

تغییرات ساختاری و نفوذپذیری غشای سلولی در طی فروپتوزیس:

مطالعه‌ای با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

یاسر شعبانپور^۱، مژگان علی‌پور^۲، بهنام حاجی‌پور وردوم^۱، پرویز عبدالمالکی^{۳*}

۱-دکتری، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲-استادیار، مرکز تحقیقات جراحی مغز و اعصاب عملکردی، قطب علمی جراحی مغز و اعصاب کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳-استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

*صندوق پستی ۱۵۴-۱۴۱۱۴، تهران، ایران.

Parviz@modares.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۳۱

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳

چکیده

فروپتوزیس نوعی جدید از مرگ سلولی است که با هیدروپراکسیداسیون لیپیدها همراه است. این فرایند به آهن و اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFAs) وابسته است. علی‌رغم اهمیت فروپتوزیس جزئیات مولکولی این فرایند به‌ویژه تأثیر آن بر ویژگی‌های غشای سلولی همچنان ناشناخته باقی مانده است. در این مطالعه تغییرات ساختاری و نفوذپذیری غشای پلاسمایی در اثر هیدروپراکسیداسیون لیپیدی طی فروپتوزیس با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شد. ابتدا بر اساس داده‌های تجربی یک مدل از غشای گلبول قرمز انسانی ساخته شد. برای مدل‌سازی غشا فروپتوزیس زنجیره‌های لیپیدی PUFA در غشای گلبول قرمز با مشتقات هیدروپراکسید آنها جایگزین شدند. هر دو سیستم (غشای نرمال و فروپتوزیسی) در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی All-Atom به مدت ۳۰۰ نانوثانیه (با سه تکرار) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در غشای فروپتوزیسی ضخامت کاهش و سطح افزایش یافته است. همچنین، گروه‌های هیدروپراکسید موجود در زنجیره‌های اسید چرب به سمت گروه‌های سرقطبی فسفولیپیدها حرکت کردند. علاوه بر این تغییرات ساختاری عملکرد غشا که به‌طور معمول به‌عنوان یک

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

سد نفوذناپذیر برای مولکول‌های قطبی مانند آب عمل می‌کند در اثر هیدروپراکسیداسیون مختل شد، در حالی که یکپارچگی کلی غشا حفظ شد. به‌طور خلاصه، هیدروپراکسیداسیون لیپیدی در فروپتوزیس تغییرات مهمی در ساختار و عملکرد غشا ایجاد می‌کند که می‌تواند در توسعه درمان‌های جدید برای بیماری‌های سخت مانند سرطان و بیماری‌های تحلیل برنده اعصاب کاربرد داشته باشد.

کلید واژگان: فروپتوزیس، غشای پلاسمایی، هیدروپراکسیداسیون لیپیدی، مدل‌سازی غشا، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

۱-مقدمه

مرگ سلولی فروپتوزیس^۱ نوعی مرگ سلولی تنظیم شده وابسته به آهن است. مکانیسم آن از مرگ‌های سلولی برنامه‌ریزی شده دیگر مانند آپوپتوزیس و نکروپتوزیس متمایز است و ناشناخته‌های آن بسیار است [۱]. در فروپتوزیس اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه^۲ (PUFA) هیدروپراکسید شده در سلول و غشا پلاسمایی تجمع می‌یابند [۲-۵]. از آنجایی که، عملکرد غشا پلاسمایی به ترکیب لیپیدی آن وابسته است، بنابراین فروپتوزیس می‌تواند با تغییر آن باعث اختلال در عملکرد طبیعی غشا شود [۶ و ۷]. برای مدل‌سازی غشا در شرایط فروپتوزیس باید مکانیسم هیدروپراکسیداسیون اسیدهای چرب PUFA را بدانیم (شکل ۱). این اسیدهای چرب دارای دو یا چند پیوند دوگانه و حداقل یک اتم کربن بیس-آلیلیک هستند [۷]. گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن^۳ (ROS/RNS) [۸-۱۰] با واسطه‌گری آهن و افزایش واکنش فنتون [۱۱ و ۱۲] همچنین، آنزیم‌های سیکلواکسیژناز^۴ (COX) و لیپوکسیژناز^۵ (LOX) به‌ویژه لیپوکسیژناز-۱۵ (LOX15) [۱۳-۱۷] با دریافت یک اتم هیدروژن از اتم‌های کربن بیس-آلیلیک منجر به تشکیل رادیکال پنتادی انیل (PUFA•) می‌شوند (شکل ۱).

این رادیکال به سرعت با اکسیژن مولکولی واکنش داده و باعث تولید رادیکال پراکسیل (PUFA-OO•) می‌شود. رادیکال‌های پراکسیل هیدروژن را از سایر اسیدهای چرب PUFA دریافت کرده، در نتیجه هیدروپراکسیدها (PUFA-OOH) (شکل ۱) و رادیکال‌های پنتادی انیل جدید را ایجاد می‌کنند. به این ترتیب واکنش زنجیره‌ای رادیکال شدن لیپیدها انتشار می‌یابد. این زنجیره تنها با افزایش فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند موالونات^۶ [۱۸]، ویتامین E [۱۹] و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز^۷ (SOD) [۲۰]، پروتئین سرکوبگر فروپتوزیس^۸ (FSP1) [۲۱]، و به‌طور ویژه آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز-۴^۹ (GPX4) پایان می‌یابد [۲۲-۲۷]. قابل ذکر است که طی پراکسیداسیون اسیدهای چرب PUFA با توجه به شرایط داخلی سلول‌ها هیدروپراکسیدهای اولیه با پیکربندی ترانس-سیس بسیار بیشتر از هیدروپراکسیدهای ثانویه با پیکربندی ترانس-ترانس تشکیل می‌شوند (شکل ۱) [۲۸]. عضو ۴ خانواده آنزیم‌های آسیل-کوآ سینتاز با زنجیره بلند^{۱۰} (ACSL4) و آنزیم لیزو فسفاتیدیل کولین آسیل ترانسفراز-۱۳^{۱۱} (LPCAT3) در فروپتوزیس نقش دارند [۲۹ و ۳۰].

^۷ Superoxide dismutase

^۸ Ferroptosis Suppressor Protein 1

^۹ Glutathione peroxidase 4

^{۱۰} Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4

^{۱۱} Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3

^۱ Ferroptosis

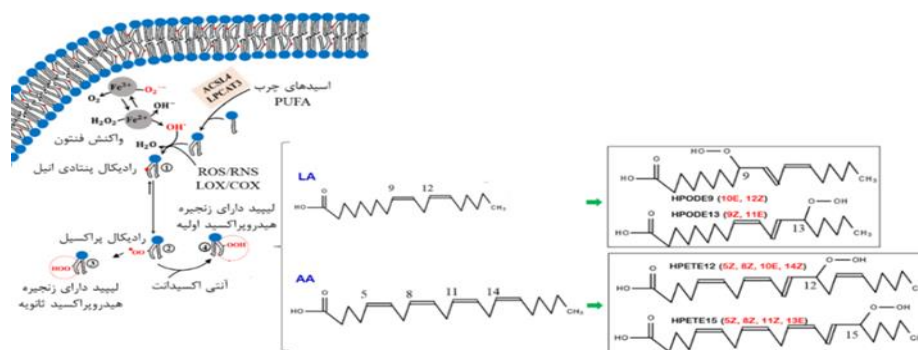
^۲ Polyunsaturated fatty acid hydroperoxides

^۳ reactive oxygen and nitrogen species

^۴ Cyclooxygenase

^۵ Lipoxigenases

^۶ Mevalonate



شکل ۱ مکانیسم هیدروپراکسیداسیون اسیدهای چرب PUFA در لیپیدهای غشاء. ساختار مهمترین ایزومرهای هیدروپراکسید هر یک از اسید چرب‌های دخیل در فروپتوزیس که در مدل غشا پراکسید شده استفاده شده‌اند، در سمت راست نمایش داده شده است (LA: هیدروپراکسی اکتا دکا دی انوئیک اسید (hydroperoxy octadecadienoic acid): ۱۰ ترانس، ۱۲ سیس (HPODE9) و ۹ سیس، ۱۱ ترانس (HPODE13); AA: هیدروپراکسی ایکوزاتترانوئیک اسید (hydroperoxieicosatetraenoic acid): ۵ سیس، ۸ سیس، ۱۰ ترانس، ۱۴ سیس (HPETE12) و ۵ سیس، ۸ سیس، ۱۱ سیس، ۱۳ ترانس (HPETE15)).

برای رسیدن به این هدف از غشا پلاسمایی گلوبول قرمز انسان (جدول ۱) که ترکیبات آن مورد مطالعه گسترده قرار گرفته استفاده کردیم (جزئیات و رفرنس در بخش مواد و روش‌ها آورده شده است).

برای مدل‌سازی غشا فروپتوزیس، فسفولیپیدهای دارای اسیدهای چرب LA و AA را با مشتقات هیدروپراکسید اولیه آنها (شکل ۱) جایگزین کردیم. سپس، شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی را با هدف بررسی تغییرات در ساختار و نفوذپذیری غشا ناشی از مرگ سلولی فروپتوزیس انجام دادیم. نتایج نشان دادند که به علت حرکت گروه‌های هیدروپراکسید به سمت گروه‌های سر قطبی فسفولیپیدها، غشا فروپتوزیس نازک‌تر از غشا سالم است و فضاهای خالی بیشتری دارد در نتیجه مولکول‌های آب با حفظ یکپارچگی غشا نفوذ بیشتری به غشا فروپتوزیس دارند. این تغییرات می‌توانند به‌طور بالقوه بر عملکرد پروتئین‌های غشایی تاثیر بگذارند. همچنین، افزایش نفوذپذیری باعث تداخل در تعادل غلظتی مواد داخل سلول شده در نهایت مرگ سلولی رخ می‌دهد.

این آنزیم‌ها اسیدهای چرب PUFA، به ویژه آراشیدونیک اسید^۱ (۲۰:۴-Δ^۵ AA (Z, 8Z, 11Z, 14Z) و لینولئیک اسید^۲ (۱۸:۲-Δ^۹ LA (Z, 12Z) را به فسفولیپیدهای غشایی متصل می‌کنند که در آن Z؛ پیوند دوگانه سیس و E؛ پیوند دوگانه ترانس است [۳۱-۳۴]. LA و AA می‌توانند توسط ROS/RNS اکسید شوند، همچنین AA مهمترین سوبسترای آنزیم‌های LOX است [۳۵-۳۸]. علاوه بر این، مطالعات نشان داده که در غشا پلاسمایی، اسیدهای چرب LA، AA بیشترین میزان را به خود اختصاص داده‌اند [۳۹]. بنابراین، طی مرگ سلولی فروپتوزیس، این اسیدهای چرب بیشتر در معرض هیدروپراکسیداسیون قرار دارند [۳۸]. انواع مختلفی از ایزومرهای هیدروپراکسیدهای اولیه از LA، AA، تولید می‌شوند، مهمترین آنها که در مدل سازی غشا فروپتوزیس استفاده شد در شکل ۱ نشان داده شده‌اند [۳۸]. مطالعات نشان داده‌اند که خواص و عملکرد غشاها علاوه بر ترکیب تحت تاثیر نحوه توزیع آنها بین لایه‌های غشا است [۴۰ و ۲۵]. بنابراین، برای مطالعه دقیق تر غشا پلاسمایی باید ترکیب طبیعی و نامتقارن آن را مدل کرد.

^۱ Linoleic acid^۲ Arachidonic acid

جدول ۱ ترکیب مدل غشا پلاسمایی گلبول‌های قرمز انسان. اسیدهای چرب عبارتند از: اسید استئاریک (a) (stearic acid)، اسید اولئیک (b) (oleic acid)، اسید لینولئیک (c) (oleic acidlin)، اسید آراشیدونیک (d) (arachidonic acid)، اسید دوکوزاهگزانوئیک (e) (docosahexaenoic acid)، اسید پالمیتیک (f) (palmitic acid)، اسید بهنیک (g) (behenic acid)، لیگنوسریک اسید (lignoceric acid) (h) و دینرونیل اسید (i) (dinervonoyl acid).

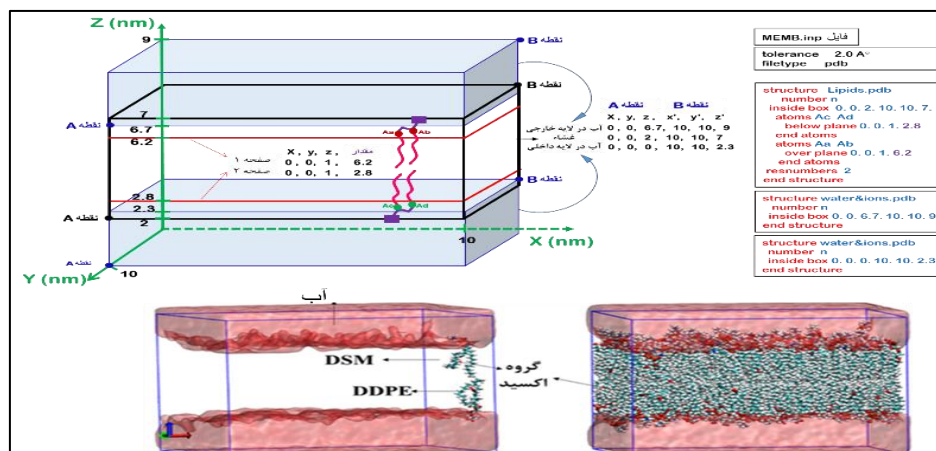
نوع و تعداد اسیدهای چرب				نوع و تعداد لیپیدها			
خارج	داخل	پیوند:کربن	درصد فراوانی	خارج	داخل	کل غشا	
۴	۳۸	a۰:۱۸	%۵۱	۳	(%۹۴) ۳۷	فسفاتیدیل سرین + فسفاتیدیل اینوزیتول (۲۰ درصد از کل لیپیدها) ۴۰	
-	۸	b۰:۱۸	%۱۰				
-	۲	c۲:۱۸	%۳				
۲	۱۴	d۴:۲۰	%۲۰				
-	۱۲	e۶:۲۲	%۱۶				
۲۸	۱۲	f۰:۱۶	%۳۷	۳۸	(%۳۰) ۱۶	فسفاتیدیل کولین (۲۷ درصد از کل لیپیدها) ۵۴	
۱۰	۴	۰:۱۸	%۱۲				
۱۲	۶	۱:۱۸	%۱۸				
۱۸	۸	۲:۱۸	%۲۳				
۶	۲	۴:۲۰	%۷				
۲	-	۶:۲۲	%۳				
۴	۲۰	۰:۱۶	%۱۹	۱۲	(%۸۰) ۴۸	فسفاتیدیل اتانول آمین (۳۰ درصد از کل لیپیدها) ۶۰	
۶	۲۰	۰:۱۸	%۲۱				
۴	۱۶	۱:۱۸	%۱۷				
۲	۶	۲:۱۸	%۷				
۴	۲۰	۴:۲۰	%۲۰				
۴	۱۴	۶:۲۲	%۱۶				
۱۰	۲	۰:۱۶	%۲۶	۴۰	(%۱۲) ۶	اسفنگومیلین (۲۳ درصد از کل لیپیدها) ۴۶	
۴	۱	۰:۱۸	%۱۰				
۴	-	۲:۱۸	%۵				
۳	-	g۰:۲۲	%۷				
۲	-	۶:۲۲	%۵				
۸	۱	h۰:۲۴	%۲۰				
۱۱	۲	i۲۴:۱	%۲۷				
-	-	-	-	۵۰	۵۰	کسترویل (۵۰ درصد لیپیدها) ۱۰۰	
۱۴۶	۲۰۸	-	-	۱۴۳	۱۵۷	مجموع ۳۰۰	

۲- مدل‌ها و روش‌ها

۲-۱ ساخت مدل

از مدل غشا پلاسمایی گلبول قرمز انسان برای ساخت غشاهای نرمال و فروپتوزیس استفاده شد (جدول ۱). ترکیب لیپیدی این غشا توسط آزمایش‌های تجربی مشخص شده است، برای مثال دیده شده که پروتئین‌های فلیپاز^۱ و فلاپاز^۲ در غشا گلبول‌های قرمز انسان [۴۱-۴۳] منجر به افزایش فسفاتیدیل کولین (PC) و اسفنگومیلین (SM) در لایه بیرونی و فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) و فسفاتیدیل سرین (PS) در لایه داخلی غشا می‌شوند [۴۴ و ۴۵]. همچنین، دیده شده که میزان کلسترول غشا سلولی پستانداران تقریباً برابر با ۵۰ درصد محتوای لیپیدی آن است، اما در رابطه با نحوه توزیع کلسترول بین دو لایه

غشا اتفاق نظر وجود ندارد. برخی مطالعات میزان کلسترول بیشتری را در لایه داخلی و برخی در لایه خارجی غشا گزارش کرده‌اند. همچنین، مطالعات دیگری توزیع متقارن آن در دو لایه غشا را نشان داده‌اند [۴۷ و ۴۶ و ۴۱ و ۳۹]. برای ساده سازی مدل، فسفاتیدیل اینوزیتول‌ها (Pi) با فسفاتیدیل سرین (PS) جایگزین شدند، زیرا هر دو Pi و PS حاوی یک بار الکتریکی منفی هستند. اما Pi به میزان خیلی کمتری از PS در غشا حضور دارد [۳۹]. ترکیب غشا فروپتوزیس از جایگزین کردن فسفولیپیدهای حاوی PUFA در غشا نرمال با ایزومرهای هیدروپراکسید آنها به دست آمد. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، برای هر یک از اسیدهای چرب LA و AA ازدو ایزومر هیدروپراکسید استفاده شد.



شکل ۲ بالا: جزئیات ساخت غشا فروپتوزیس با برنامه Packmol نشان داده شده است، در این شکل به صورت شماتیک نحوه قرار دادن یک نوع فسفولیپید (به تعداد $n=1$) در لایه خارجی با استفاده از قیدهای اتمی Aa و Ab و یک نوع دیگر در لایه داخلی با استفاده از قیدهای اتمی Ac و Ad نشان داده شده است. مختصات هر لایه (Inside box) با شش عدد (مربوط به x, y, z و x', y', z') نشان داده شده است که برای مثال فاصله x تا x' برابر با طول لایه روی محور x می‌باشد و مختصات قیود مربوط به هر صفحه (Below plane و Over plane) با ۴ عدد $(x, y, z, value)$ نشان داده شده است که برای مثال $0, 0, 1, 6.2$ یعنی صفحه‌ای که موازی صفحه $x-y$ هست و در نقطه z برابر 6.2 نانومتر قرار دارد. پایین: لیپیدهای DDPE و DSM در لایه داخلی و خارجی غشا فروپتوزیس و مدل غشا نهایی (بدون یونها) نشان داده شده است.

^۱ Floppases^۲ Flippases

به همین دلیل نیمی از فسفولیپیدهای غشا نرمال که تنها یک زنجیره LA و AA در موقعیت SN2 دارند با یک ایزومر هیدروپراکسید و نیمی دیگر با ایزومر دیگر جایگزین شدند. همچنین، فسفولیپیدهایی که در غشا نرمال دارای دو زنجیره یکسان LA یا AA بودند، همزمان هر دو نوع ایزومر هیدروپراکسید را دریافت کرده‌اند. به علت فقدان لیپیدهای هیدروپراکسید شده در CHARMM-GUI [۴۸-۵۰] از بسته نرم‌افزاری Packmol [۵۱] برای مدل‌سازی غشا فروپتوزیس استفاده شد. برای اینکار، ابتدا مختصات فضایی سه جعبه به هم پیوسته برای محیط آب پیرامون لایه داخلی، آب پیرامون لایه خارجی و غشا با استفاده از مقادیر x, y, z و x', y', z' تعیین شد. سپس، به تعداد مورد نیاز آب، یون و لیپید به جعبه‌های مربوطه اضافه شد. لازم به ذکر است که با استفاده از قیود اتمی، گروه قطبی لیپیدها نزدیک محیط آب (شکل ۲) و انتهای زنجیره هیدروکربنی آنها در مرکز غشا قرار داده شدند. در نهایت برنامه Packmol با انجام محاسبات گام به گام اجزای مختلف را در سیستم به صورت تصادفی در کنار یکدیگر قرار داد، به طوری که هر بار سعی شد ساختار بهتری نسبت به ساختار قبلی ارائه دهد که به قیود اعمال شده نزدیکتر باشد. سرانجام تمام اجزاء غشا، آب و یونها با حداقل فاصله ۲ آنگسترم (به وسیله پارامتر تلورانس) در کنار یکدیگر قرار گرفتند. سیستم‌های مدل شده غشا نرمال و فروپتوزیس حاوی مولکول‌های لیپید، کلسترول، آب و یون‌های سدیم و کلر در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

۲-۲ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

برای مطالعه سیستم‌های غشا نرمال و فروپتوزیس شبیه‌سازی دینامیک مولکولی MD (All-Atom) با استفاده از بسته نرم‌افزاری GROMACS (Version, 2018.1) و فورس فیلد CHARMM36 طراحی و اجرا شدند. برای

هر کدام از سیستم‌ها مراحل کمینه‌سازی انرژی تا شبیه‌سازی اصلی سه بار تکرار شد. کمینه‌سازی انرژی برای هر دو سیستم با استفاده از الگوریتم Steepest Descent در طی ۱۲۰۰۰ گام انجام شد. سپس، هر دو سیستم غشا در حالت ترمودینامیکی NVT طی دو مرحله متوالی ۱۰۰۰ پیکوثانیه (ps) و ۱۵۰۰ ps (به ترتیب در دمای ۳۰۵ و ۳۱۰ درجه کلونین (K)) به تعادل دمایی رسیدند. در این مرحله از معادله حرکت leap-frog و الگوریتم تنظیم دمای velocity rescale استفاده شد [۵۲ و ۵۳]. در طول تعادل دمایی NVT، گام زمانی برابر ۲ فمتوثانیه (fs) انتخاب شد. در طول تعادل دمایی NVT، گام زمانی برابر ۲ فمتوثانیه (fs) انتخاب شد. سپس، در حالت ترمودینامیکی NPT الگوریتم تنظیم فشار Parrinello-Rahman [۵۴] با گام زمانی ۲ fs سیستم‌های غشایی را در فشار ۱ اتمسفر به تعادل رسانید. در مرحله NPT، فشار ۱ اتمسفر در دمای ثابت ۳۱۰ کلونین طی چهار مرحله شبیه‌سازی (۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ پیکوثانیه) تنظیم شد. همه قیدهای حرکتی بر روی اتم‌ها در مرحله نهایی تعادل NPT حذف شدند. لیست اتم‌های همسایه پس از طی ۲۰ گام بازسازی می‌شد. حداکثر فاصله برای اینکه اتم‌ها در لیست اتم‌های همسایه قرار بگیرند (rlist) برابر ۱٫۲ نانومتر (nm) تنظیم شد. همچنین، حداکثر فاصله برای محاسبه میانکنش‌های لنارد-جونز و برهمکنش‌های الکترواستاتیک کوتاه برد، برابر ۱٫۲ نانومتر در نظر گرفته شد و برهمکنش‌های الکترواستاتیک دوربرد با استفاده از روش^۱ PME محاسبه شد [۵۵]. در نهایت، شبیه‌سازی‌های اصلی با گام زمانی ۲ fs در دمای ۳۱۰ کلونین و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۳۰۰ نانوثانیه انجام شد و ۲۰۰ نانوثانیه پایانی آن آنالیز شد. الگوریتم leap-frog برای محاسبه حرکت اتم‌ها در شبیه‌سازی اصلی به کار گرفته شد.

^۱ Particle Mesh Ewald

جدول ۲ اطلاعات مربوط به هریک از دو سیستم غشا مدل شده نشان داده شده‌اند.

بخش‌های مختلف		مختصات جعبه شبیه‌سازی			تعداد یون‌ها و مولکول‌ها				نحوه ساخت
		x (نانومتر)	y (نانومتر)	z (نانومتر)	لیپید	آب	سدیم	کلر	
غشا نرمال	لایه داخلی	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۲ - ۴,۸	۱۵۷	-	-	-	CHARM-GUI interface
	لایه خارجی	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۴,۸ - ۷,۲	۱۴۳	-	-	-	
	آب داخلی	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۰ - ۲,۴	-	۵۲۳۰	۳۴	۱۲	
	آب خارجی	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۶,۸ - ۹,۲	-	۵۲۳۰	۳۲	۱۴	
	کل	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۰ - ۹,۲	۳۰۰	۱۰۴۶۰	۶۶	۲۶	
غشا فروپتوزیس	لایه داخلی	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۲ - ۴,۴	۱۵۷	-	-	-	Packmol
	لایه خارجی	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۴,۶ - ۷	۱۴۳	-	-	-	
	آب داخلی	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۰ - ۲,۳	-	۵۲۳۰	۳۴	۱۲	
	آب خارجی	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۶,۷ - ۹	-	۵۲۳۰	۳۲	۱۴	
	کل	۰ - ۱۰	۰ - ۱۰	۰ - ۹	۳۰۰	۱۰۴۶۰	۶۶	۲۶	

۳-۲ پارامترهای فورس فیلد

پارامترهای توپولوژیکی برای فسفولیپیدها، کلاسترول، آب و یون‌ها از فورس فیلد CHARMM36 به دست آمده و از مدل مولکول‌های آب TIP3P استفاده شد. قابل ذکر است که فورس فیلد CHARMM36 فاقد برخی از پارامترهای توپولوژیک برای معرفی گروه هیدروپراکسید (OOH) از جمله نوع اتم‌ها از نظر محاسباتی و بار الکتریکی آنها، است. این پارامترها در برخی از مطالعات برای اسیدهای چرب هیدروپراکسید محاسبه شده است [۵۸-۵۶]. بنابراین، از این اطلاعات برای معرفی گروه‌های هیدروپراکسید به نرم‌افزار استفاده شد. همچنین، پارامترهای توپولوژیکی مربوط به ثابت‌های انرژی گروه‌های OOH (پارامترهای مربوط به انرژی کشش پیوندها، زوایای دو وجهی و بار اتم‌ها) در فسفولیپیدهای هیدروپراکسید شده از فورس فیلد CGenFF [۵۹] و پارامترهایی که جولیان گارک به دست آورده‌اند تعیین شد [۶۰]. ایشان پارامترهای هیدروپراکسی متان

(CH₃COOH) را به عنوان یک مولکول مدل بر اساس نظریه مکانیک کوانتومی B3LYP/6-31G* با استفاده از نرم‌افزار GAUSSIAN G9 و برنامه FFTK محاسبه کرده‌اند.

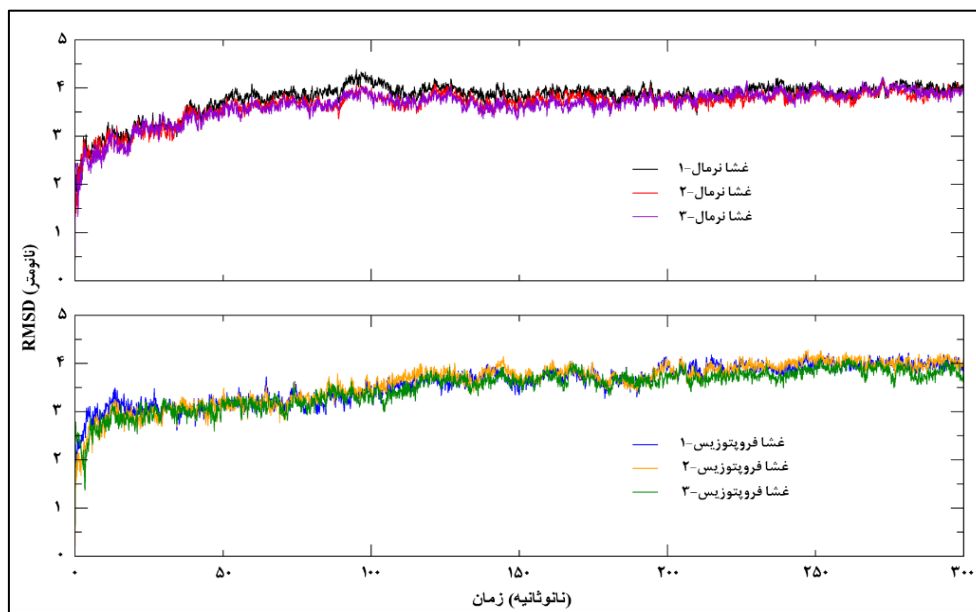
۳-۳ بحث و نتایج

۱-۳ تعادل ساختاری

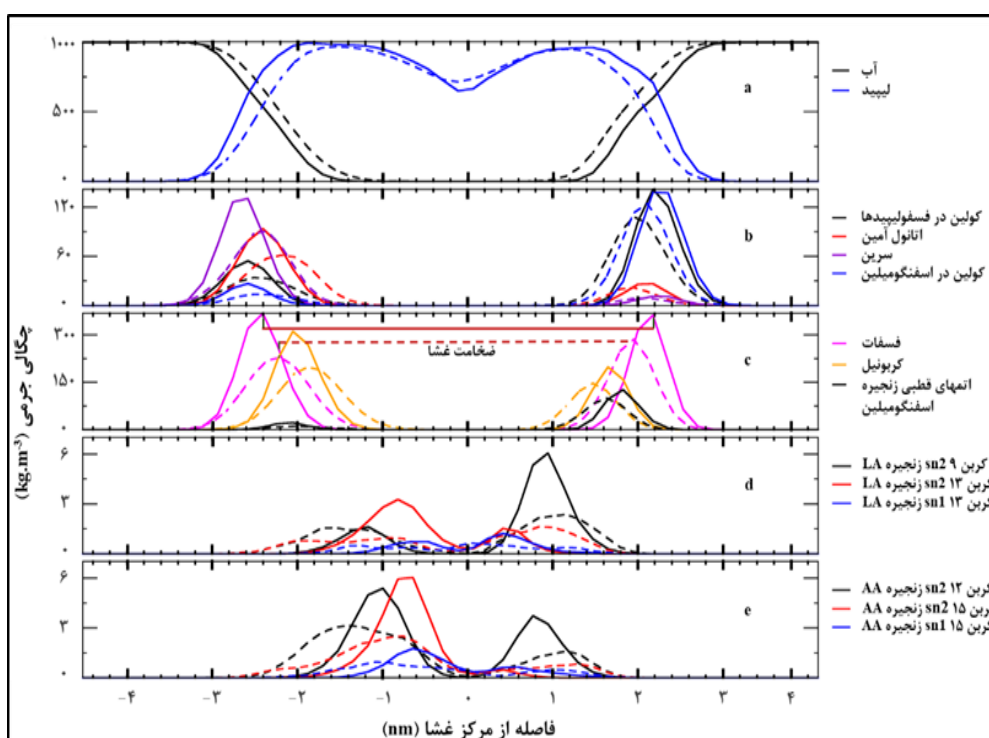
پارامتر مجذور میانگین مربعات حرکت اتم‌ها (RMSD) نشان داد که شبیه‌سازی‌ها به پایداری ترمودینامیکی لازم برای انجام آنالیزهای ساختاری رسیده‌اند (شکل ۳).

۲-۳ چگالی جرمی اجزاء غشا

چگالی جرم اجزاء مختلف غشا به عنوان تابعی از فاصله تا مرکز غشا برای غشاهای نرمال و فروپتوزیس محاسبه شد. با توجه به شکل ۴-ا، افزایش تراکم لیپیدها در مرکز غشا فروپتوزیس قابل مشاهده است که به طور بالقوه به دلیل درهم تنیده شدن انتهای زنجیره‌های لیپیدی دو لایه غشا به علت کاهش ضخامت آن است [۷۱ و ۶۲].



شکل ۳ نمودار RMSD مربوط به شبیه سازی هر یک از سیستم های غشا نرمال و فروپتوزیس با سه بار تکرار طی ۳۰۰ نانوثانیه نشان داده شده است.



شکل ۴ پروفایل چگالی جرم اجزا مختلف در عرض غشا نرمال و فروپتوزیس به عنوان تابعی از فاصله از مرکز غشا نشان داده شده است. فاصله از مرکز برای لایه داخلی غشا با اعداد منفی و برای لایه خارجی با اعداد مثبت است (داده ها از ۲۰۰ نانوثانیه پایانی شبیه سازی استخراج شده اند).

جدول ۳ مقدار جابه‌جایی نمودار توزیع چگالی جرمی و نقطه بیشینه نمودار اجزا مختلف در غشا فروپتوزیس نسبت به غشا نرمال نشان داده شده است. علامت " * " نشان‌دهنده جابجایی به سمت مرکز غشا و علامت " # " نشان‌دهنده جابجایی در جهت مخالف و به سمت ناحیه قطبی غشا است.

اجزاء غشا	لایه داخلی		لایه خارجی	
	میزان جابجایی نمودار (nm)	میزان جابجایی نقطه بیشینه (nm)	میزان جابجایی نمودار (nm)	میزان جابجایی نقطه بیشینه (nm)
گروه کولین فسفولیپ‌ها	* ۰,۷	* ۰,۲	* ۰,۵	* ۰,۲
گروه کولین اسفنگومیلین	* ۰,۷	* ۰,۲	* ۰,۵	* ۰,۲
گروه سرین	* ۰,۴	* ۰,۲	* ۰,۱	* ۰,۲
گروه اتانول آمین	* ۰,۶	* ۰,۲	* ۰,۳	* ۰,۲
گروه فسفات	* ۰,۴	* ۰,۲	* ۰,۴	* ۰,۲
گروه کربونیل فسفولیپ‌ها	* ۰,۴	* ۰,۲	* ۰,۴	* ۰,۲
اتمهای قطبی زنجیره اسفنگومیلین	* ۰,۴	* ۰,۲	* ۰,۴	* ۰,۲
کربن ۹-۲ sn زنجیره LA	# ۰,۵	# ۰,۴۵	# ۰,۲	# ۰,۲۵
کربن ۱۳-۲ sn زنجیره LA	# ۰,۹	# ۱,۱	# ۰,۶	# ۰,۵
کربن ۱۳-۱ sn زنجیره LA	# ۰,۸	# ۰,۷	# ۰,۶	# ۰,۰
کربن ۱۲-۲ sn زنجیره AA	# ۰,۶	# ۰,۴	# ۰,۲	# ۰,۴
کربن ۱۵-۲ sn زنجیره AA	# ۰,۸	۰,۰	# ۰,۸	# ۰,۹
کربن ۱۵-۱ sn زنجیره AA	# ۰,۷	# ۰,۵	# ۰,۴	# ۰,۶

شده است. همچنین، با توجه به شکل ۴-۷ و جدول ۳ نمودار توزیع چگالی جرمی فسفات‌ها، کربونیل‌ها و اتم‌های قطبی در ساختار اسفنگومیلین‌ها (CO-NH-C-OH) در هر دو لایه غشا فروپتوزیس نسبت به غشا نرمال حدود ۰,۴ نانومتر به سمت مرکز کشیده شده‌اند. همچنین، نقطه بیشینه نمودار توزیع چگالی آنها به اندازه ۰,۲ نانومتر به مرکز نزدیکتر شده است. به‌طور کلی، این نتایج نشان می‌دهد که غشا فروپتوزیس باریکتر از غشا نرمال شده است. علاوه بر این، شکل ۴-۷ و جدول ۳ نشان می‌دهند که اتم‌های کربن حامل گروه‌های OOH در غشا فروپتوزیس نسبت به غشا نرمال به سمت گروه‌های سرقطبی کشیده شده‌اند. همان‌طور که در شکل و جدول

علاوه بر این، در غشا نرمال، کلسترول نزدیک به سرقطبی زنجیره‌های هیدروکربنی آرایش یافته، در حالی که در غشا فروپتوزیس، کلسترول بیشتر به سمت انتهای زنجیره‌های هیدروکربنی لیپیدها متمایل شده است. با توجه به شکل ۴-۷ و جدول ۳ نمودار چگالی جرمی گروه‌های سرقطبی کولین، سرین و اتانول آمین در لایه داخلی به‌ترتیب در حدود ۰,۷ نانومتر، ۰,۴ نانومتر و ۰,۶ نانومتر به سمت مرکز غشا فروپتوزیس در مقایسه با غشا نرمال جابه‌جا شده‌اند. به‌طور مشابه، در لایه بیرونی، این گروه‌ها به ترتیب در حدود ۰,۵ نانومتر، ۰,۱ نانومتر و ۰,۳ نانومتر به سمت مرکز کشیده شده‌اند و نقطه بیشینه نمودار توزیع چگالی آنها به اندازه ۰,۲ نانومتر به مرکز غشا نزدیک‌تر

مربوطه دیده می‌شود، در اسیدهای چرب LA، C13 اکسید شده در sn1 و sn2 به‌طور گسترده‌تری نسبت به C9 اکسید شده در sn2 در عرض غشا توزیع شده است. به‌طور مشابه، در AA ها، C15 اکسید شده در sn1 و sn2 بیشتر از C12 اکسید شده در sn2 توزیع شده است. این طبیعی است که گروه‌های OOH نزدیک‌تر به انتهای زنجیره، برای رسیدن به ناحیه قطبی غشا باید مسافت بیشتری را طی کنند که باعث القا تغییرات ساختاری بیشتری نیز می‌شود.

۳-۳ ضخامت غشا

ضخامت غشا از طریق اندازه‌گیری فاصله بین نقطه بیشینه نمودار توزیع چگالی جرمی گروه‌های فسفات در لایه‌های داخلی و خارجی تعیین شد (شکل ۴ و جدول ۴). جدول ۴ همچنین ضخامت غشا را در برخی دیگر از مطالعات

تجربی و شبیه‌سازی جهت مقایسه نشان می‌دهد. در جدول، ضخامت دومین‌های غشا گلول قرمز که با پرتوهای ایکس با وضوح بالا مطالعه شده‌اند، در دو حالت با آرایش منظم لیپیدها (دارای زنجیره‌های هیدروکربنی اشباع) و با آرایش نامنظم لیپیدها (دارای زنجیره‌های هیدروکربنی غیراشباع) آورده شده است [۶۳]. در این مطالعه ضخامت دومین‌های با آرایش منظم ۴٫۶ نانومتر گزارش شده که با نتیجه به‌دست آمده از شبیه‌سازی غشا نرمال ما یکسان است. همچنین، ضخامت دومین‌های با آرایش نامنظم، ۴٫۱ نانومتر گزارش شده است که بسیار نزدیک به ضخامت غشا فروپتوزیس (۴٫۲ نانومتر) است. بنابراین، ضخامت غشا فروپتوزیس به اندازه ۰٫۴ نانومتر نسبت به غشا نرمال باریکتر است.

جدول ۴ ضخامت غشا و سطح اشغال شده توسط هر لیپید (APL) در غشاهای نرمال و فروپتوزیس با سایر مطالعات تجربی و محاسباتی مقایسه شده است.

سیستم‌های غشا مختلف	ضخامت غشا (nm)	نسبت سطح بر لیپید (APL)
لایه داخلی غشا نرمال	۲٫۴	۰٫۴۵
لایه خارجی غشا نرمال	۲٫۲	۰٫۵۰
لایه داخلی غشا فروپتوزیس	۲٫۲	۰٫۵۱
لایه خارجی غشا فروپتوزیس	۲٫۰	۰٫۵۶
دومین‌های لیپیدی منظم	۴٫۶۰	۰٫۳۸
دومین‌های لیپیدی نامنظم	۴٫۱۰	۰٫۵۰
غشا دولایه خالص POPC	۳٫۹۴	۰٫۶۳
غشا دولایه ۱۵٪ اکسید شده POPC	۳٫۶۴	۰٫۶۶
غشا دولایه خالص PLPC	۳٫۶۲	۰٫۶۵
غشا دولایه ۲۵٪ اکسید شده PLPC (کربن شماره ۹ لینولئیک اسید)	۳٫۶۰	۰٫۶۸
غشا دولایه ۵۰٪ اکسید شده PLPC (کربن شماره ۹ لینولئیک اسید)	۳٫۴۷	۰٫۷۰
غشا دولایه ۲۵٪ اکسید شده PLPC (کربن شماره ۱۳ لینولئیک اسید)	۳٫۵۴	۰٫۶۹
غشا دولایه ۵۰٪ اکسید شده PLPC (کربن شماره ۱۳ لینولئیک اسید)	۳٫۳۳	۰٫۷۱

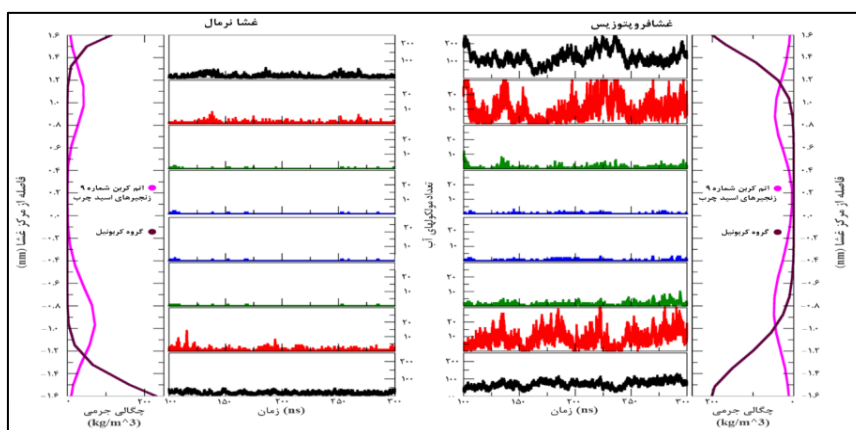
مقایسه با غشا نرمال به اندازه $0,06$ نانومتر مربع APL بزرگتری دارند. افزایش APL لیپیدها در غشا ناشی از برهمکنش گروه‌های OOH با سطح قطبی غشا و خمش زنجیره‌های لیپیدی به سمت آن است [۶۰].

همچنین، دیده می‌شود که مقدار APL در دومین‌های نامنظم گلوبول قرمز به اندازه $0,12$ نانومتر مربع بیشتر از دومین‌های منظم گزارش شده است. همچنین، با توجه به جدول ۴ دیده می‌شود که مقادیر APL در لایه داخلی و خارجی غشا نرمال و فروپتوزیس نزدیک به نتایج مطالعات تجربی است و اختلاف موجود نیز به دلیل وجود پیتیدها در دومین‌ها است. همچنین، مطالعات شبیه‌سازی نشان داده‌اند که مقدار APL غشاهای دولایه POPC (15 درصد هیدروپراکسید شده)، PLPC-9-oxi (25 درصد هیدروپراکسید شده)، PLPC-9-oxi (50 درصد هیدروپراکسید شده)، PLPC-13-oxi (25 درصد هیدروپراکسید شده)، PLPC-13-oxi (50 درصد هیدروپراکسید شده)، به ترتیب برابر $0,05$ ؛ $0,03$ ؛ $0,04$ ؛ $0,06$ و $0,04$ نانومتر مربع افزایش یافته است [۶۴ و ۶۷].

همچنین، مطالعات شبیه‌سازی نشان داده‌اند که ضخامت غشاهای دولایه POPC (15 درصد هیدروپراکسید شده)، PLPC-9-oxi (25 درصد هیدروپراکسید شده)، PLPC-13-oxi (50 درصد هیدروپراکسید شده)، به ترتیب برابر $0,15$ ؛ $0,02$ ؛ $0,03$ ؛ $0,08$ و $0,29$ نانومتر کاهش یافته است [۶۳ و ۶۴]. همچنین، جدول ۴ نشان می‌دهد که ضخامت لایه‌های داخلی/خارجی غشا نرمال و فروپتوزیس به ترتیب برابر $2,2 / 2,4$ نانومتر و $2,0 / 2,2$ نانومتر می‌باشد. لایه بیرونی در هر دو غشا نازکتر از لایه داخلی بوده و ضخامت هر کدام از لایه‌ها در غشا فروپتوزیس به مقدار $0,2$ نانومتر کاهش یافته است.

۳-۴ سطح اشغال شده توسط لیپیدها

برای محاسبه میزان سطح اشغال شده توسط لیپیدها (APL)، میانگین مساحت سطح غشا طی 200 نانوثانیه پایانی بر تعداد کل لیپیدها و کلسترول در هر لایه تقسیم شد (جدول ۴). همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود لیپیدها در هر کدام از لایه‌های داخلی و خارجی غشا فروپتوزیس در



شکل ۵ در این شکل هر یک از لایه داخلی و خارجی غشا نرمال و فروپتوزیس به چهار ناحیه به طول یکسان ($0,4$ نانومتر) تقسیم شده و تعداد مولکول‌های آب که به آنها نفوذ کرده برحسب تابعی از زمان نشان داده شده است. فاصله از مرکز برای لایه داخلی غشا با اعداد منفی و برای لایه خارجی با اعداد مثبت نشان داده شده است (داده‌ها از 200 نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی استخراج شده‌اند).

مطالعات آتی می‌تواند بر اساس این اکتشافات برای کشف اهداف درمانی بالقوه برای القا فروپتوزیس در سرطان و مهار فروپتوزیس در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی باشد.

تقدیر و تشکر

این اثر تحت حمایت مادی بنیاد ملی علم ایران (INSF) برگرفته شده از طرح شماره "۴۰۳۱۲۲۷" انجام شده است.

۵-منابع

- [1] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *cell*. 2012;149(5):1060-72.
- [2] Kuang F, Liu J, Tang D, Kang R. Oxidative damage and antioxidant defense in ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:586578.
- [3] Do Q, Zhang R, Hooper G, Xu L. Differential contributions of distinct free radical peroxidation mechanisms to the induction of ferroptosis. *JACS Au*. 2023;3(4):1100-17.
- [4] Chen X, Kang R, Tang D. Ferroptosis by lipid peroxidation: the tip of the iceberg? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:646890.
- [5] Barayeu U, Schilling D, Eid M, Xavier da Silva TN, Schlicker L, Mitreska N, et al. Hydropersulfides inhibit lipid peroxidation and ferroptosis by scavenging radicals. *Nature chemical biology*. 2023;19(1):28-37.
- [6] Neto AJ, Cordeiro RM. Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2016;1858(9):2191-8.
- [7] Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang I-M, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophysical journal*. 2007; 93(12):4225-36.
- [8] Panasenko OM, Evgina SA, Driomina ES, Sharov VS, Sergienko VI, Vladimirov YA. Hypochlorite induces lipid peroxidation in blood lipoproteins and phospholipid liposomes. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;19(2):133-40.

هم‌خوانی نتایج ما با مطالعات تجربی و شبیه‌سازی نشان می‌دهد که پارامترهای محاسباتی گروه‌های هیدروپراکسید که به فورس فیلد CHARMM36 اضافه کردیم صحیح و قابل اطمینان بوده‌اند.

۳-۵ نفوذپذیری به مولکول‌های آب

شکل ۴-a نشان می‌دهد که فاز آب به مرکز غشا فروپتوزیس نزدیکتر شده، اما چگالی آن در مرکز نزدیک به صفر می‌باشد که نشان می‌دهد یکپارچگی غشا در شرایط فروپتوزیس حفظ می‌شود. همچنین، مطالعات دیگر تشکیل منافذ در غشا دولایه ساده هیدروپراکسید شده را مشاهده نکردند [۶۵ و ۶۶]. علاوه بر این، شکل ۵ نشان می‌دهد که تعداد مولکول‌های آب بیشتری در نواحی اطراف مرکز غشا فروپتوزیس نسبت به غشا نرمال نفوذ کرده‌اند. این افزایش نفوذپذیری قابل تعمیم به مولکول‌های قطبی کوچک دیگر نیز می‌باشد که نشان دهنده اختلال در عملکرد غشا فروپتوزیس می‌باشد.

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه از شبیه‌سازی‌هایی با طول ۳۰۰ نانوثانیه برای بررسی پیامدهای مولکولی هیدروپراکسیداسیون لیپیدها بر روی خواص غشا پلاسمایی نرمال و فروپتوزیس انسان استفاده شد. یافته‌های کلیدی این مطالعه نشان می‌دهد که فروپتوزیس طی هیدروپراکسیداسیون لیپیدها باعث باریکتر شدن غشا پلاسمایی شده و سطح آن را افزایش می‌دهد. همچنین، با افزایش نفوذپذیری آب منجر به اختلال در عملکرد غشا می‌شود. این بینش‌های مولکولی درک ما از اینکه چگونه تغییرات ساختاری مرتبط به فروپتوزیس می‌تواند عملکرد غشای پلاسمایی سلولی انسان را به خطر بیندازد و به‌طور بالقوه منجر به مرگ سلولی شود، بهبود می‌بخشد. اگر چه در انجام این مطالعه با محدودیت‌هایی مانند عدم دسترسی به سیستم‌های محاسباتی قدرتمند مواجه بودیم، اما پیشرفت قابل‌توجهی در دانش ما از مکانیسم‌های زیربنایی فروپتوزیس به‌دست آمده است.

- suppression reveals essential roles of Coenzyme Q and squalene. *Communications Biology*. 2023;6(1):1108.
- [19] Hu Q, Zhang Y, Lou H, Ou Z, Liu J, Duan W, et al. GPX4 and vitamin E cooperatively protect hematopoietic stem and progenitor cells from lipid peroxidation and ferroptosis. *Cell death & disease*. 2021;12(7):706.
- [20] Chen X, Li J, Kang R, Klionsky DJ, Tang D. Ferroptosis: machinery and regulation. *Autophagy*. 2021;17(9):2054-81.
- [21] Doll S, Freitas FP, Shah R, Aldrovandi M, da Silva MC, Ingold I, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*. 2019;575(7784):693-8.
- [22] Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1982;710(2):197-211.
- [23] Liu H, Schreiber SL, Stockwell BR. Targeting dependency on the GPX4 lipid peroxide repair pathway for cancer therapy. *Biochemistry*. 2018;57(14):2059-60.
- [24] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014;156(1):317-31.
- [25] Moon S-H, Huang C-H, Houlihan SL, Regunath K, Freed-Pastor WA, Morris JP, et al. p53 represses the mevalonate pathway to mediate tumor suppression. *Cell*. 2019;176(3):564-80. e19.
- [26] Porter NA. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Accounts of Chemical Research*. 1986;19(9):262-8.
- [27] Marnett LJ. Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis*. 1987;8(10):1365-73.
- [28] Schneider C. An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(3):315-21.
- [29] Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JPF, Doll S, Croix CS, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nature chemical biology*. 2017;13(1):81-90.
- [9] Weidinger A, Kozlov AV. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*. 2015;5(2):472-84.
- [10] Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019.
- [11] Fenton HJH. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1894;65:899-910.
- [12] Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences*. 1934;147(861):332-51.
- [13] Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent-and AIF-mediated cell death. *Cell metabolism*. 2008;8(3):237-48.
- [14] Ding X-Z, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Molecular cancer*. 2003;2(1):1-12.
- [15] Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(34):E4966-E75.
- [16] Kagan VE, Tyurina YY, Vlasova II, Kapralov AA, Amoscato AA, Anthonymuthu TS, et al. Redox epiphospholipidome in programmed cell death signaling: catalytic mechanisms and regulation. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;11:628079.
- [17] Samovich SN, Mikulska-Ruminska K, Dar HH, Tyurina YY, Tyurin VA, Souryavong AB, et al. Strikingly High Activity of 15-Lipoxygenase Towards DiPolyunsaturated Arachidonoyl /Adrenoyl Phosphatidylethanolamines Generates Peroxidation Signals of Ferroptotic Cell Death. *Angewandte Chemie International Edition*. 2024;63(9):e202314710.
- [18] Sun Q, Liu D, Cui W, Cheng H, Huang L, Zhang R, et al. Cholesterol mediated ferroptosis

- (7-8):1591-600.
- [43] Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1999; 1439 (3) : 317-30.
- [44] Verkleij A, Zwaal R, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, Van Deenen L. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1973; 323 (2) :178-93.
- [45] Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;112(10):3939-48.
- [46] Marquardt D, Kučerka N, Wassall SR, Harroun TA, Katsaras J. Cholesterol's location in lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2016;199:17-25.
- [47] Choubey A, Kalia RK, Malmstadt N, Nakano A, Vashishta P. Cholesterol translocation in a phospholipid membrane. *Biophysical journal*. 2013;104(11):2429-36.
- [48] Wu EL, Cheng X, Jo S, Rui H, Song KC, Dávila-Contreras EM, et al. CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations. *Wiley Online Library*; 2014.
- [49] Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of computational chemistry*. 2008;29(11):1859-65.
- [50] Jo S, Lim JB, Klauda JB, Im W. CHARMM-GUI Membrane Builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophysical journal*. 2009;97(1):50-8.
- [51] Martínez L, Andrade R, Birgin EG, Martínez JM. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of computational chemistry*. 2009; 30(13) :2157-64.
- [52] Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*. 2007;126.(¹)
- [53] Alipour M, Hajipour-Verdom B, Abdolmaleki P, Javan M. Molecular properties of Ca²⁺ transport through TRPV2 channel: a molecular dynamics simulations study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. [30] Li Z, Chen L, Chen C, Zhou Y, Hu D, Yang J, et al. Targeting ferroptosis in breast cancer. *Biomarker research*. 2020;8:1-27.
- [31] Yuan H, Li X, Zhang X, Kang R, Tang D. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;478(3):1338-43.
- [32] Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature chemical biology*. 2017;13(1):91-8.
- [33] Wang B, Tontonoz P. Phospholipid remodeling in physiology and disease. *Annual review of physiology*. 2019;81:165-88.
- [34] Küch E-M, Vellaramkalayil R, Zhang I, Lehnen D, Brügger B, Stremmel W, et al. Differentially localized acyl-CoA synthetase 4 isoenzymes mediate the metabolic channeling of fatty acids towards phosphatidylinositol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014;1841(2):227-39.
- [35] Vickers NJ. Animal communication: when i'm calling you, will you answer too? *Current biology*. 2017;27(14):R713-R5.
- [36] Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*. 2019;8(3):72.
- [37] Shah R, Shchepinov MS, Pratt DA. Resolving the role of lipoxygenases in the initiation and execution of ferroptosis. *ACS central science*. 2018;4(3):387-96.
- [38] Trostchansky A, Rubbo H. *Bioactive Lipids in Health and Disease*: Springer; 2019.
- [39] Yawata Y. *Cell membrane: the red blood cell as a model*: John Wiley & Sons; 2006.
- [40] van Meer G. Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(5):a004671.
- [41] Marquardt D, Geier B, Pabst G. Asymmetric lipid membranes: towards more realistic model systems. *Membranes*. 2015;5(2):180-96.
- [42] Devaux PF, Herrmann A, Ohlwein N, Kozlov MM. How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008;1778

- [60] Garrec J, Monari A, Assfeld X, Mir LM, Tarek M. Lipid peroxidation in membranes: the peroxy radical does not “float”. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2014;5(10):1653-8.
- [61] Kumar S, Yadav DK, Choi E-H, Kim M-H. Insight from Molecular dynamic simulation of reactive oxygen species in oxidized skin membrane. *Scientific reports*. 2018;8(1):13271.
- [62] Mason RP, Walter MF, Mason PE. Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;23(3):419-25.
- [63] Himbert S, Alsop RJ, Rose M, Hertz L, Dhaliwal A, Moran-Mirabal JM, et al. The molecular structure of human red blood cell membranes from highly oriented, solid supported multi-lamellar membranes. *Scientific reports*. 2017;7(1):39661.
- [64] Yang H, Zhou M, Li H, Wei T, Tang C, Zhou Y, et al. Effects of low-level lipid peroxidation on the permeability of nitroaromatic molecules across a membrane: a computational study. *ACS omega*. 2020;5(10):4798-806.
- [65] Jurkiewicz P, Olżyńska A, Cwiklik L, Conte E, Jungwirth P, Megli FM, et al. Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: insights from fluorescence and EPR experiments and from MD simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2012;1818(10):2388-402.
- [66] Weber G, Charitat T, Baptista MS, Uchoa AF, Pavani C, Junqueira HC, et al. Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes. *Soft matter*. 2014;10(24):4241-7.
- 2023;41(9):3892-9.
- [54] Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics*. 1981;52(12):7182-90.
- [55] Cheatham TI, Miller J, Fox T, Darden T, Kollman P. Molecular dynamics simulations on solvated biomolecular systems: the particle mesh Ewald method leads to stable trajectories of DNA, RNA, and proteins. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117(14):4193-4.
- [56] Klauda JB, Venable RM, Freites JA, O'Connor JW, Tobias DJ, Mondragon-Ramirez C, et al. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *The journal of physical chemistry B*. 2010;114(23):7830-43.
- [57] Bjelkmar P, Larsson P, Cuendet MA, Hess B, Lindahl E. Implementation of the CHARMM force field in GROMACS: analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models. *Journal of chemical theory and computation*. 2010;6(2):459-66.
- [58] Piggot TJ, Pineiro A, Khalid S. Molecular dynamics simulations of phosphatidylcholine membranes: a comparative force field study. *Journal of chemical theory and computation*. 2012;8(11):4593-609.
- [59] Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of computational chemistry*. 2010;31(4):671-90.

Structural changes and cell membrane permeability during ferroptosis: A molecular dynamics simulation study

Yaser shabanpour¹, Mozhghan Alipour², Behnam Hajipour-Verdom¹, Parviz Abidolmaleki^{1*}

1. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Functional Neurosurgery Research Center, Shohada Tajrish Comprehensive Neurosurgical Center of Excellence, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

parviz@modares.ac.ir

Receipt: 2024/09/21

Accepted: 2024/11/03

Abstract

Ferroptosis is a newly identified form of cell death associated with lipid peroxidation. This process is dependent on iron and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). Despite the importance of ferroptosis, the molecular details of this process, particularly its impact on cellular membrane properties, remain unknown. This study investigated structural and permeability changes in the plasma membrane resulting from lipid peroxidation during ferroptosis using molecular dynamics simulations. Initially, a human red blood cell membrane model was constructed based on experimental data. To simulate ferroptosis, the PUFA lipid chains in the red blood cell membrane were replaced with their hydroperoxide derivatives. All-Atom molecular dynamics simulations examined both systems (normal and ferroptotic membranes) for 300 nanoseconds (with three replicates). The results showed that in the ferroptotic membrane, the thickness decreased, and the surface area increased. Additionally, the hydroperoxide groups in the fatty acid chains moved toward the polar head groups of the phospholipids. Besides these structural changes, the function of the membrane, which typically acts as an impermeable barrier to polar molecules such as water, was disrupted due to lipid peroxidation, while the overall membrane integrity remained intact. In summary, lipid peroxidation in ferroptosis induces significant changes in membrane structure and function, which could be utilized in the development of new treatments for severe diseases such as cancer and neurodegenerative disorders.

Keywords: Ferroptosis; Plasma membrane; Lipid peroxidation; Membrane modeling; Molecular dynamics simulation.