



УДК 57.043; 519.688; 573.7

НАНОИНДЕНТИРОВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ: МУЛЬТИМАСШТАБНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

О.Е. Глухова¹, О.А. Гришина², Г.В. Савостьянов²

¹ Кафедра радиотехники и электродинамики Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского, Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, e-mail: graphene@yandex.ru

² Образовательно-научный институт наноструктур и биосистем Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского, Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, e-mail: nano-bio@sgu.ru

Аннотация. Проведено математическое моделирование процесса воздействия иглы атомно-силового микроскопа в виде однослойной углеродной нанотрубки на биомакромолекулу липопротейна высокой плотности. Численный эксперимент проведен с помощью крупнозернистой молекулярной динамики с использованием комбинации термостата Берендсена и коллизионного термостата для учета теплообмена с окружающей средой. Модель липопротейна высокой плотности была построена методом самосборки в водной среде при $T = 310$ K из 300 крупнозернистых моделей фосфолипидных молекул типа *DPPC* (*Dipalmitoylphosphatidylcholine*) и двух поясов липопротейнов, каждый из которых составлен из 1100 укрупненных частиц (зерен) протеинов. Для процесса индентирования липопротейн размещался на подложке из графена. Проводилось индентирование нанотрубками диаметром суб- и нанометрового диапазонов. Установлено, что при приближении иглы биомакромолекула липопротейна высокой плотности деформируется на 10–50% в различных направлениях. При этом липопротейн высокой плотности разворачивается так, чтобы механическое воздействие нанотрубки было минимальным. При этом атомная структура липопротейна сохраняет свою целостность, и процесс разрушения молекулярной системы не наблюдается. Результаты численного эксперимента показали, что на каждом шаге индентирования наблюдается уменьшение энергии вандерваальсового взаимодействия, т.е. система перестраивается так, чтобы взаимодействие липопротейна с нанотрубкой стало более выгодным по энергии. С помощью крупнозернистого молекулярно-динамического моделирования авторами установлено, что при использовании нанотрубок диаметром 0,9 нм и более в качестве наноиндентора наблюдается процесс затягивания молекул – структурных элементов липопротейна высокой плотности – в нанопространство трубки. Полученные результаты позволяют рекомендовать углеродные нанотрубки в качестве капсул для транспортировки лекарств внутрь организма.

Ключевые слова: липопротейн высокой плотности, углеродные нанотрубки, крупнозернистое моделирование, молекулярная динамика, наноиндентирование.

ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие углеродной нанотрубки с клетками и микроорганизмами вызывает интерес с момента синтеза углеродной нанотрубки в

© Глухова О.Е., Гришина О.А., Савостьянов Г.В., 2014

Глухова Ольга Евгеньевна, д.ф.-м.н., заведующая кафедрой радиотехники и электродинамики, Саратов
Гришина Ольга Александровна, к.ф.-м.н., ведущий программист отдела математического моделирования, Саратов

Савостьянов Георгий Васильевич, программист отдела математического моделирования, Саратов

макроскопическом объеме. Первоначально исследования проводились на макроуровне, когда изучались факт проникновения углеродной нанотрубки в клетки [6], влияние углеродной нанотрубки на рост и поведение клеток и микроорганизмов [10]. С момента успешного применения углеродной нанотрубки в качестве иглы кантелевра атомно-силового микроскопа актуальным становится наноиндентирование клеток нанотрубками. При этом основу индентирования клеток нанотрубками составляет взаимодействие трубок с фосфолипидным бислоем, который является определяющей компонентой клеточных мембран. Экспериментальные исследования в этом направлении крайне сложны, поэтому большая роль отводится численному эксперименту для оценки перспектив этого направления. На сегодняшний день установлено, что в процессе проникновения углеродной нанотрубки в слой фосфолипидных молекул *dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)* наблюдается частичное повреждение слоя, часть молекул проникает внутрь открытой углеродной нанотрубки. Количество инкапсулирующихся внутрь молекул зависит от скорости движения углеродной нанотрубки [18]. В этом смысле более эффективной признана закрытая нанотрубка, которая менее заметно деформирует слой липидов и не вбирает в себя молекулы [13]. Однако в целом липидный слой после прохождения сквозь него нанотрубки восстанавливается полностью, что свидетельствует об успешности прохождения мембраны и возможности применения углеродной нанотрубки в качестве игл для доставки лекарств внутрь клетки, а также в качестве зондов для исследования свойств клетки. Больше информации на данный момент нет, поскольку численный эксперимент для атомистической модели очень затратный с точки зрения машинного времени и ресурсов, а натуральный эксперимент труднореализуем. Тем не менее для дальнейшего воплощения идеи с использованием нанотрубок в качестве капсулы для транспортировки лекарств внутрь организма необходимо изучение упругих свойств клеточных мембран и жиро-белковых комплексов. Эффективным способом определения таких свойств является применение технологии наноиндентирования исследуемого объекта. С помощью наноиндентирования можно будет количественно оценивать такие характеристики объекта, как коэффициент проницаемости, модуль упругости, пределы прочности на разрыв.

Интерес к возможным комбинациям фосфолипидов с углеродными структурами имеет не только прикладной характер с позиции микроскопии и наноиндентирования, но и с фундаментальной точки зрения получения нового бионанокompозитного материала на основе липидного слоя. Уже предприняты экспериментальные и теоретические попытки изучения взаимодействия липидного слоя с графеном, которые способны образовывать новый композит типа «сэндвич» [16]. Установлено, что графен способствует образованию везикул из липидных слоев [4], а также с помощью модификации поверхности графена, например окисдированием, можно управлять динамикой фосфолипидов и их самораспространением на графене [2]. Существует даже отдельное направление липидной нанотехнологии [8], которое охватывает биологические приложения липидов на уровне нанометровых структур на их основе, а также биоэлектронное приложение, конструирование на их основе наноустройств.

Еще одним фактором, доказывающим актуальность исследований липидных слоев, является их определяющая роль в поведении липопротеинов. Как известно, липопротеины делятся на три группы: высокой плотности, низкой и очень низкой плотности. Атерогенными свойствами обладают липопротеины низкой и очень низкой плотности, они являются переносчиками холестерина. Однако при изучении их свойств следует начинать с исследования липопротеинов высокой плотности, поскольку они составляют молекулярную основу липопротеинов низкой и очень

низкой плотности, отличие которых состоит только в добавлении холестерина некоторых других протеинов [12]. Остается неизвестным, как будет влиять игла атомно-силового микроскопа на макромолекулу, будет ли она разрушать ее слои, насколько будет разрушительным ее действие. В связи с этим актуальным также является определение деформируемости макромолекул липопротеинов. На сегодня все известные методы экспериментального исследования этих параметров дают усредненные значения с большим разбросом величин, поскольку эксперимент проводится не с индивидуальной клеткой, а с массивом клеток, распределенных по подложке [19].

Чтобы ответить на эти вопросы и дать рекомендации экспериментаторам, изучающим клетки, необходимо провести предварительное прогнозирование поведения молекул при контакте с углеродной нанотрубкой. В силу многоатомности изучаемых объектов, целесообразно применять крупнозернистую молекулярную модель.

Целью данной работы является численное исследование процесса взаимодействия углеродной нанотрубки с липопротеином высокой плотности. Моделирование проводится методом молекулярной динамики в рамках модифицированных авторами крупнозернистых моделей углеродной нанотрубки и липопротеина. Теплообмен с окружающей средой моделируется при помощи комбинации термостата Берендсена и коллизионного термостата.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Суть крупнозернистого моделирования заключается в упрощении атомистической модели макромолекул путем объединения групп атомов в крупнозернистые частицы (*coarse-grained particles*). Потенциальная энергия крупнозернистой макромолекулы представляется в виде суммы энергий

$$U = U_{bond} + U_{angle} + U_{dihedral} + U_{nonbond}, \quad (1)$$

где три слагаемых описывают химически взаимодействующие крупнозернистые частицы, член $U_{nonbond}$ описывает попарное взаимодействие несвязанных химически крупнозернистых частиц. Все потенциалы имеют классический вид. Потенциал U_{bond} :

$$U_{bond} = \frac{1}{2} \sum_{ij \in bond} K_{ij} (r_{ij} - r_{ij}^0)^2, \quad (2)$$

где индексы ij – номера связанных крупнозернистых частиц; K_{ij} – весовой коэффициент для взаимодействующих атомов, зависящий от типов связанных частиц; r_{ij} – расстояние между частицами; r_{ij}^0 – равновесное расстояние между частицами.

Потенциал U_{angle} :

$$U_{angle} = \frac{1}{2} \sum_{ijk \in angle} K_{ijk} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2, \quad (3)$$

где K_{ijk} – весовой коэффициент; θ_{ijk} – угол, формируемый тремя последовательно соединенными частицами i, j, k ; θ_{ijk}^0 – соответствующий равновесный угол.

Потенциал $U_{dihedral}$:

$$U_{dihedral} = \frac{1}{2} \sum_{ijkl \in dihedral} K_{ijkl} \left(1 + \cos(\varphi_{ijkl} - \delta_{ijkl}^0) \right), \quad (4)$$

где K_{ijkl} – силовая константа, φ_{ijkl} – линейный угол двугранного угла между гранями, общей для которых является связь между атомами j и k ; δ_{ijkl}^0 – соответствующий равновесный угол. Взаимодействие несвязанных частиц определяется потенциалом Леннарда-Джонса и электростатическим потенциалом:

$$U_{nonbond} = \sum_{i < j} 4\epsilon_{ij} \left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) + \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}}, \quad (5)$$

где ϵ_{ij} – глубина потенциальной ямы; r_{ij} – расстояние между парой крупнозернистых частиц; σ_{ij} – аналог радиуса Ван-дер-Ваальса для крупнозернистых частиц, на котором энергия взаимодействия обращается в нуль; q_i и q_j – заряды крупнозернистых частиц соответственно; ϵ – диэлектрическая проницаемость среды; ϵ_0 – диэлектрическая проницаемость в вакууме.

Динамика системы крупнозернистых частиц вычисляется путем решения уравнений движения Ньютона. Силы, действующие на крупнозернистые частицы, вычисляются как градиент потенциальной энергии системы.

Для контроля температуры системы использовалась комбинация термостата Берендсена [1] и коллизионного термостата [3]. Все крупнозернистые частицы, составляющие липопротеин, были помещены в термостат Берендсена, кинетическая энергия крупнозернистых частиц воды корректировалась с помощью столкновительного (коллизионного) термостата. Благодаря постоянному взаимодействию частиц воды с крупнозернистыми частицами макромолекул липопротеина негативные свойства термостата Берендсена, связанные с наличием динамического аттрактора в этом термостате, нивелируются. Использование коллизионного термостата для моделирования частиц водной среды позволяет более реалистично моделировать вязкостные и диффузионные свойства водного окружения при заданной температуре.

Для моделирования использовался собственный программный продукт.

КРУПНОЗЕРНИСТЫЕ МОДЕЛИ ЛИПОПРОТЕИНА ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ И НАНОТРУБОК

Для построения крупнозернистой модели липопротеина высокой плотности необходимо построить предварительно модели крупнозернистых фосфолипидов и протеинов, которые и определяют основной состав макромолекулы липопротеина высокой плотности. Сама макромолекула будет собираться из 249 крупнозернистых моделей фосфолипидных молекул типа *DPPC* (*dipalmitoylphosphatidylcholine*) и двух поясов липопротеинов, каждый из которых составлен из 1426 укрупненных частиц (зерен) протеинов.

В рамках модели крупнозернистых частиц фосфолипидов выделяются четыре типа частиц: полярные (*P*), неполярные (*N*), аполярные (*C*) и заряженные (*Q*) [7]. Полярные типы определяют нейтральные группы атомов, которые могут быть растворены в воде, аполярные – гидрофобные группы, а неполярные используются для смешанных объединений атомов, которые могут включать в себя как полярные, так и неполярные группы. Частицы, относящиеся к заряженным, представляют группу ионизированных атомов.

Построение крупнозернистой модели протеинов осуществлялось по принципу, описанному в работе [14]. Каждый аминокислотный остаток (серин, тирозин, глицин) отображался двумя крупнозернистыми частицами. Всего для описания липопротеинов использовалось 20 различных типов крупнозернистых частиц, каждая из которых имеет массу, равную массе атомов, ее составляющих. Крупнозернистым атомам, представляющим заряженные боковые цепи, присваивается определенный заряд. Набор весовых коэффициентов и величин для описания поведения протеинов, их взаимодействия с крупнозернистыми частицами воды и фосфолипидов по формулам (2)–(5) представлен в работе [14].

Для построения модели крупнозернистых частиц углеродной нанотрубки была взята за основу треугольная модель атомной гексагональной сетки. Каждому треугольнику соответствует область, показанная на рис. 1, *а*. В такой крупнозернистой модели углеродной нанотрубки расстояние между ближайшими соседними частицами составило 0,42 нм, внутренний угол – 60°. На рис. 1, *б* представлен фрагмент крупнозернистой модели трубки (7,7). Количество атомов на окружности трубки в рамках этой модели совпадает с числом киральности.

В приведенной выше работе были указаны все параметры для расчета полной энергии углеродных структур, а также их взаимодействия с липидами, однако отсутствовало описание взаимодействия крупнозернистой модели углеродной нанотрубки со структурными элементами протеиновых цепочек. Поэтому в данном исследовании авторами была разработана крупнозернистая модель углеродной нанотрубки для описания взаимодействия с протеинами. Поскольку основным видом взаимодействия углеродной нанотрубки с белками является вандерваальсовое взаимодействие (электростатическое отсутствует), то авторами были подобраны параметры r_{ik} и σ_{ik} для случаев взаимодействия углеродной нанотрубки с аминокислотными остатками *serine*, *tyrosine* и *glycine* и остова крупнозернистых частиц. Подбор параметров был осуществлен следующим образом. Выделялся фрагмент атомистической модели углеродной нанотрубки и фрагмент атомистической модели белка, соответствующий определенному аминокислотному остатку. Далее методом молекулярной динамики с применением силового поля *AMBER* моделировался процесс сближения атомистических фрагментов на разных скоростях и с различной начальной геометрией. В ходе этого процесса на каждом шаге фиксировалась вандерваальсовая энергия взаимодействия фрагментов. По результатам расчетов строился график зависимости усредненной энергии взаимодействия от расстояния между центрами масс объектов. На основании полученных данных определены соответствующие параметры r_{ik} и σ_{ik} , которые представлены в таблице.

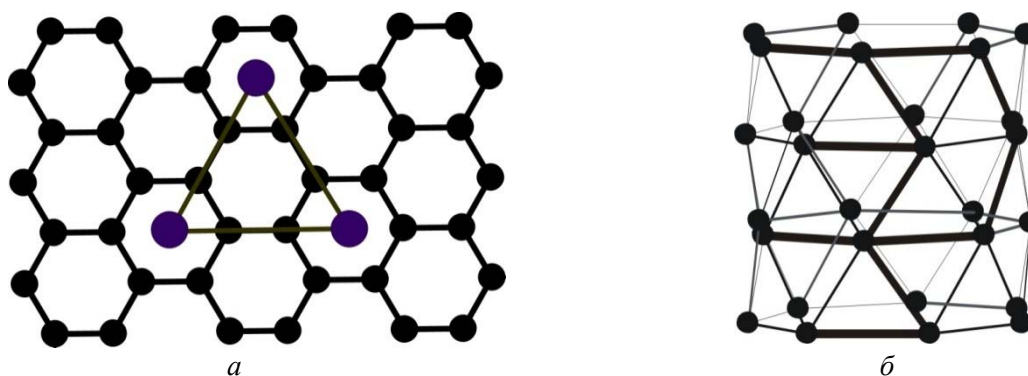


Рис. 1. Схема преобразования атомистической модели нанотрубки в крупнозернистую модель: *а* – преобразование гексагональной сетки в треугольную; *б* – фрагмент крупнозернистой модели нанотрубки (7,7)

Параметры потенциала Леннарда-Джонса для взаимодействия углеродных гексагональных структур с аминокислотными остатками

Тип аминокислотного остатка	σ_{ik} , эВ	r_{ij} , Å
Серин	0,023	3,3
Тирозин	0,072	3,8
Глицин	0,05	4,1

Известно, что липопротеин высокой плотности имеет сфероподобную форму с характерными размерами 8–13 нм [5]. Основной состав липопротеина высокой плотности – сотни фосфолипидов и протеинов. Наибольшую долю при этом составляют фосфолипиды. В зависимости от размера липопротеина высокой плотности фосфолипидное ядро может составлять 56–60% и даже больше – до 70% [17]. Липопротеин высокой плотности не является переносчиком холестерина в крови, поэтому в его составе холестерина всего несколько процентов, который обычно и не учитывается при моделировании и изучении свойств липопротеина высокой плотности. Другим важным структурным элементом является протеиновый ремешок (*belt*), состоящий из двух поясов или нитей. Это спиральные нити протеина *ApoA-I*. Можно сказать, что липопротеиновый пояс приблизительно составляет всю оставшуюся часть липопротеина высокой плотности. Модель липопротеина высокой плотности из дискообразного фосфолипидного ядра и опоясывающего протеинового пояса является наиболее популярной, поскольку достаточно проста в реализации моделирования и изучения процесса опоясывания протеиновой нитью [14, 15]. В работе [15] проведен широкий обзор статей и показано, что с 1997 года процесс опоясывания липидного диска протеиновым ремнем исследуется на одной и той же модели, которая включает строго 160 липидов *DPPC* или *POPC*. Такой выбор, как отмечают авторы, обусловлен экспериментальными данными о составе липопротеина высокой плотности, приведенными в работе [11]. Однако в той же работе указано, что такое количество фосфолипидов справедливо только для липопротеина высокой плотности диаметром 9,6–10,0 нм. Если частица липопротеина больше или меньше этого значения, то и количество фосфолипидов (*PC*) будет другим. Более современные экспериментальные исследования показали [9], что их количество определяется диаметром. Например, для липопротеина высокой плотности типа *AI-POPC-97* (97 – размер частицы в ангстремах) на одну нить *ApoA-I* приходится 78 молекул *PC*, т.е. в целом 156 в макромолекуле липопротеина высокой плотности; у липопротеина высокой плотности типа *AI-POPC-144* для одной нити *ApoA-I* будет 156 молекул *PC*; у липопротеина высокой плотности типа *AI-DMPC-95* для одной нити *ApoA-I* будет 210 молекул *PC* и т.д. (здесь *POPC* – 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, *DMPC* – dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Из приведенных данных хорошо видно, что количество фосфолипидов варьируется в пределах 156–420 молекул.

Для сборки крупнозернистой модели липопротеина высокой плотности нами было взято 260 крупнозернистых моделей фосфолипидов типа *DPPC* и две крупнозернистые нити липопротеинов *ApoA-I* по 920 укрупненных частиц в каждой. Общее количество крупнозернистых частиц составляло 4950. Выбор фосфолипидов типа *DPPC* обусловлен возможностью сравнения наших результатов с результатами предыдущих работ [14, 15]. Было использовано 20 000 крупнозернистых частиц воды. Крупнозернистая модель воды была нами заимствована из работы [7]. Температура поддерживалась около 310 К.

Самосборка проводилась нами в два этапа. На первом этапе в воде в течение 7,5 нс было собрано в рамках крупнозернистой модели фосфолипидное ядро. Ядро представляло собой сфероид размером ~10 нм. При этом в процессе сборки в водной среде 8 фосфолипидных молекул не вошли в состав ядра, оставшись свободными в воде.

На втором этапе два липопротеиновых пояса самозакручивались вокруг фосфолипидного ядра с последующим образованием липопротеина высокой плотности. Через 10 нс общий контур липопротеина уже сформировался, что отображают моментальные снимки процесса на рис. 2 (крупнозернистые частицы воды не отображены для удобства). Однако для достижения равновесной конфигурации, отвечающей минимуму энергии при данной температуре, необходимо

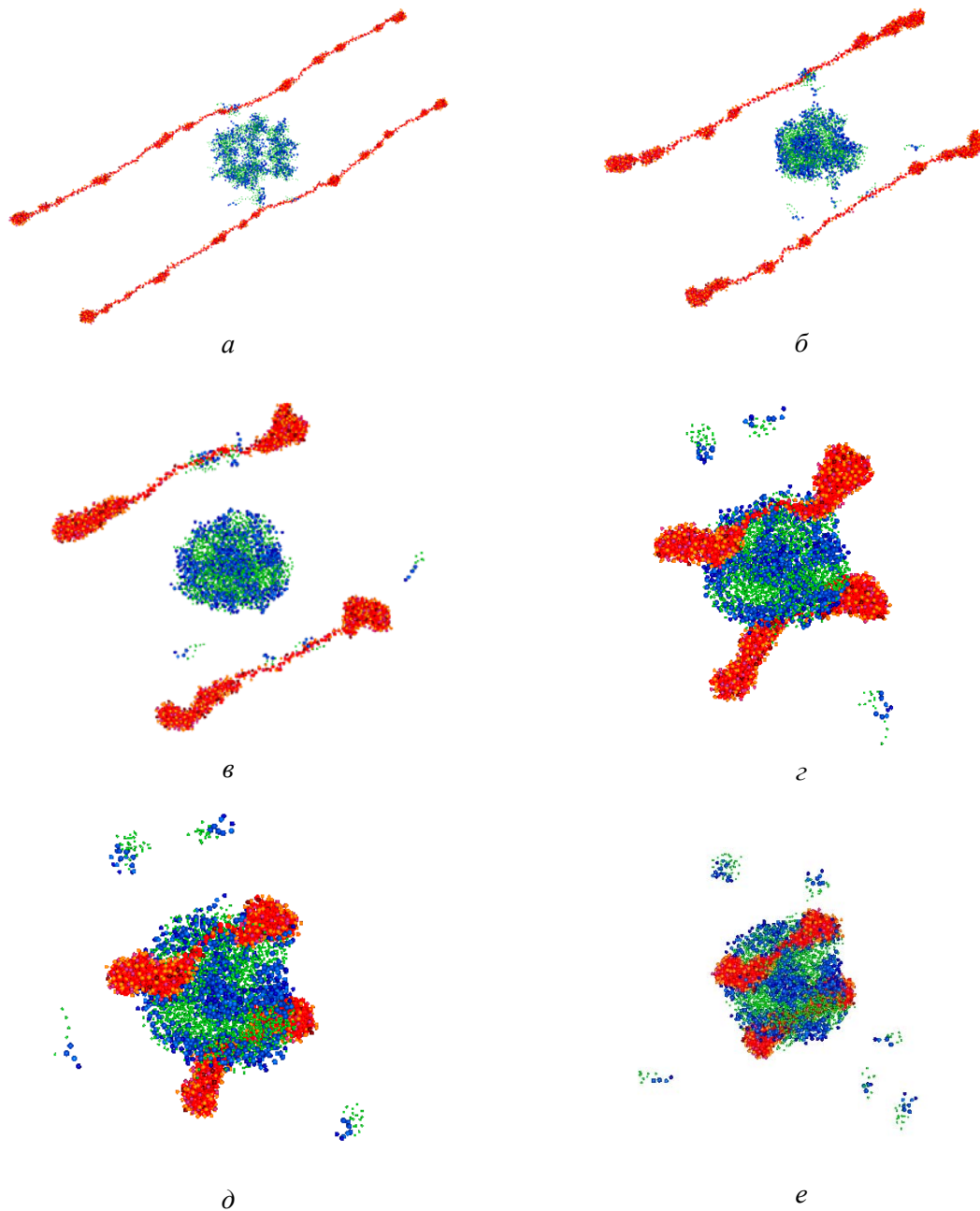


Рис. 2. Поэтапный процесс самосборки крупнозернистой модели липопротеина высокой плотности: $a - t = 1$ нс; $b - t = 4$ нс; $c - t = 6$ нс; $d - t = 9$ нс; $e - t = 10$ нс

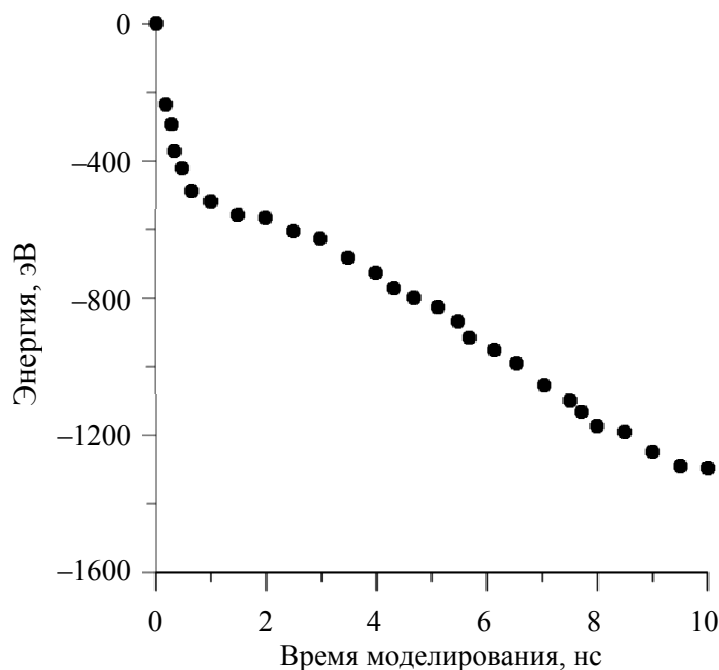


Рис. 3. Изменение энтальпии сборки в процессе самосборки липопротейна высокой плотности

гораздо большее время $\sim 0,45$ мкс. Подобные численные эксперименты, проводимые ранее, но с другим количеством фосфолипидов [15], показали, что для $T = 300\text{--}315$ К требуемое время полной сборки липопротейна высокой плотности с поясом вокруг фосфолипидного диска составляет $0,5$ мкс, а более сложная укладка протеинов вокруг фосфолипидного ядра наблюдается по истечении 1 мкс. Надо заметить, что равновесной конфигурации достичь невозможно вследствие теплового движения, поэтому на фоне стабилизировавшейся энергии около некоторого значения топология липопротейновых нитей на фосфолипидном ядре будет меняться во времени.

Наименьшее значение энергии липопротейна высокой плотности при данной температуре, рассчитанное описанным выше методом, составило -1428 эВ. Таким образом, в итоге крупнозернистая модель липопротейна высокой плотности включала 4830 крупных частиц. Количество фосфолипидов в макромолекуле липопротейна составило 250 молекул *DPPC* – 62% от общего числа молекул, а протеины – 38% . Из рис. 2 видно, что протеиновые нити оборачиваются в воде вокруг фосфолипидного ядра, которое в итоге не имеет правильной сфероидной формы. Вследствие сдавливания сфероид протеиновыми поясами структура липопротейна высокой плотности приобрела форму геоида с размерами $10,3$, $9,2$ и $8,9$ нм.

В ходе процесса самосборки липопротейна рассчитывалась энтальпия реакции образования макромолекулы липопротейна высокой плотности с временным шагом 1 пс. График изменения энтальпии показан на рис. 3. Энтальпия уменьшается с течением времени, что очевидно, поскольку процесс образования липопротейна высокой плотности в природе выгоден с точки зрения энергии. В первые пикосекунды энтальпия резко уменьшается. Уже в момент $0,1$ нс энтальпия становится равной -300 эВ. К концу процесса сборки ее значение практически не меняется и достигает значения -1295 эВ.

НАНОИНДЕНТИРОВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИНА

Моделирование процесса наноиндентирования проводилось следующим образом. Чтобы липопротеину не дать возможность уйти от иглы, т.е. ограничить число степеней свободы, липопротеин высокой плотности располагался на графеновой подложке. Игла в виде тонкой одностенной углеродной нанотрубки опускалась сверху, перпендикулярно к графену, приблизительно по центру макромолекулы. Графеновый лист, как и углеродная нанотрубка, представлялся крупнозернистой моделью. Температура поддерживалась постоянной, равной 310 К. Процесс протекал в водной среде. В начальный момент времени углеродная нанотрубка располагалась на расстоянии 1 нм от липопротеина высокой плотности, далее она приближалась к макромолекуле с постоянной скоростью 10 м/с. В качестве индентора была использована углеродная нанотрубка типа *armchair* (7,7) диаметром 0,9. Трубки этого типа удобны для индентирования тем, что их край не имеет острых углов (в отличие от трубок *zigzag*), т.е. будет наносить минимальные повреждения системе при контакте.

Было обнаружено, что по мере приближения нанотрубки к липопротеину высокой плотности макромолекула старается отклониться от внешнего воздействия (иглы углеродной нанотрубки) и начинает немного сдвигаться по плоскости графенового листа. Более того, форма макромолекулы липопротеина высокой плотности несколько меняется, она деформируется. Эта деформация легко реализуется вследствие мягкости всей системы, обусловленной вандерваальсовым взаимодействием ее компонентов. На рис. 4 приведены моментальные снимки процесса проникновения нанотрубки диаметром 0,9 нм в липопротеин (молекулы воды были убраны). На всех кадрах ориентация подложки и нанотрубки в пространстве остается постоянной на протяжении всего процесса,

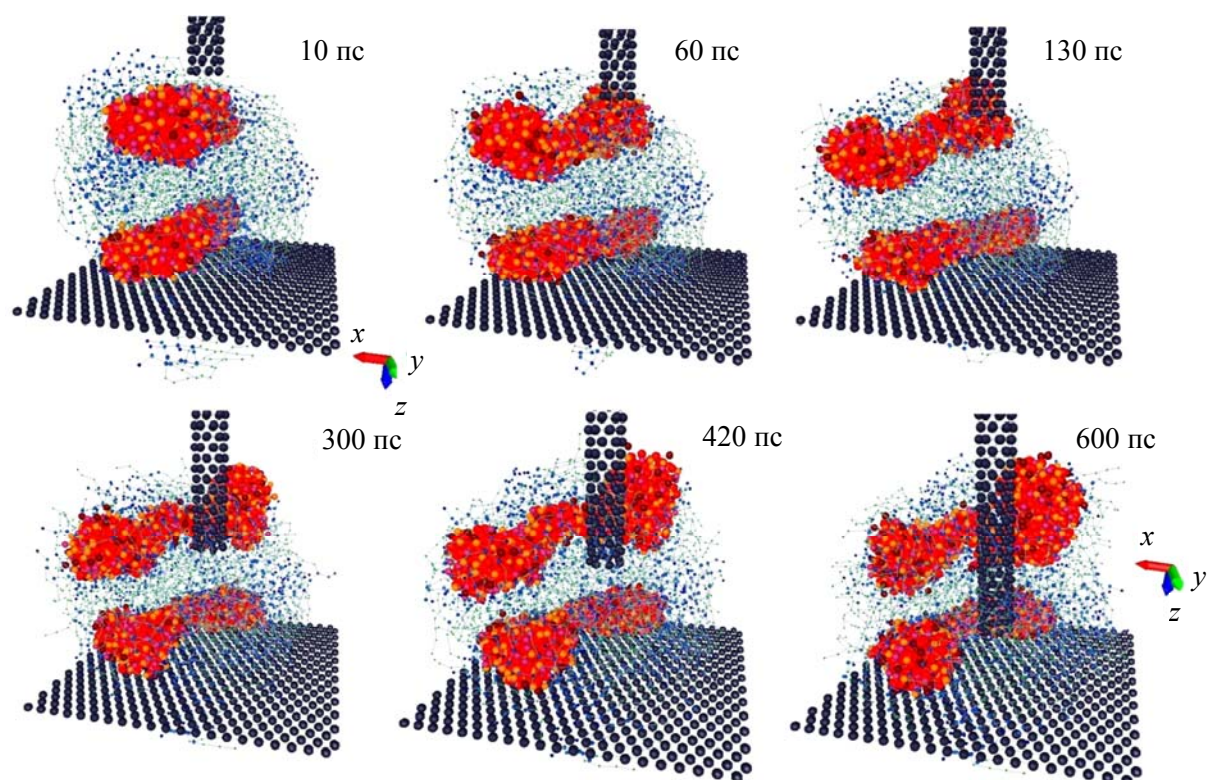


Рис. 4. Процесс индентирования. Красные пояса – протеиновые цепочки; синие точки – гидрофобные головы фосфолипидов; зеленые точки – гидрофильные хвосты фосфолипидов

что позволяет легко отследить изменение конфигурации системы «липопротеин высокой плотности – углеродная нанотрубка». Первые два кадра наглядно отображают попытку липопротеина высокой плотности уйти от соприкосновения с иглой, но подложка не позволяет свободно перемещаться. Макромолекула сплющивается, прижимаясь к поверхности графенового листа. В момент проникновения углеродной нанотрубки в структуру липопротеина макромолекула перестает двигаться по графеновому листу. Она становится как бы пригвожденной к подложке. Другие кадры рис. 4 демонстрируют, как липопротеиновые пояса разворачиваются, обволакивая углеродную нанотрубку, в результате чего трубка проходит сквозь менее плотную среду из *DPPC*.

По мере приближения трубки к липопротеину он испытывает нарастающее давление со стороны углеродной нанотрубки. Это выражается в резком увеличении энергии липопротеина, которое обусловлено, с одной стороны, отталкиванием макромолекулы и углеродной нанотрубки, с другой стороны, отталкиванием макромолекулы от подложки. На рис. 5, *a* представлено рассчитанное изменение энергии липопротеина в ходе проникновения углеродной нанотрубки в ее структуру. Это непосредственно энергия липопротеина высокой плотности, которая рассчитывалась по формулам (1)–(5).

Глубина проникновения нами отсчитывается так, что за нулевой уровень принято положение углеродной нанотрубки в первый момент контакта с липопротеином. Отрицательному значению глубины проникновения будет соответствовать положение трубки выше точки контакта, как показано на вкладке рис. 5, *a*. Увеличение энергии на 400 эВ с момента начала движения трубки в течение 200 пс (что отвечает перемещению на 2 нм) вызвано резким вандерваальсовым отталкиванием липопротеина и его деформацией.

На рис. 5, *б* перемещению от нуля до 1 нм вглубь отвечает временной интервал 100 пс. Именно в этом временном интервале наблюдается сильная деформация: сплющивание с уменьшением высоты на 1 нм, удлинение почти на 2 нм и уширение на 1 нм. В последующие временные отрезки такого резкого изменения всех трех линейных параметров уже не наблюдалось. Действительно, снимки трансформации липопротеина высокой плотности в процессе индентирования (рис. 4) показывают, что уже в момент 60 пс липопротеиновый пояс почти развернулся и далее его положение практически остается неизменным. Это также подтверждается характером изменения энергии липопротеина с момента проникновения углеродной нанотрубки на глубину 1,5 нм (т.е. по истечении 150 пс с момента контакта иглы с липопротеином). Она плавно возрастает по мере продвижения трубки вглубь.

Интересно проследить, как меняется энергия взаимодействия липопротеина высокой плотности с окружением, точнее с иглой и подложкой. Можно заранее предположить, что характер ее изменения будет сложным, поскольку определяется двумя факторами: увеличивающейся площадью соприкосновения структуры липопротеина с нанотрубкой и постоянно меняющейся площадью соприкосновения с графеновой подложкой. Поскольку нас интересует воздействие трубки на липопротеин, на рис. 5, *б* мы представили профиль энергии взаимодействия липопротеина высокой плотности с трубкой с увеличением глубины погружения. Мы снова видим, что на начальном этапе происходит резкое изменение энергии: она уменьшается. Уменьшение энергии вандерваальсового взаимодействия означает, что система перестраивается так, чтобы взаимодействие стало более выгодным по энергии. Это совпадает по времени с переориентированием протеинового пояса. Далее энергия выходит на некоторый стабильный уровень ~ -168 эВ, около которого и колеблется в процессе дальнейшего погружения нанотрубки. Возрастание, хотя и незначительное, энергии взаимодействия объясняется отталкиванием, постепенно увеличивающимся из-за роста площади контакта липопротеина высокой плотности с нанотрубкой.

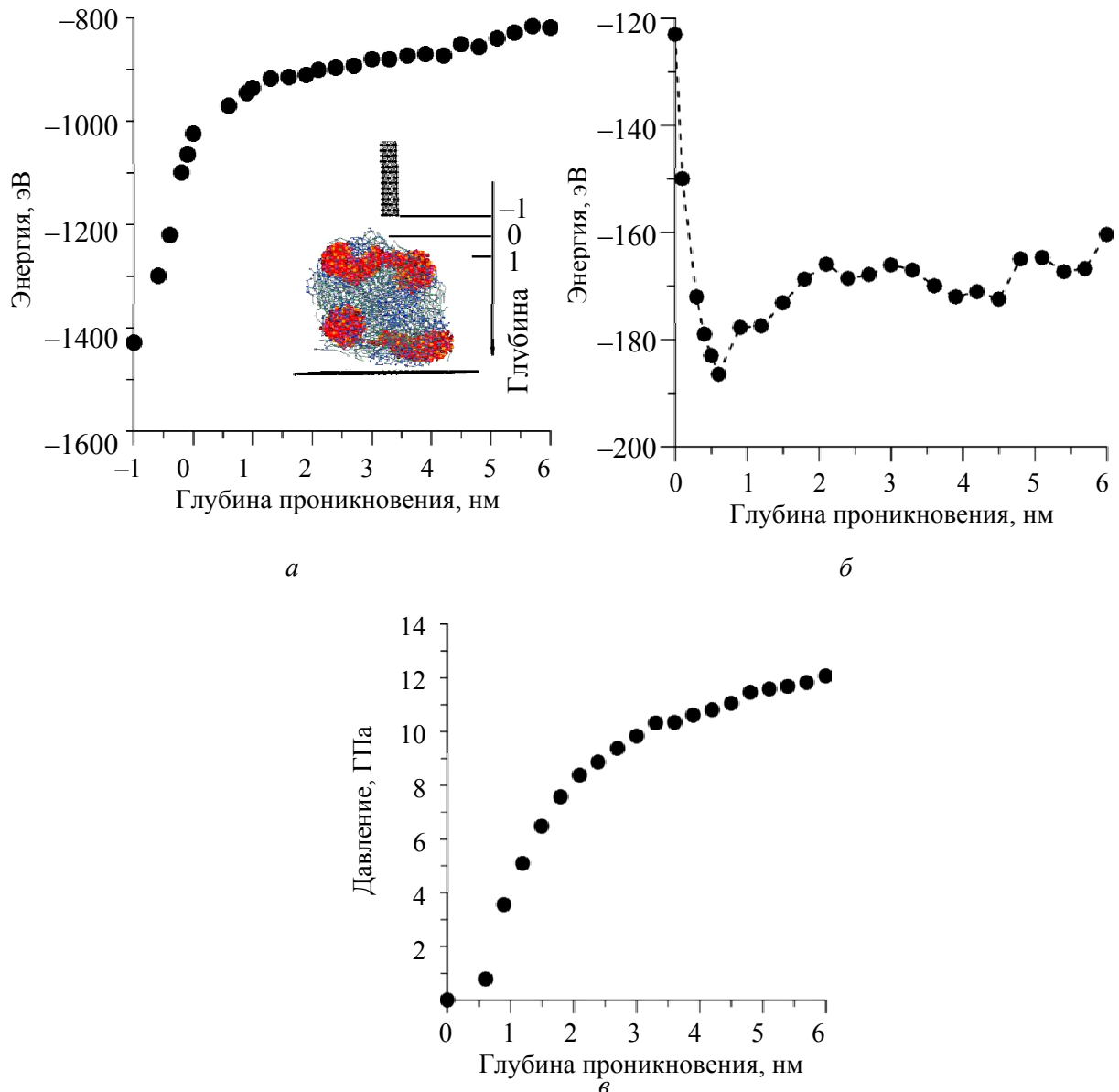
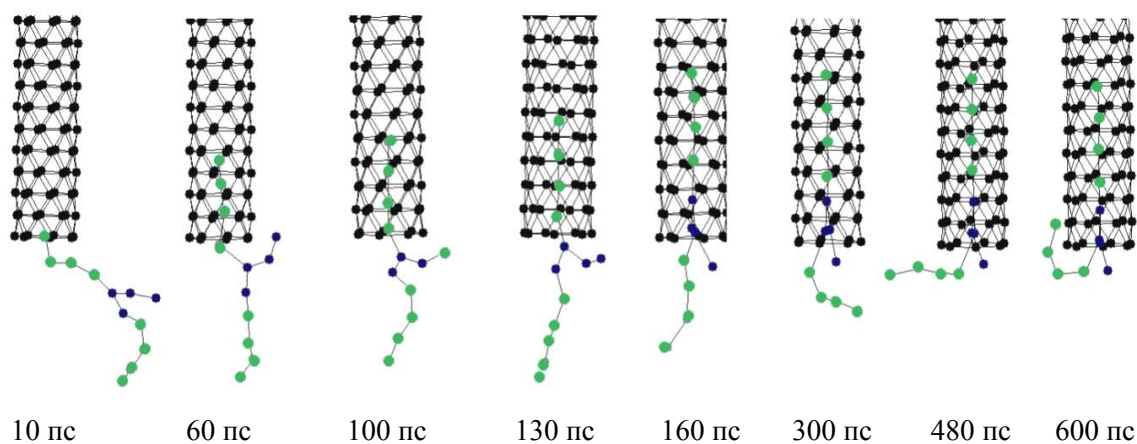


Рис. 5. Изменение параметров в ходе индентирования: *а* – энергии липопротеина; *б* – энергии взаимодействия липопротеина высокой плотности с углеродной нанотрубкой; *в* – давление со стороны трубки на липопротеин

Авторами также вычислено давление, которое испытывает липопротеин высокой плотности со стороны иглы микроскопа. Оно рассчитывалось из соображений, что давление, которое испытывает трубка, совпадает с давлением, которое она оказывает на структуру липопротеина высокой плотности. Давление рассчитывалось как отношение энергии взаимодействия макромолекулы с углеродной нанотрубкой к объему, занимаемому трубкой в структуре липопротеина, с учетом глубины погружения и расстояния между стенкой трубки и окружающими липопротеин частицами. График изменения давления представлен на рис. 5, *в*. Как и можно было ожидать, давление возрастает и наиболее заметно на начальном этапе индентирования. Атомная структура липопротеина сохраняет при этом свою целостность, и процесс разрушения молекулярной системы не наблюдается.

В ходе проведения численного эксперимента было установлено, что фосфолипидная молекула *DPPC* частично затягивается в полость углеродной нанотрубки. Процесс инкапсулирования представлен на рис. 6. Хорошо видно, что уже

Рис. 6. Процесс затягивания фосфолипида *DPPC* в нанотрубку (7,7)

в первые пикосекунды один из хвостов *DPPC* проникает внутрь. Однако целиком молекула не вмещается в полость углеродной нанотрубки (7,7), поэтому часть головы и второй хвост остаются вовне. При этом они поворачиваются, вращаясь вокруг края трубки. По окончании индентирования, когда трубка вытягивается из макромолекулы назад, молекула *DPPC* остается в ней, удерживаемая вандерваальсовым взаимодействием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследован процесс индентирования липопротейна высокой плотности иглами атомно-силовой микроскопии, представляющими собой однослойные нанотрубки суб- и нанометрового диаметров. Выявлен ряд новых интересных явлений. Липопротейн очень эластичен и способен уворачиваться частично от внешнего воздействия в виде иглы атомно-силовой микроскопии без потери общей целостности. При этом он деформируется как мягкий, но упругий шарик. Другой интересный результат нашей работы заключается в том, что индентирование нанотрубками диаметром менее 0,9 нм позволяет обеспечить неразрушающий процесс, исключающий затягивание молекул – структурных элементов липопротейна высокой плотности – в нанопространство трубки.

Обнаружено также, что в ходе индентирования липопротейновые пояса перестраиваются в структуре липопротейна высокой плотности таким образом, что игла атомно-силовой микроскопии проходит не сквозь них, а сквозь фосфолипидную среду. Все перечисленное позволяет предположить, что эластичность и высокая способность к перестроению структуры без потери целостности обеспечивает липопротейнам хорошую диффузионную способность проникновения сквозь межэндотелиальные щели в интиму артерий. Как известно, межэндотелиальные щели имеют сложную форму, при этом они достаточно узкие, сравнимые с размером липопротейна. Однако на основе имеющихся результатов авторы могут прогнозировать механизм диффузии липопротейна высокой плотности. Липопротейны способны деформироваться так, чтобы пройти сквозь узкие щели.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00128, СГУ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsterenetal W.F., DiNola A., Haak J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* – 1984. – Vol. 81. – P. 3684–3690.
2. Furukawa K., Hibino H. Self-spreading of supported lipid bilayer on SiO₂ surface bearing graphene oxide // *Chem. Lett.* – 2012. – Vol. 41. – P. 1259–1261.
3. Lemak A.S., Balabaev N.K. On the Berendsen thermostat // *Mol. Simulat.* – 1994. – Vol. 13. – P. 177–187.
4. Liu S.J., Wen Q., Tang L.J., Jiang J.H. Phospholipid-graphene nanoassembly as a fluorescence biosensor for sensitive detection of phospholipase D activity // *Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 84. – P. 5944–5950.
5. Liu X., Suo R., Xiong S.L., Zhang Q.H., Yi G.H. HDL drug carriers for targeted therapy // *Clin. Chim. Acta.* – 2013. – Vol. 415. – P. 94–100.
6. Lu Q., Moore J.M., Huang G., Mount A.S., Rao A.M., Larcom L.L., Ke P.C. RNA polymer translocation with single-walled carbon nanotubes // *NanoLett.* – 2004. – Vol. 4. – P. 2473–2477.
7. Marrink S.J., de Vries A.H., Mark A.E. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations // *J. Phys. Chem. B.* – 2004. – Vol. 108. – P. 750–760.
8. Mashaghi S., Jadidi T., Koenderink G., Mashaghi A. Lipid nanotechnology // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 4242–4282.
9. Massey J.B., Pownall H.J., Macha S., Morris J., Tubb M.R., Silva R.A. Mass spectrometric determination of apolipoprotein molecular stoichiometry in reconstituted high density lipoprotein particles // *J. Lipid Res.* – 2009. – Vol. 50. – P. 1229–1236.
10. Nechaeva O.V., Torgashov G.V., Glukhova O.E., Permyakova N.F., Kushnarenko A.N., Konnov N.P., Samarskiy M.V. Study of the influence of carbon nanotubes on the water medium and biological environment // *Radioelectronics.* – 2009. – № 9. – P. 59–63.
11. Phillips J.C., Wriggers W., Li Z., Jonas A., Schulten K. Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks // *Biophys. J.* – 1997. – Vol. 73. – P. 2337–2346.
12. Prassl R., Laggner P. Molecular structure of low density lipoprotein. Current status and future challenge // *Eur. Biophys. J.* – 2009. – Vol. 38. – P. 145–158.
13. Raczynski P., Górny K., Pabiszczak M., Gburski Z. Nanoindentation of biomembrane by carbon nanotubes – MD simulation // *Comp. Mater. Sci.* – 2013. – Vol. 70. – P. 13–18.
14. Shih A.Y., Arkhipov A., Freddolino P.L., Schulten K. Coarse grained protein–lipid model with application to lipoprotein particles // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – Vol. 110. – P. 3674–3684.
15. Shih A.Y., Freddolino P.L., Arkhipov A., Schulten K. Molecular models need to be tested: the case of a solar flares discoidal HDL model // *J. Struct. Biol.* – 2007. – Vol. 157. – P. 579–592.
16. Titov A.V., Král P., Pearson R. Sandwiched graphene–membrane superstructures // *ACS Nano.* – 2010. – Vol. 4. – P. 229–234.
17. Vuorela T., Catte A., Niemela P.S., Hall A., Hyvo M.T., Marrink S.J., Karttunen M., Vattulainen I. Role of lipids in spheroidal high density lipoproteins // *PLoS. Comput. Biol.* – 2010. – Vol. 6, № 10. – P. 1–14.
18. Wallace E. J., Sansom M.S. Blocking of carbon nanotube based nanoinjectors by lipids: a simulation study // *NanoLett.* – 2008. – Vol. 8. – P. 2751–2756.
19. Zeng D., Juzkiw T., Read A.T., Chan D.W., Glucksberg M.R., Ethier C.R., Johnson M. Young's modulus of elasticity of Schlemm's canal endothelial cells // *Biomech. Model. Mechanobiol.* – 2010. – Vol. 9. – P. 19–33.

NANOINDENTATION OF HIGH DENSITY LIPOPROTEINS BY CARBON NANOTUBES: MULTISCALE MODELLING

O.E. Glukhova, O.A. Grishina, G.V. Savostyanov (Saratov, Russia)

The mathematical modelling of the effect of the needle of an atomic force microscope that was made of the single-walled carbon nanotube on biomacromolecule of high density lipoprotein was carried out. A numerical experiment was conducted using a coarse-grained molecular dynamics using a combination of Berendsen thermostat and collision thermostat to account for heat exchange with the environment. High density lipoprotein model was built using the self-assembly in the water at $T = 310$ K from coarse-grained models of

300 phospholipid molecules such as DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine) of lipoproteins and two belts, each of which is composed of 1100 aggregated particles (grains) of proteins. The lipoprotein molecule was set on a graphene substrate for modelling of indentation process. Indentation was conducted by nanotubes of sub- and nanometer range diameter. It was found that biomacromolecule of high density lipoprotein deformed by 10–50% in different directions when approaching needle. At the same time, high density lipoprotein unfolds so that the mechanical effect of the nanotube was minimal. In this case, the atomic structure of lipoprotein retains integrity, and the process of destruction of the molecular system is not observed. The results of numerical experiments have shown that we observed a decrease in energy of the van der Waals interaction at each step of the indentation i.e. the system is rearranged so that the interaction of the lipoprotein with the nanotube became more favorable in energy. Using coarse-grained molecular dynamics simulation, we have established that a process of molecules sucking – structural elements of high density lipoproteins in nanospace of a tube is observed in a case of the use of nanotubes with a diameter of 0.9 nm and more as a nanoindenter. The obtained results allow us to recommend the carbon nanotubes as a capsule for transporting drugs into the body.

Key words: high density lipoprotein, carbon nanotubes, coarse-grained modelling, molecular dynamics, nanoindentation.

Получено 8 июля 2014