

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок

Вплив противірусних та тромболітичних препаратів на модельні мембрани вірусних частинок та клітин еукаріот

Назва конкурсу: «Наука для безпеки людини та суспільства»

Реєстраційний номер Проєкту: 2020.01/0043

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 2020.01/0043 Вплив противірусних та тромболітичних препаратів на модельні мембрани вірусних частинок та клітин еукаріот

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства» (назва конкурсу)
протокол від «___» «_____» 20__ року № _____

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Загальна тривалість виконання проєкту 2020 рік – 2021 рік

Тривалість виконання Проєкту у 2020 році

Початок – 03 листопада 2020
(дата укладання Договору про виконання наукового дослідження і розробки)

Тривалість виконання Проєкту у 2021 році

Початок – 23 квітня 2021
(дата укладання Договору про виконання наукового дослідження і розробки)

Закінчення – 15 грудня 2021

Загальна вартість Проєкту, грн. 6 751 000,00

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 2 537 500,00

2-й рік 4 213 500,00

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту залучено 11 виконавців, з них:

доктори наук 3;

кандидати наук 8;

інші працівники 0.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Інститут фізики, Державна організація, підпорядкованість Національна Академія Наук України, код за ЄДРПОУ 05417302, КВЕД 72.19.

Субвиконавець:

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна, Державна організація, підпорядкованість Національна Академія Наук України, код за ЄДРПОУ 05417288, КВЕД 72.11; 72.19.

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту Дослідження молекулярних механізмів дії амфіфільних лікарських препаратів на ліпідні мембрани вірусних частинок та клітин, які інфікуються вірусами, їх механізмів чутливості до мембранотропних ліків. Оцінка можливості селективного впливу на вірусні мембрани за допомогою мембранотропних ліків і дизайну нових препаратів.. (до 200 знаків)

4.2. Основні завдання Проєкту

- Розробити адекватні моделі ліпідної мембрани вірусу SARS-CoV-2 in vitro та in silico.
- Дослідити вплив препаратів з противірусною (римдесивір) та тромболітичною дією (тікагрелор), що застосовуються при терапії COVID-19 на моделі ліпідних мембран вірусних частинок та клітин in vitro та in silico, а також на клітинні мембрани in vivo.
- Визначити вплив досліджуваних речовин на фізичні властивості, фазовий стан та впорядкованість мембран.
- Визначити вплив холестеролу та температури на взаємодію препаратів із модельними мембранами.
- Дослідити молекулярні механізми вбудовування амфіфільних ліків у модельні мембрани in silico за допомогою методу повноатомної молекулярної динаміки для пласких бішарів та біцел з заданою кривизною, що відповідає кривизні вірусної мембрани.
- Оцінити функціональний вплив амфіфільних лікарських препаратів на модельні системи (синаптосоми).
- Порівняти вплив лікарських препаратів на модельні вірусні мембрани та мембрани клітин з метою оцінки можливості селективного впливу на вірусні частинки

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Дослідження противірусних препаратів на сьогодні є важливим напрямком, особливо актуальним у зв'язку із глобальною пандемією, спричиненою вірусом SARS-CoV-2.

Вбудовування амфіфільних препаратів у мембрани може впливати на проникнення вірусних частинок у клітину. Вони можуть модифікувати композицію ліпідів і плинність мембран. Ці зміни можуть полегшити / ускладнити доступ вірусних часток в клітини.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Вперше досліджується вплив мембранотропних препаратів на фізичні характеристики, параметри структурної організації ліпідних мембран, наближених за складом, фізичними властивостями до вірусних мембран та плазматичної мембрани клітин людини, його перспективність для противірусної терапії, можливість досягти селективності мембранотропної дії на мембрани.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Модельними об'єктами будуть: сильно викривлені мембрани штучних

ліпосом, штучні ліпідні бішари, мембрани термінацій нервових клітин, штучні ліпосоми.

Дослідження будуть проводитись біохімічними методами та методами ІЧ, Раманівської та флуоресцентної спектроскопії, конфокальної мікроскопії, комп'ютерного моделювання методами молекулярної динаміки..

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

За результатами проєкту було виконано всі поставлені задачі згідно з технічним завданням.

- Було створено модельну мембрану *in silico*, що відповідає за ліпідним складом та кривизною мембрані вірусу SARS-CoV-2 та клітин легеневого епітелію людини.
- Проведено симуляцію спонтанного вбудовування тікагрелору та ремдесивіру у модельні мембрани. Оцінено здатність створених модельних мембран до агрегації. Отримано модельну мембрану *in vitro* та визначено вплив кривизни поверхні на впорядкування ліпідів.
- Згідно з даними молекулярної динаміки (МД) та коливальної спектроскопії (ІЧ, Раман) визначено, що противірусні препарати ремдесивір та тікагрелор можуть спонтанно вбудовуватись у зовнішній моношар біологічної мембрани.
- Спектроскопічні дані свідчать, що взаємодія викликає найбільші зміни у молекулярних групах PO_2^- та OH , молекулярні групи CH реагують слабше. За даними флуоресцентної спектроскопії з використанням зонда NR12S спостерігалось зменшення впорядкованості мембрани для тікагрелору. Ремдесивір у концентраціях включно до 100 мкМ не впливає на впорядкованість мембрани, а у концентрації більше 100 мкМ - збільшував впорядкованість.
- Визначено вплив холестеролу та гіпер-/гіпотермії на взаємодію препаратів із ліпідною мембраною нервових терміналів та модельних бішарів.
- Оцінено можливості селективного впливу на вірусні мембрани за допомогою мембранотропних ліків на основі фізичних відмінностей вірусних та клітинних мембран.
- Розроблено рекомендацій щодо можливостей створення нових препаратів, які матимуть більший вплив на вірусні мембрани.
- Визначено вплив мембранотропних препаратів на пороутворення у пласкій бішаровій мембрані.
- Досліджено дію препаратів на ключові характеристики синаптичної передачі у нервових терміналях головного мозку шурів: накопичення та вивільнення глутамату та ГАМК, екзоцитоз, мембранний потенціал, ацидифікацію синаптичних везикул, спонтанну та стимульовану генерацію активних форм кисню.

В ході виконання завдань визначено, що:

1. Ремдесивір та тікагрелор спонтанно вбудовуються у зовнішній моношар біологічної мембрани. Препарати проходять через мембрану синапсом, найбільше це відчувають фосфатні молекулярні групи PO_2^- та OH зв'язки ліпідів, CH зв'язки реагують слабше.

3. Ремдесивір та тікагрелор гасять люмінесценцію синапсом і практично не впливають на спектроскопічні особливості синапсом, в той же час ІЧ спектри синапсом, інкубовані з ремдесивіром та тікагрелором відчувають проходження препаратів по змінах в структурі ліпідного шару синапсом, причому ці зміни більші в неактивних синапсомах.

3. Згідно з даними МД обидва препарати зменшують параметр порядку ліпідних хвостів зовнішнього моношару мембрани у безпосередній близькості до молекул ліганду і дещо збільшують його на більших відстанях.

4. В експериментах з флуоресцентної спектроскопії спостерігалось зменшення впорядкованості мембрани для тікагрелору в концентраціях, починаючи з 2 мкМ. Ремдесивір у концентраціях включно до 100 мкМ не впливав на впорядкованість мембрани, а у концентрації більше 100 мкМ - збільшував її. Обидва препарати і ремдесивір і тікагрелор, індукують злиття модельних ліпосом.

5. Ремдесивір може збільшувати провідність БЛМ шляхом утворення стабільних потенціалозалежних неіоноселективних пор в БЛМ. Вперше показані прямі мембранотропні та нейротропні ефекти ремдесивіру та тікагрелору пов'язані з L-[^{14}C] глутаматом та [^3H]ГАМК.

6. Результати Проєкту опубліковані у 4-х статтях (Journal of Chemical Theory and Computation, FlatChem, European Neuropsychopharmacology, Пріоритетні напрями та вектори розвитку світової науки»), дві роботи знаходяться на рецензії (Molecular Crystals and Liquid Crystals, Experimental Neurology) та 9-х тезах міжнародних конференцій:

1. GABAA receptor agonist cinazepam and its active metabolite 3-hydroxyphenazepam act differently at the presynaptic site / [T. Borisova, N. Pozdnyakova, M. Dudarenkova et al.] // *European Neuropsychopharmacology*. – 2021. – vol. 45. –P. 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.03.013>
2. Yesylevskyy S., Khandelia H. EnCurv: Simple Technique of Maintaining Global Membrane Curvature in Molecular Dynamics Simulations // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2021. – T. 17. – №. 2. – С. 1181-1193. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00800>
3. Coherent anti-stokes Raman scattering spectroscopy (CARS) and imaging of DNA on graphene layers and glass covers / [G. Dovbeshko, O. Gnatyuk, A. Dementjev et al.] // *FlatChem*.- 2021.- Vol.27. – p. 100243. <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2021.100243>
4. Afonina Uliana, Dovbeshko Galina. FTIR - ATR spectroscopy for studying lipid rafts targeting by antiviral drug remdesivir. II Міжнародна студентська наукова конференція «Пріоритетні напрями та вектори розвитку світової науки». - 2021.- Т.2. р. 78-81. DOI <https://doi.org/10.36074/liga-inter-19.11.2021>
5. O.P. Gnatyuk, U.K. Afonina, N. Krisanova, N. Pozdnyakova, T.O. Borisova, S.O. Karakhim and G.I. Dovbeshko Spectroscopic signatures of synaptosomes: ATR-IR spectroscopy data. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* [under review]
6. Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Dudarenko M., Gnatyuk O., Afonina U., Pyshev K., Dovbeshko G., Yesylevskyy S., Borisova T. Anti-SARS-CoV-2 drug remdesivir influences excitatory and inhibitory neurotransmission in cortex nerve terminals. *Experimental Neurology* (EXNR-21-765), [under review]
7. O. Gnatyuk, G. Dovbeshko, U. Afonina, N. Krisanova, N. Pozdnyakova, T. Borisova Spectroscopic signature of remdesivir and its interaction with synaptosome XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXV ISSSMC). Kyiv, Ukraine, September 21-24, 2021. p. 96
8. U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk, K.A. Pyshev, G.I. Dovbeshko. Remdesivir does inhibit the formation of lipid rafts 7th International Conference NANOBIOPHYSICS:Fundamental and Applied Aspects, 4 – 8 October 2021 , Kharkiv, Ukraine.p.25
9. Spectral characteristics of isolated presynaptic nerve terminals / [U. Afonina, O. Stanovyi, G. Dovbeshko et al.] // XVII International scientific conference for students and PhD students ‘Youth and progress of biology’: International scientific conference, Lviv, Ukraine, 19–21 April 2021 – Lviv, 2021. – P. 30.
10. G.I. Dovbeshko, S.O. Yesylevskyy, U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk, O.P. Stanovyi, N. Krisanova, N. Pozdnyakova, A. Pastukhov, K.O. Pyshev, T.O. Borisova, M.V. Bogdanov Spectroscopic signatures of real and mimetic membranes as diagnostic markers for the interaction of anti-viral drug Remdesivir with the cell membranes XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXV ISSSMC). Kyiv, Ukraine, September 21-24, 2021. p. 18
11. Barabash Yu.M., Olenchuk M.V. A technique liposomal forms preparation as carriers of water-soluble and water-insoluble drugs 7th International Conference NANOBIOPHYSICS:Fundamental and Applied Aspects, 4 –8 October 2021, Kharkiv, Ukraine. p.27
12. Barabash Yu.M Identification of Hidden Parameters of Conformational States During Photoexcitation of Protein Macromolecules XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXV ISSSMC). Kyiv, Ukraine, September 21-24, 2021. p. 176
13. G.I. Dovbeshko, S.O. Yesylevskyy, U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk , M.V. Olenchuk, Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Pyshev K., Borisova T., Bogdanov M. The effect of ticagrelor

- on the structural properties of synaptosomes: IR spectroscopy studies XIV Міжнародна конференція по біоніці і прикладній біофізиці, Київ, Україна, 4-5 листопада 2021 року, р. 18
14. G.I. Dovbeshko, S.O. Yesylevskyy, U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk, M.V. Olenchuk, Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Pyshev K., Borisova T., Bogdanov M. The effect of low temperatures on the structural properties of synaptosomes: FTIR spectroscopy Data. XIV Міжнародна конференція по біоніці і прикладній біофізиці, Київ, Україна, 4-5 листопада 2021 року, р. 22
15. Yesylevskyy S., Khandelia H. Maintaining global membrane curvature in molecular dynamics simulations using encurv technique // 7th International Conference NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects, 4 –8 October 2021, Kharkiv, Ukraine. p.106

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

1. Розроблені моделі ліпідної мембрани вірусу SARS-CoV-2 *in vitro*, що являють собою одношарові ліпосоми з кривизною, що відповідає розміру вірусної частинки та ліпідним складом, що наближений до клітин легеневого ендотелію.
 2. Розроблено модель ліпідної мембрани вірусу SARS-CoV-2 *in silico*.
 3. Досліджено вплив римдесивіру та тікагрелору на фізичні властивості (фазовий стан та впорядкованість) модельних мембран вірусних частинок та клітин *in vitro* та *in silico*, а також на клітинні мембрани синапсом *in vivo*.
 4. Досліджено молекулярні механізми вбудовування амфифільних ліків у модельні мембрани *in silico* за допомогою методу повноатомної молекулярної динаміки.
- Отримані результати щодо впливу мембранотропних лікарських препаратів на спеціально розроблені моделі вірусних та клітинних мембран не мають аналогів у світі.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Існуючі наукові дослідження впливу подібних препаратів спрямовані на їх таргетну взаємодію з білковими рецепторами і не враховують прямий вплив на ліпідний бішар. Моделювання вірусних мембран з реалістичною кривизною та ліпідним складом в цьому проєкті проведено вперше і може бути основою для оцінки ефективності дії нових противірусних препаратів на основі їх впливу на ліпідний матрикс.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

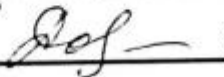
Результати можуть бути використані у подальших дослідженнях з дизайну противірусних лікарських препаратів проти мембраномісних вірусів, включно з пандемічним SARS-CoV-2. Зокрема, вони дозволять оцінити перспективність нестандартного підходу до таргетування противірусних препаратів безпосередньо до ліпідного компоненту вірусної оболонки. Результати проєкту свідчать про те, що існує можливість прямого впливу лікарських препаратів на вірусну мембрану, але потрібні додаткові дослідження для з'ясування меж величини та селективності цього ефекту. Якщо селективність виявиться високою, це відкриє шлях до створення принципово нового класу мембранотропних противірусних лікарських засобів. Якщо таку можливість не буде підтверджено, це дозволить не витратити подальші зусилля на малоперспективному напрямку досліджень.

Розроблені в цій роботі модельні мембранні системи можуть надалі використовуватися для оцінки впливу новітніх противірусних препаратів на мембрани вірусів з різним ліпідним складом. Запропоновано зосередити пошук нових противірусних препаратів в напрямку саме аденозинових похідних, а не інших нуклеозидних аналогів. При розрахунку терапевтичних доз препаратів потрібно враховувати нейротропні ефекти.

Примітка: Анотований звіт не містить відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проекту
головний науковий співробітник
відділу фізики біологічних систем ІФ НАНУ
(посада)

д.ф.-м.н., гол.н.с. Галина ДОВБЕШКО
(Власне ім'я та ПРИЗВИЩЕ)

 (підпис)