

Отчет по магистерской дипломной работе, выполненной с использованием ИВЦ НГУ.

Тема работы: «Молекулярно динамическое моделирование агрегации глицирризиновой кислоты в водном растворе»

Состав коллектива:

Сотрудники лаборатории МДС ИХКГ СО РАН:

Медведев Николай Николаевич, д.ф.-м.н., зав. лаборатории МДС (Молекулярной динамики и структуры) ИХКГ СО РАН

Наберухин Юрий Исаевич, д.х.н., профессор, с.н.с. лаб. МДС ИХКГ СО РАН

Волошин Владимир Петрович, к.ф.-м.н., с.н.с. лаб. МДС ИХКГ СО РАН

Аникеенко Алексей Владимирович, к.ф.-м.н., м.н.с. лаб. МДС ИХКГ СО РАН

Ефимов Юрий Яковлевич, к.ф.-м.н., с.н.с. лаб. МДС ИХКГ СО РАН

Ким Александра Валерьевна, ст. инженер лаб. МДС ИХКГ СО РАН

Зеликман Максим Валентинович, стажёр-исследователь (лаборант) лаб. МДС ИХКГ

Кадцын Евгений Дмитриевич, стажёр-исследователь (лаборант) лаб. МДС ИХКГ

Непосредственно участвовали в работе:

Медведев Николай Николаевич, д.ф.-м.н., зав. лаборатории МДС (Молекулярной динамики и структуры) ИХКГ СО РАН

Ким Александра Валерьевна, ст. инженер лаб. МДС ИХКГ СО РАН

Зеликман Максим Валентинович, стажёр-исследователь (лаборант) лаб. МДС ИХКГ

Научное содержание работы:

Постановка задачи

Глицирризиновая кислота (тритерпеновый сапонин из экстракта корней солодки) обладает широким спектром биологической активности и с давних пор используется для лечения и профилактики различных заболеваний [1]. К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных данных, указывающих, что кроме собственной биологической активности, ГК способна усиливать биодоступность других лекарственных препаратов при совместном применении, и увеличивает растворимость многих гидрофобных лекарственных соединений [2, 3]. Молекулярный механизм такого действия ГК до сих пор не известен, несмотря на множество физико-химических исследований. Экспериментально установлено, что благодаря наличию гидрофильной и гидрофобной частей, молекулы ГК способны образовывать прочные комплексы со многими органическими молекулами [3-12]. Константа стабильности этих комплексов превышает константы стабильности для аналогичных комплексов циклодекстринов. Известно также, что ГК проявляет свойства, типичные для мицелло-образующих веществ [11-17]. Она способна образовывать самоассоциаты в водных и водно-спиртовых растворах [3,11], строение которых зависит от концентрации ГК. Однако структура этих агрегатов и механизм их образования также неизвестны. Есть указания, что стехиометрия комплексов ГК с различными веществами при низких концентрациях обычно составляет 2:1 или 4:1 (ГК:молекула-гость). Кроме того, ранее было высказано предположение, что важную роль в механизме биологической активности ГК может играть ее связывание с мембранным холестерином [18]. Образование комплексов ГК с холестерином в растворе было доказано методом ЯМР-релаксации [18]. В нашей работе мы моделируем спонтанное образование димеров ГК в воде, а также ее ассоциаты состава 2:1, 3:1 и 4:1 с холестерином, и детально исследуем их строение.

Современное состояние проблемы

В литературе мало работ по моделированию глицирризиновой кислоты. Молекулярно-динамическое моделирование использовано в работе [19]. Там молекула ГК рассматривается как ингибитор Ку-белка, отвечающего за репарацию ДНК (данный белок потенциально применим в

качестве антиопухолевого агента). Исследования показали, что глицирризин (а также македонозид С) лучше всего (из целого банка данных веществ традиционной китайской медицины) подходят для реакционного центра данного белка. Моделирование взаимодействия белок-лиганд проводилось в NVE-ансамбле в течение 10 нс. Оказалось, что комплекс за это время не распадается, а наоборот, стабилизируется. В работе [20], исследуются ассоциаты молекул ГК с помощью квантовохимических расчетов. Показано, что в вакууме (без учета растворителя) наиболее энергетически выгодный бимолекулярный комплекс ГК имеет структуру типа "голова-хвост". Он стабилизирован водородными связями между молекулами ГК. Авторы отмечают наличие внутренней полости в данной структуре пригодной для включения соразмерных молекул-гостей. Для оценки влияния растворителя авторы добавили шесть молекул воды, которые встраиваются внутрь полости. К сожалению, из такого моделирования трудно говорить о структуре комплекса в растворе. Влияние окружающей воды на структуру бимолекулярного ассоциата может быть намного больше, чем рассчитанное в работе [20] взаимодействие между молекулами ГК. Также рассмотрен кластер состоящий из шести молекул ГК, организованных в шестичленные кольца. Внутри такого кластера имеется широкая внутренняя полость. Однако это, опять же, не означает, что в растворе будут существовать такие специфические кластеры.

Описание работы, используемые алгоритмы

Мы проводим классическое молекулярно-динамическое моделирование, используя пакет Gromacs [21]. Равновесные траектории исследуемых моделей получены в NPT ансамбле при давлении 1 бар и температуре 300К. Использовался термостат Нозе-Хувера [22] в комбинации с баростатом Парринелло-Рамана [23]. Электростатическое взаимодействие рассчитывалось при помощи быстрого метода суммирования Эвальда [24] с интерполяцией четвертого порядка. Шаг моделирования равнялся 2 фс. Для структурного анализа сохранялись конфигурации модели через каждые 2 пс. Мы не нашли в литературе готового молекулярно-динамического представления молекулы ГК. Для получения файла топологии молекулы ГК использовали программу ATB (Automatic topology builder) [25] с использованием поля сил GROMOS. ATB проводит многостадийный процесс оптимизации параметров, включающий квантово-механические расчеты для нахождения распределения зарядов на молекуле. Координаты стартовой конфигурации ГК были взяты из базы PDB. Готовая молекула холестерина была взята из базы данных ATB [26]. Для воды использовалась модель TIP4p-Ew.

Модель раствора ГК в воде представляет собой модельный бокс с двумя молекулами ГК в окружении примерно 7000 молекул воды. Модель раствора ГК и холестерина содержит, также, две молекулы ГК и одну молекулу холестерина в окружении примерно 6970 молекул воды в модельном боксе примерно такого же размера. В моделях с ассоциатами состава 3:1 и 4:1 14 000 молекул воды, что обеспечивает спонтанную встречу молекул, и образование агрегатов в условиях низких концентраций. Мы провели по тридцать независимых прогонок длительностью 30 нс для каждой модели. Как оказалось, в наших расчетах, слипшиеся молекулы больше не расходятся. Для подтверждения этого, и, кроме того, для исследования долгоживущих структур ассоциатов, некоторые прогоны продолжались более 100 нс. Каждая из прогонок начиналась со своей независимой исходной конфигурации, где растворенные молекулы были разнесены на возможно далекое расстояние, а ориентации молекул выбирались случайно, рис. 1. В результате диффузионного движения молекулы могли встретиться и образовать ассоциат.

Момент образования димера хорошо фиксируется по величине ван-дер Ваальсовского взаимодействия между молекулами ГК. В пакете Gromacs предусмотрена возможность вычислять энергию взаимодействия между заданными группами атомов. В данном случае рассчитывается энергия леннард-джонсовских взаимодействий E_{LJ} между всеми атомами молекул ГК, не связанными ковалентными связями. Эта энергия не включает взаимодействие молекул с водой, а также электростатическое взаимодействие между молекулами и водой, однако она оказывается хорошей мерой для установления момента слипания молекул (рис. 2). Также она позволяет однозначно установить состав агрегата (рис. 3). Для анализа взаимного расположения молекул ГК мы предлагаем использовать векторы, связанные с молекулой (см. Рис. 4), и рассчитывать углы (косинусы углов) между этими векторами.

Для детального представления преимущественных структур димеров, мы построили двумерные диаграммы, где по одной оси отложен косинус угла ($A1A2$), а по второй – косинус угла ($B1B2$) (рис. 5). При исследовании ассоциатов состава 2:1 оказалось, что основные пятна располагаются в тех же самых местах, но появилось одно новое пятно, отмеченное цифрой 6. Это означает, что ассоциаты 2:1 являются, как правило, димерами ГК, а молекула холестерина располагается рядом. Наглядное подтверждение этому показано на Рис. 6. В кластерах состава 3:1 и 4:1 имеется большее многообразие во взаимном расположении молекул ГК, по сравнению с молекулами в димере, поэтому на диаграммах для них не наблюдается отчетливых пятен. Однако имеется общая структурная черта для таких кластеров. Молекула холестерина в агрегате располагается снаружи, сбоку от слипшихся молекул ГК. Другими словами, молекула холестерина, как правило, присоединяется к более или менее устойчивому кластеру из молекул ГК, что хорошо видно на рис. 7.

В одной из прогонок модели с тремя молекулами ГК молекула холестерина оказалась в кольце из трех молекул ГК, см. рис. 8, где изображена конфигурация из той прогонки. Оказалось, что данная структура сохранялась в растворе в течение 300 нс без существенных изменений, после чего произошла спонтанная перестройка этого ассоциата и в результате возник ассоциат 3:1 обычной структуры. Обратной перестройки не произошло в течение 200 нс, подробное поведение ассоциата в данной прогонке показано на рис. 21. Это означает, что молекулам ГК выгоднее образовывать "клубок", чем кольцо вокруг холестерина. Подчеркнем, что при этом суммарная ван-дер-ваальсовская энергия практически не меняется (зеленая кривая).

Полученные результаты:

1. Методом молекулярной динамики изучены ассоциаты из молекул глицирризиновой кислоты (ГК) и холестерина в воде. Показано, что возникшие ассоциаты являются устойчивыми (объединившиеся молекулы не расходятся в течение всего времени моделирования), вместе с тем, молекулы в ассоциате могут менять взаимную ориентацию.

2. Димеры ГК образуют несколько характерных структур, различающихся взаимным расположением терпеновых остовов и сахарных хвостов. Молекулы в димере всегда располагаются компактно: между ними нет места, куда могла бы поместиться какая-либо молекула.

3. Ассоциаты состава 2:1 (две молекулы ГК и одна молекула холестерина) образуют несколько характерных структур, представляющих собой, как правило, димер ГК, рядом с которым расположена молекула холестерина.

4. Ассоциат состава 3:1 представляет собой тример тесно связанных молекул ГК, к которому прилипла молекула холестерина. Три молекулы ГК могут "захватить" молекулу холестерина в кольцо, однако такие конфигурации нехарактерны: со временем, молекулы ГК слипаются в тесный тример, выталкивая холестерин наружу.

5. Обнаруженные устойчивые ассоциаты молекул ГК с холестерином иллюстрируют механизм того, каким образом ГК может способствовать растворимости и транспорту гидрофобных молекул в воде при низких концентрациях ГК. Как показано в многочисленных физико-химических исследованиях [3-12] и испытаниях на лабораторных животных [2], именно предмицелярные агрегаты ГК образуют наиболее прочные комплексы с малорастворимыми лекарственными соединениями и оказывают наибольший терапевтический эффект. На основании полученных в настоящей работе результатов можно предположить, что наблюдаемые эффекты связаны с увеличением растворимости лекарственных соединений в комплексе с ГК.

Литература:

- [1] Толстикова Г.А., Болтина Л.А., Кондратенко Р.М. и др., Солодка: биоразнообразие, химия и применение в медицине. Новосибирск: НП Академическое изд-во "Гео", 2007.
- [2] Tolstikova, T.G., Khvostov, M.V. and Bryzgalov, A.O. // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry – 2009. – 9. – P. 1317-1328.
- [3] Polyakov N.E. and Leshina T. V. // The Open Conf. Proc. J., - 2011. - 2. - P. 64-72.
- [4] Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F., Ragino Yu.I., Polyakov N.E., Taraban M.B., Leshina T.V., Stakhneev, E.M., Lyakhovich V.V., Nikitin Yu.P., Tolstiko, G.A. // Biomed. Chem. - 2008 – 54 – P. 301-313.

- [5] Ragin, Yu.I., Vavilin, V.A., Salakhutdinov, N.F., Makarov S.I., Stakhneva E.M., Safronova O.G., Nikitin Yu.P., Tolstikov G.A. //Bull. Exp. Biol. Med. – 2008. – 145. – P. 285-287.
- [6] Polyakov N. E., Khan V. K., Taraban M. B. //J. Phys. Chem. B. - 2005.- 109.- P. 24526-24530.
- [7] Polyakov N.E., Leshina T.V., Salakhutdinov N.F. et al. //J. Phys. Chem. B.- 2006.- 110.- P. 6991-6998.
- [8] Polyakov N.E., Leshina T.V., Salakhutdinov N.F. et al. //Free Rad. Biol. Med. - 2006. - 40.- P. 1804-1809.
- [9] Polyakov N. E., Khan V.K., Taraban M.B., et al. //J. Phys. Chem. B. - 2008.- 112.- P. 4435-4440.
- [10] Polyakov N.E, Magyar A, Kispert L.D. //J. Phys. Chem. B. - 2013. 117, N (35). - P. 10173–10182.
- [11] Kornievskaya V.S., Kruppa A.I., Polyakov N.E., Leshina T.V. // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2007 – 60. – P. 123–130.
- [12] James K.C., Stanford J.B. //J. Pharm. Pharmacol. - 1962 - 5. – P. 445-450.
- [13] Gilbert R.J., James K.C. // J. Pharm. Pharmacol. – 1964 – 16. – P. 394-399.
- [14] Azaz E., Segal R. //Pharm. Acta Helv. – 1980 – 55. – P. 183-186.
- [15] Kondo M., Minamino H., Okiyama G. //J. Soc. Cosmet. Chem. – 1986 – 37. – P.177-189.
- [16] Maskan M. //J. Food Process Eng. – 1999 – 39. – P.389-393.
- [17] Romanenko T.V., Murinov Yu.I. //J. Phys. Chem. – 2001 – 75. – P.1601-1604.
- [18] Gluschenko O.Yu., Polyakov N.E., Leshina T.V. // Appl. Magn. Res. – 2011 – 41 – P. 283-294.
- [19] Chang T.-T., Sun M.-F., Chen K.-C. et.al. // Molecular Simulation. - 2011. - 37, N(9). - P. 804-811.
- [20] Лекарь А.В., Милов А.А., Борисенко С.Н., и др. // Вестник Южного научн. центра РАН. – 2012. – 8, N 2. – С. 18–26.
- [21] Van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., and Berendsen H.J.C. // Journal of Computational Chemistry, - 2005. - 26, N(16). - P. 1701–1718.
- [22] Hoover W. G. // Phys. Rev. A. - 1985. - 31. -P. 1695–1697.
- [23] Parrinello M., Rahman A. // J. Appl. Phys. - 1981. - 52. -P. 7182–7180.
- [24] Essmann U., Perera L.M., Berkowitz L, Darden T.A., Lee H., Pedersen L.G. // J. Chem. Phys. - 1995, - 103. - P. 8577–8593.
- [25] Malde A.K, Zuo L, Breeze M, Stroet M, Poger D, Nair P.C, Oostenbrink C, Mark A.E. //J Chem Theory Comput. - 2011, - 7, N(12). - P. 4026-4037.
- [26] <http://www.compbio.biosci.uq.edu.au/atb/>
- [27] Richards F.M. // Methods Enzymol. - 1985. - 115. - P. 440–646.

Иллюстрации

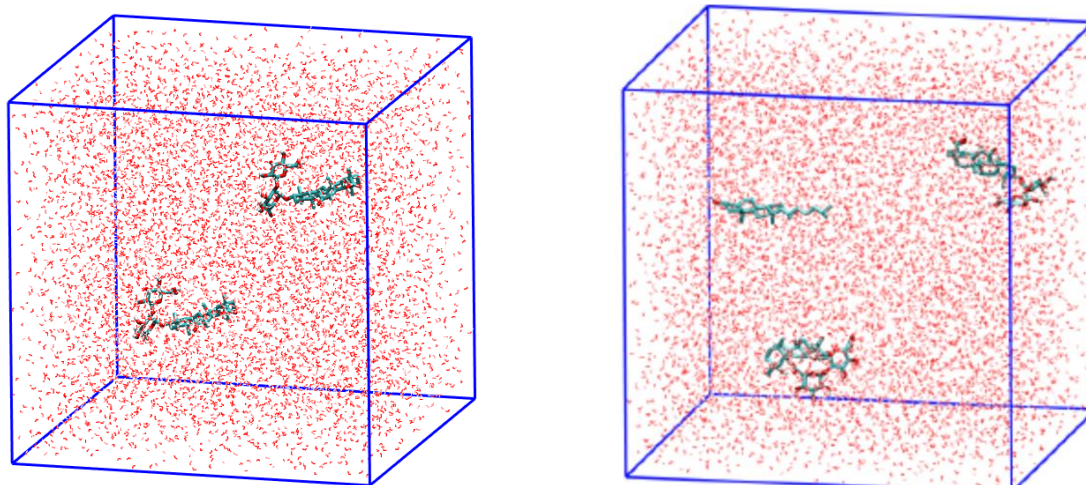


Рис. 1 Примеры исходных конфигураций. Слева - модель с двумя молекулами ГК (показаны скелеты молекул) в окружении молекул воды (показаны точками). Справа - модель с двумя молекулами ГК и одной молекулой холестерина.

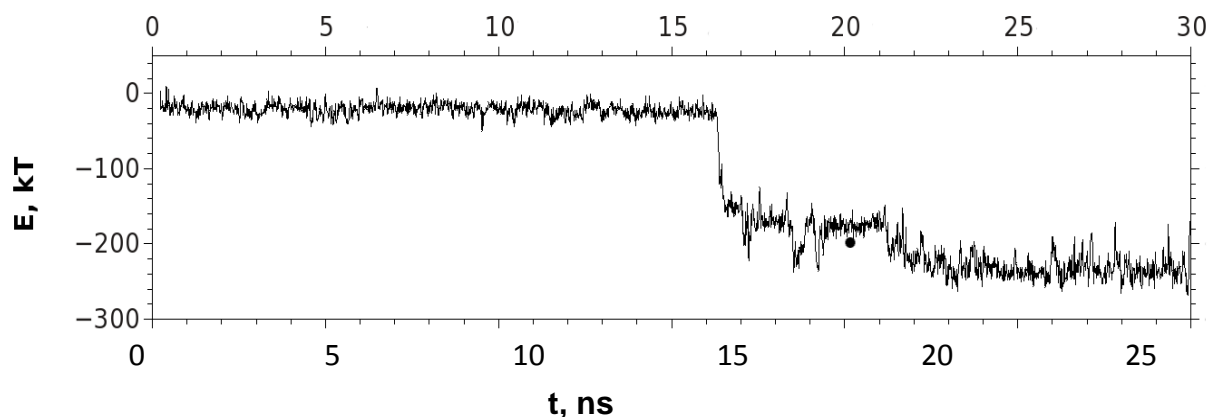


Рис. 2. Установление момента возникновения димера ГК в одной из прогонок модели с двумя молекулами ГК. Сверху - энергия леннард-джонсовского взаимодействия E_{LJ} , см. текст.

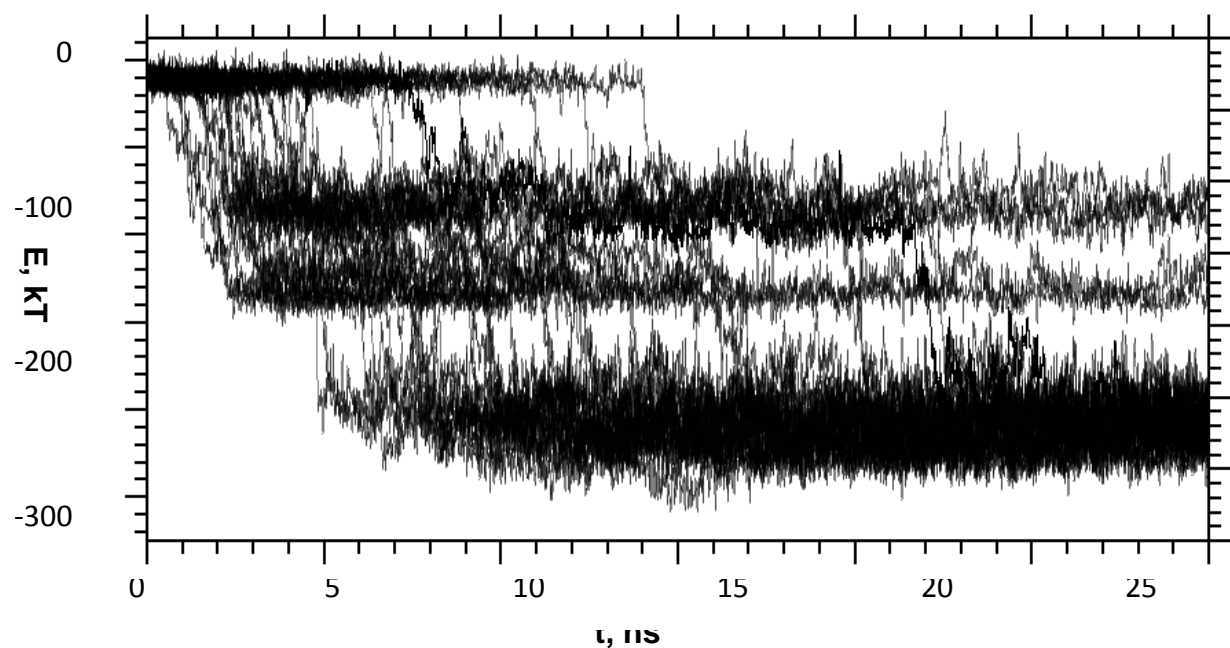


Рис. 3. Поведение суммарной энергии E_{LJ} для всех 30 прогонок модели с двумя молекулами ГК и одной молекулой холестерина. Уровень $E_{LJ} \approx -170$ кТ соответствуют образованию ассоциата из одной молекулы ГК и холестерина, уровень $E_{LJ} \approx -270$ соответствует димеру ГК без холестерина. В остальных прогонках образовался агрегат 2:1 (кривые, лежащие ниже -330).

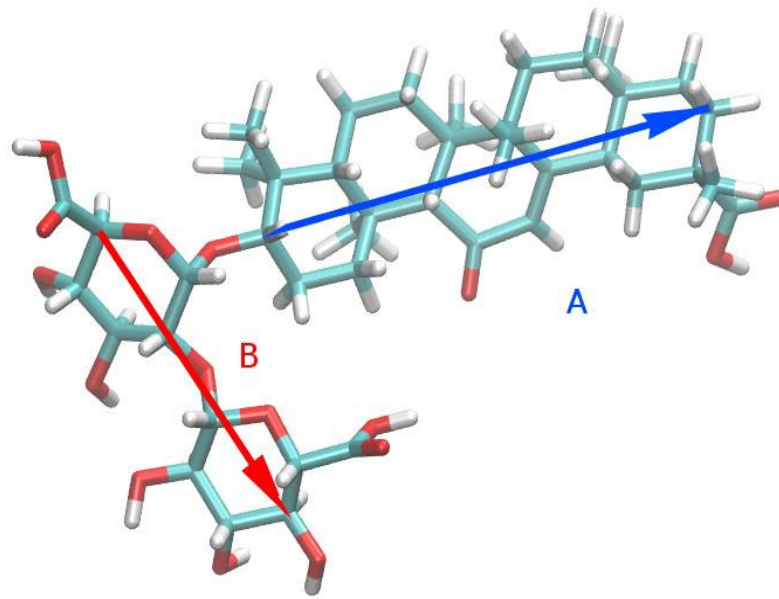


Рис. 4 Молекула глицирризиновой кислоты и связанные с ней вектора. Вектор **A** характеризует ориентацию терпенового остова (соединяет удаленные атомы углерода в крайних кольцах остова).

Вектор **B** характеризует ориентацию сахарной части (соединяет удаленные атомы в сахарных кольцах).

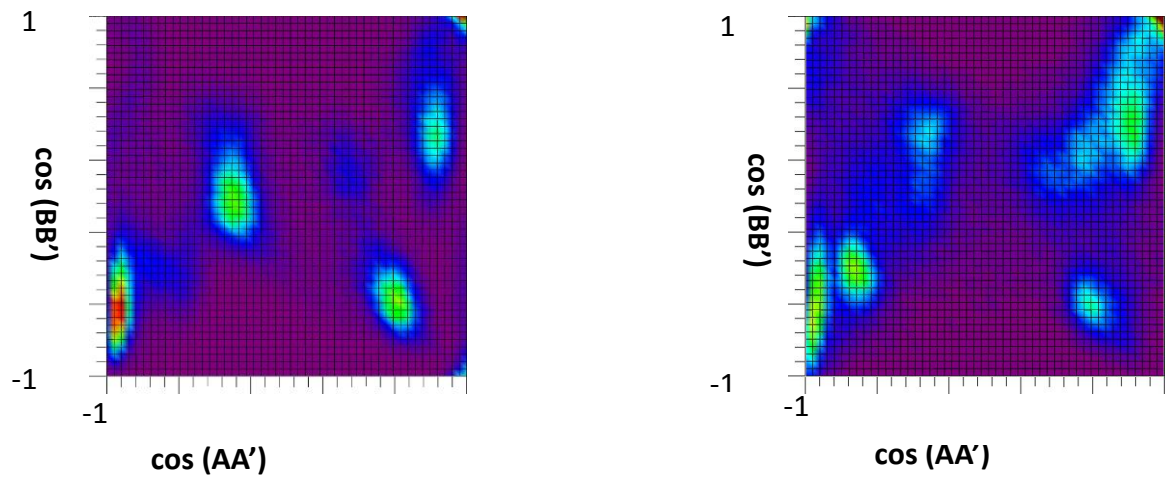


Рис. 5. Распределение димеров ГК (слева) и ассоциатов 2:1 (справа) в координатах $\cos(A1A1) - \cos(B1B2)$.

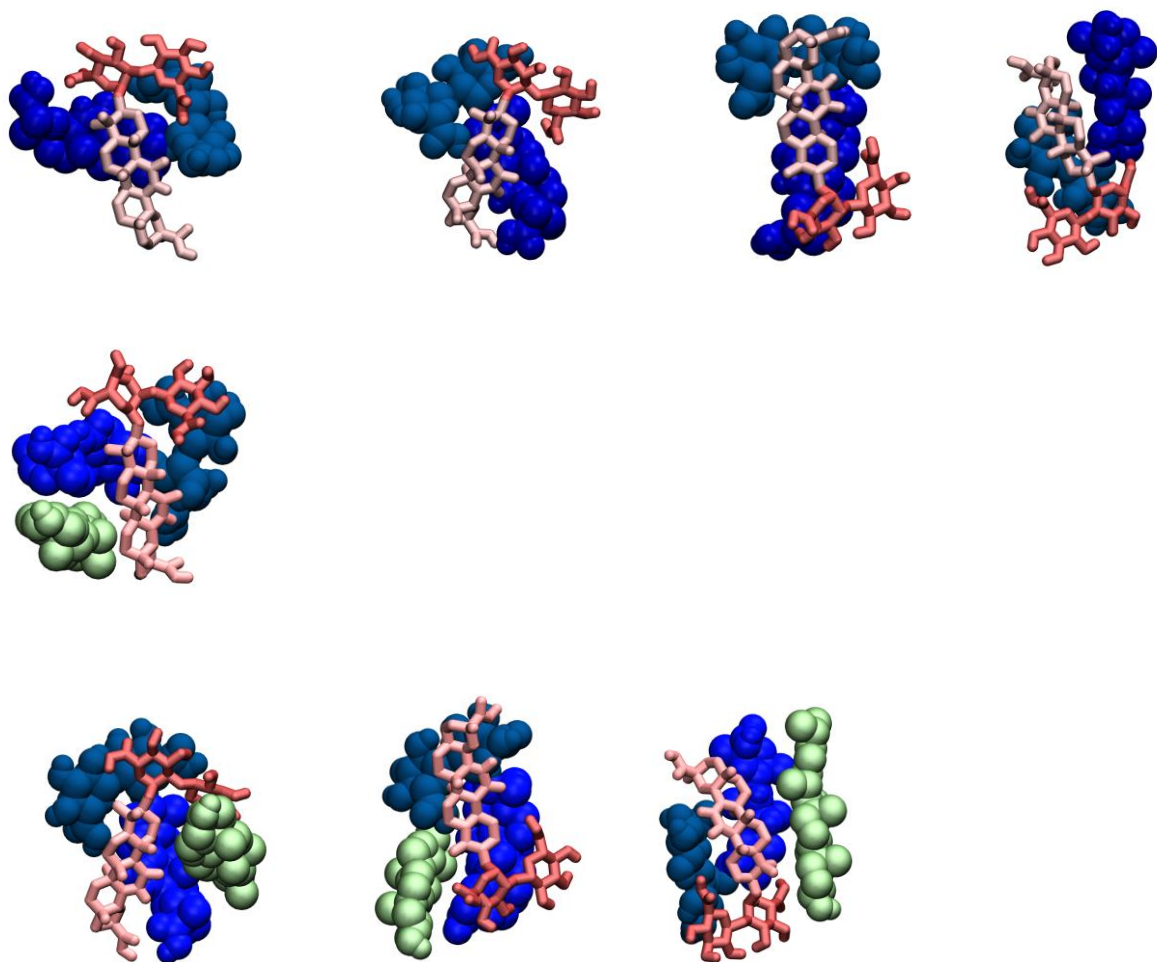


Рис. 6. Верхний ряд: димеры ГК соответствующие пятнам 1 - 4 на рисунке 7 (слева). Для ясности, одна из молекул ГК показана ван дер ваальсовскими атомами (синим), а другая скелетом. Нижний ряд - кластеры 2:1 из соответствующих пятен на Рис. 7 (справа). Молекула холестерина показана зеленым.

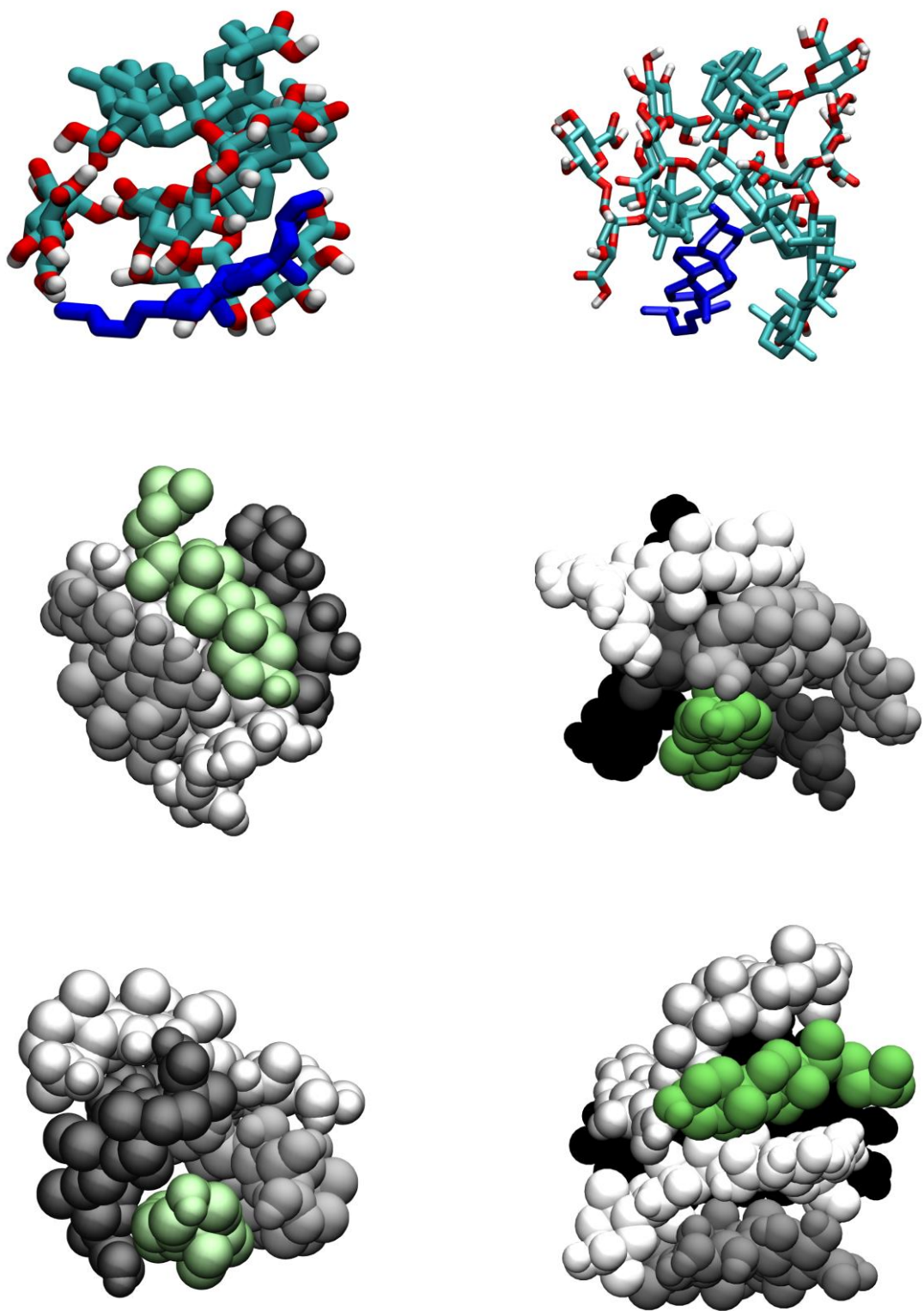


Рис. 7. Примеры структуры ассоциата 3:1 и 4:1 (приведены три разных ассоциата из разных прогонок). В верхнем ряду молекула холестерина изображена синим скелетом, а в нижних – зелеными сферами. Окружающие молекулы воды не показаны. Видно, что во всех случаях молекула холестерина находится на поверхности тримера ГК.

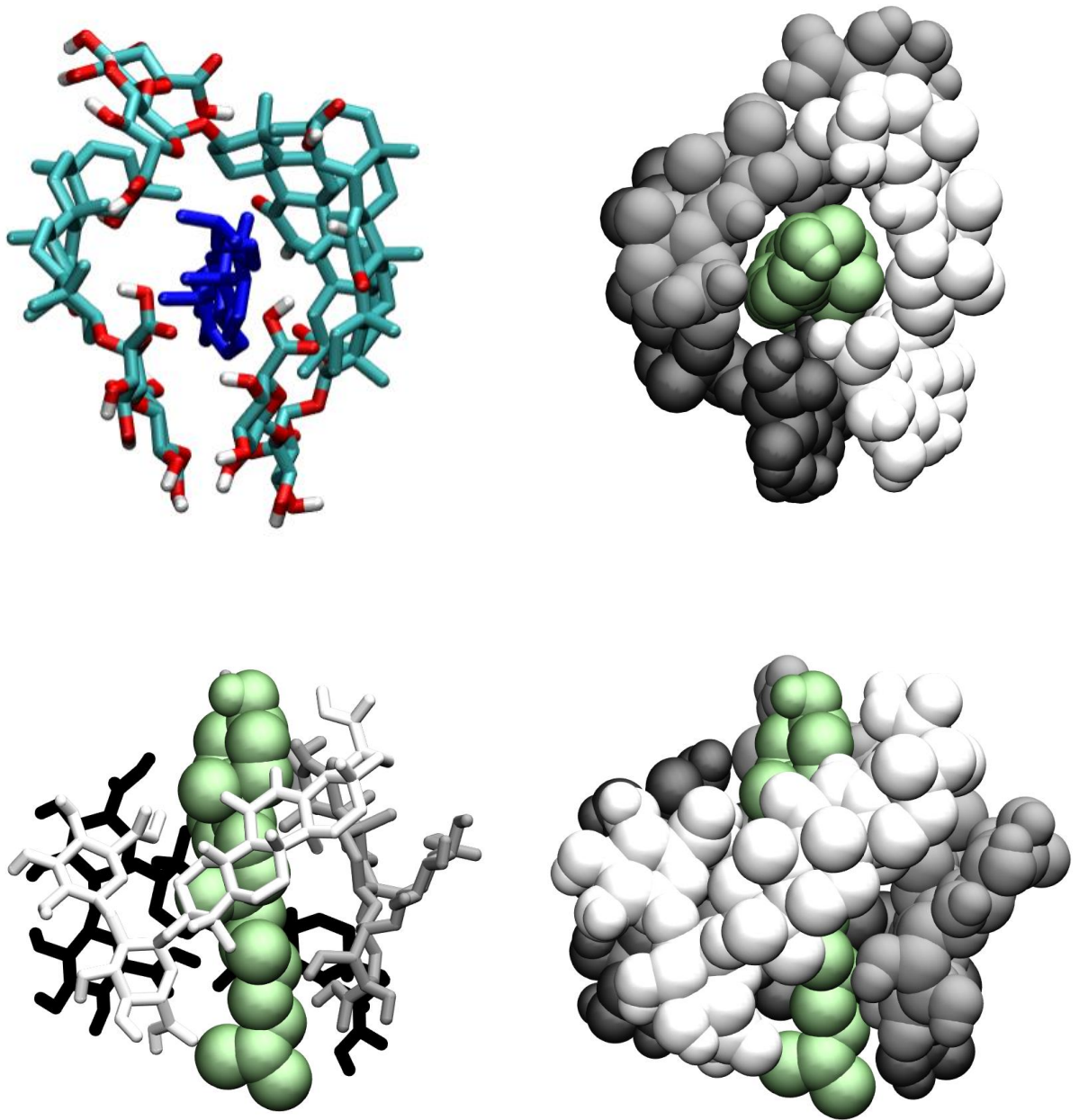


Рис. 8. Агрегат состава 3:1, где молекула холестерина «захвачена» в кольцо из молекул ГК. Приведена одна и та же конфигурация в разных проекциях. В левом верхнем углу молекула холестерина изображена синим скелетом, а в остальных позициях зеленым цветом. Молекулы воды не показаны.

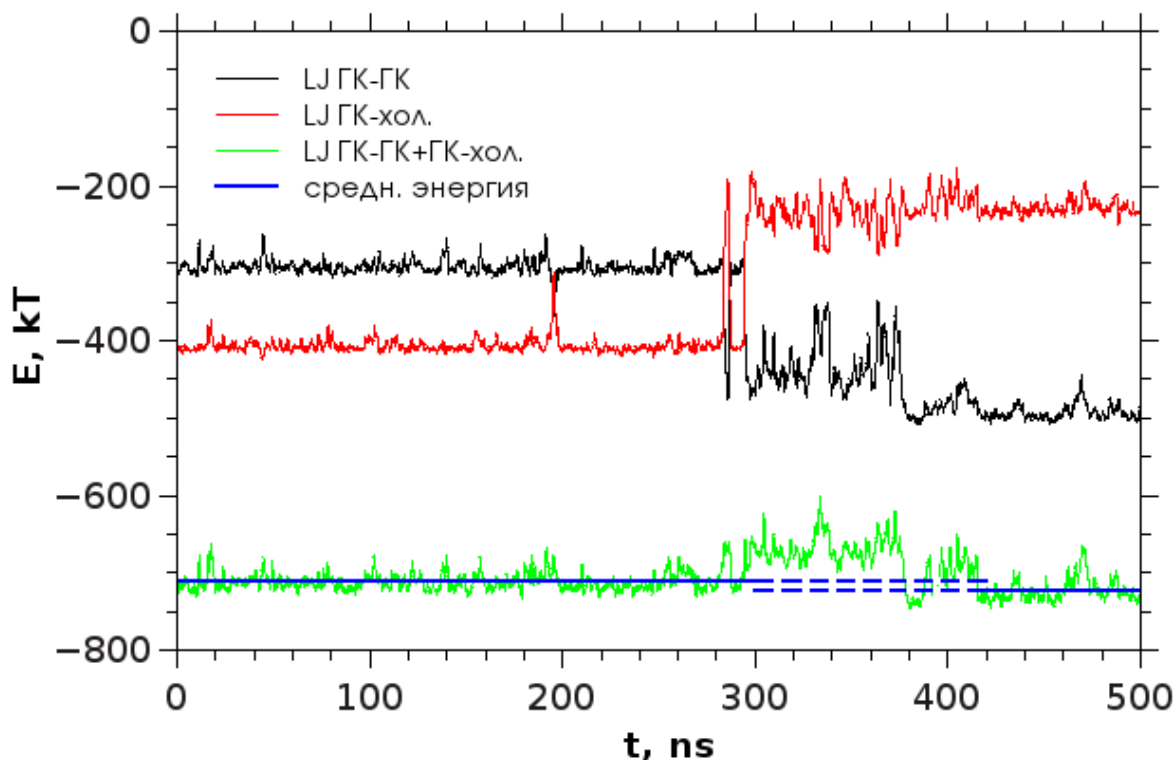


Рис. 8. Энергия взаимодействия ван-дер-Ваальса трех молекул ГК друг с другом (черная кривая), трех молекул ГК с холестерином (красная) и сумма этих энергий (зеленая).

Эффект от использования кластера в достижении целей работы:

Основная часть вычислений, включающая все моделирование, за исключением некоторых пробных моделей производилась на кластере НГУ (Информационно-вычислительный центр (ИВЦ) НГУ), предоставляющем вычислительные ресурсы и программное обеспечение для выполнения научных работ. ИВЦ предоставлял для работы вычислительные узлы, состоящие из нескольких ядер, и допускающие параллельное выполнение задач. Для работы использовалось одновременно до 6 узлов кластера по 12 ядер. При этом одна прогонка (30 нс) модели с двумя молекулами ГК занимала около 2 суток. Полученные данные передавались с динамического диска на кластере (100 Гб) для дальнейшей обработки на компьютер в лаборатории. Таким образом, средствами ИВЦ НГУ были рассчитаны молекулярно динамические модели в ряде случаев с заданными независимыми начальными условиями. Их исследование привело к результатам, представленным в этом отчете и приведенных ниже публикациях, и позволяет лучше понять структуру и механизм образования агрегатов ГК, что представляет интерес для медицины.

Перечень публикаций, содержащих результаты работы:

Статьи в рецензируемых журналах:

1. М.В. Зеликман, А.В. Ким, Н.Н. Медведев, О.Ю. Селютина, Н.Э. Поляков, Структура димеров глицерризиновой кислоты в воде и их комплексов с холестерином. Молекулярно-динамическое моделирование. // Журнал Структурной Химии, 2014, (принято в печать).

Тезисы и статьи в сборниках трудов конференций:

2. Zelikman M.V., Anishchik S.V., Medvedev N.N. Molecular dynamic simulation of the induced drift motion in liquids. // VIII International Voevodsky Conference "Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes", Novosibirsk, 2012.
3. М.В. Зеликман, Молекулярно-динамическое моделирование структуры димеров глициризиновой кислоты в воде и их комплексов с холестерином // 52-я Международная научная студенческая конференция, Новосибирск, 2014
4. М.В. Зеликман, Исследование применимости диффузионного подхода к описанию движения заряженных частиц в жидкости методом молекулярной динамики // 50-я юбилейная Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс», Новосибирск, 2012
5. М.В. Зеликман, Моделирование индуцированного дрейфа молекулы в жидкости // 49-я Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс», Новосибирск, 2012

Впечатления от работы вычислительной системы и деятельности ИВЦ НГУ, пожелания:

За исключением единичных случаев неполадок, кластер работает отлично. Вся работа сделана в срок. Выражаю большую благодарность.

Пожелание: продолжать расти и скорее починиться!