

- **Тема работы**

Молекулярно-динамическое моделирование транспортировки антигельминтного лекарства празиквантела в сопровождении глицирризиновой кислоты через липидную мембрану

- **Состав коллектива**

Ким Александра Валерьевна, н.с. Лаборатории молекулярной динамики и структуры ИХКГ СО РАН, ассистент преподавателя кафедры ХиБФ ФФ НГУ, ХТТ ФЕН НГУ, к.ф.-м.н.

Медведев Николай Николаевич, заведующий Лаборатории молекулярной динамики и структуры ИХКГ СО РАН, преподаватель кафедры ХиБФ ФФ НГУ, д.ф.-м.н.

Поляков Николай Эдуардович, заведующий Лаборатории магнитных явлений ИХКГ СО РАН, д.х.н.

Шелепова Екатерина Алексеевна, лаборант Лаборатории молекулярной динамики и структуры ИХКГ СО РАН, аспирант.

- **Информация о грантах**

- РФФИ, Создание научных основ повышения эффективности лекарственных средств для лечения описторхоза, № 17-43-540175, руководитель: Ляхов Н.З., 2017.
- РФФИ, Исследование особенностей агрегации растительных метаболитов с лекарственными препаратами и их влияние на свойства липидной мембраны: ЯМР и молекулярно-динамическое моделирование, № 18-33-00662, руководитель Зеликман Максим Валентинович, 2019.

- **Научное содержание работы:**

1. **Постановка задачи**

Празиквантел - одно из самых распространённых антигельминтных лекарств. Однако его эффективность сильно снижена из-за низкой растворимости, скорости проникновения в клетку и биодоступности. В настоящей работе исследуется проникновение празиквантела через мембрану DOPC в сопровождении глицирризиновой кислоты (ГК) как транспортной молекулы. Глицирризин (или глицирризиновая кислота, ГК), природный сапонин, проявляет способность усиливать терапевтическую активность различных лекарств, когда его используют в качестве системы доставки лекарств. Однако молекулярный механизм этого эффекта все еще обсуждается. В настоящем исследовании методом молекулярной динамики рассчитывается проницаемость модельной мембраны DOPC для молекулы празиквантела в сопровождении глицирризиновой кислоты и без. Для этого рассчитываются профили свободной энергии для обоих случаев, а также профили коэффициента диффузии в рамках метода Solubility-diffusion-model.

- **Современное состояние проблемы**

Биологические мембраны играют важную роль в жизни клеток. Одной из наиболее важных функций клеточной мембраны является транспортная функция. Через мембрану проходит транспорт ионов, лекарств и других небольших молекул, необходимых для жизнедеятельности клетки. Различные мембраны, поры и насосы входят в состав клеточных мембран, что позволяет им обмениваться с внешней средой. Кроме того, многочисленные молекулы и ионы также транспортируются непосредственно через мембраны с помощью так называемой пассивной диффузии.

Перспективным подходом для повышения проницаемости мембран для лекарственных молекул является использование систем доставки лекарств. В настоящее время это широко развивающаяся область фармакологии. Использование средств доставки позволяет повысить эффективность лекарств и снизить их токсичность и терапевтическую дозу. Одним из средств доставки лекарственных молекул является глицирризин, относящийся к тритерпеновым гликозидам. Ряд исследований показали, что глицирризин способен образовывать водорастворимые надмолекулярные комплексы с различными липофильными препаратами. Показано, что такие комплексы характеризуются повышенной растворимостью, стабильностью и биодоступностью. Кроме того, была описана мембрано-модифицирующая способность глицирризина.

Глицирризин или β -глицирризиновая кислота (Рис. 1), является одним из наиболее перспективных носителей лекарственных средств, который демонстрирует снижение токсичности лекарств и повышение терапевтической активности молекулярных комплексов, образованных рядом важных антибиотиков и сердечно-сосудистых препаратов.

В настоящем исследовании мы пытаемся ответить на вопрос о том, что является причиной усиления лекарственной активности в присутствии ГК. Влияние ГК на мембраны различного состава может быть разным. В последнее время в литературе появился ряд исследований, в которых проникновение веществ разной формы, размеров и гидрофобности в мембраны различного липидного состава рассчитывается с использованием метода *umbrella sampling* и модели *solubility-diffusion*. Систематическое изучение влияния ГК на проницаемость липидных мембран предполагает, в первую очередь, рассмотрение более простых случаев с однокомпонентными мембранами. Из-за медленной динамики липидов и, как следствие, медленной сходимости профилей свободной энергии, расчёты проницаемости очень времезатратны. В этой статье рассмотрен только однокомпонентный бислой, изготовленный из DOPC как представителя ненасыщенных жирных кислот. В будущем, чтобы сделать мембрану более реалистичной и многокомпонентной, мы планируем добавить такие насыщенные липиды, как POPC и DPPC, а также холестерин.

○ **Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы**

Моделирование проводилось в пакете GROMACS v. 4.7, 2016. Мы использовали те же наборы параметров и протокол, что и в нашей предыдущей работе [1]. Для DOPC-липидов использовалась Бергеровская параметризация в поле сил GROMOS53a6. Файлы топологии молекул глицирризиновой кислоты и празиквантела были созданы инструментом Automated Topology Builder. Модель воды - SPC, количество молекул воды ~7000. Моделируемые системы содержали в общей сложности 22000-28000 атомов. Липидный бислой был ориентирован в плоскости x-y и содержал 128 липидов (рис. 2). Постоянную температуру 300 K поддерживали с помощью термостата Nose-Hoover, а давление в 1 бар - баростатом Parrinello-Rahman.

Потенциал средней силы для празиквантела был рассчитан с использованием подхода *umbrella sampling*. Использовались 19 и 39 окон, расположенных на расстоянии 0,2 нм друг от друга перпендикулярно к плоскости бислоя. (39 окон - в присутствии молекулы ГК). Центр масс молекулы празиквантела удерживался от перемещений в направлении оси z относительно серединной плоскости бислоя. Использовался гармонический сдерживающий потенциал с константой жёсткости 800 кДж/моль/нм². Молекула ГК могла свободно перемещаться по всем направлениям. Каждое окно содержало 300 нс моделирования, что в общей сложности составляло 17 мксек. Реконструкция PMF была выполнена с использованием метода анализа взвешенных гистограмм WHAM, включенного в пакет GROMACS. Использовались 100 бинов,

нулевая точка была установлена на расстоянии -3,6 нм от срединной плоскости, в объёмной воде. Проведён также анализ сходимости полученных профилей свободной энергии. Исходные конфигурации окон umbrella sampling были сгенерированы путем моделирования протягивания молекулы празиквантела через мембрану со скоростью 0,01 нм/псек вдоль оси z. Затем соответствующие конфигурации были выбраны в качестве исходных для дальнейшего расчета потенциала средней силы в данном окне. Первые 40 нс каждого окна были отклонены как период релаксации. Расчет водородных связей проводился с использованием инструмента gmx hbonds пакета GROMACS со стандартным критерием 30-градусного угла О-Н-О и расстоянием О-О равным 3,5 Å. Оценка ошибки рассчитывалась с использованием метода блочного усреднения в каждом окне.

Эффективная проницаемость P_{eff} была рассчитана с использованием метода solubility-diffusion, в котором суммируется сопротивление $R(z)$ каждого подслоя или окна мембраны.

$$\frac{1}{P_{eff}} = R_{eff} = \int_0^Z R(z) dz = \int_0^Z \frac{e^{\beta \Delta G(z)}}{D(z)} dz \quad (1)$$

Сопротивление $R(z)$ пропорционально потенциалу средней силы с больцмановским весом и обратно коэффициенту диффузии. Последний, с свою очередь, рассчитывается как отношение дисперсии положения z центра масс празиквантела и времени автоковариации его отклонения от центра окна.

Значение коэффициента диффузии для празиквантела в объёмной воде также можно рассчитать с помощью метода среднеквадратичного отклонения для латеральной диффузии в плоскости xy, встроенного в стандартный пакет GROMACS.

○ Полученные результаты

В предыдущей работе нами был получен профиль свободной энергии для проникновения молекулы ГК через бислой DOPC [1]. У него есть потенциальный барьер в срединной плоскости мембраны, препятствующий проникновению ГА во второй полуслой. В результате время жизни молекулы ГК в одной половине мембраны довольно велико, сотни наносекунд. В настоящем исследовании молекула ГК могла свободно перемещаться куда угодно, но предпочитала оставаться во время симуляции около 300 нс в том полуслое мембраны, где она была первоначально размещена (в левом полуслое, где $z < 0$).

На Рис. 3 показан профиль потенциала средней силы в симметризованной форме (а) и асимметричной (б). Симметризованная форма означает, что статистические данные соответствующих окон слева и справа от центра мембраны были объединены. Рассмотрим случай присутствия ГК в мембране, красные кривые на а) и б), рис. 3. Симметричная кривая а) имеет большую неопределенность в центре мембраны, но в асимметричном случае диапазон ошибок намного меньше. Источник неопределенности заключается в разнице между левым и правым полуслоем. Асимметричный профиль свободной энергии учитывает, что молекула ГК была помещена в левый полуслой и остается там в течение всего времени моделирования. Правая сторона асимметричного профиля потенциала средней силы (Рис. 3 б, красный) копирует кривую без ГК (синий), поскольку она также не содержит ГК, но смещена вниз из-за уменьшения срединного барьера. Левая сторона профиля свободной энергии меняется при добавлении ГК: барьер слева уменьшается до 1,5 кТ вместо 2,4 кТ в отсутствие ГК. Он сдвигает правую сторону потенциала средней силы вниз в целом, поэтому потенциальная яма правого полуслоя углубляется, а также понижается правая полочка профиля свободной энергии в

объемной воде справа ($z > 3$ нм). Изменение высоты срединного барьера могут быть связаны с водородным взаимодействием между молекулами ГК и празиквантела. На Рис. 4 показан профиль количества водородных связей между молекулой празиквантела и водой, а также между празиквантелом и молекулой ГК.

Мы видим тенденцию к образованию водородных связей между ГК и празиквантелом, когда последний удерживается вблизи середины бислоя. Молекулы воды не проникают так глубоко в бислой, поэтому празиквантел не способен образовывать водородные связи с водой. Однако он может формировать водородные связи с молекулой ГК. Примеры такого связывания показаны на Рис. 5.

Молекула празиквантела имеет четыре акцепторных сайта для Н-связи. Молекула ГК имеет 8 донорных сайтов: 7 ОН-групп из сахарозной части и 1 из терпеновой части. Липиды DOPC не имеют донорных сайтов, поэтому Н-связь празиквантела с молекулами DOPC вообще отсутствует.

Информации, содержащейся в профиле свободной энергии, оказывается недостаточным для того, чтобы сделать выводы о проницаемости празиквантела через мембрану. Согласно модели solubility-diffusion, мы также должны рассчитать профиль коэффициента диффузии.

Полученный профиль диффузии празиквантела показан на Рис. 6. Значение коэффициента диффузии празиквантела внутри мембраны примерно в 20 раз меньше, чем в воде - это может дать нам представление о том, что празиквантелу легче перемещаться в воде, чем в воде, чем в мембране, но давайте не будем делать поспешных выводов.

Чтобы проверить используемый подход, мы вычислили коэффициент диффузии празиквантела на расстоянии $z = 3,8$ нм (почти объемная вода), используя стандартный метод среднего квадрата смещения в плоскости x , и нашли хорошее согласие с нашими расчетами по solubility-diffusion model, см. синие точки на рис. 6.

В центре мембраны наблюдается небольшое увеличение значения k -та диффузии (рис. 6, а, б), что можно объяснить уменьшением локальной плотности. Действительно, профили плотности (рис. 7, черные квадраты) показывают низкую плотность в срединной плоскости бислоя.

Имея профили свободной энергии $\Delta G(z)$ и коэффициента диффузии $D(z)$ (рис. 3 и рис. 6), мы можем рассчитать проницаемость празиквантела. Результирующее значение коэффициента проницаемости в отсутствие ГК составляет $P_{\text{eff}} = 0,67 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ см/с, а в присутствии ГК составляет $P_{\text{eff}} = 0,83 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ см/с. Несмотря на существующие погрешности в вычислении, можно сказать, что проницаемость празиквантела увеличивается с добавлением ГК. Надо обратить внимание, здесь мы говорим о проницаемости от внешней воды (левая часть) до второй половины слоя. Мы накопили суммарное значение сопротивления до $z = 1$ нм (расположение потенциальной ямы в правой половине слоя) для обоих случаев, чистого DOPC и в присутствии GA, и получили увеличение проницаемости примерно на 20%.

Также заметим, что подынтегральное выражение представляет профиль локального сопротивления проникновению празиквантела в мембрану в зависимости от расстояния z от центра бислоя, рис. 8. Прежде всего отметим, что область внутри бислоя $z \in (-2; 2)$, почти не вносит вклад в интеграл. Это связано с тем, что внутри бислоя значение свободной энергии $\Delta G(z)$, рис. 3, в несколько раз меньше, чем в воде, поэтому значения экспоненциальной функции в числителе формулы (1) на порядки меньше, чем в воде.

Таким образом, только граничные области бислоя и водные области ($z < -2$) \cup ($z > 2$) вносят значимый вклад в интеграл. На рис. 8 мы видим пик локального сопротивления при значениях z вблизи поверхности бислоя, $z \in (-3,2; -2,7)$ на рис. 8 и рис. 7. Заметим, что на этих расстояниях есть нет никаких особенностей в профилях ни в диффузии, рис. 6, ни в свободной энергии, рис. 3. Однако они конкурируют друг с другом на поверхности мембраны, что приводит к появлению максимума. Действительно, подинтегральное выражение в (1) мало для больших значений $|z|$ (на внешней поверхности бислоя) из-за больших значений D , рис. 6. С другой стороны, на расстояниях $|z|$ меньше чем 2 нм от центра (область липидных головных групп и внутренняя часть бислоя), числитель близок к нулю из-за малых значений экспоненциальной функции. В присутствии молекулы ГК этот пик уменьшается. Это действие молекулы ГК может быть объяснено тем фактом, что она возмущает липидные головные группы, делая их упаковку менее плотной. В свою очередь, это может облегчить проникновение молекулы в мембрану. Итак, наше исследование показывает, что один только профиль свободной энергии недостаточен, чтобы судить о механизме проницаемости мембраны. Скорость диффузии и их связь с профилем свободной энергии также играют важную роль.

Весь профиль сопротивления показан на рисунке 8 б. Для чистого DOPC локальное сопротивление мембраны к выходу празиквантела такое же, как и ко входу. Таким образом, общее сопротивление чистого DOPC накапливается вплоть до водной области и за её пределами. Но при наличии ГК выходное сопротивление пренебрежимо мало, что связано с уменьшением правой полки профиля свободной энергии. Тот же график, но в логарифмическом масштабе, находится в разделе «Вспомогательная информация», Fig. S12 в статье [2]. Конечная проницаемость в форме обратного сопротивления, интегрированного до Z , показана на Рис. 9. Таким образом, влияние одной молекулы ГК на увеличение проницаемости празиквантела происходит на поверхности бислоя (20%) на входе празиквантела, а затем увеличивается на выходе до 50% и более. Это влияние ГК на проницаемость празиквантела может продолжаться до тех пор, пока ГК не распределится равномерно по двум половинкам бислоя.

○ Иллюстрации, визуализация результатов

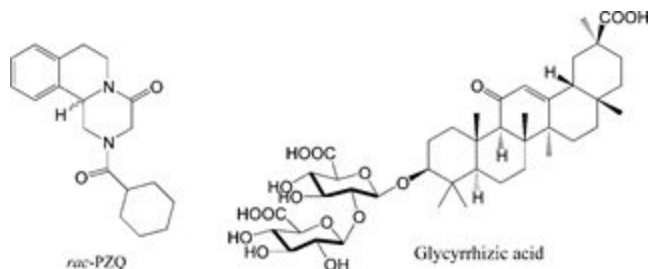


Рис. 1. Структурная формула празиквантела (PZQ) и глицирризиновой кислоты (ГК).

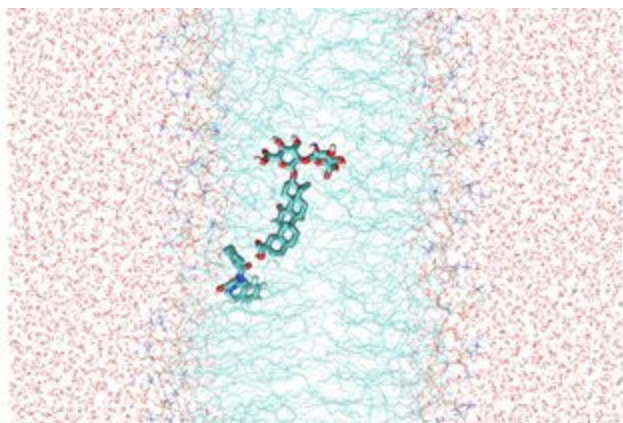


Рис. 2. Модель липидного бислоя DOPC с погруженными в него молекулами празиквантела и ГК в окружении воды. Вода и липиды показаны линиями, глицирризин и празиквантел - палочками.

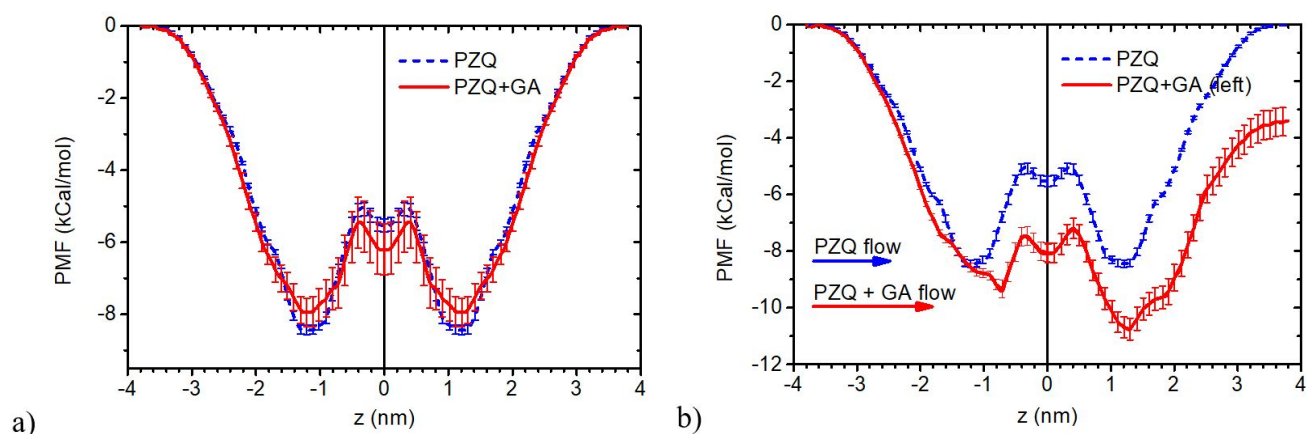


Рис. 3. Профиль потенциала средней силы для проникновения молекулы празиквантела через чистый липидный бислой DOPC (синим цветом) и в присутствии молекулы ГК (красным). а) симметризованная относительно центра мембраны форма. б) молекула ГК находится в левом полуле ($2 < z < 0$)

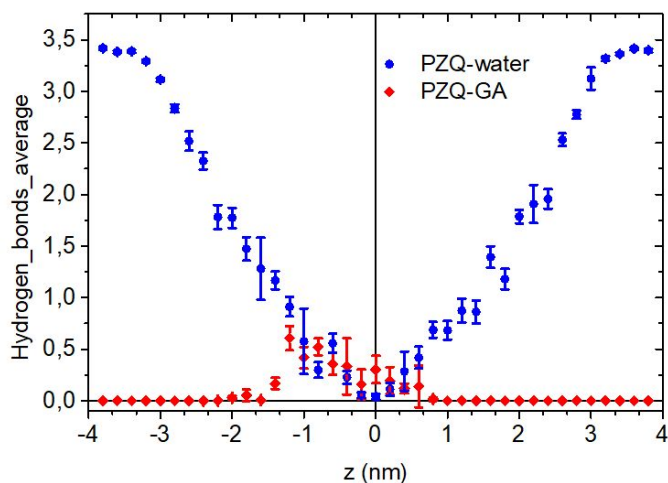


Рис. 4. Число водородных связей между молекулой празиквантела и водой (синие символы), а также ГК (красные). ГК расположена в левом полуле.

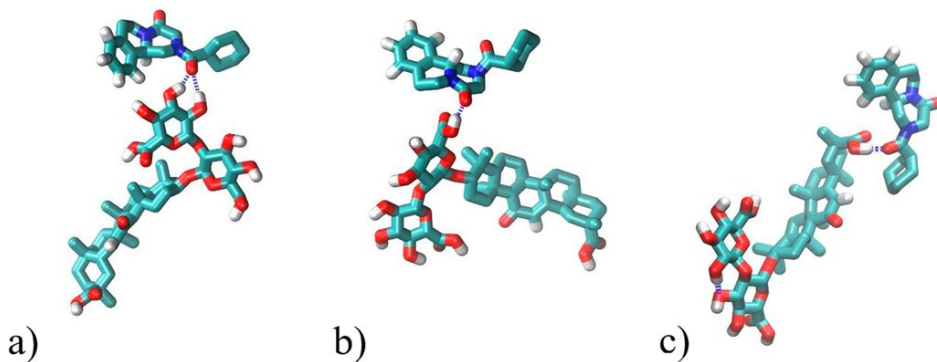


Рис. 5. Характерные конфигурации флавоноидов и ГК, соединённые водородными связями в центре мембраны. ГК может предоставить для водородной связи как сахарные кислороды (а, б), так и терпеновый кислород (с).

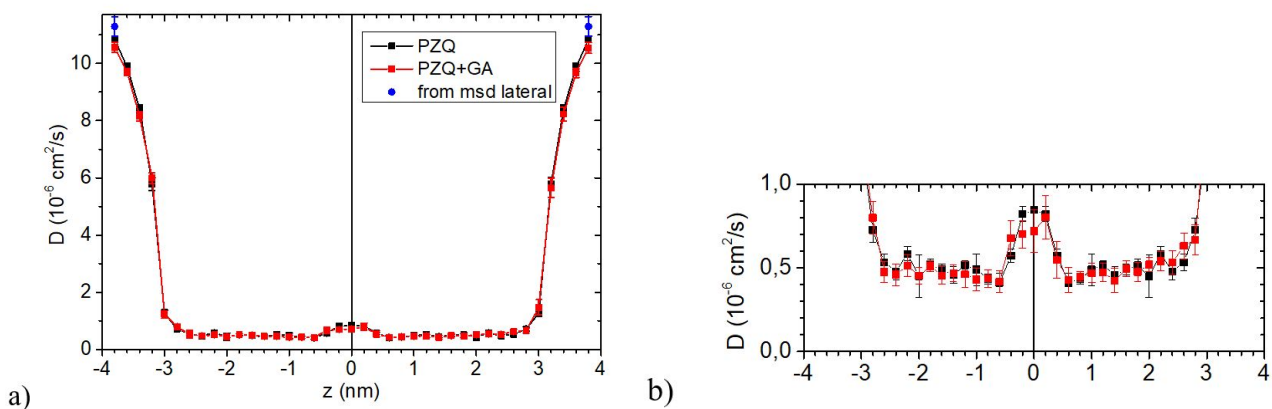


Рис. 6. Коэффициент диффузии флавоноидов в чистой мембране DOPC (чёрные квадраты) и в присутствии ГК (красные). Синие символы показывают значение k -та диффузии, вычисленное по среднеквадратичному смещению. б) - то же в увеличенном масштабе.

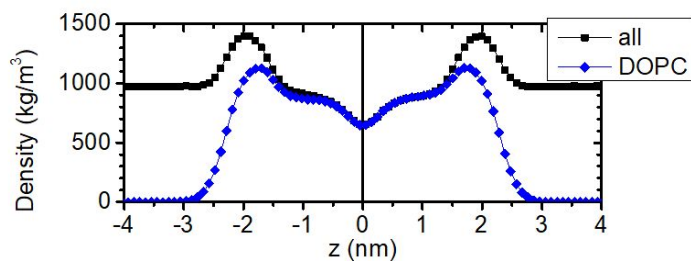


Рис. 7. Профиль плотности всей моделируемой системы (чёрные квадраты), а также парциальная плотность DOPC (синие ромбы).

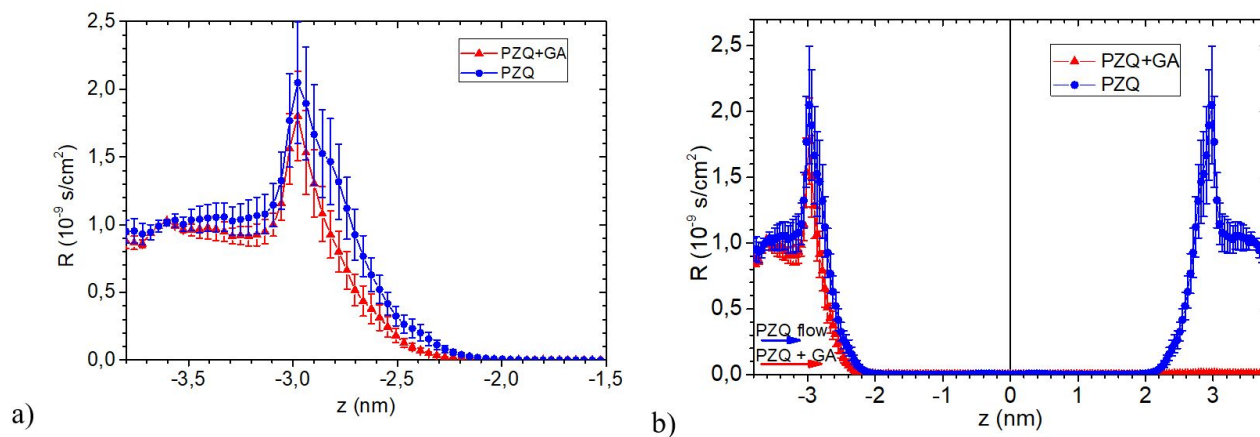


Рис. 8. Локальное сопротивление к проникновению празиквантела внутрь чистой мембраны DOPC (синим) и DOPC с ГК (красным), расположенным в левой части бислоя. а) область вхождения, б) весь диапазон z .

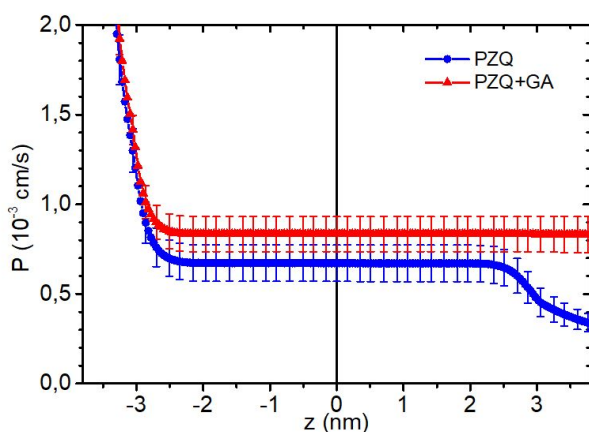


Рис. 9. Проницаемость празиквантела как функция от расстояния от срединной плоскости мембраны в отсутствие (синим) и в присутствии ГК (красным).

- **Эффект от использования кластера в достижении целей работы**

Часть расчётов профилей свободной энергии (примерно 30%) была проведена на кластере НГУ с использованием 8-ядерных узлов и программного пакета GROMACS.

- **Перечень публикаций, содержащих результаты работы**

1. Selyutina, O.Y.; Apanasenko, I.E.; Kim, A.V.; Shelepova, E.A.; Khalikov, S.S.; Polyakov N.E. Spectroscopic and molecular dynamics characterization of glycyrrhizin membrane-modifying activity. *Colloid. surface. B.* **2016**, *147*, 459-466. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.037 , IF=3.997
2. Kim, A.V.; Shelepova, E.A.; Selyutina, O.Y.; Meteleva, E.S.; Dushkin, A.V.; Medvedev, N.N.; Polyakov, N.E.; Lyakhov, N.Z. Glycyrrhizin-assisted transport of praziquantel anthelmintic drug through the lipid membrane: an experiment and MD simulation, *Mol. Pharm.*, **2019**, in print. IF=4.556