

Тема работы

Механизм усиливающего действия глицирризиновой кислоты на проникновение нифедипина через липидную мембрану

Состав коллектива

- Ким Александра Валерьевна, ИХКГ СО РАН, научный сотрудник лаборатории Молекулярной динамики и структуры, к.ф.-м.н.. Старший преподаватель Кафедры химической и биологической физики ФФ НГУ.
- Шелепова Екатерина Алексеевна, ИХКГ СО РАН, младший научный сотрудник лаборатории Молекулярной динамики и структуры, аспирант НГУ ФФ. Ассистент преподавателя кафедры общей физики ФФ НГУ.
- Медведев Николай Николаевич, ИХКГ СО РАН, заведующий лабораторией Молекулярной динамики и структуры, д.ф.-м.н. Старший преподаватель Кафедры химической и биологической физики ФФ НГУ.
- Поляков Николай Эдуардович, ИХКГ СО РАН, заведующий лабораторией Магнитных явлений, д.х.н.

Информация о грантах

- РФФИ № 0304-2017-0009, РФФИ № 0301-2019-0005

Научное содержание работы

Постановка задачи

Изучить на молекулярном уровне механизм влияния глицирризиновой кислоты как средства доставки на лекарственную молекулу нифедипин: её растворимость в воде и пассивную диффузию через липидную мембрану DOPC с холестерином и без.

Современное состояние проблемы (на момент начала работы)

В наших предыдущих работах мы продемонстрировали способность глицирризиновой кислоты (ГК) образовывать водорастворимые супрамолекулярные ассоциаты с различными липофильными препаратами. Было показано, что такие комплексы характеризуются повышенной растворимостью, стабильностью и биодоступностью. ЯМР-релаксация, МАСС-спектроскопия и гель-проникающая хроматография показали, что благодаря своим амфифильным свойствам молекулы ГК могут образовывать в водных растворах самоассоциаты и мицеллы - предшественники комплексов включения "хозяин-гость". Различные физико-химические исследования показали увеличение химической и фотостабильности "гостевых" молекул в таких комплексах.

Дополнительным механизмом влияния ГК на биодоступность препарата является её мембраномодифицирующая способность, которая была описана недавно. Мембранная проницаемость может быть ключевым параметром при разработке новых лекарственных формул. Большинство лекарств должны пройти хотя бы через одну клеточную мембрану, и низкая проницаемость мембраны часто приводит к низкой эффективности *in vivo*.

Молекулярная динамика (МД) в сочетании с методами вычисления свободной энергии дает мощный инструмент для детального изучения проницаемости мембран. Поскольку фосфатидилхолиновые липиды составляют основу клеточных мембран, один бислой может обеспечить хорошее первое приближение физико-химических свойств клеточной мембраны; также может быть добавлен холестерин.

В настоящем исследовании метод МД-моделирования был применен для выяснения того, помогают ли молекулы ГК проходить НФ через липидные мембраны, а также для выяснения молекулярного механизма этого процесса.

Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы

Моделирование проводилось с использованием пакета GROMACS v. 2016. Было использовано поле сил GROMOS53a6 и Бергеровская модель липидов DOPC. Топологии молекул глицерризиновой кислоты (ГК), нифедипина (НФ) и холестерина были сгенерированы сервисом Automated Topology Builder. Модель воды - SPC. Модельная система состоит из 0-1 молекул NF, 0-2 молекул GA, 128 или 114 молекул липидов DOPC, 0 или 14 молекул CLR и около 5000-7000 молекул воды. Моделируемые системы содержали в общей сложности ~22000-28000 атомов. Липидный бислой был ориентирован в плоскости x-y, а координата z была координатой реакции для процесса проникновения. Постоянная температура 310 К поддерживалась с помощью термостата Нозе-Хувера ($\tau = 2$ пс). Давление в 1 бар поддерживалось полуизотропным баростатом Парринелло-Рахмана ($\tau = 2$ пс). Электростатические взаимодействия были рассчитаны с помощью метода частиц-сетки Эвальда с расстоянием Фурье 0,12. Радиусы обрезания для электростатических и дисперсионных взаимодействий были положены 1,4 нм.

Потенциал средней силы был рассчитан с использованием подхода umbrella sampling для проникновения НФ через бислой DOPC с холесерином и без него, а также в присутствии и отсутствии ГК. Использовалось 39 или 20 промежуточных окон, расположенных на расстоянии 0,2 нм друг от друга. Удерживающий в z-направлении гармонический потенциал был приложен к центру масс молекулы НФ с силовой постоянной 800 кДж/моль/нм²; точкой отсчета была срединная плоскость бислоя. Молекула ГК могла свободно перемещаться. Каждое окно прогона содержало 300-400 пс моделирования, охватывая в сумме ~42 мкс. Реконструкция ПМФ проводилась с использованием метода анализа взвешенных гистограмм WHAM, встроенного в GROMACS, с учетом периодических граничных условий. Нулевая точка потенциала средней силы устанавливалась на расстоянии -3,6 нм от средней плоскости бислоя, где вода уже является свободной от влияния мембраны. Анализ сходимости полученных профилей свободной энергии показал, что время моделирования было достаточно большим для статистически достоверной выборки. Каждое окно предварительно релаксировалось в течение 100-250 нс.

Расчеты водородных связей, минимального расстояния, профиля локальной плотности и угла наклона остова GA в мембране проводились с помощью стандартных инструментов GROMACS. Критерием для нахождения водородной связи являлся угол O-H-O 30° и расстояние O-O 3,5 Å.

Метод расчёта эффективной проницаемости мембраны P_{eff} основан на общей теории диффузионного переноса в диффузионном пределе, где средняя скорость потока пропорциональна термодинамической движущей силе. Вкратце, P_{eff} обратно пропорционален сумме локальных сопротивлений $R(z)$ каждого среза мембраны. Локальное сопротивление может быть выражено как отношение потенциала средней силы ΔG с больцмановским весом и коэффициента диффузии D :

$$1/P_{eff} = \int_0^z R(z)dz = \int_0^z \frac{e^{\Delta G(z)/kT}}{D(z)} dz$$

Профиль коэффициента диффузии был рассчитан согласно Хаммеру [50] как: $D(z) = \frac{var(z)}{\tau_z}$, где $var(z) = z^2 - \bar{z}^2$ - дисперсия средней координаты реакции проникающей молекулы, а τ - время корреляции её затухающих колебаний, ограниченное окном umbrella sampling.

Полученные результаты

Классическое моделирование показало, что нифедипин в воде охотно образует стабильные, но подвижные ассоциаты с глицерризиновой кислотой. Такие ассоциаты могут также проходить внутрь липидного бислоя DOPC, оставаясь в первом полуслое в течение как минимум 600 ns.

Расчёты свободной энергии показали, что для всех рассмотренных систем имеется потенциальная яма непосредственно под поверхностью мембраны и потенциальный барьер в средней плоскости бислоя. В отсутствие ГК барьер в средней плоскости достигает значения около -2 кКал/моль. В присутствии холестерина барьер шире. Добавление молекулы ГК к мембране снижает барьер средней плоскости до -4 кКал/моль и делает присутствие и отсутствие холестерина безразличным, барьер становится менее широким и таким же по высоте, как для чистого DOPC.

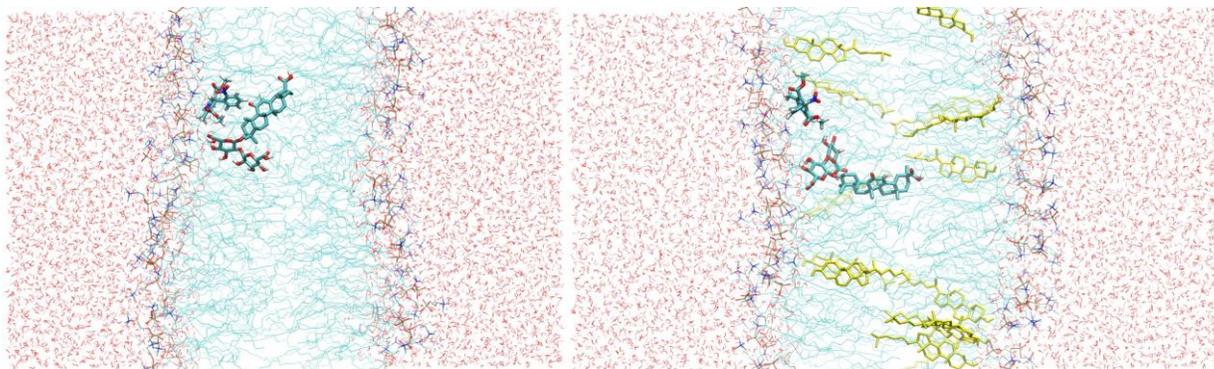


Рис. 1. Типичный вид мембраны DOPC для расчета профиля свободной энергии Гиббса, молекула НФ удерживается на данной глубине, молекула ГА может свободно двигаться.

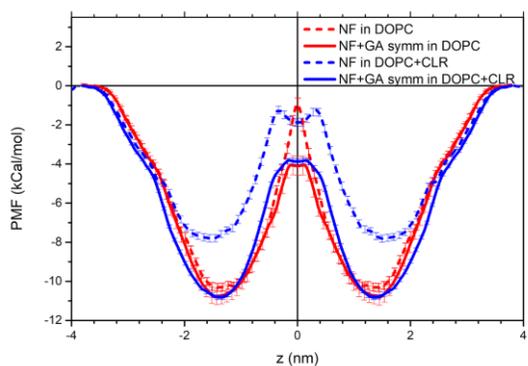


Рис. 2. Симметризованные профили свободной энергии для проникновения НФ через липидный бислой DOPC без ГК (пунктирные линии) и с ГК (сплошные линии). Синий и красный цвета линий соответствуют бислою DOPC с холестерином и без, соответственно.

Анализ водородных связей показал, что молекула НФ может образовывать в воде 5-6 водородных связей. Но в середине мембраны ни вода, ни полярные группы липидов не дотягиваются до неё. В этой ситуации на помощь приходит молекула ГК и образует с NF в среднем одну Н-связь.

Анализ влияния ГК на площадь мембраны показал, что ГК увеличивают площадь на липид в присутствии холестерина не так сильно, как в его отсутствие. В случае DOPC без холестерина молекула ГК

ориентирована параллельно поверхности мембраны и разрыхляет молекулы липидов, в результате чего мембрана расширяется. Но в присутствии холестерина молекула ГК ориентирована преимущественно перпендикулярно мембране и распрямляет липиды, вызывая сжатие мембраны. Параметр порядка показывает, что липидные хвосты неупорядочены в непосредственном окружении ГК и становятся более упорядоченными на больших расстояниях.

Значение коэффициента диффузии нифедипина $D(z)$ внутри мембраны на порядок ниже, чем в воде и равно коэффициенту диффузии молекул липида. Небольшое увеличение D в средней плоскости соответствует разрежению среды между липидными хвостами.

Профиль локального сопротивления $R(z)$, рассчитанный как комбинация профилей свободной энергии и коэффициента диффузии, показывает, что основной вклад в сопротивление вносит срединный барьер для мембраны как без, так и с холестерином. Глубина энергетической ямы под поверхностью мембраны не влияет в данном случае на сопротивляемость. Добавление ГК как в чистый DOPC, так и в DOPC с

холестерином снижает сопротивление срединной плоскости в 100 раз.

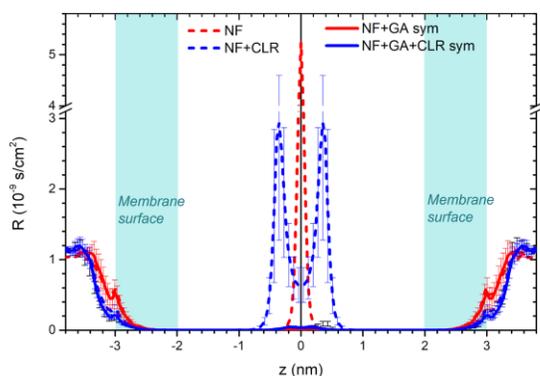


Рис. 3. Локальное сопротивление мембраны к проникновению НФ через чистый DOPC (красный) и DOPC с CLR (синий) в отсутствие ГА (пунктирные линии) и в присутствии (сплошные).

Эффект от использования кластера в достижении целей работы

В данной работе использовался вычислительный кластер НГУ при расчёте около 50% всех данных.

Перечень публикаций, содержащих результаты работы

A.V. Kim, E.A. Shelepova, V.I. Evseenko, A.V. Dushkin, N.N. Medvedev, N.E. Polyakov. Mechanism of the enhancing effect of glycyrrhizin on nifedipine penetration through a lipid membrane. *Journal of Molecular Liquids* 344C (2021) 117759. IF=6.165 doi: 10.1016/j.molliq.2021.117759