

Московский Государственный Университет имени М. В. Ломоносова

Биологический факультет

Кафедра Биоинженерии

## ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Боздаганян Маринэ Евгеньевна

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФУЛЛЕРЕНА ( $C_{60}$ ) И ЕГО ПРОИЗВОДНОГО ТРИМАЛОНАТФУЛЛЕРЕНА ( $C_3$ ) С БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**

Научные руководители:

к. б. н. Соколова О.С.,

к. ф.-м. н. Шайтан А.К.

Москва – 2010

## **АННОТАЦИЯ**

Работа посвящена изучению и применению методов классического компьютерного моделирования для исследования взаимодействия фуллерена и трималонатфуллерена с биологическими мембранами про- и эукариот. Приводится обзор литературных данных по синтезу, физико-химическим свойствам и изучению биоактивностей фуллерена и его производных. Описываются теоретические основы компьютерного молекулярного моделирования в рамках классических силовых полей, способ расчета потенциала средней силы. Изучаются практические аспекты реализации компьютерного эксперимента стохастической динамики: равновесной и управляемой.

Практическая часть работы состоит из трех частей: изучение свойств фуллеренов, изучение свойств мембран, изучение взаимодействия фуллеренов с мембранами. Проводится исследование взаимодействия немодифицированных фуллеренов в вакууме, воде и толуоле: построены профили потенциала средней силы и по величине первого максимума предсказаны растворимости фуллеренов в различных средах. Для мембран изучены следующие параметры: плотности атомов, площади липидных головок и толщины бислоя. Для изучения взаимодействия фуллеренов с мембранами были проведены следующие численные эксперименты: равновесная динамика в течение 10 нс, управляемая динамика с приложением силы к центру массы фуллеренов и расчет потенциала средней силы. В результате выявлено, что фуллерен C<sub>60</sub> имеет большую склонность накапливаться в эукариотических мембранах, нежели в прокариотических, а амфифильная молекула трималонатфуллерена выталкивается из эукариотической мембранны.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |    |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....  | 5  |
| ВВЕДЕНИЕ .....   | 6  |
| ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....                                | 7  |
| 1.1. Углерод и его аллотропные формы .....                       | 7  |
| 1.1.1. Алмаз и графит .....                                      | 8  |
| 1.1.2. Фуллерены и нанотрубки.....                               | 8  |
| 1.2. История открытия.....                                       | 10 |
| 1.3. Синтез фуллеренов .....                                     | 12 |
| 1.4. Молекулярная динамика фуллеренов.....                       | 14 |
| 1.5. Моделирование фосфолипидной биомембраны.....                | 18 |
| 1.5.1. Виды биологических мембран, их состав .....               | 18 |
| 1.5.2. Физические свойства.....                                  | 20 |
| 1.5.3. Молекулярная динамика биомембран .....                    | 22 |
| 1.6. Наномедицина и нанотоксикология .....                       | 23 |
| 1.6.1. Цитопротективная и антиоксидантная активности.....        | 23 |
| 1.6.2. Окислительный стресс и фотодинамическая терапия .....     | 26 |
| 1.6.3. Взаимодействие с белками .....                            | 26 |
| 1.7.3. Антибактериальная активность .....                        | 27 |
| 1.7.4. Нанотоксикология .....                                    | 27 |
| ГЛАВА 2. МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ .....                       | 29 |
| 2.1 Физические основы .....                                      | 29 |
| 2.2 Силовые поля .....   | 30 |
| 2.3. Поддержание постоянной температуры. Термостатирование ..... | 34 |
| 2.4. Стохастическая динамика.....                                | 36 |

|  |    |
|--|----|
| 2.5. Поддержание постоянного давления.....                             | 36 |
| ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ФУЛЛЕРНОВ .....                              | 38 |
| 3.1. Постановка задачи.....  | 38 |
| 3.2. Сборка молекул .....  | 38 |
| 3.3. Молекулярная динамика фуллеренов .....                            | 39 |
| 3.4 Расчет потенциала средней силы .....                               | 40 |
| ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МЕМБРАН .....                                | 45 |
| 4.1. Постановка задачи.....  | 45 |
| 4.2. Эукариотическая мембрана .....                                    | 45 |
| 4.3. Прокариотическая мембрана .....                                   | 46 |
| ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФУЛЛЕРНОВ С МЕМБРАНАМИ.....           | 48 |
| 5.1. Постановка задачи.....  | 48 |
| 5.2. Гидратированная мембрана из 128 ДПФХ с фуллереном .....           | 48 |
| 5.3. Гидратированная мембрана из 128 ДПФХ с трималонатфуллереном ..... | 52 |
| 5.4. Гидратированная мембрана из 128 ПОПЭ/ПОПГ с фуллереном .....      | 56 |
| ВЫВОДЫ .....   | 59 |
| Приложение 1.....  | 60 |
| Приложение 2.....  | 61 |
| Приложение 3.....  | 63 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....                                  | 65 |

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| МД          | молекулярная динамика                 |
| УНТ         | углеродная нанотрубка                 |
| ЯМР         | ядерный магнитный резонанс            |
| ИК          | инфракрасная спектроскопия            |
| ДПФХ        | дипальмитоилфосфатидилхолин           |
| PMF,<br>ПСС | потенциал средней силы                |
| АФК         | активные формы кислорода              |
| ДПФХ        | дипальмитоилфосфатидилхолин           |
| ПОФЭ        | пальмитоилолеолилфосфатидилэтаноламин |
| ПОФГ        | пальмитоилолеолилфосфатидилглицерол   |

## **ВВЕДЕНИЕ**

Последние два десятилетия знаменуются бурным развитием нанотехнологий. Широкий интерес, проявляемый сейчас к новому направлению науки, вызван, по крайней мере, тремя причинами.

Во-первых, методы нанотехнологии позволяют получить принципиально новые устройства и материалы с характеристиками, значительно превосходящими их современный уровень. Во-вторых, нанотехнология оказалась весьма широким междисциплинарным направлением, объединяющим специалистов в области физики, химии, биологии, фундаментальной медицины, материаловедении и др. В-третьих, решение проблем нанотехнологии выявило много пробелов как в фундаментальных так и в технических знаниях, что сконцентрировало внимание научно-инженерного общества в этом направлении.

С развитием производства различных наноматериалов и наночастиц остро встал вопрос об их безопасности для живых организмов.

Анализ данных литературы показал, что наночастицы обладают более высокой токсичностью по сравнению с обычными микрочастицами, способны проникать в неизмененном виде через клеточные барьеры, а также через гематоэнцефалический барьер в центральную нервную систему, циркулировать и накапливаться в органах и тканях, вызывая более выраженные патоморфологические поражения внутренних органов, а также обладают длительным периодом полувыведения. Классические органы-мишени для наночастиц в зависимости от пути поступления - легкие, печень, почки, головной мозг, желудочно-кишечный тракт.

Нанобиобезопасность – новое направление в нанотехнологии. Изучение взаимодействия с организмами, выявление безопасных доз и предсказание свойств наночастиц входит в задачи нанобиобезопасности.

Фуллерены, активно использующиеся в настоящее время в продукции не только новых материалов, но и лекарств, обнаруживают сильный цитотоксический эффект. Однако механизмы, при помощи которых данные наночастицы проникают внутрь клетки до сих пор мало изучены.

Цель данной работы - изучить взаимодействие фуллерена  $C_{60}$  и его производного трималонатфуллерена  $C_3$  с биологическими мембранами, используя метод молекулярной динамики.

# ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1. Углерод и его аллотропные формы

Углерод является уникальным в своем роде элементом. В зависимости от типа, силы и количества связей он может образовывать множество соединений с различными физическими и химическими свойствами.

Химические свойства углерода определяются расположением электронов вокруг ядра атома, которое имеет 6 протонов и 6 нейтронов (12 нуклонов). В атоме углерода 6 электронов, находящихся на  $1s^2 2s^2 2p_x^1 2p_y^1 2p_z^0$ -орбиталах. Ковалентные связи образуются путем обобществления двух электронов — по одному от каждого атома за счет перемещения электронов с 2s-орбитали на одну или более 2p-орбиталь. В зависимости от того, сколько p-орбиталей задействовано, возможны три варианта гибридизации. В первом типе гибридизации ( $sp^1$ ) одна s- и одна p-орбиталь смешиваются, образуя две равноценные sp-орбитали, расположенные под углом  $180^\circ$ , т.е. на одной оси. Две оставшиеся негибридные p-орбитали располагаются во взаимно перпендикулярных

плоскостях и участвуют в образовании  $\sigma$ -связей, либо занимаются неподелёнными парами электронов. Во втором типе гибридизации ( $sp^2$ ) происходит смешивание одной s- и двух p-орбиталей, т.е. образуется три гибридные орбитали с осями, расположенные в одной плоскости и направленными к вершинам треугольника под углом  $120^\circ$ .

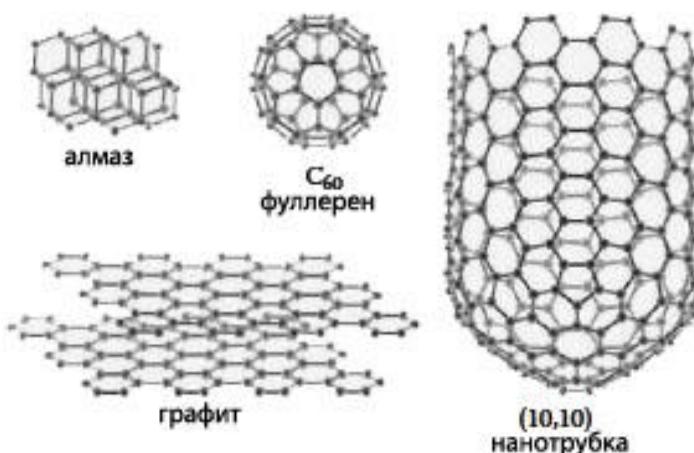


Рис. 1. Три аллотропные формы углерода

Негибридная p-атомная орбиталь перпендикулярна плоскости и, как правило, участвует в образовании  $\pi$ -связей. В третьем типе гибридизации ( $sp^3$ ) происходит смешивание одной s- и трех p-орбиталей, в результате возникают четыре одинаковые орбитали, расположенные относительно друг друга под тетраэдрическими углами  $109.5^\circ$ .

Таким образом, конечная молекулярная структура зависит от типа гибридизации углеродных орбиталей. В  $sp^1$ -гибридизации углерод может образовывать две  $\sigma$ -связи и две  $\pi$ -связи, в  $sp^2$ -гибридизации углерод образует три  $\sigma$ -связи и одну  $\pi$ -связь, в  $sp^3$ -гибридизации углерод образует четыре  $\sigma$ -связи. Количество и природа химических связей определяет геометрию и свойства различных аллотропных форм углерода.

Углерод может образовывать три аллотропных формы: графит, алмаз, фуллерен (Рис. 1).

### 1.1.1. Алмаз и графит

Алмаз имеет кристаллическую структуру, каждый атом находится в  $sp^3$ -гибридизации и соединен с тремя другими атомами углерода. Кристаллическая решетка алмаза определяет его физические свойства: высочайшая среди минералов твёрдость, наиболее высокая теплопроводность среди всех твердых тел, большие показатель преломления и дисперсия. Длина связи в кристаллической решетке алмаза 0,154 нм, валентный угол 109,5°.

Структура графита представляет собой непрерывный ряд слоев, параллельных основной плоскости и состоящих из гексагонально связанных друг с другом атомов углерода ( $sp^2$ -гибридизация). Расстояние между слоями 0,335 нм, длина связи 0,142 нм, валентный угол 120°.

### 1.1.2. Фуллерены и нанотрубки

У фуллерена  $C_{60}$  каждый атом в молекуле также находится в состоянии  $sp^2$ -гибридизации. Поскольку наиболее эффективные способы получения фуллеренов основаны на термическом разрушении графита, то, казалось бы, длины связей у фуллерена должны быть такие же как и у графита. Однако в действительности в структуре  $C_{60}$  имеется два типа связей, одна из которых – двойная – общая сторона двух шестиугольников, а другая – одинарная – общая сторона пятиугольника и шестиугольника. Результаты экспериментов [1, 2] показывают, что длины связей составляют  $0,139 \pm 0,001 \text{ \AA}$  и  $0,144 \pm 0,001 \text{ \AA}$ . Диаметр молекулы согласно исследованиям составляет  $7.113(10) \text{ \AA}$ . Валентные углы 120° и 108°.

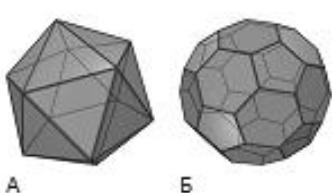


Рис. 2. Икосаэдр (А) и усеченный икосаэдр (Б)

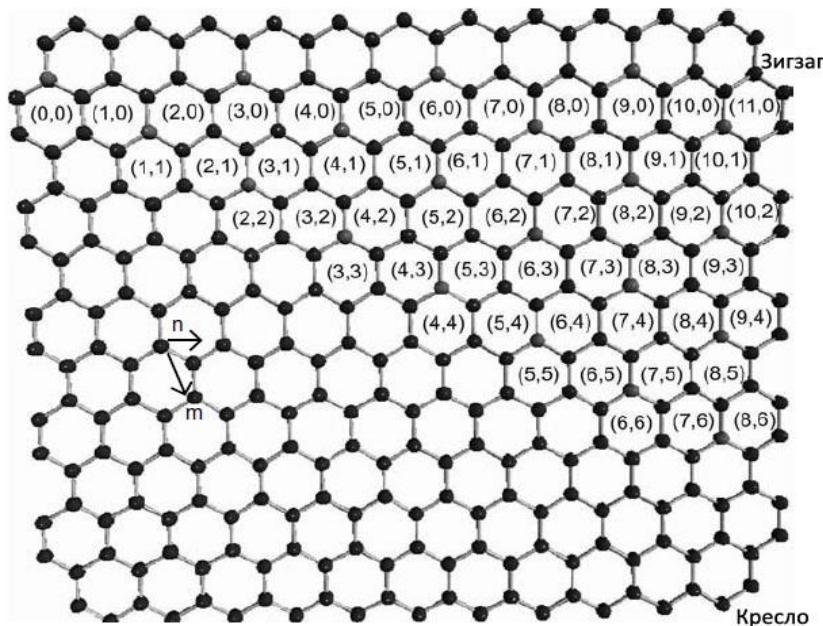
Для существования замкнутого многогранника, построенного из  $n$  вершин, образующих только пяти- и шестиугольные грани, согласно теореме Эйлера для многогранников, необходимым условием является наличие ровно 12 пятиугольных граней и  $n/2 - 10$  шестиугольных граней. В молекуле  $C_{60}$  32 грани: 12 пятигранныков и 20 шестигранников.

Молекула фуллерена  $C_{60}$  имеет структуру усеченного икосаэдра (Рис. 2). Как икосаэдр, так и усеченный икосаэдр, моделирующий молекулу фуллерена  $C_{60}$ , характеризуются десятью осями симметрии третьего порядка. Это означает, что поворот вокруг указанных осей на угол  $2\pi/3$  сохраняет эти фигуры. Оси третьего порядка проходят

через центр фигуры и центры поверхностных треугольников в случае икосаэдра или же через центр фигуры и центры поверхностных шестиугольников в случае усеченного икосаэдра. Кроме того, каждая из рассматриваемых структур характеризуется шестью осями симметрии пятого порядка. В случае икосаэдра эти оси проходят через центр фигуры и его вершины, а в случае усеченного икосаэдра они соединяют центр фигуры и центры поверхностных пятиугольников. В силу высокой симметрии молекулы фуллерена, заряд на каждом атоме углерода равен 0.

Однослойная нанотрубка представляет собой свернутый в цилиндр лист графита. Свойства УНТ зависят от параметров сворачивания графита. Для того чтобы охарактеризовать различные типы нанотрубок используют вектор  $\mathbf{C}_h$  (Рис. 3). Вектор  $\mathbf{C}_h$  определяет направления сворачивания:  $\mathbf{C}_h = n\mathbf{a}_1 + m\mathbf{a}_2$ , где  $\mathbf{a}_1$  и  $\mathbf{a}_2$  - базисные векторы графита,  $m$  и  $n$  – индексы, которые определяют хиральный угол

$$\theta = \tan^{-1} \left[ \sqrt{3} \frac{n}{2m+n} \right].$$



**Рис. 3. Графитовый слой с отмеченными индексами ( $n$ ,  $m$ ). Диаметр, хиральный угол и тип нанотрубки определяется соотношением ( $n$ ,  $m$ ).**

По значению хирального угла все нанотрубки можно разделить на три класса, различающиеся по своим электронным свойствам: «кресло» ( $n=m$ ,  $\theta=30^\circ$ ), «зигзаг» ( $m=0$ ,  $n>0$ ,  $\theta=0$ ) и хиральные или спиральные ( $0<|m|<n$ ,  $0<\theta<30^\circ$ ) (Рис. 4). Кресловидные нанотрубки обладают металлическими свойствами (выродившиеся полуметаллы с нулевой шириной запрещенной зоны). Хиральные и зигзагообразные нанотрубки могут быть полуметаллами с конечной шириной запрещенной зоны, если  $n-m/3=i$  ( $i$  – целое

число и  $m \neq n$ ) или полупроводниками во всех остальных случаях. Ширина запрещенной зоны [3] для полуметаллических и полупроводниковых нанотрубок обратно пропорциональна диаметру нанотрубки [4], поэтому каждая нанотрубка обладает уникальными электронными свойствами. Диаметр нанотрубки может быть выражен следующим образом:

$$d_t = \sqrt{3} \left[ a_{c-c} \sqrt{(m^2 + mn + n^2)} \right] / \pi = C_h / \pi$$

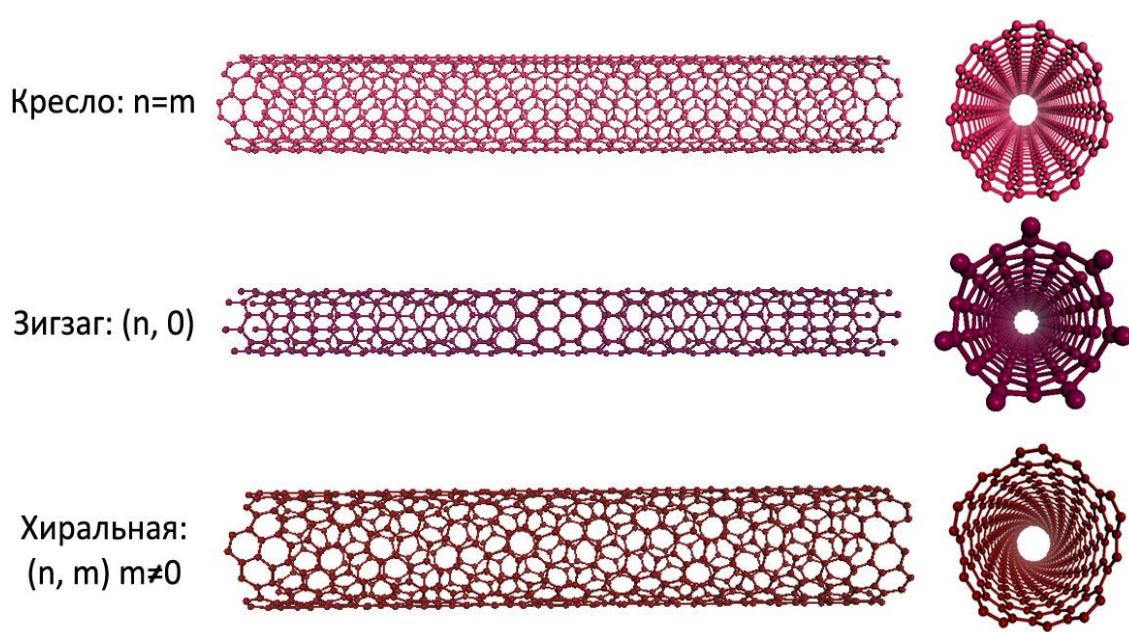


Рис. 4. Различные виды нанотрубок.

где  $C_h$  – это длина вектора  $\mathbf{C}_h$ ,  $a_{c-c}$  – длина связи С-С (1,42 Å)

## 1.2. История открытия

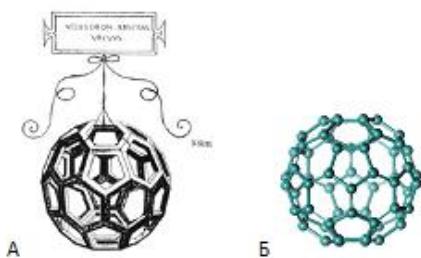


Рис. 5. А. Усеченный икосаэдр из книги "De Divina Proportionе" (1509 г., автор – математик Luca Pacioli), позаимствованный из чертежей Леонардо да Винчи Б. Структура фуллерена

Открытие и изучение молекулы  $C_{60}$  имеет долгую и интересную историю. Структура усеченного икосаэдра была известна еще Леонардо да Винчи, жившему в XVI веке (Рис. 5). В двадцатом веке задолго до открытия фуллерена была предсказана высокая устойчивость икосаэдральной молекулы, обладающей максимально возможной высокой степенью симметрии [5]. В 1933 году Tisza рассчитал точечные группы симметрии для

икосаэдральных молекул [6], а в 1970 году Osawa предположил, что молекула C<sub>60</sub> химически стабильна.

Открытие молекулы фуллерена было случайностью. Harold Kroto, астрофизик по специальности, изучал межзвездную пыль, представляющую собой длинноцепочечные молекулы полиенов, формирующиеся из красных гигантских звезд. Richard Smalley и Robert Curl примерно в это же время разработали метод анализа атомных кластеров, образующихся при облучении лазером, с использованием масс-спектрометрии [7]. Именно это и требовалось Kroto для исследования образования цепочек полиенов. В сентябре 1985 года Harold Kroto, Robert Curl и Richard Smalley при изучении масс-спектров паров графита наблюдали пики, соответствующие массам 720 и 840 а.е. [8] (Рис. 6). Они предположили, что данные пики отвечают молекулам C<sub>60</sub> и C<sub>70</sub> и выдвинули гипотезу, что молекула C<sub>60</sub> имеет форму усечённого икосаэдра симметрии I<sub>h</sub>. Для молекулы C<sub>70</sub> была предложена структура с более вытянутой эллипсоидальной формой симметрии D<sub>5h</sub>. Исследователи назвали данные молекулы, представляющие собой новую форму углерода, фуллеренами — по имени американского архитектора Бакминстера Фуллера, использующего своеобразную структуру, напоминающую футбольный мяч, в своих строительных композициях. Вот почему в зарубежных научных публикациях часто используется термин “buckminsterfullerene”. В 1996г. первооткрывателям фуллеренов была присуждена Нобелевская премия по химии.

В настоящее время понятие “фуллерены” применяется к широкому классу многоатомных молекул углерода C<sub>n</sub>, где n≥24, представляющих собой выпуклые замкнутые многогранники, составленные из чётного числа атомов углерода.

В 1990 году Richard Smalley высказал гипотезу о возможном существовании «трубчатого» фуллерена [9]. Структура такой трубки представлялась ему как сильно вытянутый

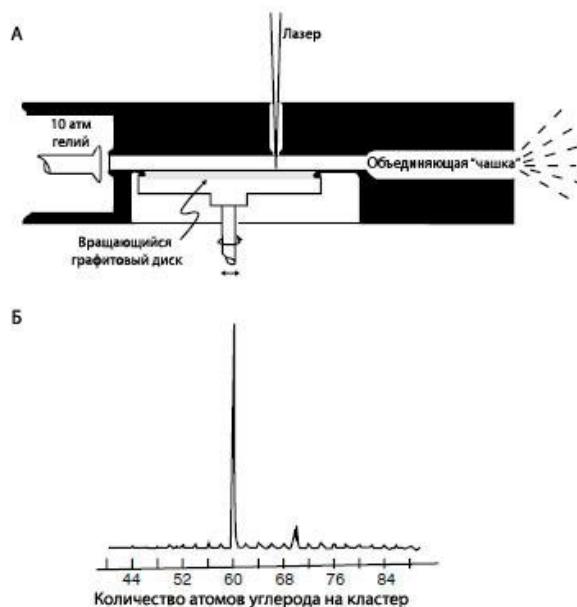
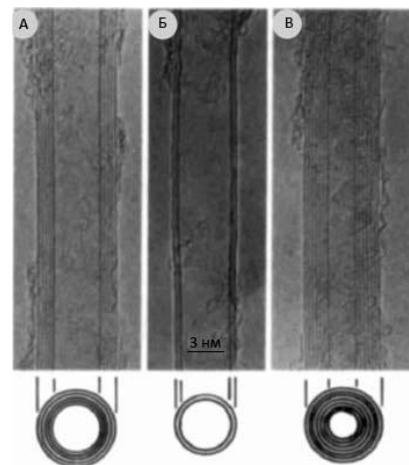


Рис. 6. А. Схематическое изображение установки для синтеза углеродных кластеров Б. Масс-спектры кластеров углерода, полученных при облучении графита лазером и охлажденных в сверхзвуковом пучке. (Из [1])

фуллерен. В августе 1991 года Dresselhaus выступил на конференции с предположением о том, что углеродная нанотрубка (УНТ) может быть кэпирована с двух сторон полусферами, состоящими из остатков фуллерена [10]. Экспериментальное доказательство существования нанотрубок было представлено в 1991 году, когда японский ученый Iijima опубликовал в журнале Nature фотографии многослойных углеродных нанотрубок, полученных при помощи трансмиссионного электронного микроскопа [11] (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Два года спустя одновременно были открыты однослойные углеродные нанотрубки Iijima с сотрудниками [12] и Bethune с сотрудниками [13] независимо друг от друга.

Несмотря на то, что Iijima является «официальным» первооткрывателем, УНТ были зарегистрированы на 30 лет раньше. В 1956 году Bacon занялся исследованием свойств углеродных фибрилл. Он изучал испарение графита при высоких температурах и давлениях, и возможно, наблюдал именно нанотрубки в своих образцах. В статье, опубликованной в 1960 году, Bacon описал «наноусы» [14] и предположил, что они могли быть образованы путем скручивания. В 1970 году Endo получил нанотрубки пиролизом бензола и ферроцена при 1000 °C [15]. При этом наблюдались трубы с полой сердцевиной и каталитические частицы в конце синтеза. Позже Endo выяснил, что каталитической частицей являлся оксид железа из наждачной бумаги. Сейчас оксид железа активно используется как катализатор в производстве УНТ.

Исследование УНТ стало одним из лидирующих направлений в нанотехнологии. Если в 1992 году было выпущено 900 статей с ключевыми словами «углеродная нанотрубка», то 2004 - более 5000. Интерес к этой теме вызван новыми уникальными свойствами нанотрубок, которые в будущем могут найти широкое применение в самых различных областях человеческой деятельности.



**Рис. 7. Фотография нанотрубок, полученная при помощи трансмиссионного электронного микроскопа (Из [12]).**

### 1.3. Синтез фуллеренов

Первоначально предполагалось, что  $C_{60}$  собирается из оторвавшихся от слоя графита частей при абляции плоских листков с шестиугольной структурой, сворачивающихся в чашечки – половинки фуллерена  $C_{60}$ , которые соединяются с

меньшими фрагментами графита в целый фуллерен. Эксперименты по получению  $C_{60}$  при совершенно различных условиях (сгорание бензола, аблация полимеров, высших оксидов углерода и  $C_2H_2$ ) показывают на наличие других путей синтеза  $C_{60}$ . Решающий эксперимент [16] с локальным внедрением аморфного изотопа  $^{13}C$  в графитовые электроды, показал на однородное смешивание изотопов углерода в образовавшихся фуллеренах. Это указывает на образование фуллеренов из атомов и ионов, хорошо перемешанных в канале дуги или в капельной фазе. Большинство авторов считают, что на начальном этапе из атомов (ионов) образуются линейные цепочки и кольца. На следующем этапе число возможных вариантов синтеза фуллеренов быстро возрастает.

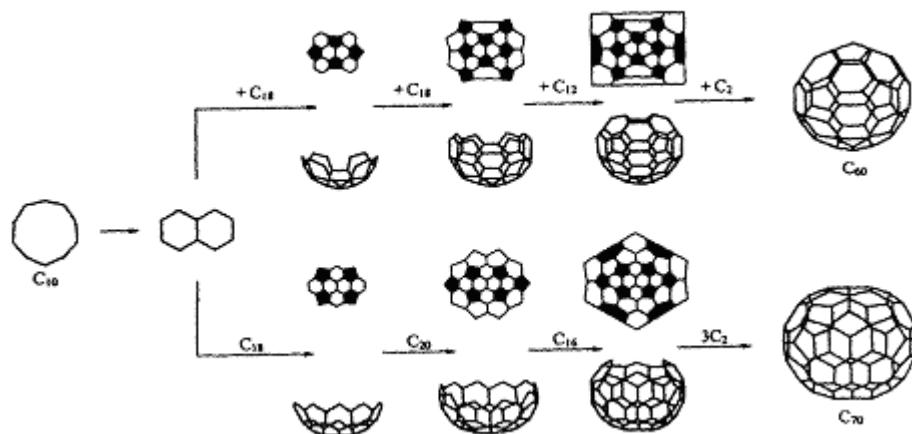


Рис. 8. Схема образования фуллерена  $C_{60}$  согласно модели “сборки из колец” из [16].

Одна из моделей предлагает последовательное присоединение к кольцу  $C_{10}$  устойчивых объединений  $C_2$ , что косвенно подтверждается чёткостью номеров образовавшихся устойчивых фуллеренов. На Рис. 8 представлена модель образования  $C_{60}$  и  $C_{70}$  из колец. Три других варианта синтеза фуллеренов показаны на Рис. 9.

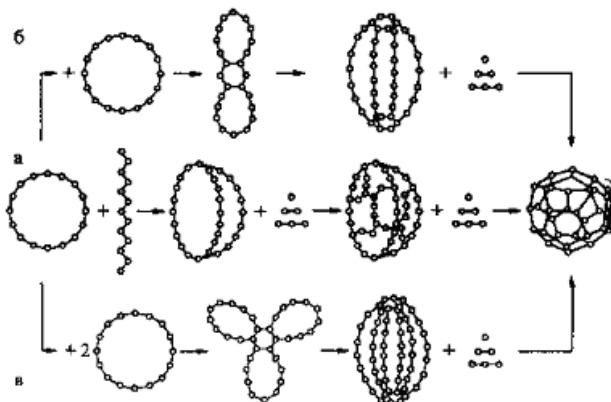


Рис. 9. Схема роста углеродного кластера, учитывающая следующие этапы: цепочка-кольцо-трёхмерный полициклический кластер-трансформация в фуллерен. Показаны различные возможности образования трёхмерного полициклического кластера: (а) цепочка+кольцо – трёхмерный трёхциклический кластер-

**трёхмерный полициклический кластер; (б) два кольца-плоский бициклический кластер-трёхмерный полициклический кластер; (в) три кольца – плоский трёхциклический кластер-трёхмерный полициклический кластер [16].**

Авторы обзора [16] наиболее вероятным и распространённым способом образования фуллеренов считают предварительное образование больших жидких капельных углеродных кластеров (за счёт слипания меньших кластеров). Затем эти кластеры кристаллизуются в фуллерены с испусканием атомов и микрокластеров. Образованием жидкой фазы авторы объясняют и смешивание  $C_{12}$  и  $C_{13}$  перед последующей кристаллизацией в фуллерены, и образование металлофуллеренов, и более позднее образование фуллеренов с  $n=30-40$  (мёртвая область) так как кластеры с  $n=30-40$ , имеющую меньшую энергию связи, приходящую на один атом, а следовательно, и меньшую температуру кристаллизации, позднее кристаллизуются в фуллерены при остывании плазмы, и у них больше времени для слияния в кластеры. В качестве зародышей кристаллизации предполагаются незамкнутые кластеры  $C_{20}$  (пятиугольник, окружённый шестиугольниками в виде загнутого листа). Лишние атомы (при нечётном их общем числе) или микрокластеры испускаются при кристаллизации. При кристаллизации могут образовываться фуллерены с дефектами, которые впоследствии устраняются в результате поглощения и испускания микрокластеров и переходов фуллеренов друг в друга с испусканием и поглощением вставок  $C_2$  и простого распада на два фуллерена.

В настоящее время существует несколько экспериментальных способов получения фуллеренов [17, 18]:

- 1) Лазерные испарения графита
- 2) Термическое испарение графита
- 3) Дуговой контактный разряд
- 4) Сжигание и пиролиз углеродосодержащих соединений

#### **1.4. Молекулярная динамика фуллеренов**

Метод молекулярной динамики может быть применен для детального изучения взаимодействия фуллеренов с биообъектами на атомарном уровне. Как отмечалось ранее, молекула фуллерена является гидрофобной, и это в целом определяет ее поведение в воде и вблизи биомембранны.

Множество статей посвящено проблеме взаимодействия и агрегация фуллеренов в различных растворителях. Растворимость фуллерена в некоторых растворителях не монотонна и зависит от температуры системы [19]. В полярных растворителях фуллерены

агрегируют в кластеры размером до нескольких десятков нанометров. Молекулы воды образуют организованную структуру вокруг фуллеренов с толщиной слоя примерно в 6,2 Å независимо от размера фуллерена. Коэффициент диффузии молекул воды монотонно убывает с повышением концентрации фракции фуллеренов также независимо от размера фуллеренов [20].

Для изучения поведения молекул в растворителях рассчитывают потенциал средней силы (Potential of Mean Force, PMF) - суммарный результат взаимодействия большого числа молекул. В отличие от потенциала взаимодействия молекул в отсутствие среды, потенциал средней силы имеет осциллирующий характер (наблюдается чередование минимумов и максимумов с периодом порядка диаметра молекул среды). В работе Vanin с соавторами [21] исследовалось влияние растворителей (воды и дисульфида углерода) на взаимодействия двух фуллеренов между собой. Для этого строились профили потенциала средней силы в двух растворителях и вакууме. Было показано, что присутствие молекул растворителя ослабляет взаимодействие между двумя фуллеренами. Значение минимума PMF коррелирует с растворимостью фуллеренов. В дисульфиде углерода растворимость составляет 5,2-11,8 мг/мл, а минимум PMF -6,2 кДж/моль, в воде растворимость  $10^{-15}$  мг/мл и минимум -10,6 кДж/моль. Таким образом, делают заключение авторы, рассчитав профиль средней силы, можно предсказать поведение молекул фуллерена в различных средах.

Взаимодействие фуллерена с мембраной исследовалось в статье Qiao с соавторами [22]. В работе использовалась тяжелоатомная модель гидратированной дипальмитоилфосфатидилхолиновой мембранны (128 липидов) для исследования проникновения  $C_{60}$  и  $C_{60}(OH)_{20}$ . Согласно проведенным экспериментам, было обнаружено, что фуллерен «прыгает» самопроизвольно в мембрану спустя 4 нс со скоростью 10 м/с и остается на расстоянии около 1 нм от центра массы мембранны в течение следующих 46 нс. Для фуллерена в мембране был рассчитан потенциал средней силы. Судя по графику,  $C_{60}$  находится в потенциальной яме величиной 8  $k_B T$  на расстоянии 1 нм от центра мембранны (Рис. 10, Рис. 11). Кроме того, были проведены расчет системы, когда фуллерен находился в центре мембранны, и за время 500 пс  $C_{60}$  оказывался на расстоянии 1 нм от центра бислоя.

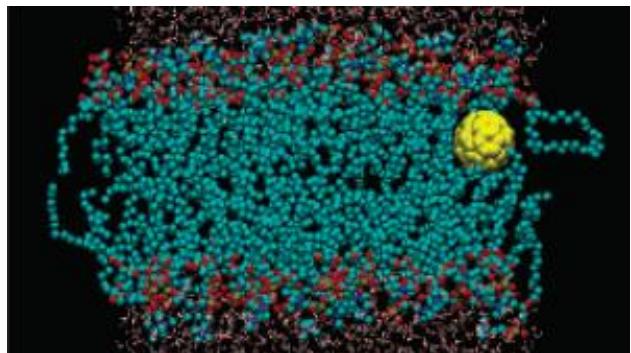


Рис. 10. Вид системы фуллерен-мембрана спустя 34,5 нс [22].

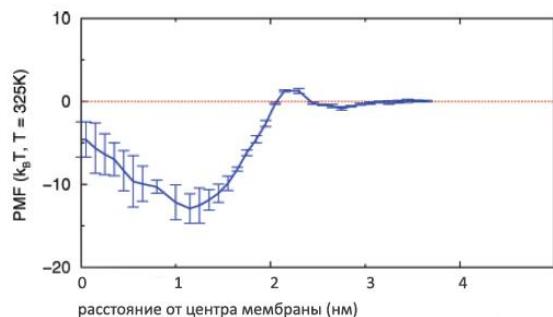


Рис. 11. Потенциал средней силы  $C_{60}$  как функция расстояния от центра мембранны [22].

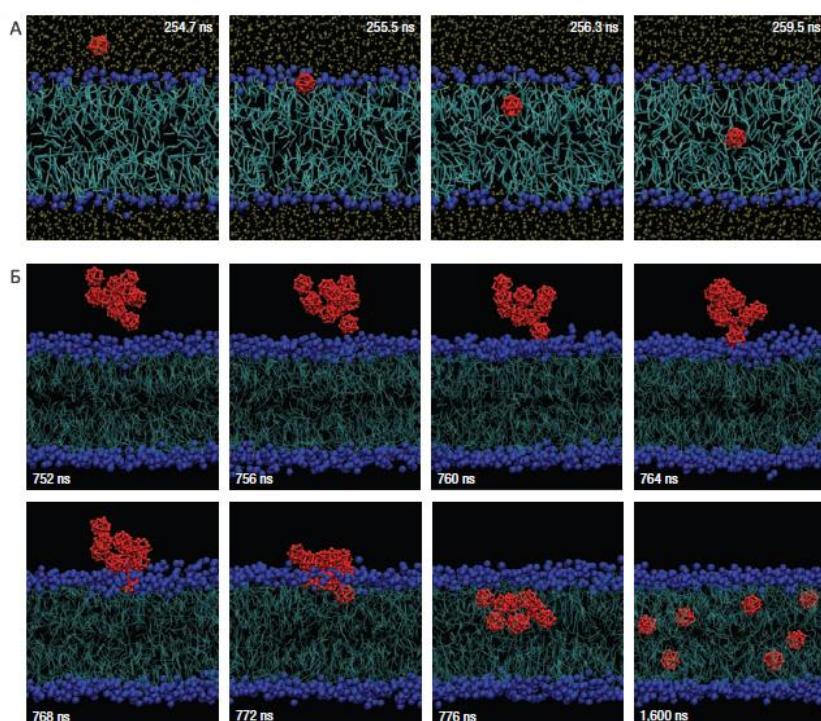
Авторами также была исследована структура мембраны во время проникновения фуллерена, и построена 2d карта с распределением площадей липидных головок. Было показано, что в месте проникновения фуллерена площадь головки увеличивалась на 25% ( $0,80 \text{ нм}^2$ ), т.е. фуллерен вызывает конформационные перестройки в мембране. В результате в образовавшуюся микропору могут проникнуть и другие молекулы, что вызовет нарушение мембраны – таким образом авторы объясняют цитотоксический эффект фуллеренов.

В работах [23, 24] Bedrov и Li с соавторами исследовали поведение фуллерена вблизи и внутри димиристоилфосфатидилхолиновой мембраны. Их исследования показали, что свободная энергия фуллерена уменьшается при переходе из воды в головки липидов, а затем в область гидрофобных хвостов. Согласно проведенным расчетам понижение энергии происходит не за счет гидрофобных взаимодействий, а благодаря более сильным Ван-дер-Ваальсовым взаимодействиям между фуллереном и мембраной, чем между фуллереном и водой. Также было показано, что никакого энергетического барьера для транспорта фуллерена из воды в мембрану нет. Изучение поведения молекулы в области гидрофобных хвостов показало, что наиболее вероятная позиция фуллерена – 6–7 Å от центра мембранны в сравнительно плотном окружении липидных хвостов. Тенденция фуллеренов избегать центра мембранны связана, скорее всего, с теми структурными нарушениями, которые они вызывают у липидных хвостов. Взаимодействие фуллеренов внутри мембранны ослаблено по сравнению с взаимодействием двух фуллеренов в алкане (где происходит их агрегация) такой же молекулярной массы, что и липидные хвосты. Авторы связывают этот факт с тем, что алканы находятся в более упорядоченном состоянии по сравнению с алкильными хвостами бислоя.

Как было замечено выше, фуллерены существуют в водной среде лишь в агрегированном состоянии. Исследование по проникновению кластеров из фуллеренов

проводилось в статье Wong-Ekkabut с соавторами [25]. В работе использовалась модель coarse-grain, благодаря этому время расчета удалось увеличить до 4 мкс. Для проведения экспериментов были взяты мембранны из ДПФХ и ДОФХ (существенной разницы между ними, как показали расчеты, нет) и 16 молекул фуллерена в воде на разных расстояниях от центра мембраны (в воде, ближе к липидным головкам, в центре мембраны). Молекулы фуллерена агрегируют в воде в течение 500 нс, причем кластер из 16 фуллеренов не проникает в мембрану, в то время как меньшие по размеру агрегаты способны проникнуть в мембрану (Рис. 12).

При проникновении в районе головок образуется маленькая пора, время жизни которой около 500 пс, куда проникает первый фуллерен из кластера. После этого остальные фуллерены проникают внутрь мембраны и на временах порядка микросекунд дезагрегируют. Наиболее вероятное положение фуллерена в мембране – 0,5–1 нм от центра. Для того чтобы изучить влияние фуллеренов на бислой были рассчитаны структурные, динамические и упругие свойства мембраны при различных концентрациях фуллеренов. С повышением молярной концентрации фуллеренов возрастает площадь, приходящаяся на липидную головку и толщина мембраны. Однако параметр порядка для алкильных хвостов изменяется незначительно даже



**Рис. 12. Механизм проникновения фуллерена в мембрану.** А. Проникновение одного фуллерена Б. Проникновение кластера из 10 фуллеренов. Синим цветом обозначены фосфатные головки, зеленым – углеводородные хвосты, красным – фуллерены. Из [25].

при самых высоких концентрациях. При молярной концентрации фуллерена 11,1% понижается коэффициент латеральной диффузии на 40%, на 10% уменьшается модуль сжатия и на 20% модуль изгиба, что свидетельствует об общем смягчении мембраны. Однако изменение механических свойств мембраны не привело к каким-либо видимым повреждениям: разрыву, мицеллообразованию или формированию пор на временах расчета. Таким образом, авторы делают вывод, что фуллерены даже при очень высокой концентрации не способны вызвать механических повреждений в мембранах.

## 1.5. Моделирование фосфолипидной биомембраны

Самая первая модель мембраны («жидко-мозаичная») была предложена в 1972 году [26], согласно ей, мембрана представляла собой двойной жидкий слой липидов, в котором «плавают» белки. Со временем стало ясно, что мембрана играет роль не только растворителя для белков. Современные методы исследования, такие как ядерный магнитный резонанс (ЯМР), инфракрасная (ИК) и флуоресцентная микроскопии, рентгеноструктурный анализ и нейтронная дифракция, позволяют достаточно точно и детально описать структуру и основные физико-химические свойства мембран.

С 70-х годов предпринимались попытки изучить строение билипидного слоя на атомарном уровне, однако из-за сложности объекта сделать это трудно, а иногда и невозможно. Мощным методом в изучении структуры мембран явилась молекулярная динамика: в 1988 году Egberts [27, 28] впервые представил первую методику моделирования мембраны. С тех пор благодаря бурному развитию компьютерной техники разработаны новые подходы к изучению биомембран.

### 1.5.1. Виды биологических мембран, их состав

Биологические мембранны построены в основном из белков, липидов и углеводов. Белки и липиды составляют основную часть сухой массы мембран. Доля углеводов обычно не превышает 10-15%, причем они связаны либо с молекулами белка (гликопротеины), либо с молекулами липидов (гликолипиды). В мембранах различного происхождения содержание липидов колеблется от 25 до 75% по массе по отношению к белку (Табл. 1) [29].

**Табл. 1. Липидный состав клеток млекопитающих, % от массы всех липидов**

| Липиды          | Плазматические мембранны | Митохондрии | Лизосомы | Ядра | ЭПР | Аппарат Гольджи |
|-----------------|--------------------------|-------------|----------|------|-----|-----------------|
| Фосфатидилхолин | 18,5                     | 37,5        | 23       | 44   | 48  | 24,5            |
| Сфингомиелин    | 12                       | 0           | 23       | 3    | 5   | 6,5             |

|                          |      |      |      |      |     |     |
|--------------------------|------|------|------|------|-----|-----|
| Фосфатидилэтаноламин     | 11,5 | 28,5 | 12,5 | 16,5 | 19  | 9   |
| Фосфатидилсерин          | 7    | 0    | 6    | 3,5  | 4   | 2,5 |
| Фосфатидилинозитол       | 3    | 2,5  | 6    | 6    | 7,5 | 5   |
| Лизофосфатидилхолин      | 2,5  | 0    | 0    | 1    | 1,5 | 3   |
| Дифосфатидилглицерин     | 0    | 14   | 5    | 1    | 0   | 0   |
| Другие фосфолипиды       | 2,5  |      |      |      |     |     |
| Холестерин               | 19,5 |      | 14   | 10   | 5,5 | 7,5 |
| Эфиры холестерина        | 2,5  | 2,5  | 8    | 1    | 1   | 4,5 |
| Свободные жирные кислоты | 6    |      |      | 9    | 3,5 | 18  |
| Другие липиды            | 15   | 15   | 2,5  | 5,5  | 5   | 16  |

Липидный состав биологических мембран весьма различен и зависит от выполняемых функций, изменения в нем ведут к неправильному функционированию [30, 31]. Например, изменение эффективной молекулярной формы липида может привести к изменению функции белков. Экспериментально доказано, что мембрана состоит из так называемых рафтов, которые представляют собой функциональные «островки» из липидов определенного состава с белками [32]. Кроме того, рафты одной мембранны могут находиться в разных фазах.

Состав мембран разных организмов варьирует. В данной работе рассматриваются два типа мембран: про- и эукариот (Табл. 2).

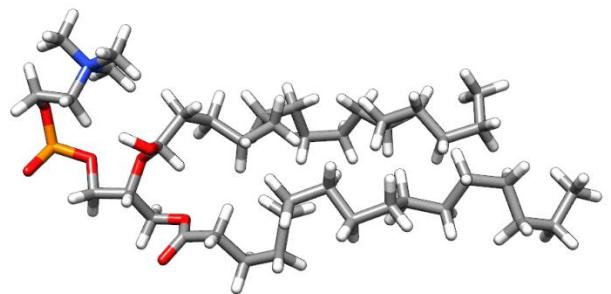
**Табл. 2. Липидный состав мембран про- и эукариот<sup>1</sup>.**

| Мембранны                              | Основные липиды           |
|--|---------------------------|
| Саркоплазматический ретикулум (кролик) | ФХ 66%, ФЭ 12,6%, ФИ 8,1% |
| <i>E. coli</i> (внутренняя мембрана)   | ФЭ 74%, ФГ 19%, КЛ 3%     |

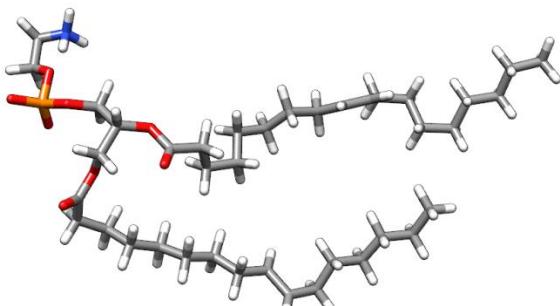
В качестве модельной мембраны эукариотической клетки в молекулярном моделировании часто используют мембрану из фосфатидилхолинов. ФХ (Рис. 13) относится к группе глицерофосфолипидов (одна из гидроксильных групп глицерола связана с полярной группировкой, содержащей фосфат, а две другие – с гидрофобными остатками).

---

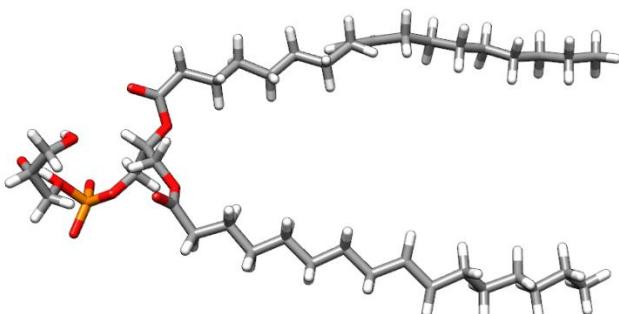
<sup>1</sup> Используемые сокращения: ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – Фосфатидилэтаноламин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФГ – фосфатидилглицерол, КЛ - кардиолипин



Дипальмитоилфосфатидилхолин



Пальмитолеинолеинфосфатидилэтаноламин



Пальмитолеинолеинфосфатидилглицерол

**Рис. 13. Структурные формулы мембранных липидов.**

Для моделирования прокариотической мембраны пользуются моделью, состоящей из смеси липидов: фосфатидилэтаноламина и фосфатидилглицерола (также относятся к группе глицерофосфолипидов) в соотношении 3:1 соответственно. Фосфатидилэтаноламин – нередко основной липид прокариотических мембран, фосфатидилглицерол несет заряд -1, поэтому модельные мембранные прокариотов всегда заряжены отрицательно.

### 1.5.2. Физические свойства

На свойства мембран оказывает сильное влияние температурозависимый переход липидов кристалл-жидкость. При низких температурах фосфолипидный бислой находится в гель-фазе ( $L_\beta$ ), характеризующейся высокой степенью упорядоченности, т.е. цепи ориентируются практически параллельно друг другу. Следствием этого является уменьшение площади, приходящейся на липид. В случае фосфолипидов происходит также наклон цепей по отношению к нормали мембраны. При более высоких температурах мембрана переходит в жидкокристаллическую фазу ( $L_\alpha$ ).  $L_\alpha$ -фаза характеризуется меньшим значением коэффициента упорядоченности и большим значением площади, приходящейся на один липид. Фазовый переход для ДПФХ наблюдается при 41,5 °С. При

физиологических температурах большинство липидов находится в  $L_\alpha$ -фазе и небольшая в  $L_\beta$ .

Длина фосфолипидной молекулы в жидкой закристаллизованной мембране порядка 20 Å. Длина зависит от состава хвоста и головки, и самое главное, от конформации молекулы. По данным рентгеноструктурного анализа ( $T=323$  K) для молекулы ДПФХ площадь, приходящаяся на липид составляет  $62,9 \pm 1,3$  Å<sup>2</sup>; количество молекул воды, приходящаяся на липид при полной гидратации мембранны 29,1, ламеллярное пространство составляет 67,2 Å [33]. Латеральная диффузия составляет  $10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с. Параметр порядка может быть получен экспериментально из данных ЯМР или ИК-спектроскопии и определен как:  $S_{ij} = < 1,5 \cos \theta_i \cos \theta_j - 0,5 \delta_{ij} >$ , где  $\theta_i$  - угол между C-H-связью при  $i$ -том атоме в алкильной цепи и нормалью к мембране, угловые скобки означают усреднение по времени. Для ДПФХ параметр порядка может быть вычислен как  $-S_{CD} = \frac{2}{3} S_{xx} + \frac{1}{3} S_{yy}$ , и модуль  $|S_{CD}|$  для атомов с C4 по C8 равен 0,217 согласно экспериментальным данным [34].

Самые быстрые колебания (связей, валентных и торсионных углов) в молекуле липида совершаются атомами водорода (время порядка 0,5 фс). Колебания остальных атомов совершаются при временах порядка нескольких пикосекунд; переход транс-гош конформации осуществляется на временах порядка десятков пикосекунд, причем чем ближе к головке липида, тем больше времени требуется для такого конформационного перехода благодаря более плотной упаковке цепей (Рис. 14).

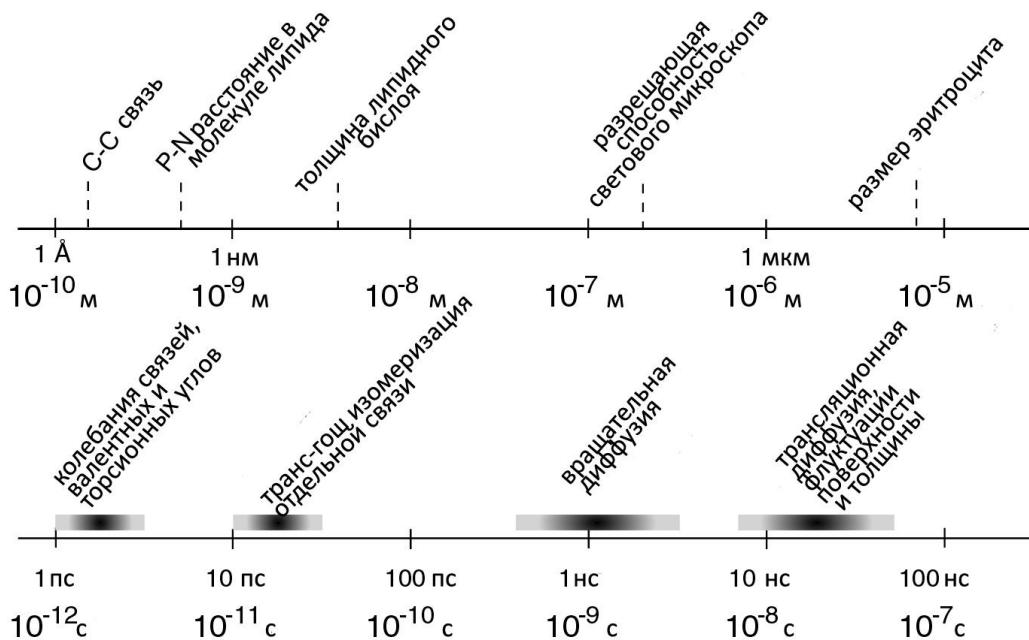


Рис. 14. Соотношение характерных времен и расстояний в биомембранах

Движение головки относительно поверхности мембраны осуществляется быстро (десятки пикосекунд), в то время как существенные изменения в положении головки происходят за несколько наносекунд. Поворот липида вокруг своей оси осуществляется за время порядка нескольких наносекунд, диффузия двух липидов в латеральной плоскости мембраны осуществляется за время порядка нескольких десятков наносекунд, переходы типа флип-флоп могут занимать время порядка минут или даже часов.

### **1.5.3. Молекулярная динамика биомембран**

Молекулярное моделирование является мощным инструментом в визуализации динамики липидов. Однако в методе МД существуют ограничения, связанные с размерами системы, временами расчета и точностью подбираемых параметров. Обычно проводится динамика нескольких сотен липидов в течение десятков наносекунд. Один из наиболее часто используемых методов для увеличения скорости расчета – это исключение дальнодействующих электростатических взаимодействий. Часто используются метод обрезания (cut-off), который однако вносит значительные изменения в свойства системы и поэтому в настоящее время все чаще используется методы PME [35] (particle mesh Ewald) и RF [36] (reaction field). Метод PME основывается на интерполяции обратной суммы Эвальда. Центральная ячейка расчета копируется периодическими граничными условиями, и все электростатические взаимодействия в такой «размноженной» системе суммируются. Метод суммирования по Эвальду подходит для расчета дальнодействующих электростатических сил в периодических граничных условиях. В данной работе использовались методы cut-off для вакуума и PME для систем с водой.

При моделировании мембранны важно, чтобы соблюдались основные ее физические свойства, а для этого необходимо верно подобрать не только силовое поле но и параметры симуляции. В работе Anezo с соавторами [37] проводятся методологические исследования моделирования липидных бислоев. Основные выводы из этой работы таковы:

1. Для расчета площади, приходящейся на одну головку необходимо провести динамику в течение 5-10 нс из-за высоких флуктуаций в значениях.
2. Значение площади, приходящейся на головку липида довольно чувствительно к параметрам симуляции, особенно к учету дальнодействующих электростатических взаимодействий. Для ДПФХ считается приемлемым значения 62-66 Å<sup>2</sup>.
3. Тип баростата не влияет на равновесные свойства мембраны. Однако предпочтительнее использовать баростат Паринелло-Рамана для теоретических расчетов свойств мембраны, нежели баростат Берендсена. С другой стороны, баростат Берендсена

лучше погашает осцилляции возникающие в мембране, которые достаточно часто появляются при релаксации бислоя.

## 1.6. Наномедицина и нанотоксикология

Со времени открытия фуллерена  $C_{60}$  и, особенно со времени разработки методов получения его в макрополличествах, органическая химия фуллерена приобрела невиданную популярность и превратилась в самостоятельную ветвь органической химии.

Производные фуллерена могут применяться в самых различных областях науки и техники, особый интерес представляет приложение в области биологии и медицины (Рис. 15).

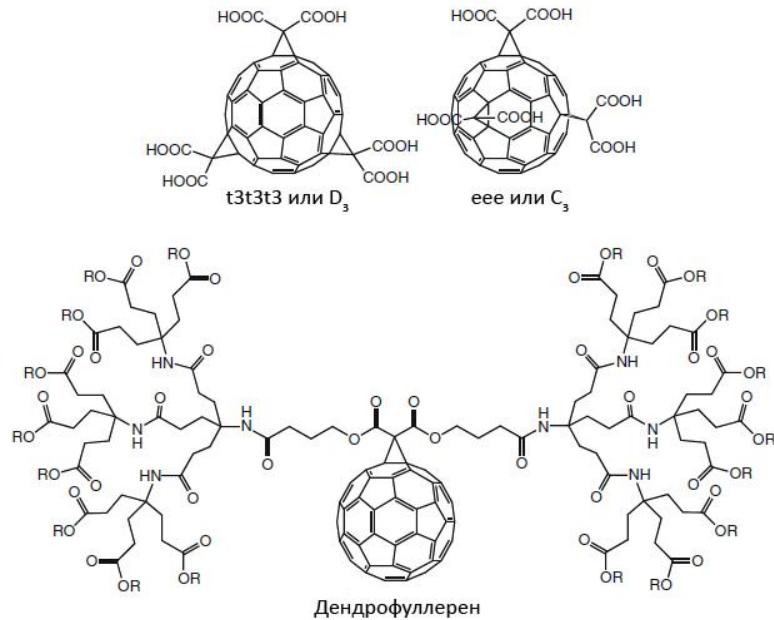
### 1.6.1. Цитопротективная и антиоксидантная активности

Возможность использования  $C_{60}$  в качестве цитопротективного агента – одно из наиболее изученных приложений благодаря фундаментальным исследованиям Dugan с соавторами, которые изучали способность фуллерена к утилизации супероксидных радикалов [38-40].

Примеры водорастворимых фуллеренов-антиоксидантов даны на Рис. 16. Дендрофуллерен и трималонат фуллерен были детально исследованы Witte с соавторами [41]. Сначала была создана библиотека положительно и отрицательно заряженных производных фуллерена. Дендрофуллерены и отрицательно заряженные производные показали наибольшую активность по сравнению с другими синтезированными молекулами. Авторы анализировали взаимодействия производных фуллеренов с цитохромом  $c$ , с которым они напрямую и реагируют. Цитохром  $c$ , будучи чувствительным к активным формам кислорода (АФК), участвует во множестве путей реализации апоптоза клетки. Отсюда вполне ясна важность изучения механизма связывания этих двух молекул.



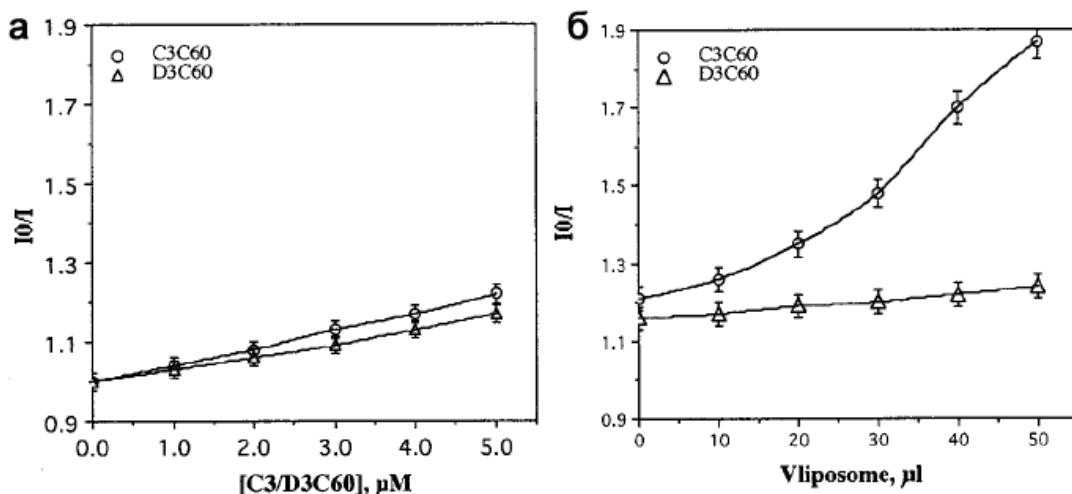
Рис. 15. Потенциальные биологические приложения фуллеренов



**Рис. 16. Трисмалонаты фуллеренов  $C_3$  и  $D_3$ , дендрофуллерен**

Wang [42] с соавторами проводили сравнительную характеристику действия производных фуллеренов  $C_3$  и  $D_3$  на перекисное окисление липидов. В ходе исследований выяснилось, что  $C_3$  лучше, чем  $D_3$  защищает мембрану от АФК благодаря более сильному с ней взаимодействию. Скорее всего, это связано с расположением COOH-группировок на фуллерене: у  $C_3$  на одной полусфере молекулы, у  $D_3$  - на двух (Рис. 17).

Цитопротективная активность тех же производных фуллерена была изучена на полосатой перцине (*Percina caprodes*) [43]. Авторы анализировали природную токсичность соединений фуллерена и их действие на неврому волосковой клетки, вызванную гентамицином и цисплатином.



**Рис. 17. Графики, иллюстрирующие большую проницаемость производного  $C_3$  по сравнению с  $D_3$  (из [42]).**

В целом для клеток более токсичны положительно заряженные производные фуллерена, но необходимо подчеркнуть, что некоторые отрицательнозаряженные производные (например, трис-малонат фуллерены) способны к декарбоксилированию - такая неустойчивость повышает их токсичность. Анионные производные способны блокировать индуцированный апоптоз. Дендрофуллерены хорошо защищают от цисплатины, а производное фуллерена C<sub>3</sub> блокирует действие гентамицина. Механизм защиты зависит от процессов, активирующихся при введении веществ в клетку. Разные активности по отношению к цисплатине и гентамицину дендрофуллеренов и цис-малонат фуллеренов скорее всего вызваны различной локализацией в клетке производных фуллерена и их химической активностью.

Использование аланин-фуллерена (Рис. 18) уменьшает усвоение вне- и внутриклеточных форм активного кислорода, что в свою очередь ведет к снижению риска возникновения апоптоза. Производное фуллерена с пятью цистеинами способно утилизировать супероксид и гидроксил радикалы [44, 45].

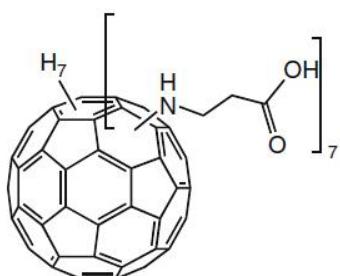


Рис. 18. 7 β-аланин фуллерен

Нитроксид малонат метанофуллерены способны нивелировать токсичность циклофосфамида благодаря нитроксидному радикалу [46]. Эксперименты проводились на мышах с лейкемией Р-388. Циклофосфамид или фуллерен отдельно введенные в организм мышей не поднимали выживаемость, в то время как комбинация противоракового агента и производного фуллерена оказалось более эффективным средством – продолжительность жизни мышей увеличилась на 70%.

Впервые в 2007 году появились сообщения об использовании водорастворимых фуллеренов в качестве противоаллергических средств. Производные (C<sub>60</sub>(OH)<sub>x</sub> и C<sub>60</sub>(NEt)<sub>x</sub>) исследовались на человеческих тучных клетках (ТК) и базофилах периферической крови (БПК). Клетки росли при постоянной концентрации фуллеренов 1 мкг/мл, при этом цитотоксического эффекта не наблюдалось. При инкубации веществ с ТК и БПК выброс медиатора не происходил, но при некоторых условиях наблюдалось ингибирование дегрануляции и продукция цитокинов. В то же время предварительная обработка производными фуллерена не ингибировала связывание IgE с ТК. В экспериментах *in vivo* введение 2нг/г производных фуллерена в мышей ингибирует анафилаксию (патологическую реакцию живого организма на введение чужеродных веществ), при этом токсического эффекта не наблюдается. Учитывая то, что для

остановки анафилаксии требуются концентрации производных фуллерена в 400-300000 раз меньшие, чем те, что вызывают токсический эффект, водорастворимые фуллерены в будущем могут быть применены в лекарственных препаратах против аллергии [47].

### **1.6.2. Окислительный стресс и фотодинамическая терапия**

С одной стороны,  $C_{60}$  является эффективным акцептором радикалов, с другой стороны, под действием света фуллерен способен сам образовывать радикалы. Свет возбуждает молекулу  $C_{60}$ , и происходит переход в короткоживущее возбужденное состояние  $^1C_{60}$ , которое переходит в долгоживущее  $^3C_{60}$ .  $^3C_{60}$  может отдать часть своей энергии молекулярному кислороду (в результате получается токсичный  $^1O_2$ ), при этом переходя обратно на нижний энергетический уровень. Более того, триплетный и синглетный фуллерены могут быть окислены до  $C_{60}^-$ . Все эти активные формы фуллерена могут атаковать биомолекулы: липиды, белки, нуклеиновые кислоты. Иными словами, существует два механизма действия радикалов: первый тип – повреждение обусловлено любыми молекулами, кроме  $^1O_2$ , тип второй – повреждение осуществляется синглетным кислородом. Для ДНК оба пути ведут к окислению гуанозина, что понижает стабильность фосфодиэфирной связи, в результате чего при щелочных рН происходит ее гидролиз.

Harhaji с соавторами в своей статье [48] продемонстрировал противоопухолевый эффект водной суспензии  $nC_{60}$  при облучении светом. В зависимости от концентрации фуллерена, в культурах клеток глиомы наблюдается киназы, регулирующие внеклеточное содержание АФК: при высоких концентрациях фуллерена происходит некроз, при низких концентрациях киназы блокируют пролиферацию клеток и происходит автофагия (процесс разрушения клеток лизосомами данных или других клеток). Более того, опыты на мышиных астроцитах показали, что они менее чувствительны к маленьким концентрациям  $nC_{60}$ , чем измененные астроциты. Отсюда следует, что и немодифицированные фуллерены могут использоваться в будущем как противораковые агенты.

### **1.6.3. Взаимодействие с белками**

Benyamin с соавторами [49] проводили докинг фуллерена  $C_{60}$  и карбоксифуллерена со следующими белками: ВИЧ-протеаза, фуллерен-специфичное антитело, человеческий сывороточный альбумин и бычий сывороточный альбумин. Паттерны, схожие для всех четырех белков, не обладают высокой специфичностью к связыванию с фуллереном, однако во всех случаях белки испытывают конформационные изменения, которые могут приводить к изменениям в функционировании.

Благодаря своей сфероидальной поверхности фуллерен может быть использован в качестве стабилизирующего агента для денатурирующих белков. Такая активность фуллерена была показана для соевой пероксидазы [50], устойчивость которой повышалась в 13 раз по сравнению с нативным белком.

Некоторые производные фуллеренов (например, дендрофуллерены) проявляют ингибиторную активность ВИЧ-протеазы [51]. Эти же вещества также активны против ацетилхолиновой эстеразы – гидролазы одного из нейротрансмиттеров.

### **1.7.3. Антибактериальная активность**

Производные фуллерена обнаруживают антибактериальную активность: рост бактерий замедляется из-за разобщения цепи дыхания. При низких концентрациях производных фуллеренов сначала происходит повышение потребления кислорода, что ведет за собой повышение производства пероксида водорода. Более высокие концентрации  $C_{60}$  скорее всего вызывают утечку электронов в бактериальной цепи дыхания [52].

### **1.7.4. Нанотоксикология**

В последние годы в несколько раз увеличилось производство фуллеренов и их производных. В связи с вышеперечисленными активностями производных фуллерена довольно остро стоит вопрос об их токсичности. В основе биологической активности фуллеренов лежат, в первую очередь, три свойства этих молекул: липофильность, определяющая мембранотропные свойства, электронодефицитность, приводящая к способности взаимодействовать со свободными радикалами, и способность их возбужденного состояния передавать энергию молекуле обычного кислорода и превращать его в синглетный кислород. Именно благодаря последним двум свойствам фуллерены могут проявлять себя как оксиданты и как антиоксиданты.

Fortner с соавторами [53] зарегистрировал ингибиторный эффект фуллеренов (концентрация  $>4$  мг/л) на рост бактерий. Скорее всего токсический эффект связан с перекисным окислением липидов мембранны.

Эксперименты на человеческих дермальных фибробластах, клетках карциномы печени и астроцитах с немодифицированным  $C_{60}$  показали, что суспензия фуллеренов вызывает также перекисное окисление липидов, однако изменение структуры мембранны митохондрий не наблюдается [54]. В опытах на альвеолярных макрофагах,  $C_{60}$  не обнаруживает цитотоксической активности, однако наблюдается снижение фагоцитарной активности клетки [55]. Изучение распределения фуллеренов в клетке методом трансмиссионной электронной микроскопии показало, что свободные молекулы

обнаруживаются в цитоплазме, ядерной и плазматической мембранах, лизосомах и даже в ядре [56] (Рис. 19, Рис. 20, Рис. 21).

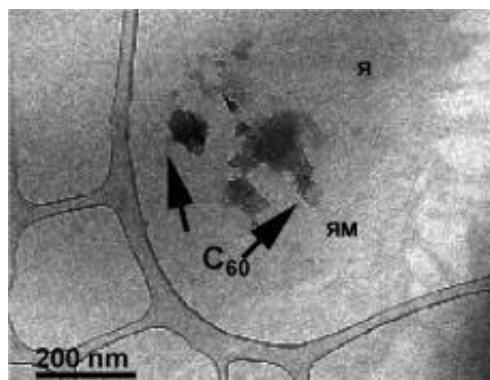
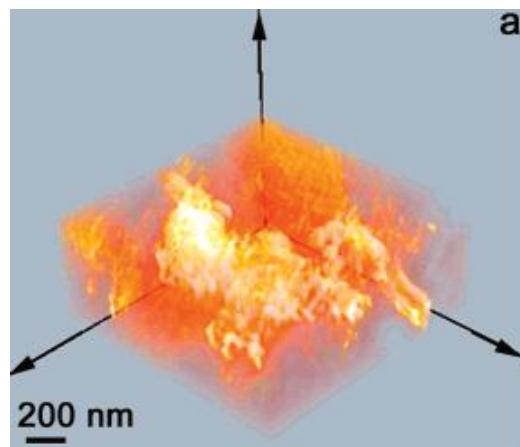


Рис. 19. Локализация фуллеренов в ядре клетки (из [56]). ЯМ - ядерная мембра, я - ядро



б

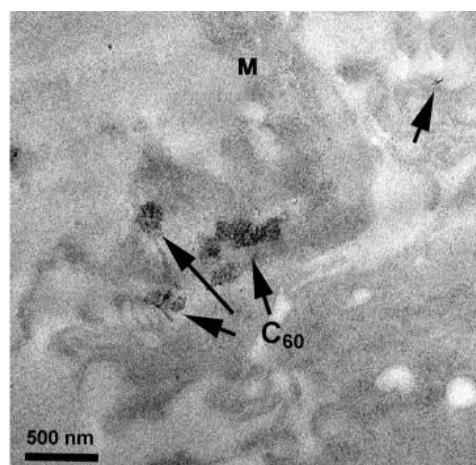


Рис. 20. Локализация кластеров C<sub>60</sub> внутри плазматической мембрани. М - мембра

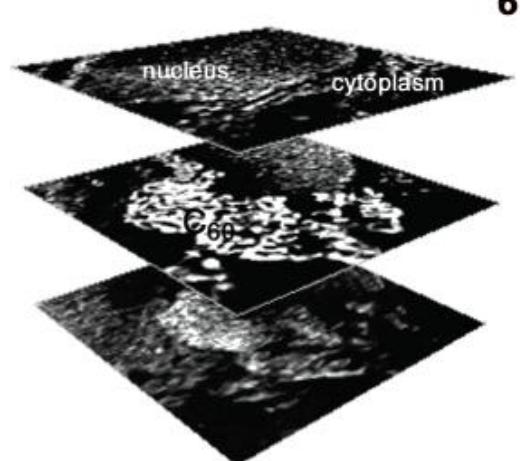


Рис. 21. 3D реконструкция кластера C<sub>60</sub>, проникнувшего в ядро клетки.

Токсичность фуллеренов зависит от способа их приготовления и экстракции. Растворенный предварительно в тетрагидрофуране фуллерен вызывает более сильный токсический эффект, чем фуллерен экстрагированный при помощи CCl<sub>4</sub>.

Для проверки токсичности фуллеренов крысам, при помощи ингаляции, были введены микро и наночастицы аэрозоля. Данные ингаляции не оказали отрицательного влияние на дыхание крыс, наблюдалось лишь небольшое увеличение концентрации белков в бронховоальвеолярной жидкости [57].

## ГЛАВА 2. МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Одним из методов вычислительного эксперимента является метод молекулярной динамики (МД), который широко применяется в прикладных задачах биотехнологии, биоинженерии, фармакологии, нанотехнологии и др.

### 2.1 Физические основы

В основе метода молекулярной динамики лежит представление о многоатомной молекулярной системе, в которой все атомы являются взаимодействующими материальными точками, поведение атомов описывается уравнениями классической механики. Данный метод позволяет исследовать системы порядка  $10^6$  атомов на временном диапазоне 100 нс. Несмотря на некоторые ограничения, такое представление может достаточно хорошо описывать динамику макромолекул на атомарном уровне. Однако, данный метод не позволяет рассматривать химические реакции, а также образование и разрыв химических связей. Для этих целей существуют комбинирующие подходы классической и квантовой механики.

Поведение каждого атома описывается классическим уравнением движения:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i(1),$$

$$\vec{F}_i = -\frac{dU(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_n)}{d\vec{r}_i} (2),$$

где  $i$  – номер атома,  $n$  – количество атомов в системе,  $m_i$  – масса атома,  $\vec{r}_i$  – радиус-вектор атома,  $\vec{F}_i$  – равнодействующая сила, действующих на атом,  $U$  – потенциальная энергия системы.

Равнодействующая сила находится как градиент потенциала, который включает в себя сумму всех взаимодействий атомов в системе. Для пар атомов это валентные связи, кулоновские, ван-дер-ваальсовые взаимодействия и водородные связи. Для троек атомов – валентные углы, а для четверок – торсионные углы (Рис. 23).

Затем рассчитываются новые координаты и скорости атомов в следующий момент времени  $t + \Delta t$  (Рис. 22):

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + (\Delta t) \vec{v}_i(t) + \frac{1}{2} (\Delta t)^2 \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} (3),$$

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{1}{2} (\Delta t)^2 \frac{\vec{F}_i(t + \Delta t)}{m_i} (4).$$

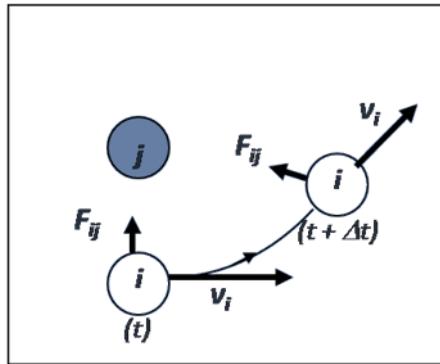


Рис. 22. Алгоритм расчета траектории и скорости  $i$ -ой частицы методом молекулярной динамики

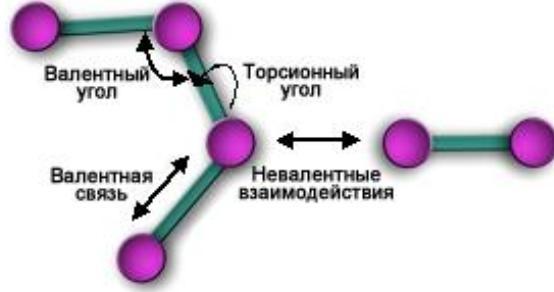


Рис. 23. Типы взаимодействий атомов в методе молекулярной

динамики

Принципиальным моментом процедуры интегрирования является выбор величины шага интегрирования  $\Delta t$ . Длина шага должна быть меньше чем период самых быстрых движений системы. Для органических молекул это характерное время осцилляции валентной связи C-H, которое составляет 10фс. Таким образом, для полноатомных систем обычно выбирается значение шага интегрирования 1-2фс.

Начальные скорости системы обычно выбираются случайным образом в соответствии с распределением Максвелла для заданной температуры.

## 2.2 Силовые поля

Общий вид потенциальной энергии в разных силовых полях практически одинаковый, однако, они могут значительно различаться расчетом отдельных вкладов и параметризацией.

В общем виде потенциальная энергия системы записывается как:

$$U(r_1, r_2, \dots, r_N) = U_{\text{bond}} + U_{\text{n-b}} = \\ [\sum_k U_k^{\text{bond}}(r_1, r_2) + \sum_k U_k^{\text{angle}}(r_1, r_2, r_3) + \sum_k U_k^{\text{torsional}}(r_1, r_2, r_3, r_4)] + [\sum_k U_k^{\text{LJ}}(r_1, r_2) + \\ \sum_k U_k^{\text{coulomb}}(r_1, r_2)] \quad (5)$$

,

где  $U_{\text{bond}}$  - потенциал всех валентных взаимодействий,  $U_{\text{n-b}}$  - потенциал невалентных взаимодействий,  $U_k^{\text{bond}}$  - потенциал валентной связи,  $U_k^{\text{angle}}$  - потенциал валентного угла,  $U_k^{\text{torsional}}$  - потенциал торсионного угла,  $U_k^{\text{LJ}}$  - потенциал Ван дер Ваальсовых взаимодействий,  $U_k^{\text{coulomb}}$  – потенциал электростатического взаимодействия.

Энергия валентных связей аппроксимируется гармоническим потенциалом с жесткостью  $k_{ij}$  и равновесной длиной связи  $b_{ij}^0$ :

$$U_{ij}^{\text{bond}}(b_{ij}) = \frac{k_{ij}}{2} (b_{ij} - b_{ij}^0)^2 \quad (6),$$

где  $b_{ij}$  – фактическая длина связи.

Константа жесткости и равновесная длина связи выбираются таким образом, чтобы воспроизводилась геометрия и колебательные частоты простых модельных соединений. Основной недостаток данного представления валентных связей заключается в том, что при сильном расхождении атомов связь не рвется, а энергия системы резко возрастает, что может привести к артефактам. Большинство программных пакетов по МД позволяют фиксировать валентные связи при расчете с помощью алгоритмов SHAKE [58] и LINKS [59]. Такой подход позволяет увеличить шаг интегрирования до 4-5 фс.

Потенциальная энергия валентных углов также представлена гармоническим потенциалом:

$$U_{i,j,k}^{\text{angle}}(\theta_{i,j,k}) = \frac{k_{i,j,k}^\theta}{2} (\theta_{i,j,k} - \theta_{i,j,k}^0)^2 \quad (7),$$

где  $k_{i,j,k}^\theta$  – константа жесткости,  $\theta_{i,j,k}$ ,  $\theta_{i,j,k}^0$  – фактическое и равновесное значение угла соответственно. Также как и для валентных связей, константа жесткости и равновесное значение угла выбираются таким образом, чтобы воспроизводить равновесную геометрию и колебательные частоты простых молекул.

Торсионный угол для связанных атомов  $i, j, k$  и  $l$  представляет собой двугранный угол между плоскостями, определяемыми атомами  $i j k$  и  $j k l$  (Рис. 24). Значение угла 0 соответствует цис-конформации.

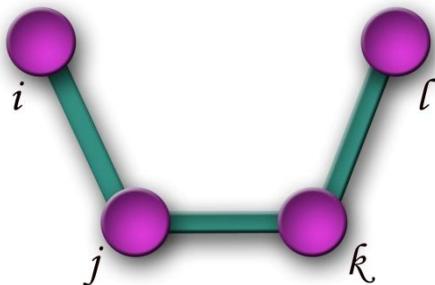


Рис. 24. Торсионный угол.

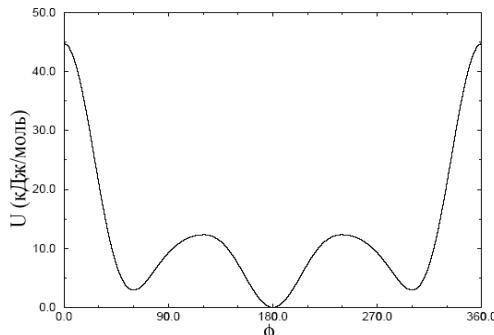


Рис. 25. Потенциал Ryckaert-Bellemaans для двугранного угла.

Наиболее распространены два потенциала для расчета энергии двугранный углов: с помощью периодической функции и через степени  $\cos\varphi$  (потенциал Ryckaerta-Bellemaans).

Для первого случая потенциальная энергия определяется следующим образом:

$$U_{i,j,k,l}^{\text{torsional}}(\varphi_{i,j,k,l}) = k_{i,j,k,l}^\varphi [1 + \cos(n\varphi - \varphi^0)] \quad (8),$$

где параметры подобраны таким образом, чтобы воссоздавать энергию цис- и транс-конформаций.

Потенциал Ryckaerta-Belleman выглядит следующим образом (Рис. 25):

$$U_{i,j,k,l}^{\varphi}(\varphi_{i,j,k,l}) = \sum_0^5 c_n (\cos(\varphi - \pi))^n \quad (9).$$

Оба потенциала могут давать погрешность в случае алифатических углеводородов, где переход между цис- и транс-конформациями может быть стерически затруднен. Поэтому для более точного описания можно вводить поправки в невалентные взаимодействия (кулоновские и Ван-дер-ваальсовы) между крайними атомами торсионного угла («1-4» взаимодействия).

К невалентным взаимодействиям относятся кулоновские и Ван-дер-ваальсовые взаимодействия. В некоторых силовых полях отдельно вводится потенциал для водородных связей, энергия которых находится в соответствии с следующему эмпирическому выражению:

$$U^{H-bond} = \varepsilon \left[ A \left( \frac{r_0}{r} \right)^{12} - B \left( \frac{r_0}{r} \right)^{10} \right] \quad (10).$$

В молекулярной динамике атомы являются материальными точками и существование электронов не учитывается явным образом. Однако распределение электронной плотности в молекуле неравномерно, поэтому для описания распределения электронной плотности в силовых полях используется парциальный заряд для каждого атома. Кулоновская энергия взаимодействия между атомами системы описывается выражением:

$$U_{i,j}^{coulomb}(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon \varepsilon_0 r_{ij}} \quad (11),$$

где  $q_i$ ,  $q_j$  – парциальные заряды атомов,  $\varepsilon$  и  $\varepsilon_0$  – диэлектрическая проницаемость вакуума и среды соответственно,  $r_{ij}$  – расстояние между атомами. Обычно диэлектрическая проницаемость среды в МД-расчетах равна 1, так как в системе присутствует явно заданная среда. Однако диэлектрическая проницаемость определяется не только переориентацией молекул среды, а также перераспределением электронной плотности на атомах, которую нельзя учесть в методе молекулярной динамики. Поэтому в задачах, где исследуется взаимодействие заряженных молекул, необходимо корректировать кулоновские взаимодействия за счет изменения диэлектрической проницаемости среды.

Особенно важно при расчете электростатических взаимодействий – расчет парциальных зарядов на атомах. При моделировании углеводородов в некоторых случаях можно пренебречь кулоновскими взаимодействиями. Было показано, что для подобных

систем термодинамические величины, рассчитанные с учетом электростатических взаимодействий, могут не сильно отличаться от тех же величин, рассчитанных без их учета.

При расчете невалентных взаимодействий потенциальная энергия рассчитывается не для каждой пары атомов системы, а для атомов, находящихся на расстоянии меньше определенного значения – радиуса обрезания.

В структурированных средах, таких как липидные бислои, использование радиуса обрезания может привести к серьезным артефактам, поэтому для подобных систем часто используют методы учета дальних кулоновских взаимодействий.

Наиболее общепринятым подходом является вычисление сил при помощи метода сумм Эвальда. В этом методе суммирование всех парных взаимодействий производится в обратном пространстве Фурье, это позволяет производить суммирование по всему бесконечному периодическому пространству. Вычислительная сложность метода –  $\mathcal{O}(N^2)$ , где  $N$  – количество атомов в системе. Это делает затруднительным применение данного метода для полноатомных гидратированных бислоев фосфолипидов. Модифицированный метод Эвальда – PME (Particle Mesh Ewald) имеет сложность  $\mathcal{O}(N \cdot \log(N))$ , и основывается на быстрых преобразованиях Фурье при суммировании в обратном пространстве.

Не связанные валентной связью атомы взаимодействуют за счет сил электродинамической природы, так называемое Ван-дер-ваальсово взаимодействие. Оно складывается из ориентационного, индукционного и дисперсионного взаимодействий атомов. В молекулярной динамике Ван-дер-ваальсовые взаимодействия описываются потенциалом Леннард-Джонса или потенциалом «6-12» следующего вида:

$$U_{i,j}^{LJ}(r_{i,j}) = 4\epsilon_{i,j} \left[ \left( \frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}} \right)^6 \right] \quad (12),$$

где член  $\left( \frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}} \right)^{12}$  описывает отталкивание электронных орбиталей на близком расстоянии.

Выбор степени эмпирический, поскольку описание межатомного отталкивания лишь качественное. Член  $\left( \frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}} \right)^6$  отвечает за притяжение атомов на большом расстоянии и имеет квантово-механическую природу, связанную с согласованными колебаниями электронной плотности в обоих атомах. Значения  $\epsilon$  и  $\sigma$  имеют простую интерпретацию: значение  $\sigma$  соответствует расстоянию, на котором энергия взаимодействия атомов меняет знак, переходя через нулевое значение, фактически этот параметр определяет «размеры» атомов. Значение  $\epsilon$  соответствует глубине потенциальной ямы.

Обычно параметры  $\varepsilon$  и  $\sigma$  в силовом поле задаются для каждого атома. Далее при расчете потенциальной энергии для каждой пары  $\varepsilon_{ij}$  и  $\sigma_{ij}$  находятся как среднее геометрическое и среднее арифметическое соответственно.

Суммирование потенциальной энергии Ван-дер-ваальсовых взаимодействий проводится по всем парам атомов, разделенных более чем двумя химическими связями и находящимися на расстоянии менее радиуса обрезания. На границе радиуса обрезания могут возникнуть возмущения радиальной функции распределения атомов. Для уменьшения возникающего эффекта применяют сглаживающую функцию, плавно уменьшающую до нуля потенциал взаимодействия.

### 2.3. Поддержание постоянной температуры. Термостатирование

Мгновенное значение температуры связано с кинетической энергией системы следующим соотношением:

$$\sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{2m_i} = \frac{3Nk_B T}{2} \quad (13)$$

где  $p_i$  – импульс частицы,  $m_i$  – масса частицы,  $N$  – количество частиц в системе,  $k_B$  – константа Больцмана,  $T$  – температура системы.

При численном моделировании динамики молекул используется конечная длина шага, за который атомы перемещаются на определенное расстояние, рассчитанное из ньютоновских уравнений. Таким образом, в конце шага атомы могут оказаться на слишком маленьком расстоянии (в запрещенной области потенциального поля), и атом на следующем шаге может получить избыточную кинетическую энергию, которая впоследствии приведет к разогреванию системы. Для избегания подобной ситуации используются специальные алгоритмы – термостаты.

#### 1. Масштабирование скорости

При применении алгоритма масштабирования скорости каждые несколько шагов величины скорости каждого атома умножается на фактор, который зависит от отношения температуры системы к значению текущей температуры.

Пусть температура системы в момент времени  $t$  составляет  $T(t)$  (вычисляется из кинетической энергии системы), а  $-T_0$  необходимая температура, значение фактора  $-\lambda$ , тогда изменение температуры может быть вычислено как:

$$\Delta T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N 2 \frac{m_i (\lambda v_i)^2}{3Nk_B} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N 2 \frac{m_i v_i^2}{3Nk_B} \quad (14)$$

$$\Delta T = (\lambda^2 - 1)T(t) \quad (15)$$

$$\lambda = \sqrt{T_0/T(t)} \quad (16)$$

Одним из недостатков такого алгоритма является отсутствие флюктуаций температуры, которые всегда присутствуют в каноническом ансамбле.

## 2. Термостат Берендсена

Для поддержания температуры система подогревается извне фиксированной температурой  $T_0$ . Скорости масштабируются на каждом шаге, а изменение температуры со временем описывается выражением:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau} (T_0 - T(t)) \quad (17),$$

где  $\tau$  — параметр, определяющий взаимодействие между внешним нагревателем и системой. Изменение температуры между последовательными шагами по времени в таком случае:

$$\Delta T = \frac{\delta t}{\tau} (T_0 - T(t)) \quad (18)$$

Тогда фактор  $\lambda$  будет определяться как:

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\delta t}{\tau} \left\{ \frac{T_0}{T(t - \frac{\delta t}{2})} - 1 \right\} \quad (19).$$

Этот термостат обладает рядом недостатков. Он не отвечает каноническому распределению Гиббса и нарушает закон равнораспределения кинетической энергии по степеням свободы. В вычислительных экспериментах с небольшими молекулярными системами наблюдалось перекачивание энергии из высокочастотных в низкочастотные моды колебаний.

## 3. Термостат Нозе-Гувера

Суть этого метода заключается в том, что термостат становится неотъемлемой частью системы путем добавления искусственной переменной  $s$ , связанной с «массой»  $Q > 0$ .

В этом случае лагранжиан системы будет выглядеть как:

$$L_{\text{Noise}} = \sum_{i=1}^N \frac{m_i}{2} s^2 \dot{r}_i^2 - U(r^n) + \left(\frac{Q}{2}\right) \left(\frac{ds}{dt}\right)^2 - (f+1)k_B T \ln s \quad (20),$$

где  $f$  – количество степеней свободы системы,  $T$  – необходимая температура, третий и четвертый члены уравнения – кинетическая и потенциальная энергии системы.

## 2.4. Стохастическая динамика

Уравнения стохастической динамики отличаются от уравнений Ньютона добавлением теплового шума и трения и выглядят следующим образом:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = -m\gamma \frac{d\vec{r}_i(t)}{dt^2} + \vec{F}_i(r) + \vec{R}_i(t) \quad (21),$$

где  $\gamma$  – коэффициент трения (1/пс), а  $\vec{R}_i(t)$  –случайная сила. Для получения статистически достоверных результатов эти величины должны удовлетворять флюктуационно-диссипативной теореме:

$$\langle \vec{R}_i(t) \rangle = 0 \quad (22),$$

$$\int \langle \vec{R}_i(0) \cdot \vec{R}_i(t) \rangle dt = 6k_B T \gamma \quad (23).$$

В моделировании считается, что случайные силы не коррелируют друг с другом, а потому верхнее выражение приобретает вид:

$$\langle \vec{R}_i(t) \cdot \vec{R}_i(t') \rangle = 6k_B T \gamma \delta(t - t') \quad (24).$$

Когда  $\gamma$  порядка временной шкалы расчета, то в системе поддерживается постоянная температура.

## 2.5. Поддержание постоянного давления

В молекулярно динамических расчетах часто бывает удобно использовать ансамбли с постоянным давлением. В частности это касается систем, где есть раздел фаз. Наиболее распространенным баростатом являются баростаты Берендсена и Парринелло-Рамана.

Тензор давления  $P$  может быть вычислен с помощью вироальной теоремы Клаузиуса как

$$P = \frac{2}{V} (\mathbf{E}_{\text{kin}} - \Xi) \quad (25),$$

где  $V$  – объем ящика,  $\mathbf{E}_{\text{kin}}$  – кинетическая энергия, а выражение для вироала:

$$\Xi = -\frac{1}{2} \sum_{i < j} r_{ij} \cdot F_{ij} \quad (26).$$

Баростат Беренсена в конце каждого шага пересчитывает координаты и линейные размеры ячейки, чтобы привести систему к заданному давлению  $P_0$ .

$$x' = x - \frac{\Delta t}{3\tau} \beta (P_0 - P(t)) \quad (27),$$

где  $\beta$  – сжимаемость,  $\tau$  – коэффициент баростатирования,  $P_0$  – задаваемое давление,  $P(t)$  – текущее давление на шаге.

Баростат Парринелло-Рамана является модифицированной формой баростата Андерсена. Он допускает не только изменение объема вычислительной ячейки, но и ее формы.

Все расчеты работы проводились в программном пакете Gromacs 3.3.1 [60]. Свойства фуллерена изучались в силовом поле OPLS-AA, свойства мембранны и взаимодействие фуллерена с мембраной в силовом поле GROMOS. Для численного интегрирования во всех экспериментах использовался алгоритм Верле. Начальные скорости определялись с помощью генератора случайных чисел по распределению Максвелла. Расчет электростатики производился при помощи алгоритма PME в среде и cut-off в вакууме.

## ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ФУЛЛЕРНОВ

### 3.1. Постановка задачи

Для реализации заданной цели были поставлены следующие задачи:

1. Создание молекулярной модели фуллерена и его производного трималонатфуллерена.
2. Изучение динамики фуллеренов в вакууме и воде методом МД.
3. Построение профиля потенциала средней силы для фуллерена  $C_{60}$  в вакууме, воде, толуоле.

### 3.2. Сборка молекул

Молекулы фуллеренов были собраны по схеме, представленной на Рис. 26. Для проведения молекулярной динамики фуллерена  $C_{60}$  и  $C_3$  (Рис. 27, Рис. 28) было выбраны силовые поля OPLS-AA и GROMOS. Заряд на каждом атоме углерода у фуллерена равен 0 в силу симметрии молекулы (порядок симметрии  $n=120$ ). Для производного фуллерена – трималонатфуллерена – заряды были рассчитаны в программе GAMESS по Малликену методом Хартри-Фока с базисом 6-31ГФ\*\* с использованием оптимизации геометрии молекулы (таблицу с зарядами см. в приложении 1).

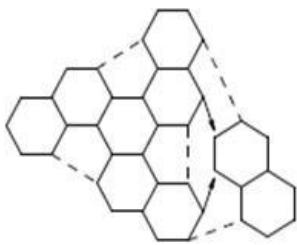


Рис. 26. Схема сборки молекул фуллеренов.

Константы жесткости для связей и валентных углов были взяты как для полиенов. Параметры Ван-дер-Ваальса были взяты из статьи [24]. В силовых полях OPLS-AA и GROMOS были описаны новые типы молекул со следующими параметрами:

- $m(C)=12.01100$  а.е.м.
- тип связи – C3
- параметры Ван-дер-Ваальса:  $\sigma_{C-C}=3,47$  Å,  $\xi_{C-C}=0,275$  кДж/моль
- тип двойной связи:  $b_0=1,38$  Å,  $k_b=265265.6$  Дж/моль
- тип одинарной связи:  $b_0=1,44$  Å,  $k_b=265265.6$  Дж/моль
- валентные углы пятичлененных циклов:  $\theta=108^\circ$ ,  $\chi=488.273$  Дж/моль
- валентные углы шестичленных циклов:  $\theta=120^\circ$ ,  $\chi=488.273$  Дж/моль

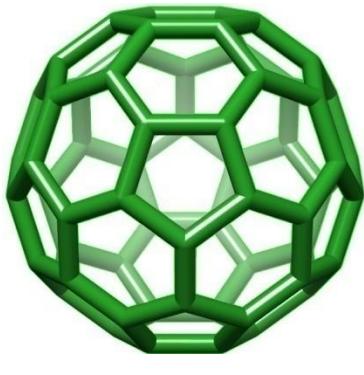


Рис. 27. Фуллерен  $C_{60}$

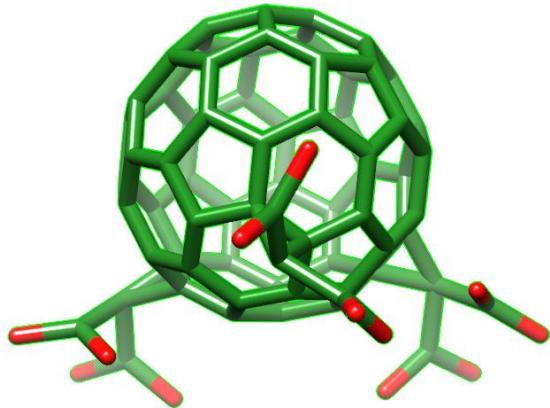


Рис. 28. Трималонатфуллерен  $C_3$

### 3.3. Молекулярная динамика фуллеренов

Проведены расчеты фуллерена  $C_{60}$  в вакууме и воде при 300 К в течение 200 пс, радиус молекулы составляет  $3,556 \pm 0,089$  Å в вакууме и  $3,579 \pm 0,005$  в воде, что хорошо согласуется с экспериментальными данными (Рис. 29, Рис. 30). Аналогичные расчеты были проведены для трималонатфуллерена: радиус молекулы составил  $4,296 \pm 0,045$  Å в вакууме и  $4,523 \pm 0,001$  в воде.

Протокол молекулярной динамики фуллерена в вакууме и воде см. в приложении 2:

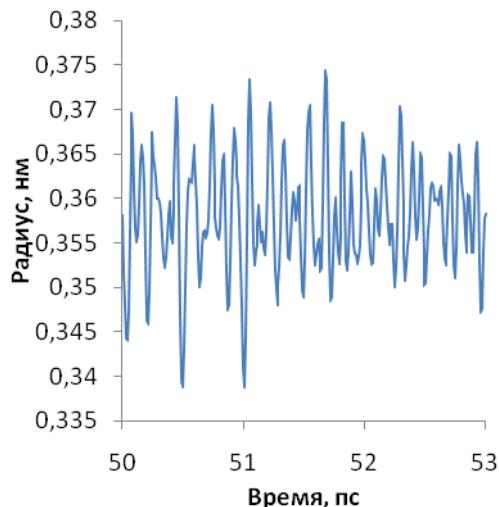


Рис. 29. Зависимость радиуса фуллерена от времени в вакууме

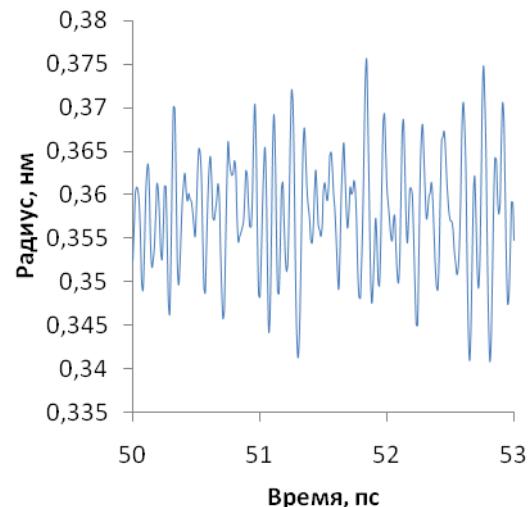
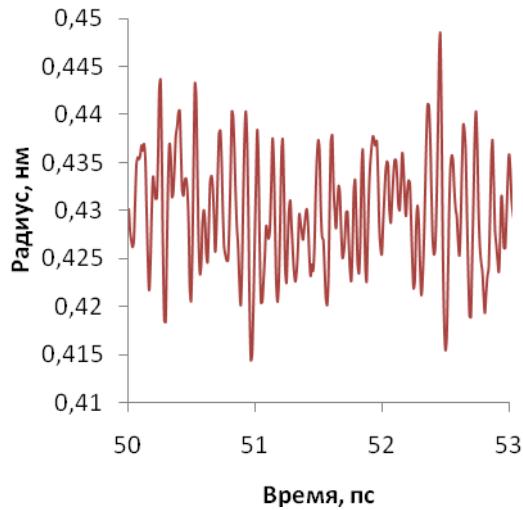
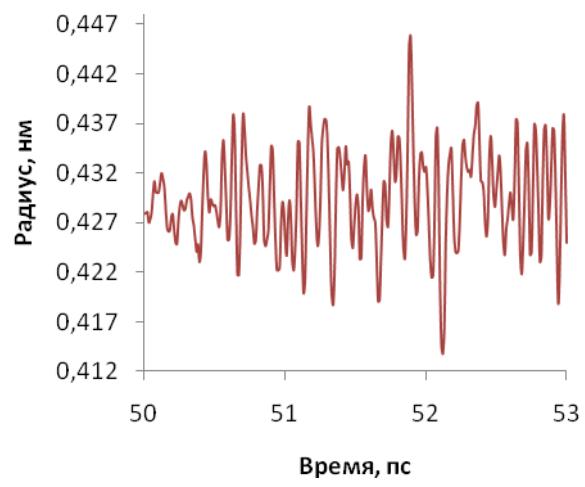


Рис. 30. Зависимость радиуса фуллерена от времени в воде

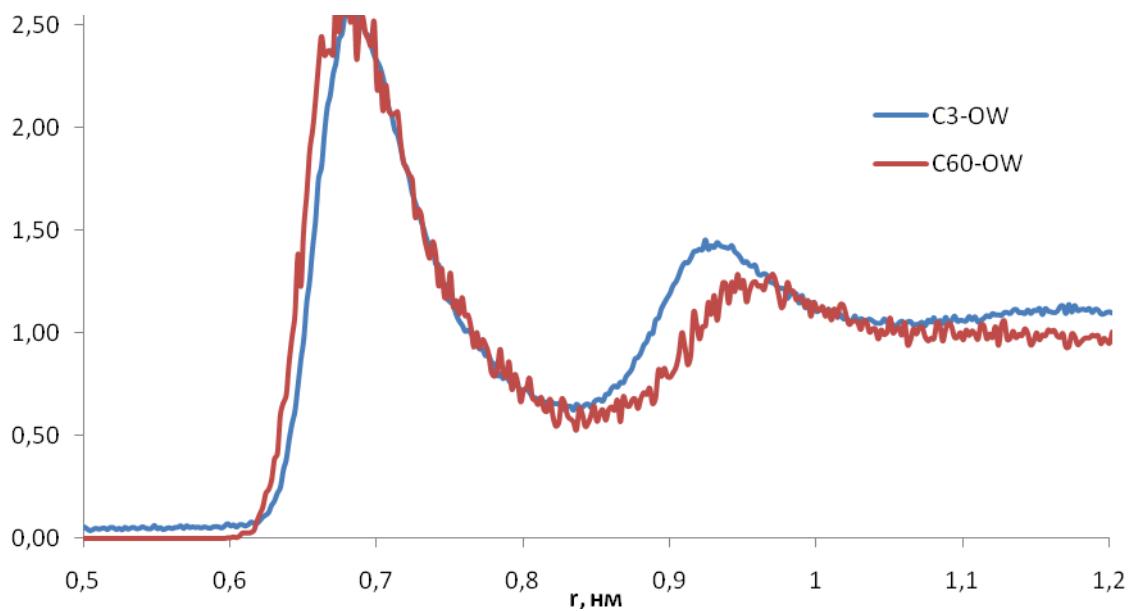


**Рис. 31. Зависимость радиуса т trimalonатфуллерена от времени в вакууме**



**Рис. 32. Зависимость радиуса т trimalonатфуллерена от времени в вакууме в воде.**

Кроме того была построена радиальная функция распределения молекул фуллеренов относительно атомов кислорода воды (Рис. 33). Она характеризует распределение молекул растворителя относительно растворенного вещества и имеет осциллирующий характер с периодом равным длине молекулы растворителя. В данном случае радиальная функция распределения имеет первый максимум в точке 7 Å (радиус фуллерена), далее осциллирует с периодом 2,5 Å.

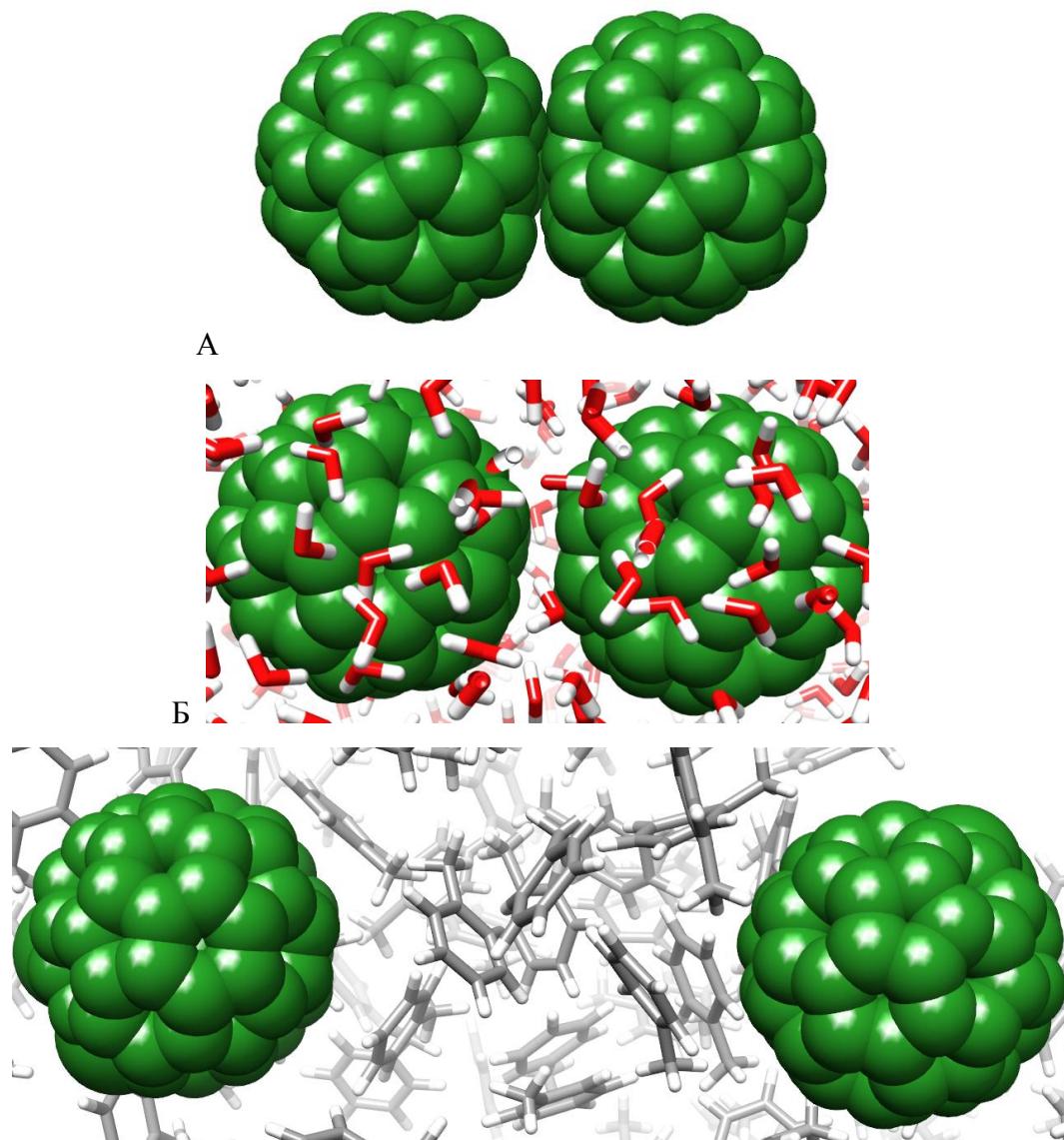


**Рис. 33. Радиальная функция распределения  $g(r)$  для фуллеренов и кислородов воды.**

### 3.4 Расчет потенциала средней силы

Как было отмечено выше, потенциал средней силы является важной характеристикой взаимодействия фуллеренов в различных средах. В данной работе были

исследованы взаимодействия фуллеренов между собой в вакууме, воде и толуоле. Начальные структуры были сделаны при помощи umbrella sampling (см. подробное описание метода в приложении 3): фуллерены раздвигались друг от друга на расстояние от 0 до 2 нм в вакууме, воде и толуоле (Рис. 34).



**Рис. 34. Фуллерены на расстоянии 0, 1 и 2 нм в вакууме, воде и толуоле (А, Б, В)**

Далее для каждой структуры запускалась молекулярная динамика, и между двумя молекулами в течение нескольких наносекунд рассчитывалась сила взаимодействия. Благодаря большому расчетному времени в каждой точке ошибка расчета составляет не более 5%. (Рис. 35, Рис. 36, Рис. 37)

Протокол молекулярной динамики расчета ПСС фуллеренов в воде, вакууме и толуоле см. в приложении 2:

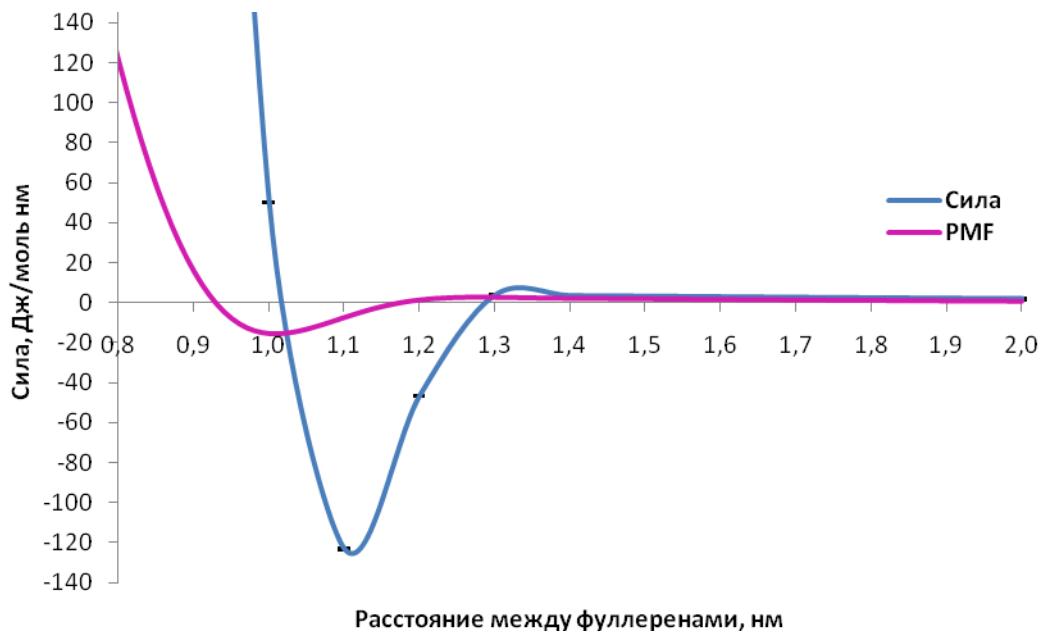


Рис. 35. Зависимость средней силы от расстояния и профиль PMF между двумя фуллеренами в вакууме.

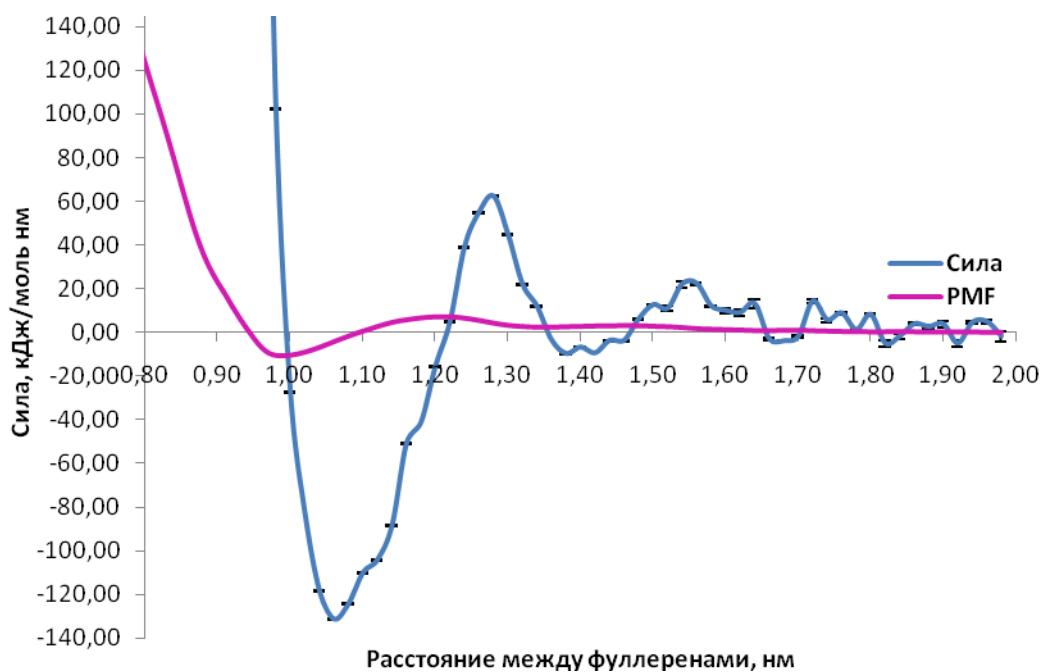


Рис. 36. Зависимость средней силы от расстояния и профиль PMF между двумя фуллеренами в воде

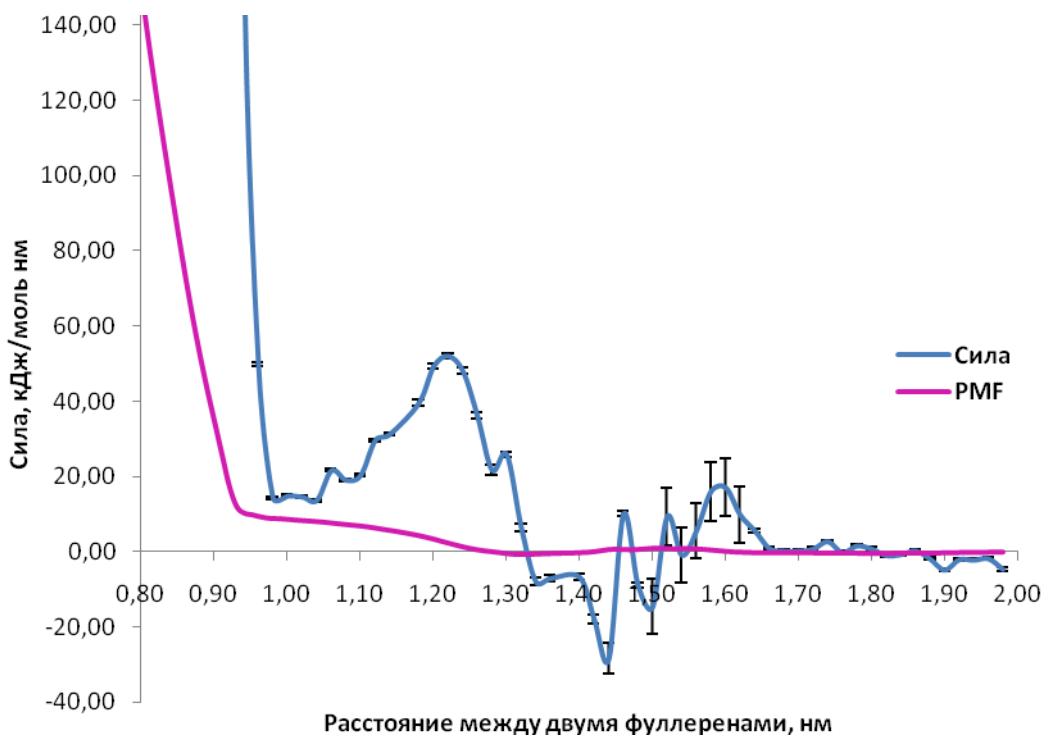


Рис. 37. Зависимость средней силы от расстояния и профиль PMF между двумя фуллеренами в толуоле.

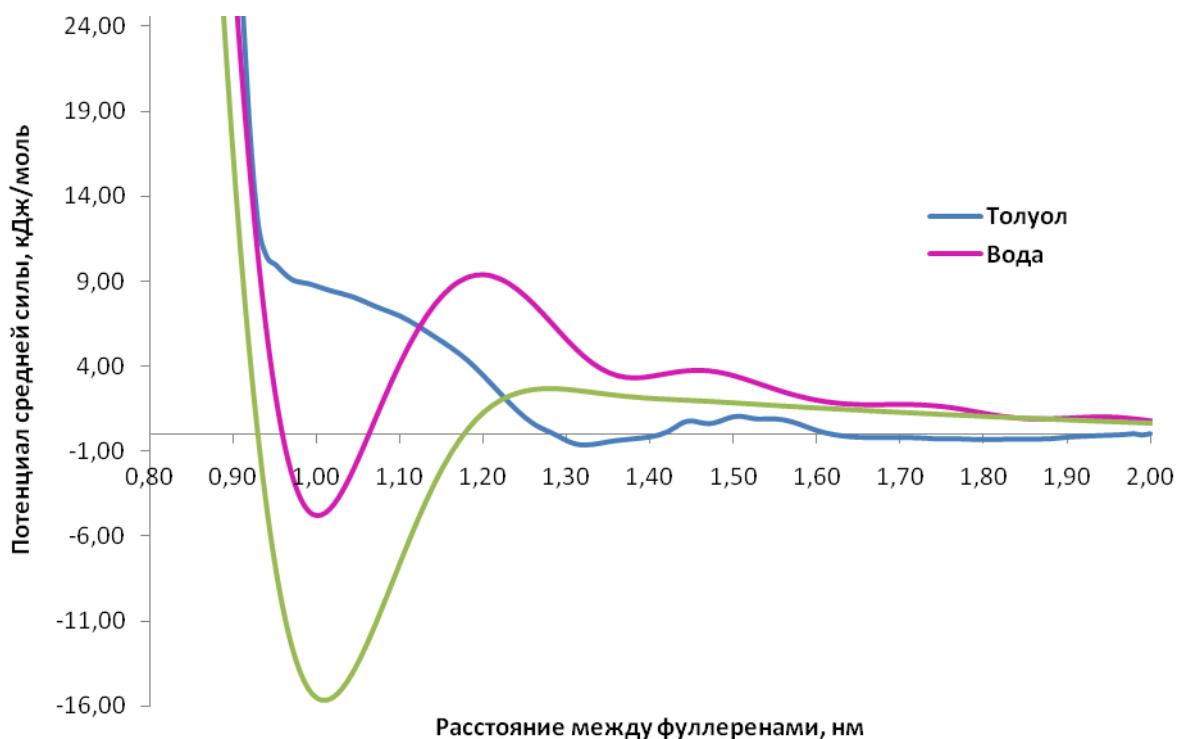


Рис. 38. Профиль потенциала средней силы двух фуллеренов в вакууме, воде и толуоле.

Как видно из графика на Рис. 38, энергия гидрофобного взаимодействия неполярных молекул в воде, отвечающая глубине потенциальной ямы, превосходит энергию

дисперсионного взаимодействия фуллеренов в вакууме. В растворителе период колебаний ПСС равен диаметру молекул воды и толуола. Поскольку первый минимум на графике потенциала средней сил «отвечает» за гидрофобные взаимодействия, то по его величине можно сделать вывод о силе этих взаимодействий в разных растворителях. Для толуола же мы вовсе не наблюдаем первого минимума как такового - растворитель неполярный, и гидрофобные взаимодействия между фуллеренами настолько ослаблены, что молекулам выгоднее существовать поодиночке, нежели в агрегатах (как например в воде). По значениям первого минимума (разница минимумов в вакууме и воде составляет 8 кДж/моль), можно судить о растворимости фуллерена в различных средах: толуол > вода > вакуум.

Таким образом, проверка свойств фуллерена и их совпадение с литературными данными дает нам право утверждать о правильности полученной модели молекулы.

## ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МЕМБРАН

### 4.1. Постановка задачи

Для реализации заданной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование физических свойств про- и эукариотической мембран.
2. Подбор оптимальных параметров для проведения молекулярной динамики.

### 4.2. Эукариотическая мембрана

Молекулярная модель эукариотической мембраны из 128 гидратированных (степень гидратации – 27,7 молекул воды на липид) ДПФХ (Рис. 39) и ее топология были взяты с сайта Tielman и Berendsen [61]. Исходная мембрана релаксировалась в течение 2 нс. Для проверки применимости данной модели рассчитывались следующие физико-химические параметры: толщина билипидного слоя, площадь, приходящаяся на липидную головку и плотность атомов.

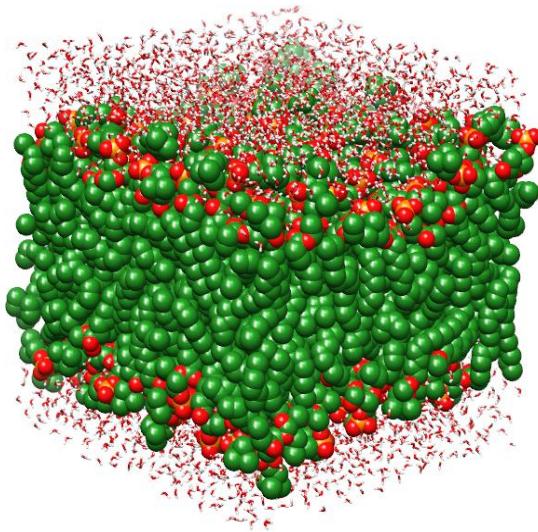


Рис. 39. Мембрана ДПФХ с водой

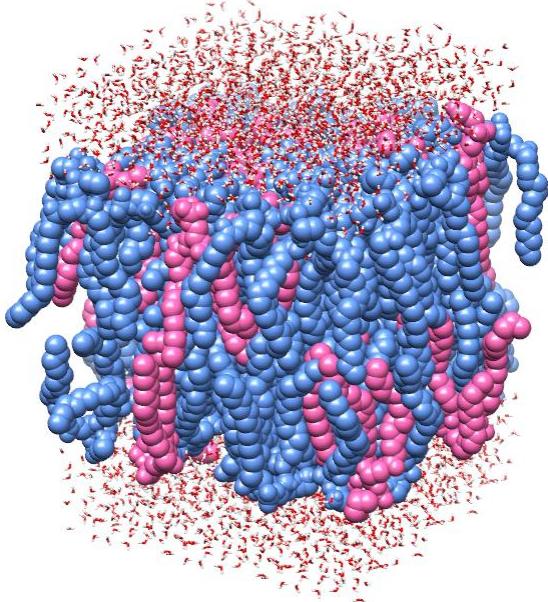


Рис. 40. Мембрана POPC/POPG с водой

Протокол молекулярной динамики см. в приложении 2.

Для расчета толщины мембраны и площади, приходящейся на головку был использован скрипт GridMAT-MD [62] и программа визуализации gnuplot [63]. Средняя площадь липидной головки  $64,2 \text{ \AA}^2$  до релаксации и  $63,6 \text{ \AA}^2$  после двух наносекунд динамики. Согласно двумерной карте толщина мембранны находится в пределах от 3,5 до 4 нм, что соответствует толщине нативной мембранны (Рис. 41).

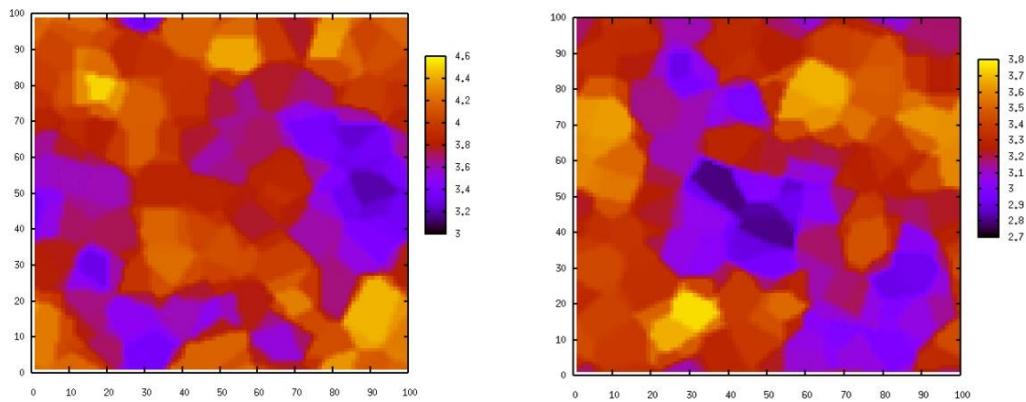


Рис. 41. Двумерная карта толщины мембраны до (слева) и после релаксации (справа)

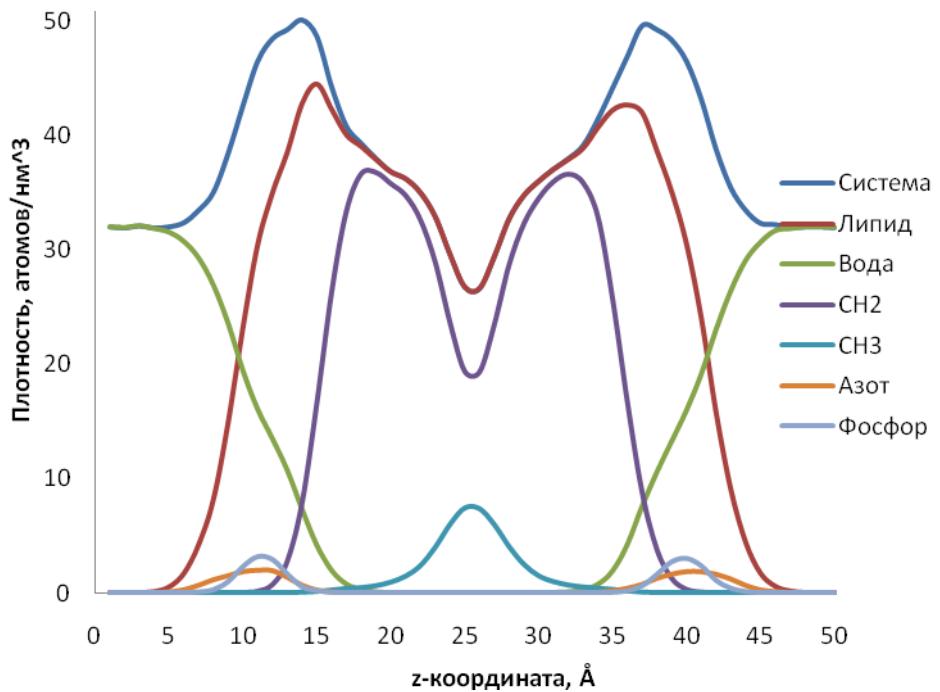


Рис. 42. Профиль плотности отрелаксированной мембраны ДПФХ.

Профиль плотности атомов в  $\text{нм}^3$  (Рис. 42) практически идентичен приведенному в статье Tielemans с соавторами [64].

### 4.3. Прокариотическая мембрана

Молекулярная модель прокариотической мембраны из 128 гидратированных (степень гидратации – 26 молекул воды на липид) ПОПЭ/ПОПГ и ее топология были взяты с того же сайта, что и эукариотическая. Заряд мембраны -32. Исходная мембрана релаксировалась в течение 2 нс. Для проверки применимости данной модели рассчитывались те же физико-химические параметры, что и для эукариотической (Рис. 43, Рис. 44).

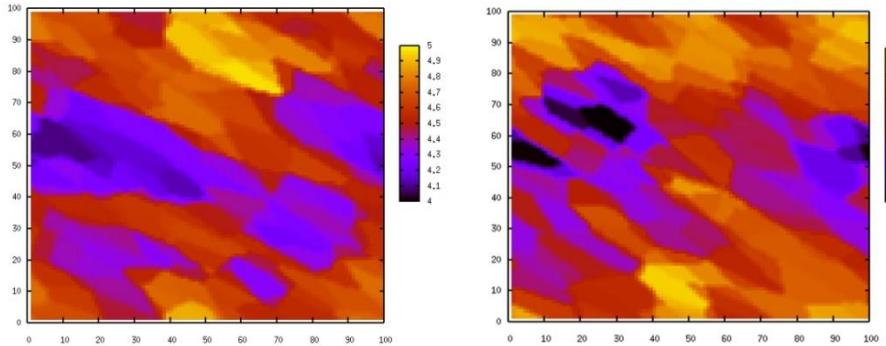


Рис. 43. Двумерная карта толщины мембраны до (слева) и после релаксации (справа)

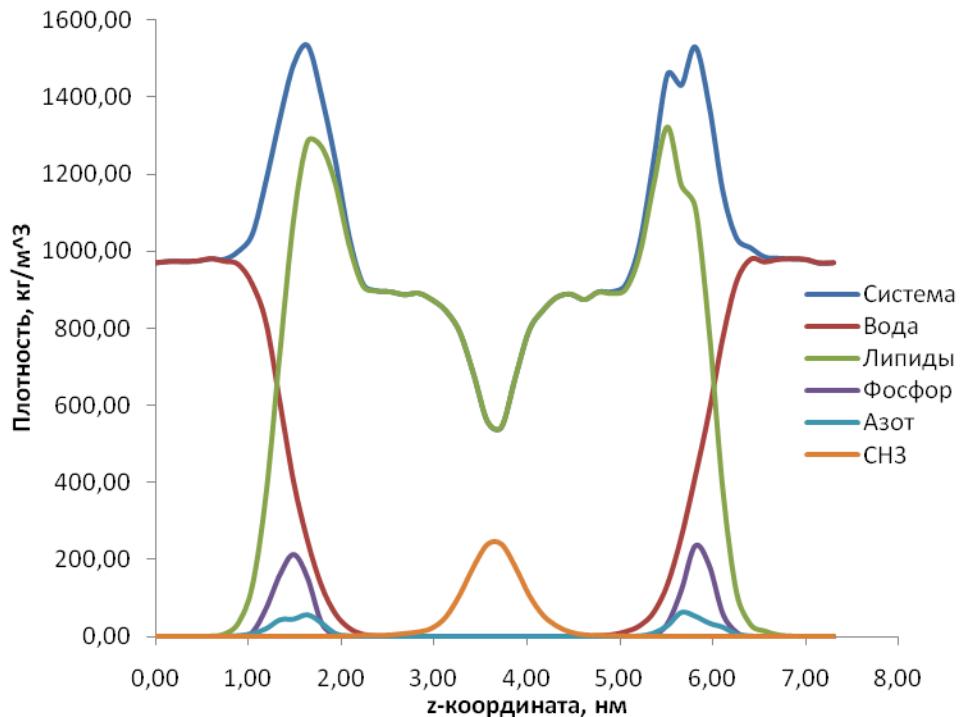


Рис. 44. Профиль плотности отрелаксированной мембраны ПОПГ/ПОПЭ

Толщина мембраны от 3,5 до 5 нм, площадь липидной головки  $55,6 \text{ \AA}^2$  до релаксации и  $58,1 \text{ \AA}^2$  - после.

Таким образом, выбранные модели мембран подходят для проведения молекулярно-динамического эксперимента.

# ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФУЛЛЕРЕНОВ С МЕМБРАНАМИ

## 5.1. Постановка задачи

1. Создание молекулярных моделей мембран про- и эукариот с фуллереном ( $C_{60}$ ) и его производным трималонатфуллереном  $C_3$ .
2. Исследование проникновения фуллерена и его производного  $C_3$  через биомембранны: пассивного и активного (с приложением силы к центру массы фуллерена и его производного).
3. Расчет профилей свободной энергии фуллерена и его производного с биомембранными.

Были созданы три молекулярнодинамических модели:  $C_{60}$  с гидратированной мембраной ДПФХ,  $C_{60}$  с гидратированной мембраной ПОПЭ/ПОПГ,  $C_3$  с гидратированной мембраной ДПФХ. Протоколы молекулярной динамики представлены в приложении 2.

## 5.2. Гидратированная мембрана из 128 ДПФХ с фуллереном

Фуллерен был помещен на расстоянии 2,84 нм от центра мембраны и на прямую не контактировал с поверхностью мембраны. Система была помещена в ящик размером  $6,56 \times 6,59 \times 6,69$  нм и минимизирована. После чего проводились расчеты.

Молекулярная динамика в течение 10 нс не привела к самопроизвольному «прыжку» фуллерена внутрь мембраны, после первой наносекунды моделирования произошла сорбция молекулы в область гидрофильных головок (Рис. 46), где она и оставалась до конца симуляции.

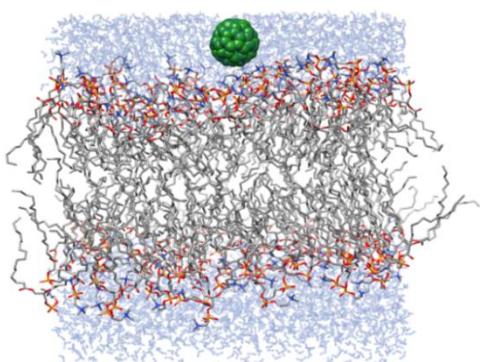


Рис. 45. Фуллерен с гидратированной мембраной ДПФХ.

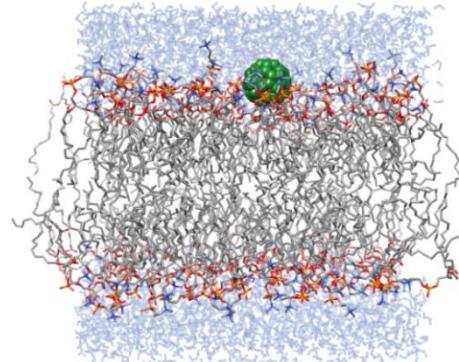
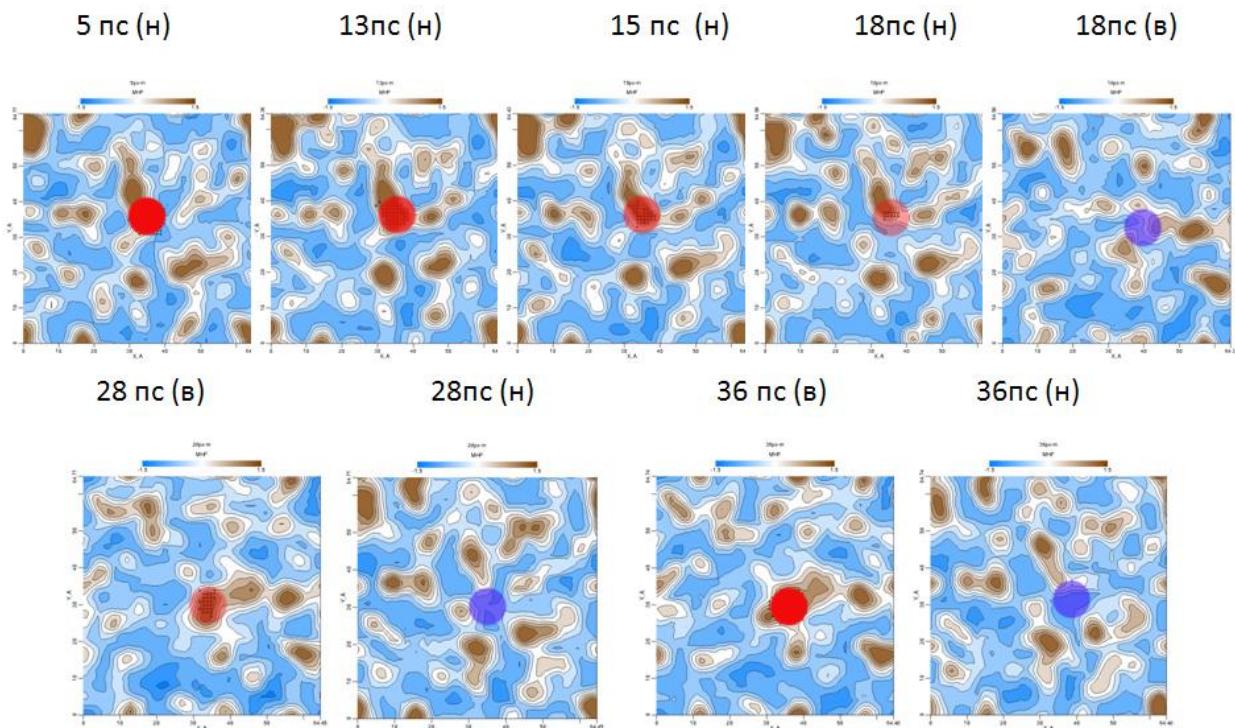


Рис. 46. Вид системы после первой наносекунды моделирования.

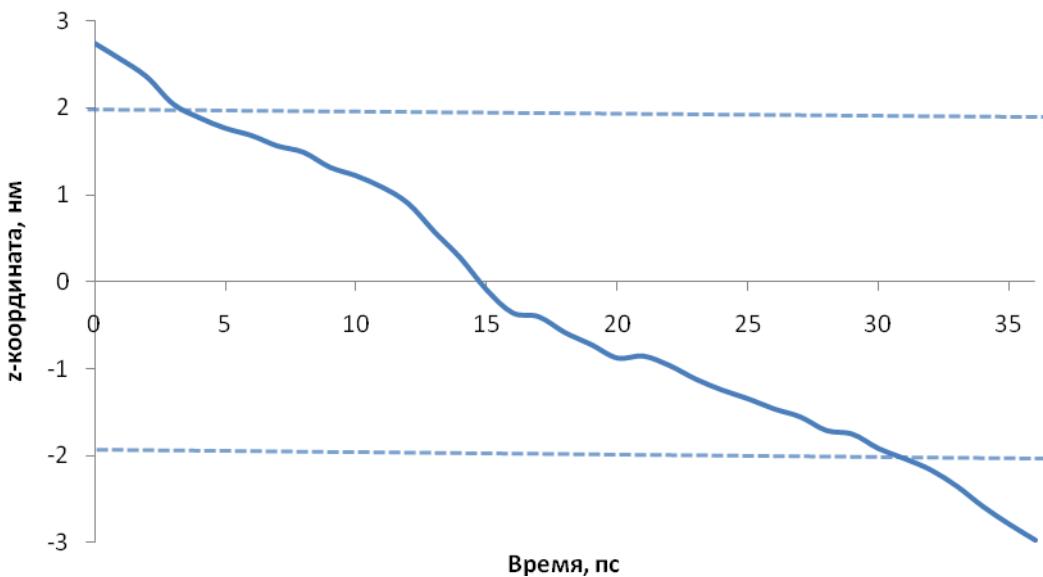
Чтобы изучить динамику проникновения фуллерена через мембрану, к первому было приложена сила 8,5 ккал/моль· $\text{\AA}$ . График зависимости расстояния между центрами масс

фуллерена и мембранны от времени представлен на Рис. 48. Фуллерен преодолевает расстояние в 5,7 (начальное расстояние – 2,75 нм от центра мембранны, конечное – 2,95 нм) нм за 36 пс. В области гидрофобных головок оказывается через 5 пс, преодолевая расстояние в 1 нм, а в центре мембранны – через 15 пс. Вторую половину пути – до области гидрофобных головок – фуллерен проходит за 13 пс. Целостность мембранны за время прохождения фуллерена не нарушается.

Кроме того, построены карты гидрофобности [65] для мембранны и фуллерена. Они наглядно демонстрируют, что при проникновении фуллерена, головки липидов раздвигаются, но не выбиваются и не увлекаются вовнутрь мембранны (Рис. 47). По картам также можно судить о возникновении и времени жизни микропор в области липидных головок мембранны: на 28 пс в месте проникновения фуллерена не обнаруживается гидрофобной области - головки возвращаются в исходное положение.



**Рис. 47. Гидрофобные карты поверхности мембранны с фуллереном. (н) и (в) - нижняя и верхняя части бислоя. Красным кругом обозначен фуллерен, по мере проникновения в мембрану прозрачность становится выше (см. рис. 48). Синими кругами обозначены места, куда вошла или откуда должна выйти молекула фуллерена.**

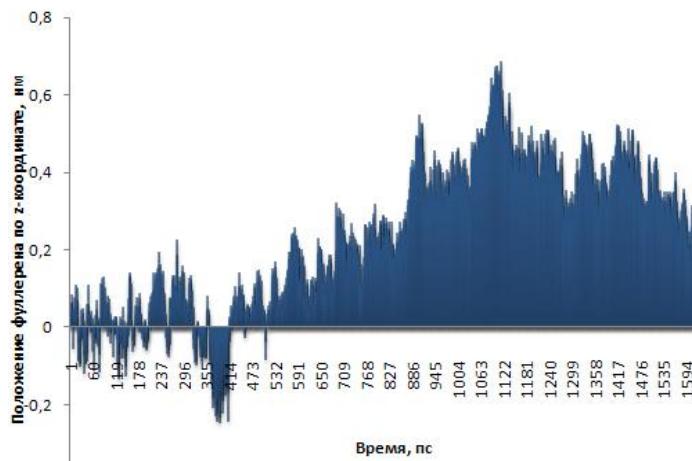


**Рис. 48. График зависимости расстояния от времени центров масс фуллерена и мембраны.**

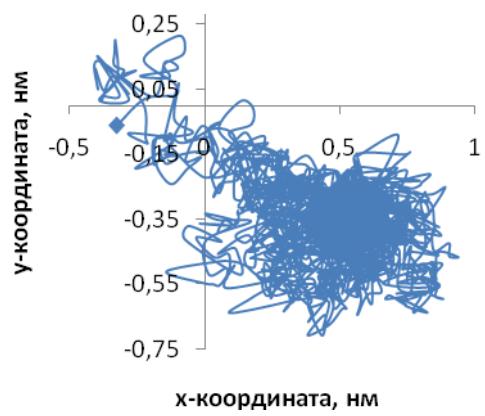
**Пунктиром обозначены границы мембраны.**

Для детального изучения поведения молекулы фуллерена в мемbrane был построен потенциал средней силы (Рис. 51). Стоит отметить, что полученный график совпадает с результатами Qiao с соавторами.

Из рисунка следует, что для преодоления области головок молекуле необходимо перепрыгнуть небольшой барьер величиной порядка 10 кДж/моль. Минимум энергии (-34 кДж/моль) приходится на 0,75 нм от центра мембраны. А это означает, что, находясь в водной среде, фуллерен будет стремиться в область гидрофобных хвостов.



**Рис. 49. Положение центра массы молекулы фуллерена относительно центра массы мембраны по z-координате.**



**Рис. 50. Положение центра массы молекулы фуллерена относительно центра массы мембраны по координатам x-y**

Особого внимания заслуживает тот факт, что молекула не оказывается в центре мембраны - между хвостами, а «предпочитает» некоторую удаленность в углеводородные

цепи (Рис. 49, Рис. 50). Скорее всего, такое положение фуллерена связано с сильными

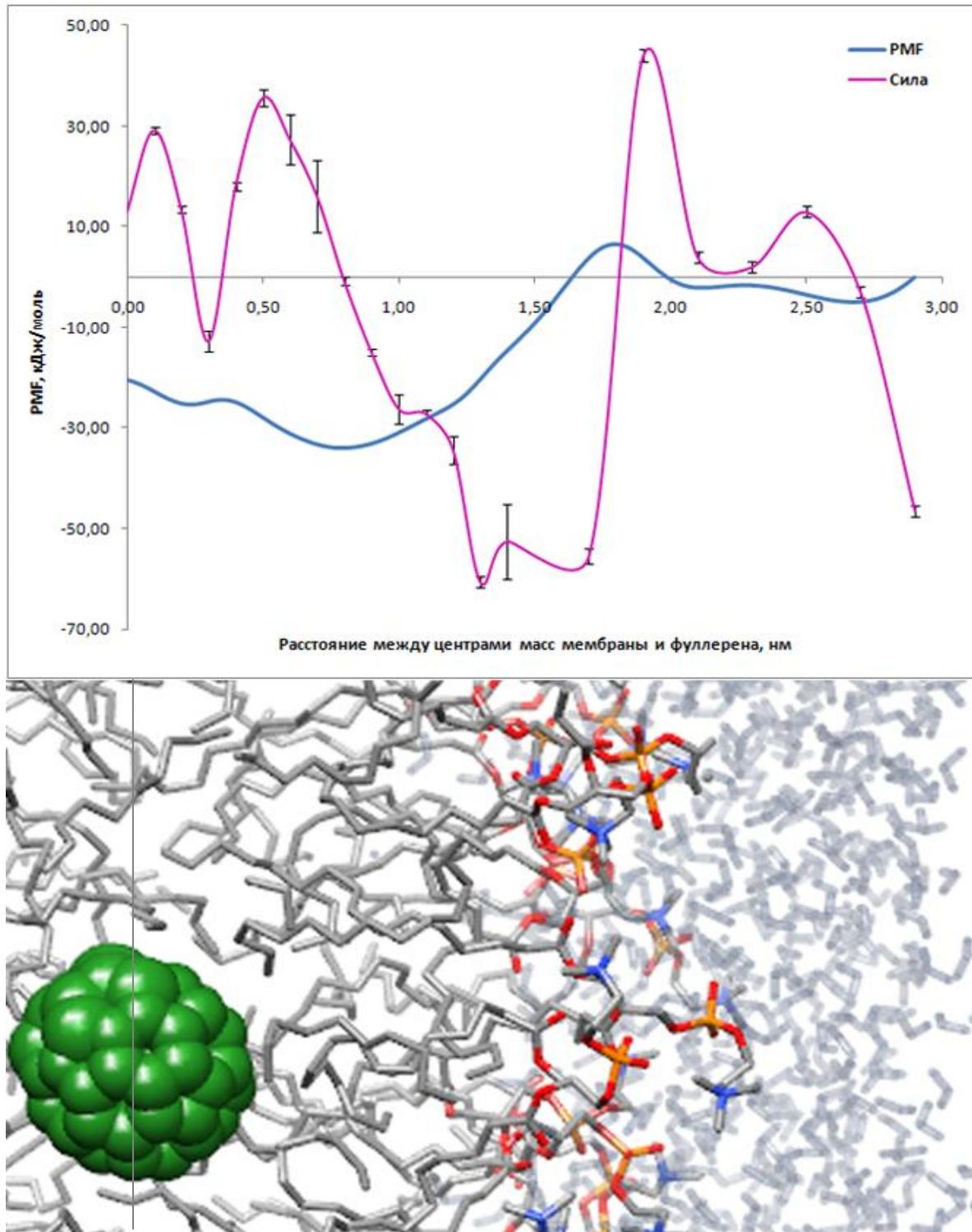


Рис. 51. Профиль свободной энергии взаимодействия фуллерена с эукариотической мембраной дисперсионными взаимодействиями молекулы с плотной упаковкой липидных хвостов. А перемещение C<sub>60</sub> в область гидрофильных головок является энергетически невыгодным из-за деформации последних.

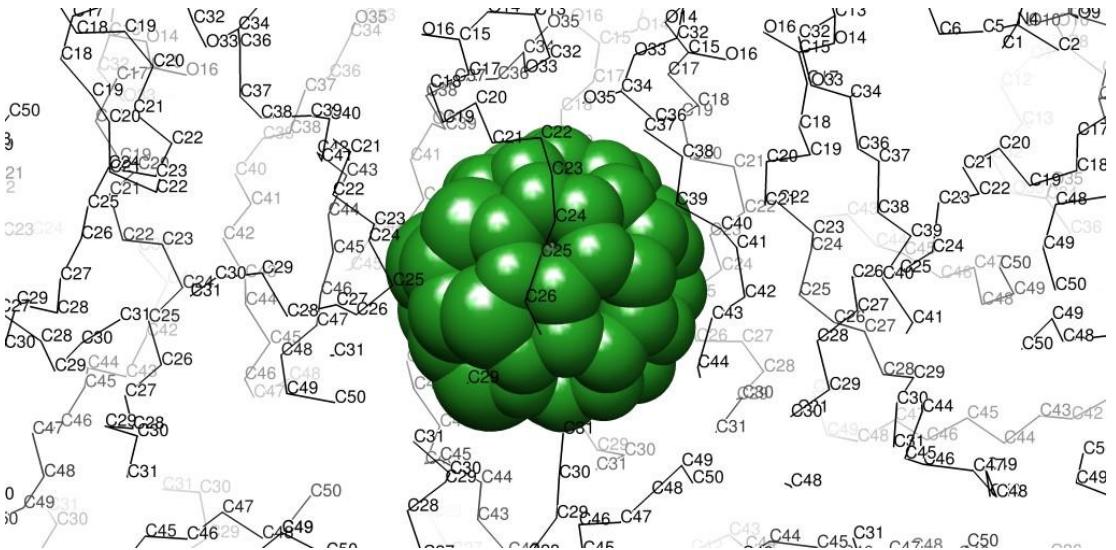


Рис. 52. Ориентация липидных хвостов вокруг фуллерена.

Для того чтобы узнать, внес ли фуллерен существенные изменения в структуру мембраны (Рис. 52), находясь в ее центре, были вычислены параметры порядка для углеводородных цепей. Как видно из графика на Рис. 53, параметр порядка уменьшился, а это означает, что произошла деструктуризация мембраны и переход ее в более жидкое состояние. С ростом номера атома углеродной цепи параметр порядка падает, что соответствует экспериментальными исследованиями.

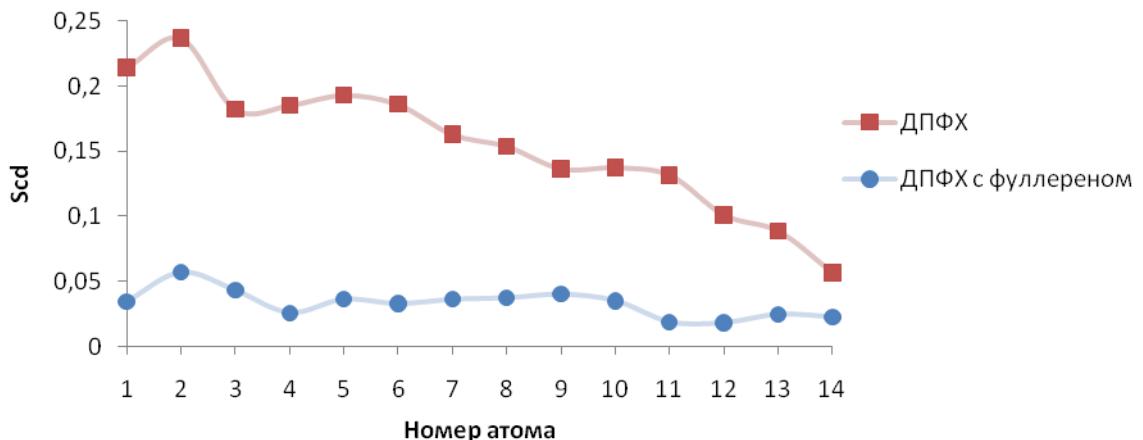


Рис. 53. Параметр порядка для углеводородных хвостов мембранны.

### 5.3. Гидратированная мембрана из 128 ДПФХ с трималонатфуллереном

Трималонатфуллерен был помещен на расстоянии 3,13 нм от центра мембраны (степень гидратации 46,2) и на прямую не контактировал с поверхностью мембраны. Система была помещена в ящик размером 6,98×6,98×6,76 нм и минимизирована (Рис. 54). После чего проводились расчеты.

Равновесная молекулярная динамика (длина траектории 10 нс) привела к сорбции молекулы в область гидрофильных головок через 4,5 нс (Рис. 54), где фуллерен и оставался до конца симуляции.

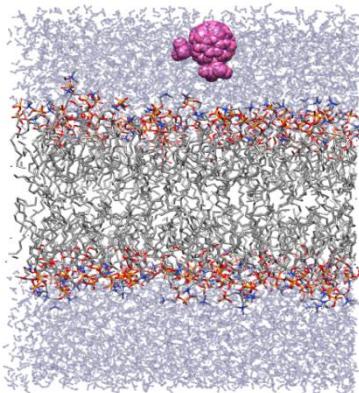


Рис. 54. Трималонатуллерен с гидратированной мембраной ДПФХ.

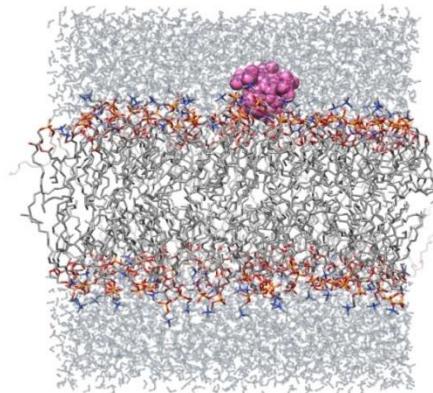


Рис. 55. Вид системы после пятой наносекунды моделирования.

Управляемая молекулярная динамика (к трималонатфуллерену была приложена сила 8,5 ккал/моль· $\text{\AA}$ ) показала (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**), что молекула  $C_3$  преодолела расстояние в 6,8 нм за 850 пс, а мембрану за 755 пс (что почти в 20 раз дольше, чем для немодифицированного фуллерена).

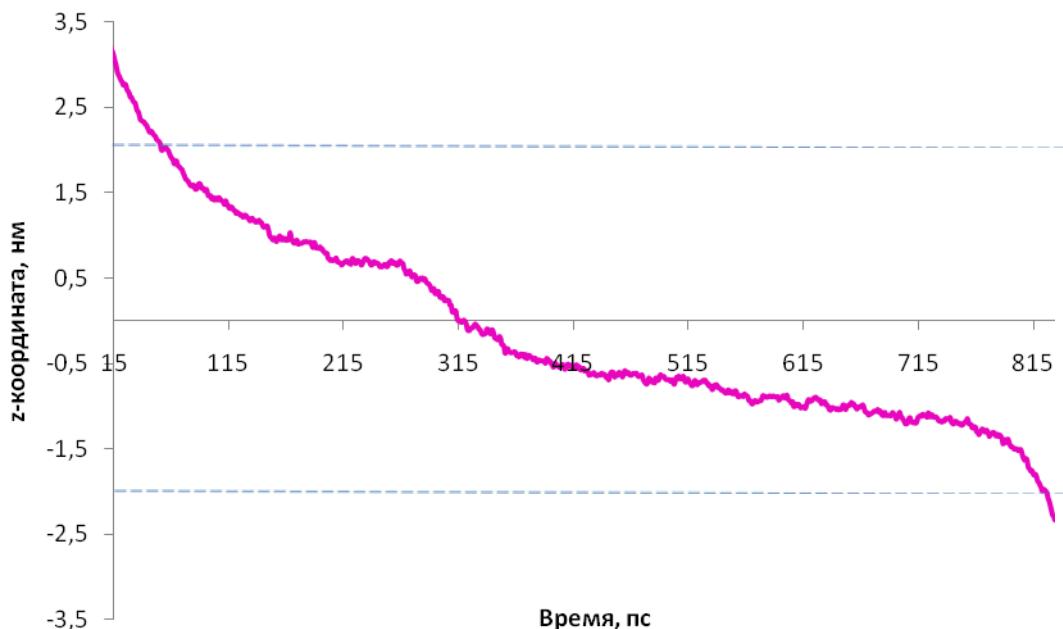


Рис. 56. График зависимости расстояния от времени центров масс трималонатфуллерена и мембранны. Пунктиром обозначены границы мембранны.

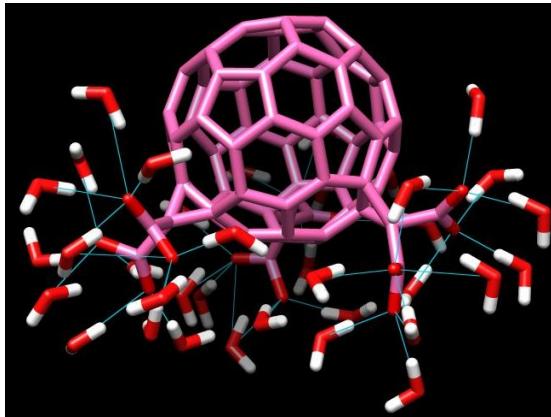


Рис. 57. Водородные связи молекулы трималонатфуллерена в воде.

Вокруг молекулы трималонатфуллерена в воде образуется гидратная оболочка (Рис. 57), состоящая примерно из 40 молекул воды (на каждый атом кислорода приходится по 3-4 молекулы воды). Причем при проникновении  $C_3$  вглубь мембраны вода увлекается за ним (Рис. 58), а количество водородных связей сохраняется примерно на одном и том же уровне (Рис. 59).

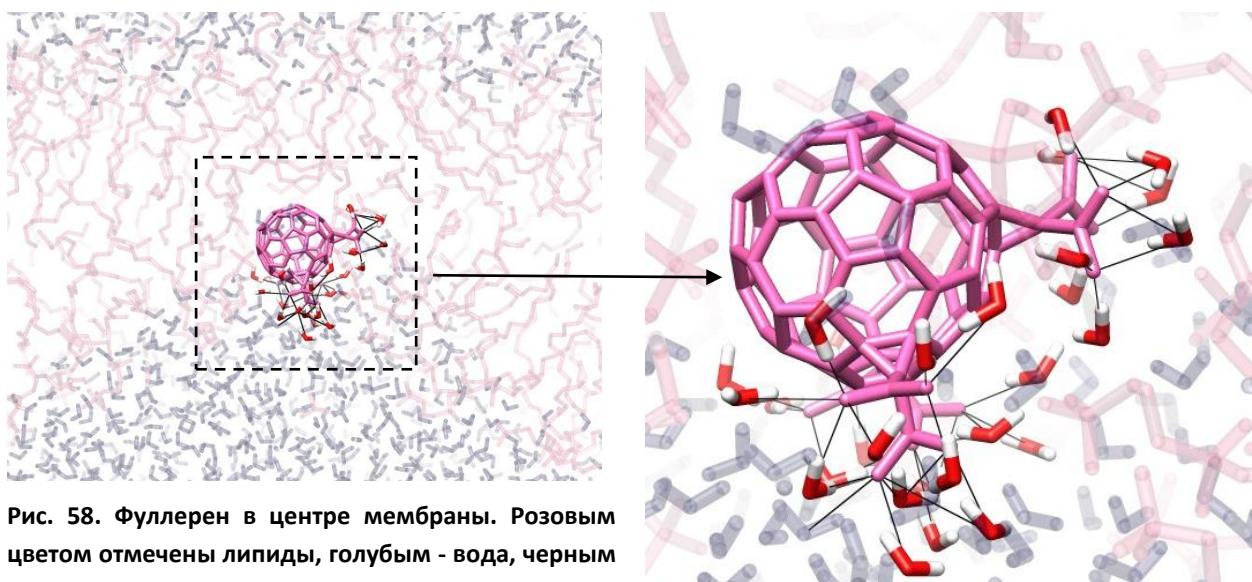


Рис. 58. Фуллерен в центре мембраны. Розовым цветом отмечены липиды, голубым - вода, черным показаны водородные связи.

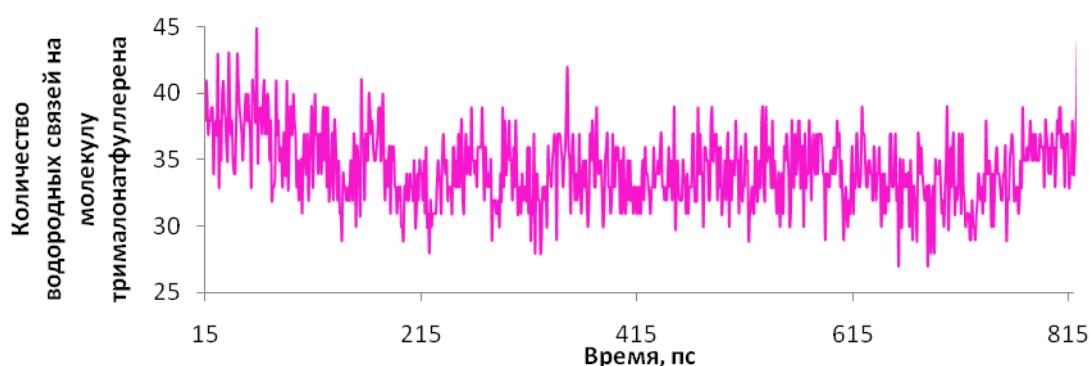


Рис. 59. График зависимости количества водородных связей, приходящихся на одну молекулу  $C_3$  от времени.

Профиль свободной энергии, построенный для мембраны и модифицированного фуллерена показан на Рис. 60. Как следует из графика,  $C_3$  энергетически невыгодно

проникать в мембрану - с уменьшением расстояния между фуллереном и мембраной отталкивающая сила растет, и только в центре наблюдается локальный минимум. Такое препятствие проникновению трималонатфуллерена внутрь мембраны может быть связано с гидрофильной частью молекулы, которая несет на себе отрицательный заряд и гидратную оболочку.

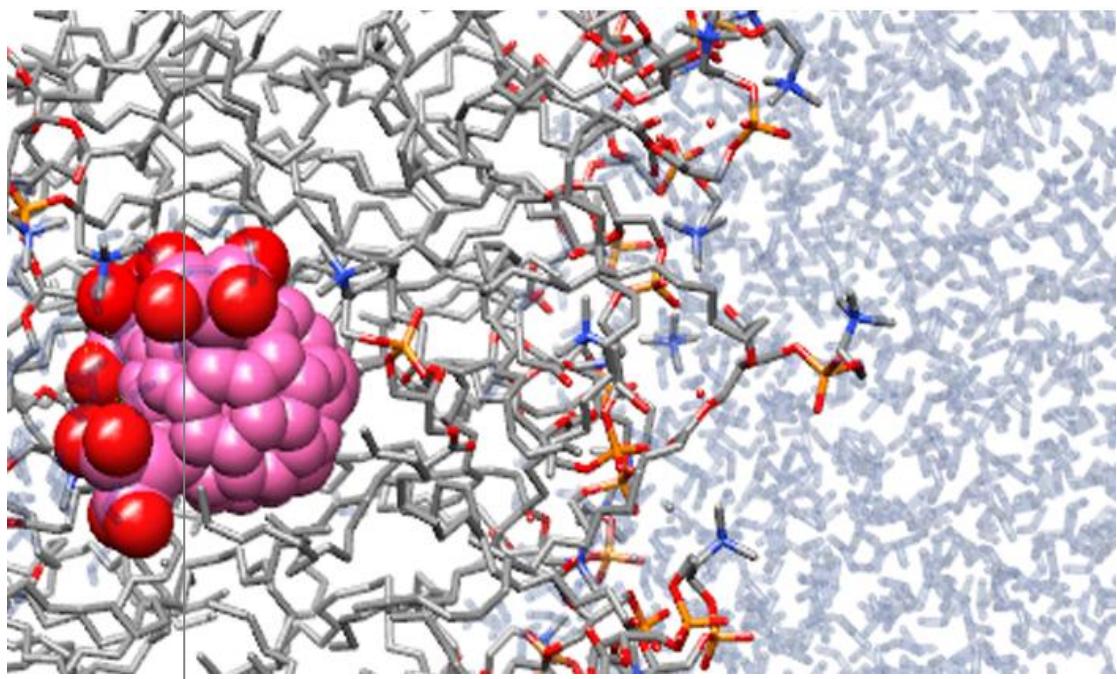
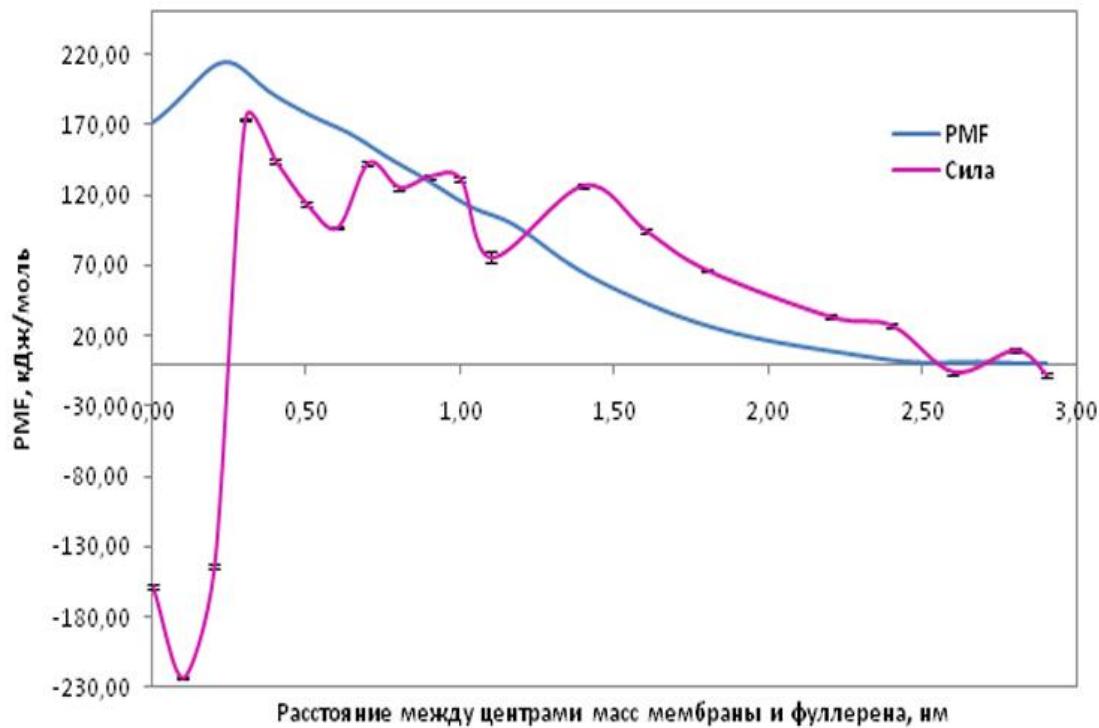


Рис. 60. Профиль свободной энергии взаимодействия трималонатфуллерена с эукариотической мембраной

## 5.4. Гидратированная мембрана из 128 ПОПЭ/ПОПГ с фуллереном

Фуллерен был помещен на расстоянии 2,91 нм от центра мембраны и не контактировал с ее поверхностью. Система была помещена в ящик размером  $6,7 \times 6,7 \times 6,94$  нм и минимизирована (Рис. 61). После чего проводились расчеты.

Молекулярная динамика в течение 10 нс показала, что сорбция молекулы в область головок не происходит (Рис. 62). Скорее всего, это связано с плотной гидратной оболочкой, которая образуется вокруг заряженной мембраны (Рис. 63).

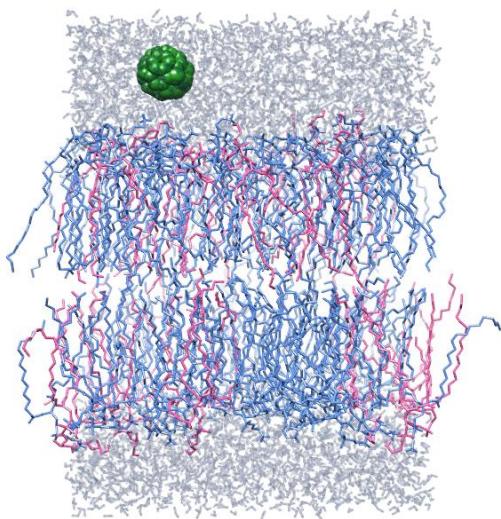


Рис. 61. Фуллерен с гидратированной мембраной

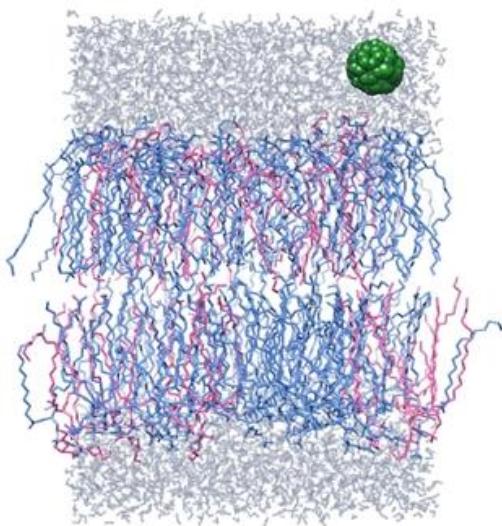


Рис. 62. Вид системы после 10 нс моделирования

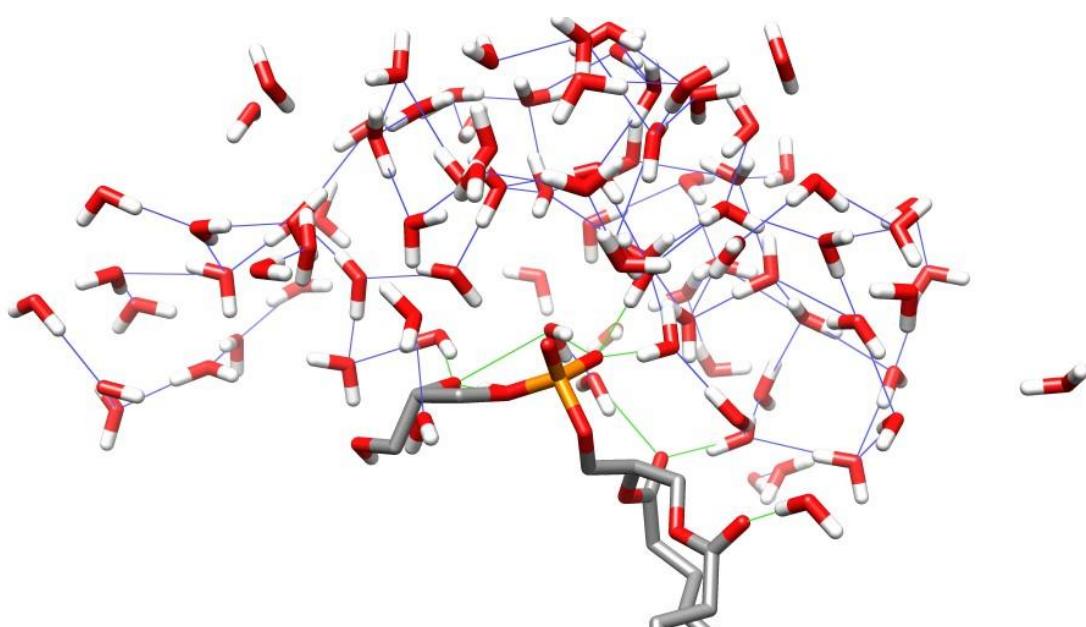


Рис. 63. Организация сети водородных связей над мембраной. Синим цветом обозначены водородные связи между молекулами воды, зеленым – между липидом и молекулами воды.

Управляемая молекулярная динамика (сила, равная 8,5 ккал/моль· $\text{\AA}$ , приложена к центру масс фуллерена) показала, что фуллерен преодолевает мембрану за 600 пс, причем движение внутри мембранны неравномерное (Рис. 64), структура мембранны не нарушилась.

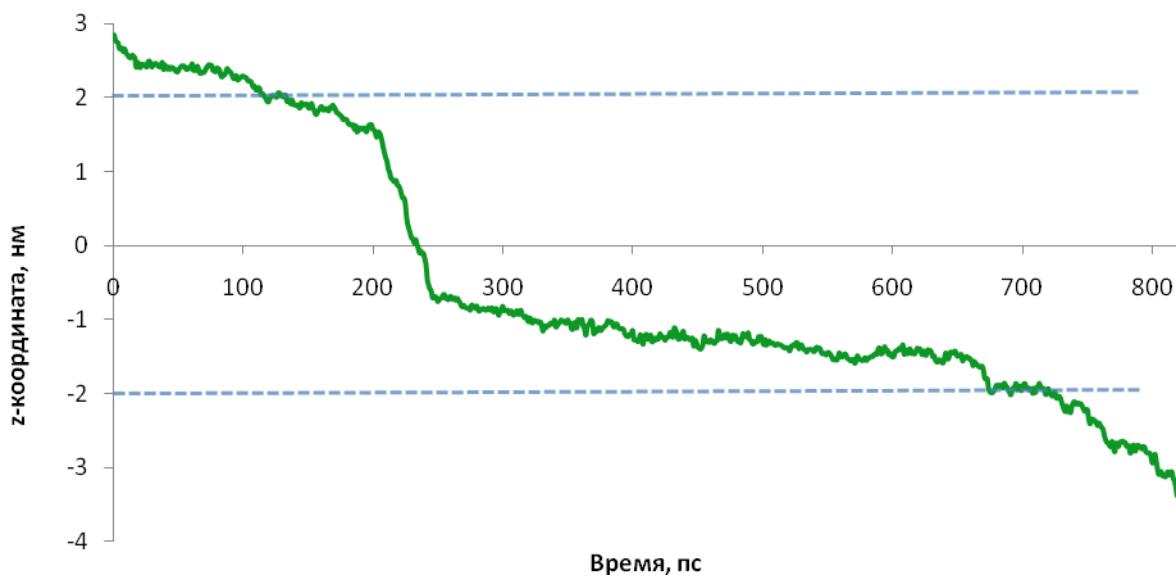


Рис. 64. График зависимости расстояния от времени центров масс фуллерена и мембранны. Пунктиром обозначены границы мембранны

На Рис. 65 представлено сравнения сети водородных связей вокруг фуллерена вблизи двух мембран – эу- и прокариотической.

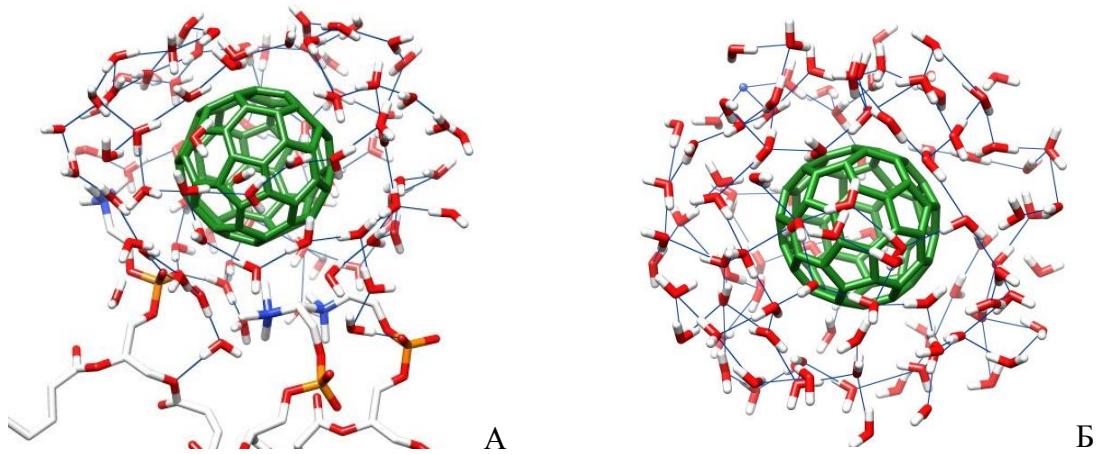


Рис. 65. Сравнение сети водородных связей вокруг фуллерена (в радиусе 6  $\text{\AA}$  от поверхности молекулы) вблизи эукариотической (А) и прокариотической (Б) мембран.

Видно, что вокруг фуллерена в прокариотической мембране больше молекул воды и водородных связей, а это в свою очередь ограничивает ее в движении и, скорее всего, является причиной трудности прохождения фуллерена в мембрану (см. Рис. 64 – 1 нм до мембранны фуллерен преодолевает за 115 пс).

Как и для двух предыдущих систем, для этой также были построены профиль потенциала средней силы (Рис. 66). Из графика следует, что фуллерен выталкивается из центра прокариотической мембраны. В области головок есть энергетический барьер в 20 кДж/моль, а в гидрофобной области мембраны – минимум 1,8 кДж/моль.

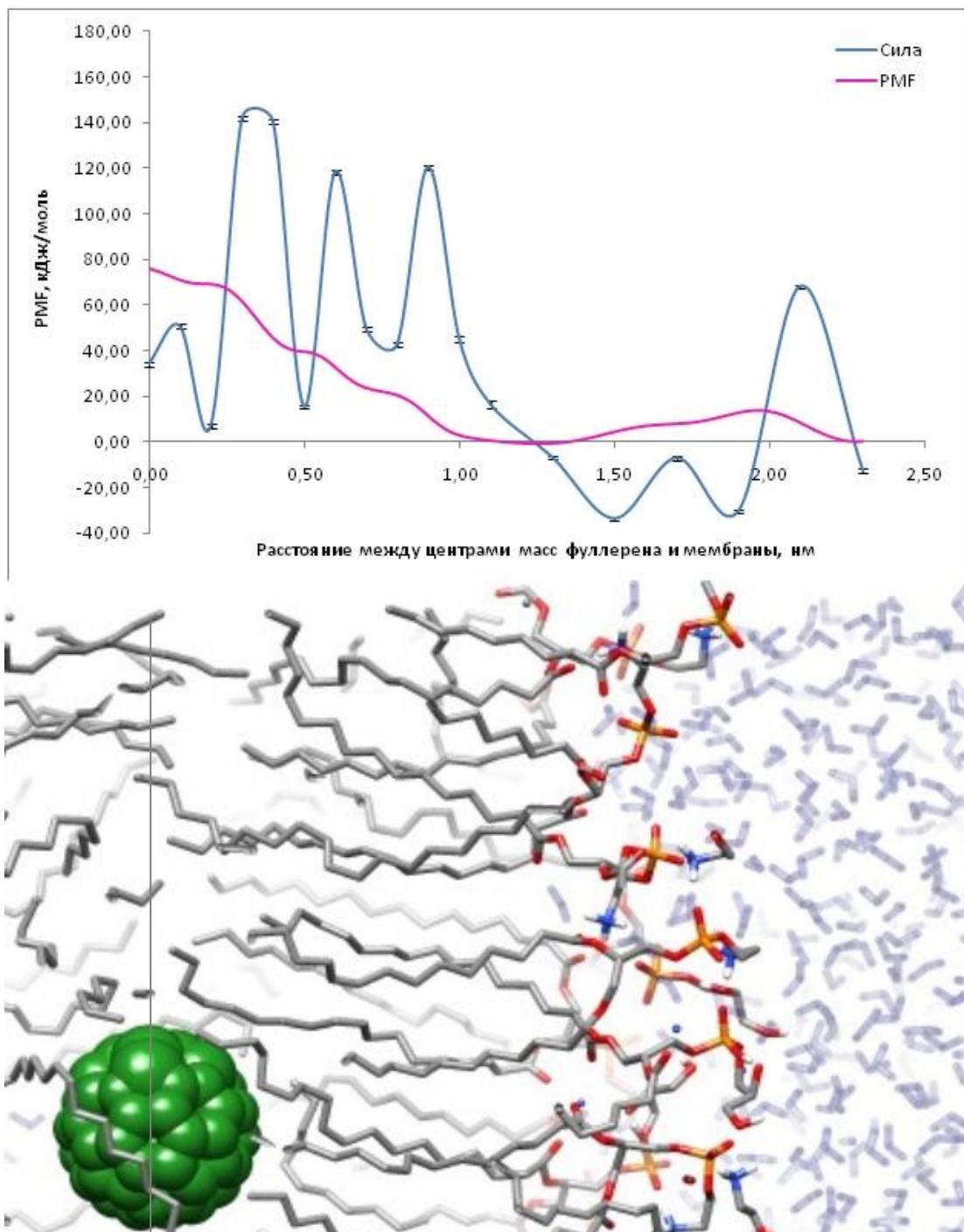


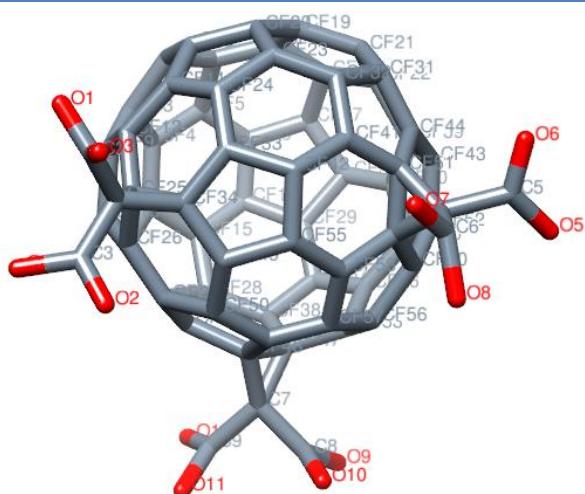
Рис. 66. Профиль свободной энергии взаимодействия фуллерена с прокариотической мембраной

## **ВЫВОДЫ**

1. Разработаны молекулярнодинамические модели фуллерена и его производного – трималонатфуллерена, двух мембран – эукариотической и прокариотической.
2. Изучена статистика взаимодействия фуллеренов в различных средах: вакууме, воде и толуоле (потенциал средней силы). Показано, что минимум свободной энергии взаимодействия фуллеренов различен для случая фуллеренов в воде и вакууме, разница составляет 8 кДж/моль. Гидрофобные взаимодействия между фуллеренами в толуоле отсутствуют.
3. Изучена динамика проникновения и накопления фуллеренов в билипидных слоях (в течение 10 нс): самопроизвольного «прыжка» в область гидрофобных хвостов не наблюдается ни в одной из систем. Сорбция молекул фуллеренов на незаряженную эукариотическую мембрану происходит в течение первых пяти наносекунд симуляции.
4. Проведен анализ проникновения фуллерена в эукариотическую мембрану с помощью карт гидрофобности. Выявлено, что «микропора» в мемbrane, образованная раздвинутыми головками липидов, имеет время жизни порядка 20 пс.
5. После проникновения в эукариотическую мембрану, фуллерен оказывается на расстоянии порядка 1 нм от центра мембранны и вызывает снижение параметра порядка  $S_{CD}$ , что говорит об общем смягчении мембранны.
6. Анализ проникновения трималонатфуллерена через липидный бислой показал, что у  $C_3$  в водном окружении образуется устойчивая гидратная оболочка из 40 молекул воды.
7. Амфи菲尔ный трималонатфуллерен не проникает внутрь эукариотической мембранны.
8. Фуллерен имеет склонность накапливаться в эукариотической мембране, нежели в мембране прокариот. Об этом свидетельствуют профили потенциала средней силы: в эукариотической мембране на расстоянии 0,75 нм от центра минимум энергии -34 кДж/моль, в прокариотической мембране сила отталкивания растет по мере приближения к ее центру.

## Приложение 1.

*Заряды атомов в молекуле трималонатфуллерена*



| № атома | Имя атома | Заряд | № атома | Имя атома | Заряд | № атома | Имя атома | Заряд |
|---------|-----------|-------|---------|-----------|-------|---------|-----------|-------|
| 1       | CF1       | 0     | 28      | CF28      | 0     | 55      | CF55      | 0     |
| 2       | CF2       | 0     | 29      | CF29      | 0     | 56      | CF56      | 0     |
| 3       | CF3       | 0     | 30      | CF30      | 0     | 57      | CF57      | 0     |
| 4       | CF4       | 0     | 31      | CF31      | 0     | 58      | CF58      | 0     |
| 5       | CF5       | 0     | 32      | CF32      | 0     | 59      | CF59      | 0     |
| 6       | CF6       | 0     | 33      | CF33      | 0     | 60      | CF60      | 0     |
| 7       | CF7       | 0     | 34      | CF34      | 0     | 61      | C1        | 0,098 |
| 8       | CF8       | 0     | 35      | CF35      | 0     | 62      | C2        | 0,271 |
| 9       | CF9       | 0     | 36      | CF36      | 0     | 63      | C3        | 0,271 |
| 10      | CF10      | 0     | 37      | CF37      | 0     | 64      | C4        | 0,098 |
| 11      | CF11      | 0     | 38      | CF38      | 0     | 65      | C5        | 0,271 |
| 12      | CF12      | 0     | 39      | CF39      | 0     | 66      | C6        | 0,271 |
| 13      | CF13      | 0     | 40      | CF40      | 0     | 67      | C7        | 0,098 |
| 14      | CF14      | 0     | 41      | CF41      | 0     | 68      | C8        | 0,271 |
| 15      | CF15      | 0     | 42      | CF42      | 0     | 69      | C9        | 0,271 |
| 16      | CF16      | 0     | 43      | CF43      | 0     | 70      | O1        | -0,66 |
| 17      | CF17      | 0     | 44      | CF44      | 0     | 71      | O3        | -0,66 |
| 18      | CF18      | 0     | 45      | CF45      | 0     | 72      | O2        | -0,66 |
| 19      | CF19      | 0     | 46      | CF46      | 0     | 73      | O4        | -0,66 |
| 20      | CF20      | 0     | 47      | CF47      | 0     | 74      | O7        | -0,66 |
| 21      | CF21      | 0     | 48      | CF48      | 0     | 75      | O8        | -0,66 |
| 22      | CF22      | 0     | 49      | CF49      | 0     | 76      | O6        | -0,66 |
| 23      | CF23      | 0     | 50      | CF50      | 0     | 77      | O5        | -0,66 |
| 24      | CF24      | 0     | 51      | CF51      | 0     | 78      | O9        | -0,66 |
| 25      | CF25      | 0     | 52      | CF52      | 0     | 79      | O10       | -0,66 |
| 26      | CF26      | 0     | 53      | CF53      | 0     | 80      | O11       | -0,66 |

## Приложение 2.

*Протокол молекулярной динамики расчета свойств фуллерена и трималонатфуллерена в вакууме и воде*

|   | вакуум                     | вода                       |
|---|----------------------------|----------------------------|
| Потенциальное поле  | OPLS-AA                    | OPLS-AA                    |
| Тип интегратора   | Стохастическая<br>динамика | Стохастическая<br>динамика |
| Длина траектории  | 200 пс                     | 200 пс                     |
| Баростат  |                            | Беренсена                  |
| Постоянная баростатирования                               |                            | 0,1 пс                     |
| Температура термостата                                    | 300 К                      | 300 К                      |
| Постоянная времени изменения среды                        | 0,1 пс                     | 0,1 пс                     |
| Радиус обрезания для электростатических<br>взаимодействий | 10 Å                       | 10 Å                       |
| Радиус обрезания для взаимодействия Ван-дер-<br>Ваальса   | 10 Å                       | 10 Å                       |
| Шаг интегрирования  | 1 фс                       | 1 фс                       |
| Шаг записи в траекторный файл                             | 0,1 пс                     | 0,1 пс                     |
| Размер расчетной ячейки, нм×нм×нм                         | 2,21×2,21×2,21             | 4,72×4,72×4,72             |
| Количество молекул воды                                   | 0                          | 980                        |

*Протокол молекулярной динамики для расчета ПСС фуллерена в  
вакууме, воде и толуоле*

|   | вакуум                     | вода                       | толуол                     |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Потенциальное поле  | OPLS-AA                    | OPLS-AA                    | OPLS-AA                    |
| Тип интегратора   | Стохастическая<br>динамика | Стохастическая<br>динамика | Стохастическая<br>динамика |
| Длина траектории  | 10 нс                      | 10 нс                      | 5 нс                       |
| Баростат  |                            | Беренсена                  | Беренсена                  |
| Постоянная баростатирования                               |                            | 0,1 пс                     | 0,1 пс                     |
| Температура термостата                                    | 300 К                      | 300 К                      | 300 К                      |
| Постоянная времени изменения среды                        | 0,1 пс                     | 0,1 пс                     | 0,1 пс                     |
| Радиус обрезания для электростатических<br>взаимодействий | 10 Å                       | 10 Å                       | 10 Å                       |
| Радиус обрезания для взаимодействия Ван-дер-<br>Ваальса   | 11 Å                       | 11 Å                       | 11 Å                       |
| Шаг интегрирования  | 1 фс                       | 1 фс                       | 1 фс                       |
| Шаг записи в траекторный файл                             | 0,1 пс                     | 0,1 пс                     | 0,1 пс                     |

|                             |        |       |       |
|-----------------------------|--------|-------|-------|
| Размер расчетной ячейки, нм | 10×5×5 | 8×3×3 | 8×3×3 |
| Количество молекул среды    |        | 2264  | 175   |

*Протокол молекулярной динамики для расчета свойств эу- и прокариотических мембран.*

|  |                         |
|--|-------------------------|
| Потенциальное поле                                     | GROMOS                  |
| Тип интегратора  | Стохастическая динамика |
| Длина траектории                                       | 2 нс                    |
| Баростат   | Парриннело-Рамана       |
| Давление   | полуизотропное (-50 1)  |
| Постоянная баростатирования                            | 0,1 пс                  |
| Температура термостата                                 | 323 К                   |
| Радиус обрезания для электростатических взаимодействий | 12 Å                    |
| Радиус обрезания для взаимодействия Ван-дер-Ваальса    | 10 Å                    |
| Шаг интегрирования                                     | 1 фс                    |
| Шаг записи в траекторийный файл                        | 0,1 пс                  |

*Протокол молекулярной динамики для расчета систем эукариотическая мембрана + фуллерен, прокариотическая мембрана + фуллерен, эукариотическая мембрана + трималонатфуллерен*

|  |                         |
|--|-------------------------|
| Потенциальное поле                                     | GROMOS                  |
| Тип интегратора  | Стохастическая динамика |
| Баростат   | Парриннело-Рамана       |
| Давление   | полуизотропное (-50 1)  |
| Постоянная баростатирования                            | 0,1 пс                  |
| Температура термостата                                 | 323 К                   |
| Радиус обрезания для электростатических взаимодействий | 12 Å                    |
| Радиус обрезания для взаимодействия Ван-дер-Ваальса    | 10 Å                    |
| Шаг интегрирования                                     | 1 фс                    |
| Шаг записи в траекторийный файл                        | 0,1 пс                  |

### Приложение 3.

#### *О гидрофобных взаимодействиях и потенциале средней силы*

Гидрофобное взаимодействие (от греч. *hydor*-вода и *phobos*-боязнь, страх) - сильное притяжение в воде (и других полярных растворителях) между неполярными частицами. Причина гидрофобного взаимодействия - большая энергия водородной связи между молекулами воды, превосходящая энергию их взаимодействия с неполярными частицами. Термодинамическая невыгодность контакта воды с неполярными веществами (рассматриваемая как гидрофобность) и предопределяет сильное притяжение их молекул друг к другу [66].

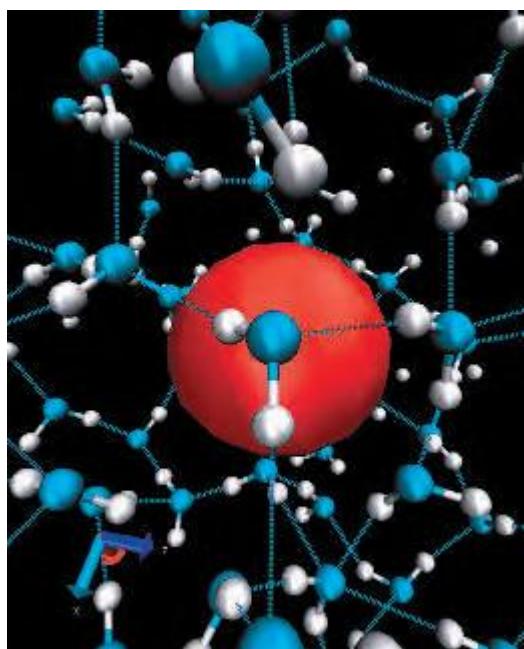


Рис. 67. Организация сети водородных связей воды вокруг гидрофобной молекулы. Из [67].

Гидрофобные взаимодействия двух неполярных молекул в различных средах может характеризовать потенциал средней силы, который учитывает не только взаимодействие двух частиц между собой, но и влияние всех молекул растворителя. В газовой фазе ПСС представляет собой парный потенциал взаимодействия  $U(r)$  и имеет один минимум. В случае если есть растворитель, функция принимает осциллирующий вид с периодом осцилляции примерно равным диаметру молекулы растворителя.

Простейшим представлением ПСС является использование в качестве координаты реакции расстояние  $r$  между частицами. ПСС связан с

радиальной функцией распределения следующим выражением:

$$A(r) = -k_B T \ln g(r) + \text{const}$$

На данный момент существует масса методик расчета потенциала средней силы. В данной работе была использована constraint force.

Начальные структуры (раздвинутые друг от друга на разные расстояния молекулы фуллерена в среде) были приготовлены при помощи метода Umbrella sampling: к потенциальну системы  $U(r)$  прикладывается дополнительный гармонический потенциал  $W(r)$ , в результате новый потенциал системы выглядит следующим образом:

$$\textcolor{brown}{U}'(r) = U(r) + W(r), \text{ где } W(r) = k_W(r - r_0)^2.$$

Задавая конечное расстояние между фуллеренами  $r$  и константу жесткости  $k_W$ , можно получить желаемый набор систем.

Суть алгоритма constraint - расчет силы, которая требуется для того, чтобы расстояние между центрами масс молекул оставалось постоянным. Для получения статистически достоверного результата время симуляции увеличивают до нескольких наносекунд. Далее для каждого расстояния  $r$  получают усредненную силу  $F(r)$ . После интегрирования находят зависимость  $A(r)$ .

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hedberg, K., et al., *Bond Lengths in Free Molecules of Buckminsterfullerene, C<sub>60</sub>, from Gas-Phase Electron Diffraction*. Science, 1991. **254**(5030): p. 410-412.
2. Liu, S., et al., *The Structure of the C<sub>60</sub> Molecule: X-Ray Crystal Structure Determination of a Twin at 110 K*. Science, 1991. **254**(5030): p. 408-410.
3. Rao, A.M., et al., *Diameter-Selective Raman Scattering from Vibrational Modes in Carbon Nanotubes*. Science, 1997. **275**(5297): p. 187-91.
4. Kataura, H., *Optical properties of single wall carbon nanotubes*. Synthetic Metals, 1991. **103**: p. 2555-2558.
5. Kroto, H.W., *Introduction*. Carbon, 1992. **30**: p. 1139-1141.
6. Tisza, A., *Zeitschrift far Physik*. 1933. **82**.
7. T.G. Dietz, M.A.D., D. E. Powers, and R. E. Smalley, *J. Chem. Phys.*, 1981. **74**.
8. . W. Kroto, J.R.H., S. C. Obrien, R. F. Curl, and R. E. Smalley, *C-60-Buckminsterfullerene*. Nature, 1985. **318**: p. 162-163.
9. Smalley, R.E., *Formation and properties of C<sub>60</sub> and the fullerenes*. 1990, Institute of Standards and Technology.
10. Dresselhaus, M.S., *Oral presentation at fullerene workshop*. 1991, University of Pennsylvania.
11. Iijima, S., *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature, 1991. **354**: p. 54-58.
12. S. Iijima, T.I., *Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter*. Nature, 1993. **363**: p. 603-605.
13. D. S. Bethune, C.H.K., M. S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, and R. Beyers, *Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls*. Nature, 1993. **693**: p. 607-609.
14. Bacon, R., *Growth, structure, and properties of graphite whiskers*. Journal of Applied Physics, 1960. **31**: p. 283-290.
15. A. Oberlin, M.E., and T. Koyama, *Filamentous growth of carbon through benzene decomposition*. Journal of Crystal Growth, 1976. **32**(335-349).
16. Ю.Е. Лозовик, А.М.П., *Образование и рост углеродных наноструктур-фуллеренов, наночастиц, нанотрубок и конусов*. УФН, 1997. **167**(7): p. 751-774.
17. Сысун, В.И., *Фуллерены: синтез, методы получения*, ПетрГУ.
18. А.В.Елецкий, Б.М.С., *Фуллерены и структуры углерода*. УФН, 1995. **165**(9).

19. Ruoff R.S., M.R., Huestis D.L., Tse D. S., and Lorents D. C, *Anomalous solubility behavior of C<sub>60</sub>*. Nature, 1993. **362**: p. 1402-1403.
20. Fang, K.-C., Weng, I Cheng, Ju, Shin-Pon *An investigation into the structural features and thermal conductivity of silicon nanoparticles using molecular dynamics simulations*. Nanotechnology, 2006. **17**(15): p. 3909-3914.
21. AA Vanin, E.P., LB Piotrovsky, *Investigation of Fullerene Solutions by the Molecular Dynamics Method* Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures, 2008. **16**(5): p. 555-562.
22. Qiao, R., et al., *Translocation of C<sub>60</sub> and its derivatives across a lipid bilayer*. Nano Lett, 2007. **7**(3): p. 614-9.
23. Bedrov, D., et al., *Passive transport of C<sub>60</sub> fullerenes through a lipid membrane: a molecular dynamics simulation study*. J Phys Chem B, 2008. **112**(7): p. 2078-84.
24. Li, L., et al., *A molecular dynamics simulation study of C<sub>60</sub> fullerenes inside a dimyristoylphosphatidylcholine lipid bilayer*. J Phys Chem B, 2007. **111**(16): p. 4067-72.
25. Wong-Ekkabut, J., et al., *Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes*. Nat Nanotechnol, 2008. **3**(6): p. 363-8.
26. SJ Singer, a.G.N., *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**: p. 720-731.
27. Egberts, E., S.J. Marrink, and H.J. Berendsen, *Molecular dynamics simulation of a phospholipid membrane*. Eur Biophys J, 1994. **22**(6): p. 423-36.
28. Egberts, E., *Molecular dynamics simulations of multibilayer membranes*. 1988, University of Groningen.
29. Рубин, А.Б., . *Биофизика: Учебник: В 2-х мм. .* Vol. 2. 2004, Москва: Издательство МГУ. 462.
30. Kinnunen, O.M.a.P., *Role of lipid organization and dynamics for membrane functionality*. Birkhäuser, 1996: p. 463-502.
31. PR Cullis, D.F.a.M.H., *Physical properties and functional roles of lipids in membranes*. Elsevier, 1996: p. 1-33.
32. Somerharju, P., J.A. Virtanen, and K.H. Cheng, *Lateral organisation of membrane lipids. The superlattice view*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1440**(1): p. 32-48.
33. Nagle, J.F., et al., *X-ray structure determination of fully hydrated L alpha phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers*. Biophys J, 1996. **70**(3): p. 1419-31.

34. Douliez, J.P., A. Leonard, and E.J. Dufourc, *Restatement of order parameters in biomembranes: calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splittings*. Biophys J, 1995. **68**(5): p. 1727-39.
35. Darden, T.A. and L.G. Pedersen, *Molecular modeling: an experimental tool*. Environ Health Perspect, 1993. **101**(5): p. 410-2.
36. Ilario G. Tironi, R.e.S., Paul E. Smith, Wilfred F. van Gunsteren, *A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations*. The Journal of Chemical Physics, 1995. **102**(13): p. 5451-5459.
37. C. Anezo, A.H.d.V., H-D. Holtje, D. P. Tielemans, S-J. Marrink, *Methodological Issues in Lipid Bilayer Simulations*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(35): p. 9424-9433.
38. Dugan, L.L., et al., *Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons*. Neurobiol Dis, 1996. **3**(2): p. 129-35.
39. Dugan, L.L., et al., *Carboxyfullerenes as neuroprotective agents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9434-9.
40. Ali, S.S., et al., *A biologically effective fullerene (C<sub>60</sub>) derivative with superoxide dismutase mimetic properties*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(8): p. 1191-202.
41. Witte, P., et al., *Water solubility, antioxidant activity and cytochrome C binding of four families of exohedral adducts of C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub>*. Org Biomol Chem, 2007. **5**(22): p. 3599-613.
42. Wang, I.C., et al., *C(60) and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation*. J Med Chem, 1999. **42**(22): p. 4614-20.
43. Beuerle F., W.P., Hartnagel U., Lebovitz R., Parng C., Hirsch A. , *Cytoprotective activities of water-soluble fullerenes in zebrafish models*. J. Exp. Nanosci., 2007. **2**: p. 147–170.
44. Z. Hu, W.G., W. Wang, L. Huang, H. Xing, Z. Zhu, *Synthesis of β-alanine C<sub>60</sub> derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells*. Cell Biol Int., 2007. **31**: p. 798–804.
45. Z. Hu, W.G., W. Wang, L. Huang, H. Xing, Z. Zhu, *Protective effect of a novel cystine C<sub>60</sub> derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells*. Chem. Biol. Interact, 2007. **167**: p. 135–144.
46. Gubskaya, V.P., et al., *Synthesis, structure and biological activity of nitroxide malonate methanofullerenes*. Org Biomol Chem, 2007. **5**(6): p. 976-81.

47. Ryan, J.J., et al., *Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 665-72.
48. Harhaji, L., et al., *Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene*. Eur J Pharmacol, 2007. **568**(1-3): p. 89-98.
49. Benyamin, H., et al., *Interaction of c(60)-fullerene and carboxyfullerene with proteins: docking and binding site alignment*. Bioconjug Chem, 2006. **17**(2): p. 378-86.
50. Asuri, P., et al., *Enhanced stability of enzymes adsorbed onto nanoparticles*. J Nanosci Nanotechnol, 2007. **7**(4-5): p. 1675-8.
51. Marchesan, S., et al., *Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(15): p. 3615-8.
52. Mashino, T., et al., *Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(24): p. 4395-7.
53. Fortner, J.D., et al., *C60 in water: nanocrystal formation and microbial response*. Environ Sci Technol, 2005. **39**(11): p. 4307-16.
54. Sayes, C.M., et al., *Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation*. Biomaterials, 2005. **26**(36): p. 7587-95.
55. Jia, G., et al., *Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene*. Environ Sci Technol, 2005. **39**(5): p. 1378-83.
56. Porter, A.E., et al., *Visualizing the uptake of C60 to the cytoplasm and nucleus of human monocyte-derived macrophage cells using energy-filtered transmission electron microscopy and electron tomography*. Environ Sci Technol, 2007. **41**(8): p. 3012-7.
57. Isakovic, A., et al., *Inactivation of nanocrystalline C60 cytotoxicity by gamma-irradiation*. Biomaterials, 2006. **27**(29): p. 5049-58.
58. Miyamoto, K.K.K., *An analytical version of the shake and rattle algorithm for rigid water models*. J. Comput. Chem, 1992. **13**: p. 952–962.
59. Hess, H.B., H.J. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, *A linear constraint solver for molecular simulation*. J. Comput. Chem, 1997. **18**: p. 1463–1472.
60. [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org).
61. <http://www.ucalgary.ca/tieleman/files/dppc128.pdb>.
62. Allen, W.J., J.A. Lemkul, and D.R. Bevan, *GridMAT-MD: a grid-based membrane analysis tool for use with molecular dynamics*. J Comput Chem, 2009. **30**(12): p. 1952-8.
63. <http://www.gnuplot.info/>.

64. Tieleman, D.P., S.J. Marrink, and H.J. Berendsen, *A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1331**(3): p. 235-70.
65. Pyrkov, T.V., et al., *PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(9): p. 1201-2.
66. <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/1060.html>.
67. Chandler, D., *Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly*. *Nature*, 2005. **437**(7059): p. 640-7.