده و در داخل جعبه محاسباتی به ابعاد $80 \times 80 \times 87 \text{ \AA}^3$ پس از اضافه کردن محلول و یون جای داده شده است.

5- جزئیات شبیه‌سازی

برای مدل‌سازی از نرم‌افزار وی‌ام‌دی³ نسخه 1.9.1 [13] و برای شبیه‌سازی از کد نم‌د⁴ ورژن 2.9 [14] استفاده شده است. ضرایب نیروی شبیه‌سازی برای محاسبه برهم‌کنش پروتئین و لیپید به ترتیب از چارم⁵ 22 [15] و چارم⁶ 27 [16] استخراج شده‌اند شرایط مرزی شبیه‌سازی به صورت پریودیک اعمال شده است. محلول آب مورد استفاده از نوع سه نقطه‌ای است و 15% از آن به صورت آب ضد انجماد قرار داده شده است که تفاوت آن با بقیه مولکول‌های آب، اندازه بزرگ‌تر آن است که باعث بر هم خوردن ساختارهای منظم کریستال آب می‌شود و از انجماد آن جلوگیری می‌کند. در تهیه جعبه محاسباتی، محلول در راستای عمود بر غشا از سمت پایین غشا تا فاصله 15 آنگسترومی از غشا و از سمت بالای غشا تا فاصله 15 آنگسترومی از پنتراتین اضافه شده است. میزان اضافه کردن یون‌ها به صورتی است که سیستم از لحاظ بار الکتریکی خنثی شود. برای برهم‌کنش‌های غیر پیوندی که شامل پتانسیل لرنارد جونز و کولمب است، شعاع برشی معادل $1/2$ نانومتر و برای اعمال تغییرات پیوسته، شعاع $0/9$ نانومتر برای شروع تغییر برهم‌کنش غیر پیوندی در نظر گرفته شده است به صورتی که در فاصله $1/2$ نانومتری مقدار این برهم‌کنش‌ها به صفر برسد. گام زمانی برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدمند 20 fs است. همچنین از آنجا که در نگاشت مارتینی دما باید حدود



شکل 5 نحوه قرار گیری پنتراتین و تصویر جعبه محاسباتی شبیه‌سازی تعادلی

PMF_f و برای مسیر برگشت، کار انجام شده برای حرکت اتم هدف W_r ، تغییر انرژی فنر V_r ، کار نیروی استهلاکی $W_{d/r}$ و تغییر در انرژی پتانسیل PMF_r باشد. واضح است که $PMF = PMF_f = PMF_r$ و $W_d = W_{d/f} = W_{d/r}$. معادلات (9) و (10) به ترتیب کار انجام شده در مسیر رفت و برگشت را نشان می‌دهند:

$$W_f = V_f + PMF + W_d \quad (9)$$

$$W_r = V_r - PMF + W_d \quad (10)$$

پس ساده‌سازی روابط، انرژی پتانسیل و کار نیروی استهلاکی به ترتیب با روابط (11) و (12) محاسبه می‌شوند.

$$PMF = \frac{W_f - W_r}{2} - \frac{V_f - V_r}{2} \quad (11)$$

$$W_d = \frac{W_f + W_r}{2} - \frac{V_f + V_r}{2} \quad (12)$$

مقدار ضریب دیفیوژن با رابطه (13) که رابطه انیشتین نام دارد بدست می‌آید [12]:

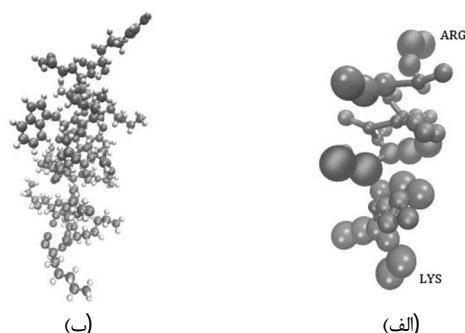
$$D = \frac{k_B T v}{\frac{dW_d}{dz}} \quad (13)$$

که در آن k_B ثابت بولتزمن و v سرعت کشش است.

4- جزئیات مدل‌سازی

حامل داروی استفاده شده در این پژوهش پنتراتین نام دارد که ساختار اولیه آن از بانک اطلاعاتی پروتئین¹ با شماره شناسه 1QM1 مدل 1، آمینواسیدهای 43-58 تهیه شده است. ابتدا پنتراتین در داخل محلول آب و یون قرار داده شده و در مقیاس تمام اتمی به میزان 20 نانوثانیه به تعادل رسانده می‌شود. از ساختار نهایی این شبیه‌سازی تعادلی پس از اعمال نگاشت مارتینی، برای دیگر شبیه‌سازی‌ها به عنوان ساختار پایه استفاده شده است. شکل 4 نشان‌دهنده ساختار تمام اتمی و دانه‌درشت این مولکول را نشان می‌دهد. در حالت تمام اتمی این مولکول دارای 331 اتم است که پس از نگاشت مارتینی، تعداد ذرات آن به 47 عدد کاهش می‌یابد.

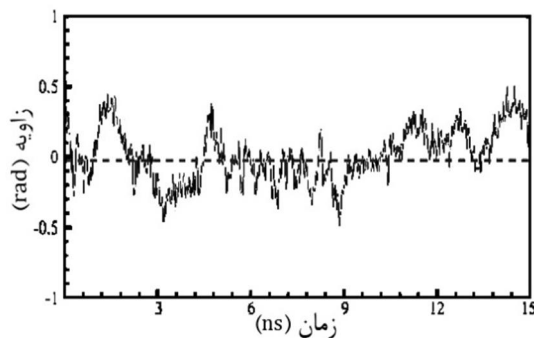
برای مدل‌سازی غشا سلول، 128 فسفولیپید نوع POPC² به صورت دولایه (هر لایه 64 عدد) در نظر گرفته شده است. این مدل نیز به صورت تمام اتمی به میزان 500 پیکوثانیه در داخل محلول آب و یون به تعادل رسانده و پس از اعمال نگاشت دانه‌درشت مارتینی به عنوان ساختار پایه برای شبیه‌سازی‌های دانه‌درشت دیگر مورد استفاده قرار گرفت. غشا سلول در حالت تمام اتمی حاوی حدود 23000 اتم است که پس از اعمال نگاشت مارتینی تعداد ذرات آن به 1650 عدد کاهش می‌یابد.



شکل 4 نمای الف) دانه‌درشت و ب) تمام اتمی پنتراتین

3- VMD
4- NAMD
5- CHARMM

1- Protein Data Bank
2- 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine



شکل 6 زاویه پنتراتین نسبت به محور افقی هنگام نزدیک شدن به غشا و نشست روی آن

تشکیل حفره آب در فرایند نفوذ پنتراتین به داخل سلول است. در مولکول پنتراتین نفوذ از ترمینال آمینی، جایی که آمینواسید آرژینین قرار دارد، شروع می‌شود. به دلیل وجود بار مثبت بر روی پنتراتین، سرگروه‌های⁴ فسفاتی بر روی تک‌لایه بالایی غشا جذب آن می‌شوند. به طور همزمان سرگروه‌های فسفاتی واقع بر تک‌لایه زیرین نیز به طرف پپتاید حرکت می‌کنند. از آنجا که فرایند جذب دوطرفه است، پپتاید نیز شروع به حرکت به سمت پایین (داخل سلول) کرده و باعث به‌وجود آمدن انحنا بر روی غشا می‌شود. به دنبال نفوذ آرژینین به داخل غشا و جذب سرگروه‌های فسفاتی، تمام مولکول به داخل غشا کشیده می‌شود و باعث به‌وجود آمدن حفره بر روی غشا می‌شود. شکل 7، تشکیل حفره آب را در طی شبیه‌سازی نشان می‌دهد.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، برای بهتر مشخص شدن حفره، دو سلول محاسباتی کنار یکدیگر از نمای بالا نشان داده شده است. تصویر الف، لحظه اولیه شبیه‌سازی است. با گذشت زمان، جهت‌گیری پنتراتین تغییر کرده و به صورت عمودی درمی‌آید (ب تا ت). هرچه این تغییر زاویه بیشتر شده و مولکول بیشتر وارد غشا شود، حفره نیز بزرگ‌تر شده و قطر آن افزایش می‌یابد. تصویر ث نمای از بالای انتهای شبیه‌سازی رفت را نشان می‌دهد که حفره کاملاً تشکیل شده و پنتراتین به سمت دیگر غشا رسیده است. وجود این حفره آب سبب تسهیل در نفوذ پنتراتین به داخل سلول می‌شود. جهت اعمال نیرو زمانی عوض می‌شود (از سمت داخل به سمت خارج سلول) که مولکول به سمت دیگر غشا رسیده است.

شکل 8 همراهی آب با حامل دارو در عبور از داخل غشا نشان داده شده است. از آنجا که بر روی بدنه داخلی حفره شکل گرفته سرهای آب دوست⁵ است. از آنجا که بر روی بدنه داخلی حفره شکل گرفته سرهای آب دوست⁵ است. از آنجا که بر روی بدنه داخلی حفره شکل گرفته سرهای آب دوست⁵ است. از آنجا که بر روی بدنه داخلی حفره شکل گرفته سرهای آب دوست⁵ است.

شکل 9 نمودار انرژی پتانسیل مؤثر در داخل غشاء و در طی شبیه‌سازی را نشان می‌دهد (نمودار از راست به چپ خوانده شود). در طی 16 شبیه‌سازی صورت گرفته که شامل مسیرهای رفت و برگشت است، مقدار میانگین گرفته شده انرژی پتانسیل مؤثر با رنگ تیره‌تر نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که سد انرژی پیش روی دارو در عبور از غشاء سلول حدود 110 kJ/mol است.

10 تا 15 کلوبین بالاتر در نظر گرفته شود تا بتوان آن را معادل حالت واقعی در نظر گرفت [11]. دمای شبیه‌سازی 323 کلوبین در نظر گرفته شده و از ترموستات لانجوين برای ثابت نگه‌داشتن آن استفاده شده است. برای شبیه‌سازی تعادلی فشار 1 اتمسفر توسط بارومتر لانجوين ثابت نگه‌داشته شده است. به منظور اعمال نیرو به پنتراتین برای نفوذ به سلول، نزدیک‌ترین بکبون¹ به مرکز جرم به فنری با ثابت نیروی 1500 kJ/mol/Å² متصل شده و از آنجا که نفوذ در راستای عمود بر غشا مدنظر است، بزرگترین مقدار با شرط همگرایی شبیه‌سازی اتخاذ شده است و سر دیگر فنر با سرعت 0.5 Å/ns به داخل سلول حرکت می‌کند. آنسامبل شبیه‌سازی تعادلی هم-دما-هم-فشار و آنسامبل شبیه‌سازی هدفمند کانونیکال است. برای بدست آوردن نتایج دقیق‌تر، 8 شبیه‌سازی رفت و برگشتی و در مجموع 16 شبیه‌سازی یک‌طرفه انجام شده است. در این پروژه از یک دستگاه کارت گرافیک انویدیا² GTX-580 در کنار 4 هسته اینتل³ 2500 k به عنوان پردازنده اصلی استفاده شده است. استفاده از کارت گرافیک تأثیر بسیار زیادی در کاهش زمان محاسبات داشته و در افزایش چشمگیری در سرعت محاسبات داشته است. شبیه‌سازی در حالت یک طرفه (رفت یا برگشت) به مدت 140ns به طول انجامید و در مجموع حالت رفت و برگشتی 280ns شبیه‌سازی انجام شد. همچنین مدت هر شبیه‌سازی یک طرفه 25 ساعت و در حالت رفت و برگشتی حدود 50 ساعت طول کشید.

در نتیجه مدت شبیه‌سازی غیر تعادلی در کل به میزان 400 ساعت، تقریباً معادل 17 روز است، و برای شبیه‌سازی تعادلی که با تعداد اتم‌های بیشتر و به مدت 1 μs صورت گرفت به مدت 6 روز به طول انجامید. به منظور کاهش حجم اطلاعات ذخیره شده اطلاعات گرافیکی به ازای هر 1000 گام زمانی ذخیره شدند.

6- نتایج و بحث

به منظور تحلیل کمی جهت‌گیری پنتراتین هنگام نزدیک شدن به غشا سلول، برداری فرضی بین دو بکبون از وسط این مولکول که امتداد آن، در راستای کلی این پپتاید است، در نظر گرفته شده است. سپس زاویه این بردار با محور افق در زمان شبیه‌سازی محاسبه شده است. شکل 6 دیگرام جهت‌گیری پنتراتین را نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که مقدار میانگین این زاویه حدوداً صفر است (خط‌چین). این امر به این دلیل است که توزیع بار بر روی پنتراتین به صورت یکنواخت بوده و قسمت خاصی از مولکول برای نزدیک شدن به غشا اولویت ندارد. در پژوهش تمام اتمی صورت گرفته نیز که طی آن جهت‌گیری این پپتاید حین نزدیک شدن به غشاهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، برای غشای انتخاب شده در این نتایج پژوهش، نشان داده شده است که پنترا به صورت موازی با سطح غشا به آن نزدیک می‌شود که مقایسه نتایج، حاکی از صحت شبیه‌سازی تعادلی است [17].

پس از قرارگیری پپتاید بر روی غشا سلول، شبیه‌سازی به مدت 1 میکروثانیه ادامه یافت که پس از اتمام این زمان نیز پپتاید هیچ نفوذی به داخل غشا نداشت. هزینه بالایی محاسباتی لازم برای مشاهده پدیده نفوذ در شبیه‌سازی تعادلی، سبب استفاده از دینامیک مولکولی هدفمند در بررسی این فرایند شد.

هدف اولیه این شبیه‌سازی در بررسی نفوذ پپتاید، مشاهده پدیده

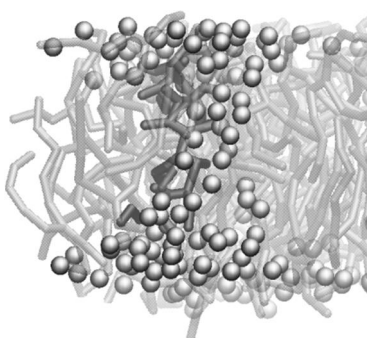
4- Head Groups
5- Hydrophilic

1- Backbone
2- Nvidia
3- Intel

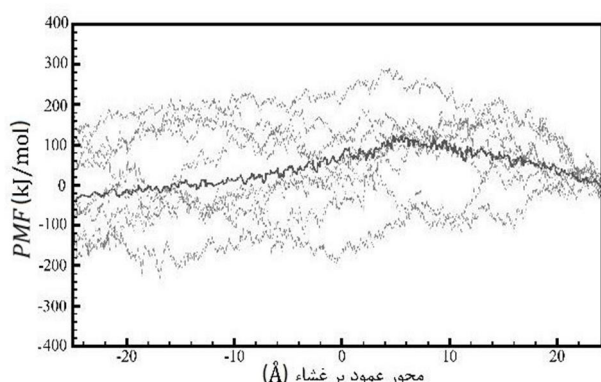
نقطه ماکزیمم دیاگرام انرژی پتانسیل نیز بیانگر محل قرارگیری پنتراتین در داخل غشا است که حفره تشکیل شده و آب شروع به عبور از غشا می‌کند. عبور آب از غشا باعث کاهش سد انرژی و نفوذ سریعتر و آسان‌تر دارو به سلول می‌شود. لذا در انتقال این حامل دارو به داخل سلول فرایند تشکیل حفره آب روی غشاء زمینه‌ساز نفوذ آن‌ها را به درون سلول فراهم می‌آورد.

در شکل 10 نمودار کار نیروی استهلاکی در داخل غشاء برای 16 شبیه‌سازی در مسیر رفت و برگشت نشان داده‌است. همان‌طور که در نمودار انرژی پتانسیل مؤثر سد انرژی تا حدود 4 آنگستروم از مرکز غشا افزایش می‌یابد در این نمودار نیز همین اتفاق صورت می‌گیرد (نمودار از راست به چپ خوانده شود).

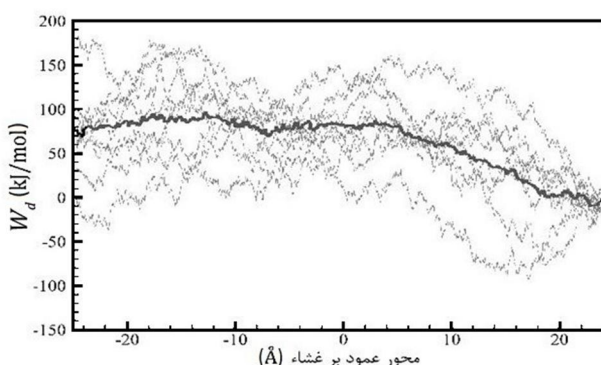
طبق رابطه (13) ضریب دیفیوژن با شیب نمودار رابطه عکس دارد و تا فاصله 4 آنگسترومی از مرکز غشا، نمودار دارای شیب زیادی است که بیانگر



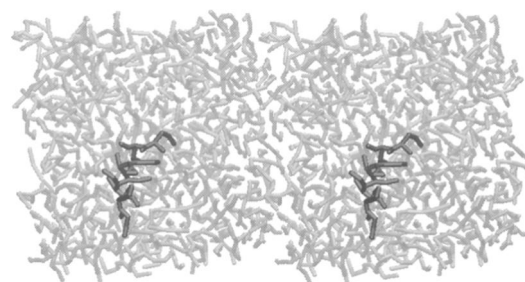
شکل 8 نشت آب از قسمت بیرون سلول به داخل سلول همراه با نفوذ پنتراتین



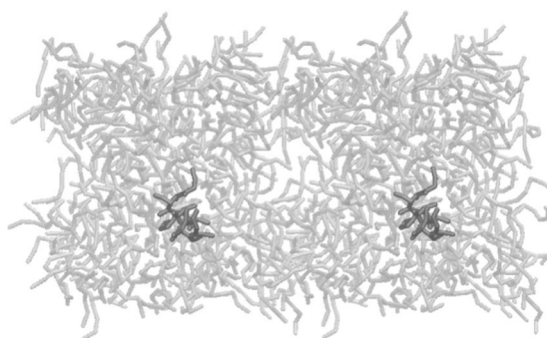
شکل 9 نمودار پتانسیل مؤثر در غشا، خطوط کم‌رنگ معرف شبیه‌سازی‌های صورت گرفته شده و خط پر رنگ مقدار میانگین آن‌ها است



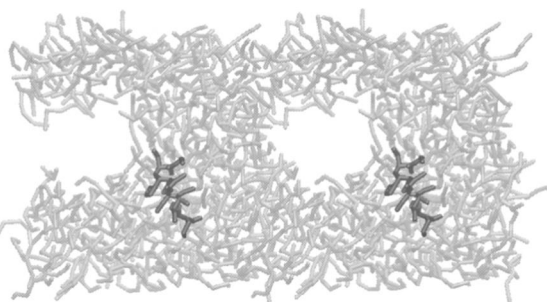
شکل 10 نمودار کار نیروی اتلافی در غشا، خطوط کم‌رنگ معرف شبیه‌سازی‌های صورت گرفته شده و خط پر رنگ مقدار میانگین آن‌ها است



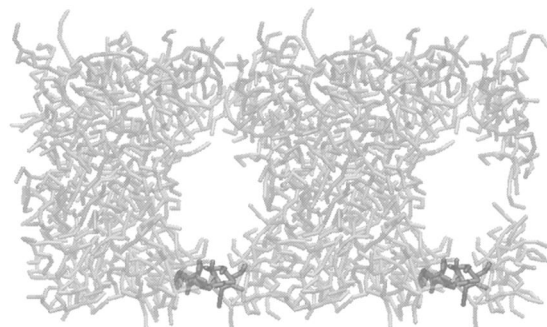
(الف)



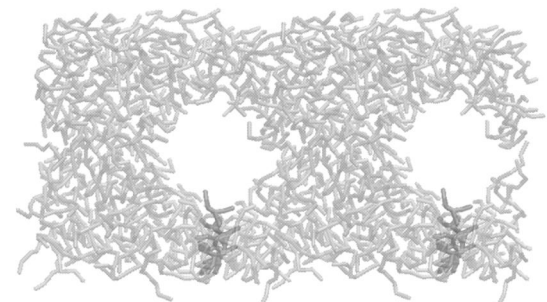
(ب)



(پ)



(ت)



(ث)

شکل 7 تشکیل حفره آب در طی شبیه‌سازی و نفوذ پنتراتین به داخل غشا

8- مراجع

- [1] D. Luo, W. M. Saltzman, Synthetic DNA delivery systems, *Nature Biotechnology*, Vol. 18, No. 1, pp. 33-37, 2000.
- [2] N. Schmidt, A. Mishra, G. H. Lai, G. C. Wong, Arginine-rich cell-penetrating peptides, *FEBS Letters*, Vol. 584, No. 9, pp. 1806-1813, 2010.
- [3] S. Yesylevskyy, S.-J. Marrink, A. E. Mark, Alternative mechanisms for the interaction of the cell-penetrating peptides penetratin and the TAT peptide with lipid bilayers, *Biophysical Journal*, Vol. 97, No. 1, pp. 40-49, 2009.
- [4] H. D. Herce, A. E. Garcia, Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 104, No. 52, pp. 20805-20810, 2007.
- [5] D. Derossi, A. H. Joliet, G. Chassaing, A. Prochiantz, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 14, pp. 10444-10450, 1994.
- [6] C. Southgate, M. L. Zapp, M. R. Green, Activation of transcription by HIV-1 Tat protein tethered to nascent RNA through another protein, 1990.
- [7] A. D. Frankel, C. O. Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell*, Vol. 55, No. 6, pp. 1189-1193, 1988.
- [8] M. Pooga, M. Hallbrink, M. Zorko, Cell penetration by transportan, *The FASEB Journal*, Vol. 12, No. 1, pp. 67-77, 1998.
- [9] C. T. Taylor, G. T. Furuta, K. Synnestvedt, S. P. Colgan, Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 97, No. 22, pp. 12091-12096, 2000.
- [10] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 30, pp. 18188-18193, 1996.
- [11] S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, A. H. de Vries, The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations, *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 111, No. 27, pp. 7812-7824, 2007.
- [12] I. Kosztin, B. Barz, L. Janosi, Calculating potentials of mean force and diffusion coefficients from nonequilibrium processes without Jarzynski's equality, *The Journal of chemical physics*, Vol. 124, No. 6, pp. 064106, 2006.
- [13] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *Journal of Molecular Graphics*, Vol. 14, No. 1, pp. 33-38, 1996.
- [14] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 26, No. 16, pp. 1781-1802, 2005.
- [15] A. Mackerell, D. Bashford, M. Bellott, R. Dunbrack, M. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph, Self-consistent parameterization of biomolecules for molecular modeling and condensed phase simulations, in *Proceeding of FEDERATION AMER SOC EXP BIOL 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998*, pp. A143-A143.
- [16] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. Dunbrack, J. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. a. Ha, All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins, *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 102, No. 18, pp. 3586-3616, 1998.
- [17] M. Lensink, B. Christiaens, J. Vandekerckhove, A. Prochiantz, M. Rosseneu, Penetratin-membrane association: W48/R52/W56 shield the peptide from the aqueous phase, *Biophysical Journal*, Vol. 88, No. 2, pp. 939-952, 2005.
- [18] S. Yaghoobi Koopay, A.R. Pishevar, M.S. Saidi, Y. Afshar, S. Mokhtarian, Calculation the diffusion coefficient for water and lipid through the biological cell bilayer membranes using dissipative particle dynamics method, *Modares Mechanical Engineering*, Vol. 14, No. 5, pp. 102-110, 2014. (In Persian)

ضرب دیفیوژن پایین آن است. پس از تشکیل حفره و نفوذ آب، دیگرام دارای شیب کمتری می‌شود که به معنای افزایش ضریب دیفیوژن است. همچنین مقدار ضریب دیفیوژن متوسط برای این مولکول با استفاده از فرمول (13) به میزان $1/4 \times 10^{-15} \text{ Å}^2/\text{ns}$ محاسبه شده است. بنابراین، علاوه بر بررسی کیفی پدیده انتقال حامل دارو، با مقایسه این مقدار و مقادیر محاسبه نفوذ مواد دیگر مانند آب، مشخص می‌شود که نفوذ این حامل دارو نیازمند زمان زیادی است [18].

در شبیه‌سازی تمام اتمی صورت گرفته توسط یسیلوسکوی و همکارانش پنتراتین [3]، پپتاید بر روی غشاء شامل 128 لیپید قرار داده شده و توسط فنری با ضریب سختی 1000 kJ/mol/Å^2 که یک سر آن با $0/01 \text{ Å/ns}$ و سر دیگر آن به پپتاید متصل است کشیده می‌شود. در طی این شبیه‌سازی که حفره آب در طی آن مشاهده شد، از روش نمونه‌برداری چتری¹ برای محاسبه انرژی پتانسیل مؤثر غشا که روشی نیمه تعادلی نیمه غیرتعادلی است استفاده شده است. لازم به ذکر است که در این پژوهش از غشا نوع DPPC² استفاده شده است که نسبت به POPC دارای طول زنجیره کوتاه‌تر در قسمت آب‌گریز است.

در این پژوهش سد انرژی پیش روی دارو به داخل حدود 75 kJ/mol بدست آمده است که مقایسه نتایج، حاکی از همخوانی قابل قبول روش استفاده شده در این پروژه با روش تمام اتمی است. مقدار سد انرژی محاسبه شده در روش دانه‌درشت به میزان 110 kJ/mol به دست آمد که این افزایش مقدار ناشی از سرعت بالاتر حرکت سر فنر، تفاوت در روش محاسبه و قسمت اعظم آن به دلیل بلندتر بودن و اعوجاج دم آب‌گریز لیپید مورد استفاده در شبیه‌سازی است که باعث طولانی‌تر شدن زمان نفوذ پپتاید به داخل سلول و وجود سد انرژی بیشتر شده است.

7- جمع‌بندی

هدف اصلی این تحقیق بررسی نحوه نفوذ حامل داروی پنتراتین در غشای دو لایه سلول بود. بدین منظور در مرحله اول، مولکول مذکور با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دانه‌درشت شده تعادلی به غشا نزدیک شده و نحوه نشست آن بر روی غشای دو لایه لیپیدی بررسی شده است. در شبیه‌سازی دوم با استفاده از روش دینامیک مولکولی هدفمند رفت و برگشتی با سرعت ثابت ترکیبی با دینامیک مولکولی دانه‌درشت، عبور این مولکول از غشا سلول بررسی شد. با استفاده از نتایج این قسمت سد انرژی مقابل نفوذ پپتاید به داخل سلول، محاسبه و تأثیر نفوذ آب بر ضریب پخش پنتراتین در غشا به صورت کیفی مورد بررسی قرار گرفته شد.

1- Umbrella Sampling
2- Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline