УДК 53.09
№ держреєстрації 0121U111116
Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, тел: 239-31-25

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
професор _____ Ганна ТОЛСТАНОВА
«14» _____ 2021 р.

ЗВІТ

про науково-дослідну роботу

за договором від «29» жовтня 2020 р. № 101/01.2020
за договором від «28» квітня 2021 р. № 43/01/0103

ВПЛИВ СТРУКТУРИ ТА ФІЗИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІПІДНОЇ МЕМБРАНИ НА РОЗВИТОК ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

грантова підтримка Національного фонду досліджень України у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»

(остаточний)

Науковий керівник НДР
д.ф.-м.н., проф., академік НАН України _____ Леонід БУЛАВІН

2021

Результати роботи розглянуто Науково-технічною радою Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
протокол № 10 від 09. 12. 2021 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Науковий керівник НДР, головний науковий співробітник, д.ф.-м.н., проф., академік НАН України	Леонід БУЛАВІН (реферат, вступ, підрозділ 2.7, висновки)
Відповідальний виконавець, провідний науковий співробітник, д.ф.-м.н., ст. досл.	Ірина ДОРОШЕНКО (підрозділ 2.1, розділ 3)
Виконавці: старший науковий співробітник, д.ф.-м.н.	Дмитро СОЛОВЙОВ (підрозділи 1.1, 1.3, 1.5)
Науковий співробітник, д.ф.-м.н.	Тимофій НІКОЛАЄНКО (підрозділи 2.2 – 2.6)
Науковий співробітник, к.ф.-м.н.	Олександр ІВАНЬКОВ (підрозділи 1.4, 1.5)
Провідний інженер	Валентина ІЛЯШ (підрозділ 1.2)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 105 с., містить 3 розділи, 49 рис., 7 табл., 65 джерел.

Об'єкт дослідження: структура та властивості ліпідних мембран
Мета роботи: виявлення особливостей структури та динамічних характеристик ліпідної мембрани під час взаємодії з вірусним патогеном
Методи дослідження: малокутове розсіяння нейтронів, коливальна спектроскопія, молекулярна динаміка

Ключові слова: ЛІПІДНА МЕМБРАНА, ХОЛЕСТЕРИН, МЕЛАТОНІН, МАЛОКУТОВЕ РОЗСІЯННЯ НЕЙТРОНІВ, SARS-CoV-2, КОЛИВАЛЬНА СПЕКТРОСКОПІЯ

Методом молекулярної динаміки проведено комп'ютерне моделювання впливу домішок (мелатонін, холестерин, білкові молекули) на структурні властивості модельної ліпідної мембрани на основі диміристоїлфосфатидилхоліну (ДМФХ). Оцінено залежність структурних параметрів модельної ліпідної мембрани, утвореної подвійним шаром молекул ДМФХ, у складі водної рідинної системи від вмісту домішок. Досліджено вплив S-протеїну («шипа») коронавірусу SARS-CoV-2 на структурні параметри модельної ліпідної мембрани на модельних системах на основі ДМФХ з домішками холестерину або мелатоніну в різних концентраціях.

Проведено експериментальне дослідження структурних особливостей взаємодії білкових молекул з модельними ліпідними мембранами методами малокутового розсіяння нейтронів та коливальної спектроскопії. Порівнювались структурні параметри наступних систем: водний розчин ДМФХ без домішок, розчин ДМФХ з додаванням білкових молекул (RBD SARS-CoV-2), розчини ДМФХ до дадаванням 15% та 30% мелатоніну або холестерину, системи ДМФХ + 30% мелатоніну або холестерину + RBD SARS-CoV-2.

Показано, що збільшення концентрації мелатоніну в ліпідній мембрані призводить до зменшення товщини ліпідного бішару, а збільшення концентрації холестерину, навпаки, призводить до збільшення товщини ліпідного бішару незалежно від фазового стану ліпідної системи. Виявлено також, що взаємодія активної частини S-протеїну відбувається навіть при відсутності в модельній системі трансмембранного білка ACE2, тобто саме з головними частинами мембрани. Зроблено припущення, що збільшення концентрації мелатоніну в мембрані запобігає взаємодії коронавірусного S-протеїну з ліпідною мембраною. За присутності домішок холестерину в системі взаємодія ліпідної мембрани з активною частиною S-протеїну відбувається залежно від фазового стану ліпіду.

ABSTRACT

SRW report: 105 p., includes 3 chapters, 49 figs., 7 tables, 65 references.

Research object: structure and properties of lipid membranes
Purpose of work: detection of structural features and dynamic characteristics of lipid membrane during interaction with viral pathogen
Research methods: small angle neutron scattering, vibrational spectroscopy, molecular dynamics

Key words: LIPID MEMBRANE, CHOLESTEROL, MELATONIN, SMALL ANGLE NEUTRON SCATTERING, SARS-CoV-2, VIBRATIONAL SPECTROSCOPY

Molecular dynamics computer simulation of the effect of impurities (melatonin, cholesterol, protein molecules) on the structural properties of the model lipid membrane based on dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) was performed. The dependence of the structural parameters of the model lipid membrane formed by the double layer of DMPC molecules in the aqueous liquid system on the content of impurities was estimated. The effect of SARS-CoV-2 coronavirus S-protein ("thorn") on the structural parameters of the model lipid membrane on model systems based on DMPC with impurities of cholesterol or melatonin in different concentrations was studied.

An experimental study of the structural features of the interaction of protein molecules with model lipid membranes by small angle neutron scattering and vibrational spectroscopy was performed. The structural parameters of the following systems were compared: aqueous DMPC solution without impurities, DMPC solution with the addition of protein molecules (RBD SARS-CoV-2), DMPC solutions with the addition of 15% and 30% melatonin or cholesterol, DMPC + 30% melatonin or cholesterol + RBD SARS-CoV-2.

It is shown that an increase in the concentration of melatonin in the lipid membrane leads to a decrease in the thickness of the lipid bilayer, and an increase in the concentration of cholesterol, in contrast, leads to an increase in the thickness of the lipid bilayer regardless of the phase state of the lipid system. It was also found that the interaction of the active part of the S-protein occurs even in the absence of the ACE2 transmembrane protein in the model system, i.e. with the main parts of the membrane. It has been suggested that increasing the concentration of melatonin in the membrane prevents the interaction of coronaviral S-protein with the lipid membrane. In the presence of cholesterol impurities in the system, the interaction of the lipid membrane with the active part of the S-protein occurs depending on the phase state of the lipid.

ЗМІСТ

СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАКИ. . ……. . 6
ВСТУП 7
1 ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН МЕТОДОМ МАЛОКУТОВОГО РОЗСІЯННЯ НЕЙТРОНІВ 11
1.1 Методика проведення експерименту. 12
1.2 Приготування зразків 15
1.3 Вплив холестерину на структуру ліпідного бішару 17
1.4 Вплив мелатоніну на структуру ліпідного бішару 19
1.5 Структурні особливості взаємодії S-протеїну SARS-COV-2 з модельними ліпідними мембранами 21
2 ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ДИНАМІКИ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН МЕТОДОМ КОМП'ЮТЕРНОГО МОДЕЛЮВАННЯ. 33
2.1 Квантово-хімічне моделювання спектроскопічних проявів міжмолекулярної взаємодії у воді. 33
2.2 Визначення статичного структурного фактору подвійного шару молекул фосфоліпідів за допомогою комп'ютерного моделювання 39
2.3 Загальна характеристика систем, вибраних для моделювання взаємодії мембрани з вірусом методом молекулярної динаміки 46
2.4 Методика молекулярно-динамічного моделювання 51
2.5 Результати моделювання впливу домішок на структурні властивості модельної ліпідної мембрани 56
2.6 Динамічний структурний фактора модельної ліпідної мембрани з домішками та його залежність від компонентного складу системи. 64
2.7 Моделювання деформаційної поведінки системи "коронавірус–клітина". 76
3 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ СТРУКТУРИ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН МЕТОДОМ КОЛИВАЛЬНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ 84
3.1 Спектроскопія ІЧ поглинання модельних систем ліпідних мембран . 84
3.2 Спектри КРС модельних систем ліпідних мембран 90
3.3 Спектральні прояви впливу холестерину на структуру ліпідної мембрани на основі ДОФХ 92
ВИСНОВКИ 96
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ 99
ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ВИДАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ. 104

СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАКИ

ДМФХ (DMPC) – димiристоїлфосфатидилхолін (2R)-2,3-Bis(tetradecanoyloxy) propyl 2-(trimethylazaniumyl)ethyl phosphate)
ДОФХ (DOPC) – диолеоїлфосфатидинхолін
ДПФХ (DPPC) – дипальмітоїлфосфатидилхолін (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)
ІЧ – інфрачервоний
КРС – комбінаційне розсіяння світла
МКРН – малокутове розсіяння нейтронів
Мел (Mel) – мелатонін
Хол (Chol) – холестерин
СФ – структурний фактор
ССФ – статичний структурний фактор
ACE2 - ангіотензин-перетворювальний ензим 2 (angiotensin-converting enzyme 2)
RBD - рецептор-зв'язувальна ділянка (receptor-binding domain)
RMSD – середньоквадратичне відхилення
S - «шип» вірусу (spike glycoprotein)

ВСТУП

Біологічна мембрана є основною структурною одиницею в живому організмі. Вона не лише обмежує клітину, а й виконує функції, які набагато складніші, ніж звичайний бар'єр. Біологічні мембрани можна порівняти із сучасними автоматизованими механізмами, які регулюють транспорт речовин усередину та назовні клітини, виконують сигнальну, захисну та селективну функції. При цьому мембрана кожної окремої органели має набір функцій, які визначаються певною структурною будовою самої мембрани. Вважається, що функції, які виконує біологічна мембрана, забезпечуються саме за рахунок значної кількості компонент, що входять до її складу.

Більш простою моделлю біологічної мембрани є ліпідна мембрана. Додавання різноманітних домішок (наприклад холестерину) до ліпідної мембрани може суттєво змінювати її фізичні властивості та структуру. Тому подібні експерименти можуть бути корисними для встановлення реальних механізмів життєдіяльності як окремих мембран, так і клітини в цілому.

Біологічні мембрани головним чином складаються з ліпідів та білків. Саме ліпідний бішар є тією матрицею, що формує каркас мембрани. Такий ліпідний бішар, з одного боку, виконує функції стабілізації каркаса, що відокремлює одну клітину від іншої, а з іншого - забезпечує її плинність і рухливість, які необхідні для підтримки біологічних функцій клітинними компонентами. У реальних мембранах у бішар також включені білки, що можуть знаходитись як усередині ліпідної фази, так і бути розташованими на її поверхні. Частка мембранних ліпідів у клітині сягає 40 % за масою.

При дослідженні клітинних мембран доводиться враховувати велику кількість факторів, пов'язаних з різноманіттям їхніх компонент. Тому для спрощення задачі в експериментах, як правило, використовуються так звані модельні ліпідні мембрани. Такі модельні системи зручні тим, що їхній склад чітко визначений. По суті їх можна порівняти з ліпідним скелетом, з якого

виключені зайві компоненти. Тому можна відносно легко досліджувати властивості таких систем та вплив на них зовнішніх факторів.

Назва «ліпіди» об’єднує велику кількість різноманітних органічних сполук, включаючи жирні кислоти з їхніми похідними, масла, гормони, які слабо взаємодіють з водою. Виділяють дві основні групи ліпідів, які відрізняються один від одного хімічною будовою, – прості та складні ліпіди. До групи простих ліпідів належать сполуки, що мають вуглеводневий ланцюг (хвіст) та функціональну групу, як правило, похідну певної кислоти, зокрема карбоксильної. Також до цієї групи включають спирти, сфінгозинові та вуглеводні основи, альдегіди. Прості ліпіди можуть бути присутні в живому організмі в натуральному вигляді, але процент вмісту їх невисокий. В основному вони виконують роль будівельного матеріалу для складних ліпідів.

Складні ліпіди мають більш комплексну структуру і складаються з декількох окремих частин, що поєднуються між собою слабкими зв’язками та можуть бути розщеплені при гідролізі. Зазначену велику групу ліпідів можна поділити на дві підгрупи: нейтральні (парафіни, воски, стерини, тригліцериди та ін.) та полярні ліпіди (фосфоліпіди, фосфогліколіпіди, миш’яколіпіди, гліколіпіди, сфінголіпіди та ін.). Одним з найбільш поширених класів полярних ліпідів є фосфоліпіди, які, з одного боку, у великій кількості присутні в реальних біологічних мембранах, а з іншого - є зручним компонентом та основою модельних ліпідних систем. Саме тому ліпіди цієї групи стали об’єктом наших досліджень.

До складу фосфоліпідної молекули входить досить компактна гідрофобна ліпідна голова та один або два вуглеводневі ланцюги – ліпідні хвости, які є залишками жирних кислот. Залежно від виду жирної кислоти хвости можуть мати різну довжину, бути насиченими та ненасиченими. Крім цього, одна молекула ліпіду може включати в себе два різні хвости. Усі ці фактори визначають структурні і термодинамічні властивості як окремих ліпідних молекул, так і в цілому мембран.

Характерною рисою фосфоліпідних молекул є їхня здатність до спонтанної самоорганізації. У водному розчині молекули групуються таким чином, щоб мінімізувати контакт гідрофобних хвостів з водою. У результаті цього можуть утворюватися міцели (при наявності лише одного ліпідного хвоста), або одно- та багатошарові ліпосоми (у випадку двох ліпідних хвостів), стінки яких складаються з концентрично розміщених ліпідних бішарів – двох ліпідних площин, розвернутих одна до одної хвостами. Такі форми структурної організації ліпідних молекул є найбільш енергетично вигідними. При цьому експериментально встановлено, що молекули води та деякі інші молекули можуть вільно проходити крізь ліпідний бішар, незважаючи на його внутрішню гідрофобну природу. Бішари між собою відокремлюються водним прошарком, товщина якого може сягати 20 Å. Діаметр самих ліпосом варіюється від декількох одиниць до декількох десятків мікрометрів. У випадку гідрофобного розчинника, наприклад хлороформу, відбувається мінімізація контакту ліпідних голів із розчинником, у результаті чого утворюються обернені міцели та ліпосоми з оберненими бішарами.

Найбільш відомим ліпідом, що міститься в переважній більшості клітин ссавців, є холестерин. Він належить до групи стеролів, у значних кількостях міститься в клітинах печінки, жирових тканинах тощо. Холестерин, так само як і більшість стеролів, відіграє особливу роль в упорядкуванні ліпідних молекул усередині біологічних мембран. На відміну від фосфоліпідів холестерин не має гідрофільної частини, він є повністю гідрофобним. Тому при попаданні у водну фосфоліпідну систему він уникає контакту з водою, розміщуючись в області фосфоліпідних хвостів. При цьому холестерин відіграє роль своєрідного модифікатора ліпідної фази. Збільшення його кількості в мембрані призводить до більш щільної упаковки молекул у ліпідному бішарі, а також до формування ліпідних рафтів (доменів) в мембрані. В літературі зустрічаються дані, що відзначають певну роль ліпідних рафтів у процесах зв’язування коронавірусів з клітиною. У деяких випадках наявність рафтів є необхідною

умовою для проникнення вірусу в клітину (наприклад, всередині рафту міститься мембранний білок, який зв’язується з вірусом), але водночас відомі випадки (вірус мишачого гепатиту), коли наявність рафтів ускладнює проходження вірусу в клітину, але механізм такого впливу є невідомим.

Відомо, що біологічний процес проникнення вірусу в клітину починається із взаємодії мембранного протеїна-рецептора ACE2 з S-протеїном (так званим «шипом») коронавірусу SARS-CoV2 [1 – 4]. Через неможливість експериментального дослідження систем з включенням трансмембранного білка ACE2 ми досліджували безпосередню взаємодію рецептор-зв'язувальної ділянки (RBD) глікопротеїну «шипа» S з основними частинами мембрани, в результаті чого було показано правомочність саме такого підходу. Таким чином, для визначення впливу S-протеїну коронавірусу SARS-CoV-2 на структурні параметри модельної ліпідної мембрани було проведено дослідження методом малокутового розсіяння нейтронів (МКРН) на наступних системах: водний розчин ДМФХ (Система 1), ДМФХ + 15%Мелатоніну/Холестерину (Система 2), ДМФХ + 30%Мелатоніну/Холестерину (Система 3) та ДМФХ + 30% мелатоніну/Холестерину + RBD SARS-CoV-2 (Система 4). Крім того, структурні особливості та відповідні фізичні властивості цих самих систем було досліджено також методами коливальної спектроскопії: комбнаційного розсіяння світла та інфрачервоного поглинання.

1 ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН МЕТОДОМ МАЛОКУТОВОГО РОЗСІЯННЯ НЕЙТРОНІВ

Відомо, що компонентний склад реальних біологічних мембран є досить різноманітним. Для визначення функціонального призначення кожної з її компонент необхідно досліджувати найбільш прості, одно- та двокомпонентні, ліпідні мембрани, поступово збільшуючи кількість компонент. В такий спосіб було досліджено впливу холестерину та мелатоніну на структурні параметри фосфоліпідних мембран. Для цього були проведені експерименти з малокутового розсіяння нейтронів (МКРН) на одношарових ліпідних везикулах. При цьому концентрація ліпіду в розчині D_2O становила 1%. У даному проєкті було досліджено зразки, що містять лише один ліпід, що є досить розповсюдженим в реальних біологічних мембранах. Такий підхід дозволяє уникнути появи додаткових ефектів, властивих багатокомпонентним ліпідним системам.

Вважається, що додавання холестерину в ліпідну мембрану призводить до збільшення її в’язкості [5]. Мелатонін, навпаки, знижує в’язкість мембрани. Відомо, що холестерин присутній в тканинах людини у фізіологічних концентраціях, що можуть сягати до 33% [6]. Натомість доведено, що мелатонін може контролювати вміст холестерину в мембрані та зменшувати його вплив на властивості мембрани та на процеси формування доменів всередині ліпідного бішару [7, 8]. Концентрація мелатоніну при цьому також може змінюватись у достатньо широких межах [9]. Такі протилежні ефекти впливу холестерину та мелатоніну на густину упаковки ліпідних молекул передбачають можливість отримання наперед заданих властивостей мембрани шляхом зміни концентрацій вказаних речовин. Ми вважаємо, що зміна концентрацій холестерину та мелатоніну у мембрані має суттєво впливати на функціонування мембранних білків, зокрема на їх взаємодію з вірусними патогенами.

1.1 Методика проведення експерименту

Експерименти з МКРН було проведено на спектрометрі ЮМО на 4-му каналі імпульсного реактора ІБР-2 в Об’єднаному інституті ядерних досліджень (м. Дубна) [10]. Основні вузли та деталі спектрометра зображені на рис. 1.1.

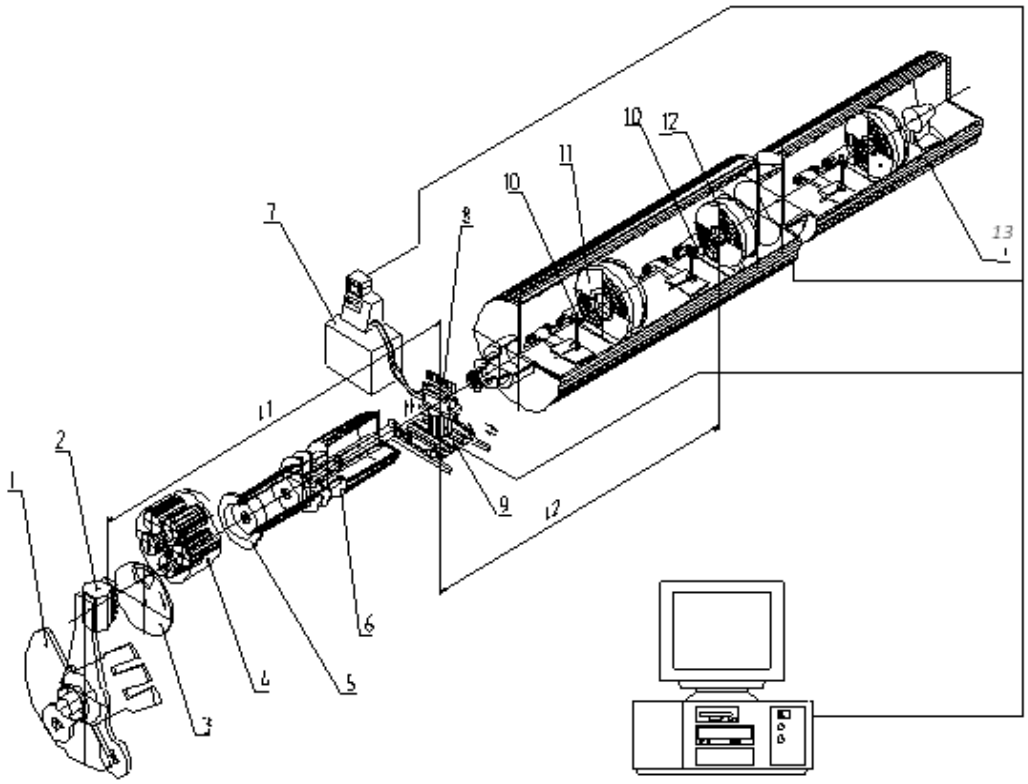


Рисунок 1.1 – Схема установки для проведення експериментів з малокутового розсіяння нейтронів ЮМО

Реактор ІБР–2М (1) створює імпульси нейтронів з частотою 5 Гц. Після проходження нейтронів через водяний сповільнювач (2) формується потік теплових нейтронів. За сповільнювачем розташований переривач (3), що зменшує фон та імпульси, сформовані додатковим рефлектором. Розмір і розбіжність пучка нейтронів формується коліматорною системою (4, 6). Нейтрони, що потрапляють на зразок, утворюють пучок від 8 до 22 мм в діаметрі з інтенсивністю до $2{,}6 \cdot 10^7$ нейтронів. Зразки розміщуються в спеціальному

боксі, що підігрівається і охолоджуються за допомогою термостата (7), що працює в діапазоні температур від –20ºС до +200 ºС. В боксі знаходиться штатив для кювет із зразками. Потік нейтронів, розсіяних на зразку (8), потрапляє в ступінчастий вакуумний нейтроновід, де розташовані кільцеві детектори нейтронів (11–12), а також детектор прямого пучка (13). Детектори розміщені на візку, який дозволяє встановлювати їх на певній відстані від зразка. Розташований безпосередньо перед детектором ванадієвий розсіювач (10) періодично вводиться і виводиться з пучка нейтронів, що дозволяє уникнути небажаних ефектів від довгоперіодних коливань потужності реактора і отримувати переріз розсіяння нейтронів в абсолютних одиницях.

Керування вузлами і механізмами спектрометра, а також контроль за всіма параметрами установки здійснювалися за допомогою програмного забезпечення SONIX [11].

Первинна обробка отриманих експериментальних даних здійснювалася за допомогою програмного комплексу SAS [12]. При обробці експериментальних даних було враховано ефективність реєстрації нейтронів кожним детектором, функція роздільної здатності установки для поточних умов експерименту, поправки на поглинання нейтронів зразком, фонові умови та некогерентне розсіяння [13].

Розчини досліджуваних зразків заливались в плоскі кварцеві кювети Hellma товщиною 1 мм, які далі встановлювались в багатопозиційну підставку, температура якої контролювалась за допомогою термостату Lauda. Отримані криві розсіяння були скоректовані на фонове розсіяння буферного зразка важкої води D_2O.

На рис. 1.2 червоними точками показано криву малокутового розсіяння нейтронів на розчині одношарових везикул ДПФХ (зразок 1) за температури 25°С.

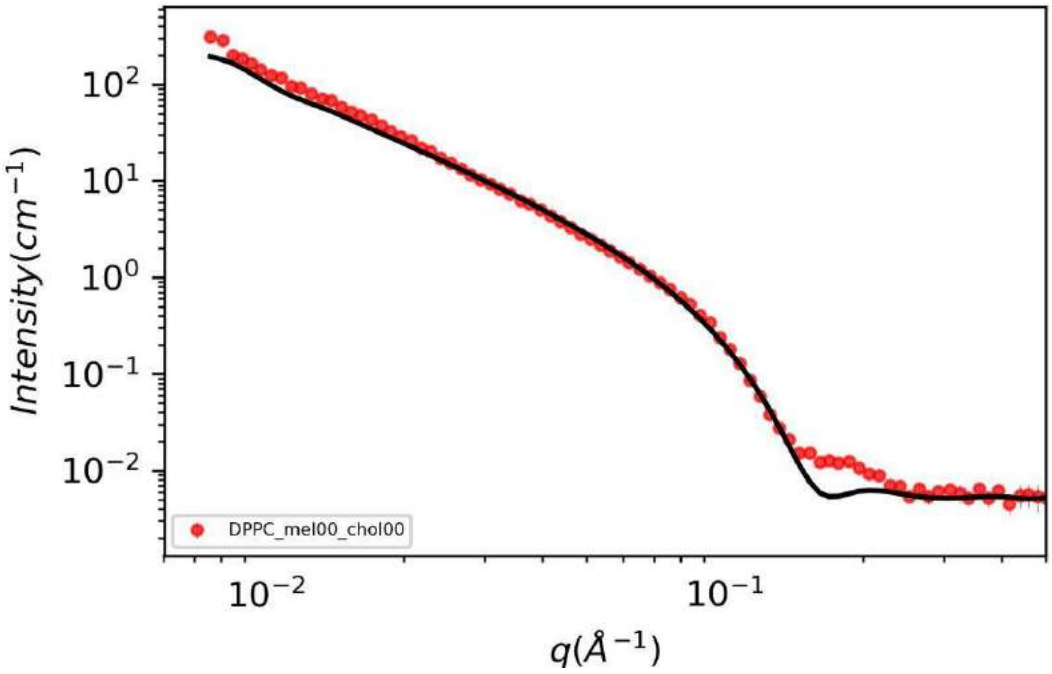


Рисунок 1.2 – Крива малокутового розсіяння нейтронів на одношарових везикулах, сформованих молекулами ДПФХ (червоні точки). Чорною лінією показано результат підгонки експериментальної кривої моделлю везикул в програмі SasFit

Для визначення структурних параметрів досліджуваного зразка отриману експериментальну криву було підігнано моделлю одношарової везикули з використанням програми SasFit. Модельну криву зображено на Рис. 1.2 чорною лінією. В результаті підгонки експериментальних даних було знайдено радіус везикул R (530±30Å) та товщину ліпідного бішару D (50,9±0,1Å). Оскільки радіус везикул вказує лише на якість приготування зразка і жодним чином не впливає на властивості ліпідного бішару, то надалі ми не будем порівнювати цю величину для різних зразків. Натомість, товщина ліпідного бішару D є досить важливим параметром з точки зору його впливу на властивості мембрани. Тому надалі ми зосередимось на тільки на дослідженні зміни товщини мембрани від її компонентного складу.

1.2 Приготування зразків

Для приготування ліпідних розчинів було використано ліпіди дипальмітоїлфосфатидилхолін (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (ДПФХ), диміристоїлфосфатидилхолін (ДМФХ, назва за IUPAC: (2R)-2,3-Bis(tetradecanoyloxy)propyl-2-(trimethylazaniumyl)ethyl phosphate, структурна формула представлена на рис. 1.3), диолеоїлфосфатидинхолін (ДОФХ), структурна формула якого представлена на рис. 1.4, а також холестерин та мелатонін у вигляді сухого порошку, придбані в компанії Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

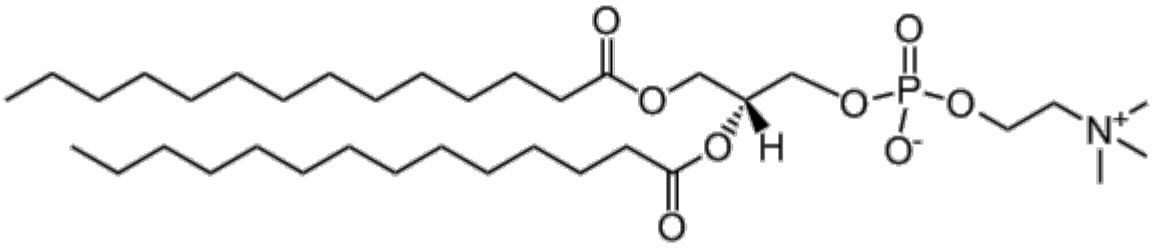


Рисунок 1.3 – Структурна формула диміристоїлфосфатидилхоліну (ДМФХ)

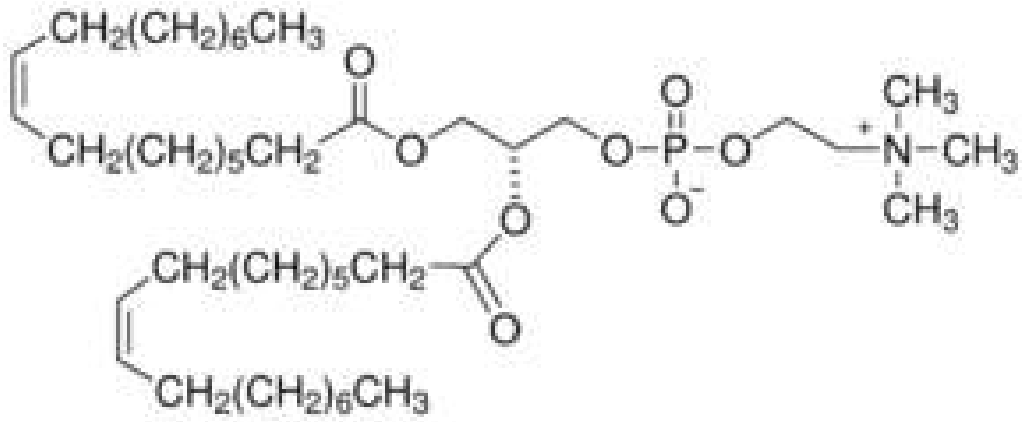


Рисунок 1.4 – Структурна формула диолеоїлфосфатидинхоліну (ДОФХ)

Необхідну кількість кожної з компонент зважували на вагах Sartorius в скляній тарі, а потім розчиняли в органічному розчиннику (1:1 суміш хлороформу та трифторетанолу) для отримання розчину з концентрацією ліпіду 25 мг/мл для однорідного змішування компонент в середині кожної суміші. Для запобігання окисленню ліпідів, хлороформ випаровували за допомогою інертного газу (аргону) до утворення ліпідної плівки. Залишки органічних розчинників видалялись шляхом розміщення ліпідних плівок всередині вакуумної камери протягом 12 годин. Після цього в кожну систему додавали відповідну кількість важкої води D_2O для отримання розчинів ліпідних систем з концентрацією 10 мг/мл. Така концентрація ліпіду з одного боку дозволяє забезпечити достатню інтенсивність розсіяння нейтронів, а з іншого запобігає взаємодії ліпідних везикул між собою та виключає ефект багатократного. Зауважимо, що важка вода використовувалась з метою забезпечення контрасту між розчинником та ліпідними молекулами, а також для зниження некогерентного фону, порівняно зі звичайною водою, під час проведення експерименту з МКРН. Після цього зразки ретельно перемішувались за допомогою шейкера Vortex, а потім охолоджували та заморожували при температурі T = - 20°C. Цикл заморозки-відтаювання повторювали для кожного зразка не менше п’яти разів з метою отримання гомогенних багатошарових везикул.

Для перетворення багатошарових везикул в одношарові кожен зразок за допомогою екструдера пропускався через спеціальний полікарбонатний фільтр з порами 500 Å (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL).

Оскільки головною метою даного проєкту є дослідження особливостей взаємодії ліпідних мембран з рецепторами коронавірусу вірусу SARS-CoV-2, тому до отриманих розчинів ліпідів (як у чистому вигляді, так і при додаванні холестерину та мелатоніну) було додано активну частину S-протеїну вірусу

SARS-CoV-2. Ця активна частина є частинкою «шипа», за допомогою якого вірус кріпиться до клітини. Її називають RBD – Receptor Binding Domain.

Для подальшого дослідження методами МКРН та коливальної спектроскопії були приготовані наступні системи:

1. розчин ліпіду у D_2O з концентрацією 10 мг/мл;
2. розчин ліпіду у D_2O з додаванням RBD S-протеїну коронавірусу SARS-CoV-2
3. розчин ліпіду у D_2O з додаванням 15% холестерину;
4. розчин ліпіду у D_2O з додаванням 30% холестерину;
5. розчин ліпіду у D_2O з додаванням 30% холестерину та RBD SARS-CoV-2
6. розчин ліпіду у D_2O з додаванням 15% мелатоніну;
7. розчин ліпіду у D_2O з додаванням 30% мелатоніну;
8. розчин ліпіду у D_2O з додаванням 30% мелатоніну та RBD SARS-CoV-2

На різних етапах виконання проєкту досліджувлись системи на основі різних ліпідів – ДПФХ, ДМФХ, ДОФХ. Проте, поведінка описаних вище систем не залежить від конкретного виду ліпіду.

1.3 Вплив холестерину на структуру ліпідного бішару

Для визначення впливу холестерину на структурні параметри ліпідного бішару ДПФХ було проаналізовано дані малокутового розсіяння нейтронів для зразків ДПФХ + 9%Мелатоніну + 9%Холестерину (Система 2) та ДПФХ + 9%Мелатоніну + 29%Холестерину (Система 3). Отримані експериментальні дані порівнювались з реперними спектрами, отриманими для одношарових везикул ДПФХ (Система 1). На рис. 1.5 наведено спектри малокутового розсіяння нейтронів для вказаних систем: помаранчевими точками – для Системи 2, синіми – для Системи 3. Червоними точками для порівняння показано спектр МКРН для Системи 1 (див. рис. 1.2).

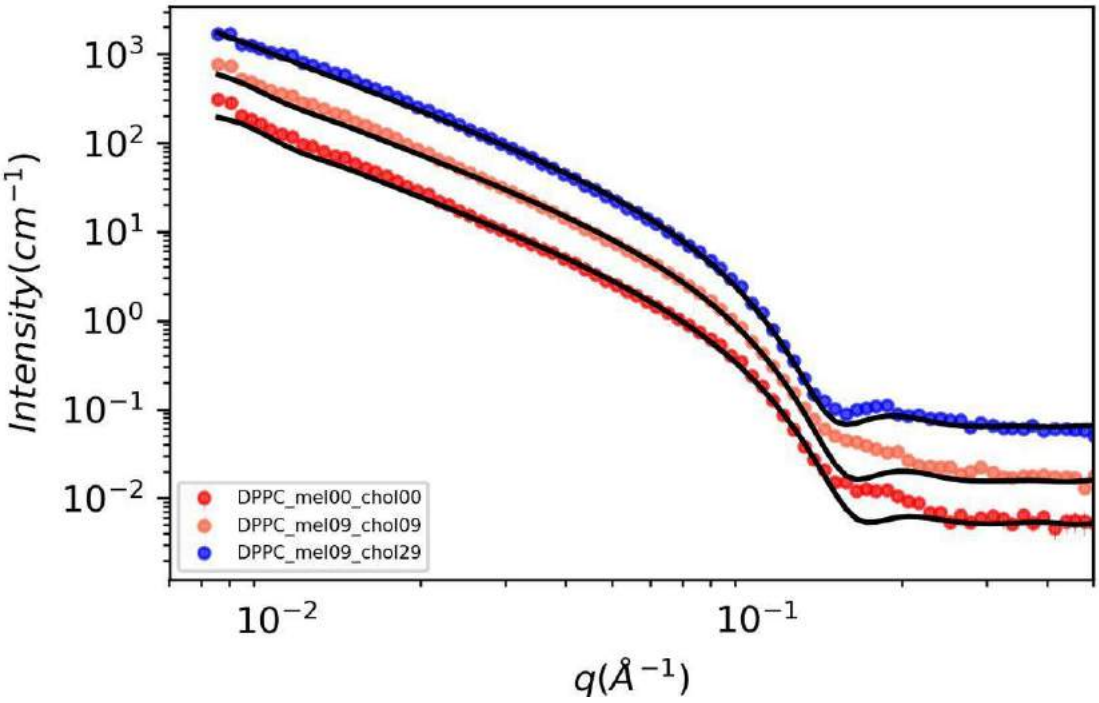


Рисунок 1.5 – Криві малокутового розсіяння нейтронів на розчинах ліпідних везикул для Системи 2 (помаранчеві точки) та Системи 3 (сині точки). Лініями показано результати підгонки експериментальних даних.

Підгонка експериментальних кривих моделлю одношарової везикули проводилася за методикою, описаною в п. 1.1. Модельні криві, отримані в програмі SasFit, представлені на рис. 1.5 чорними лініями окремо для кожної ліпідної системи. В результаті аналізу було знайдено товщини ліпідних бішарів для кожної з досліджуваних систем: 50,9 Å для Системи 2, що містила 9% холестерину, та 55 Å для Системи 3 із вмістом холестерину 29%. Таким чином, збільшення концентрації холестерину в ліпідній мембрані призвело до збільшення товщини ліпідного бішару. Такий ефект є досить очікуваним, оскільки конформація гідрофобних ліпідних хвостів при їх взаємодії з молекулами холестерину змінюється з цис- на транс- [14]. Це призводить до збільшення довжини хвостів, і, як наслідок, до збільшення товщини ліпідного бішару.

1.4 Вплив мелатоніну на структуру ліпідного бішару

Залежність товщини ліпідного бішару від концентрації мелатоніну в мембрані було встановлено шляхом порівняння структурних параметрів ліпідних Систем №№ 3, 4 та 6:

- Система 3: одношарові везикули ДПФХ з додаванням 29% холестерину та 9% мелатоніну.
- Система 4: одношарові везикули ДПФХ з додаванням 14% холестерину та 14% мелатоніну.
- Система 6: одношарові везикули ДПФХ з додаванням 29% холестерину та 29% мелатоніну.

Спектри малокутового розсіяння нейтронів для вказаних систем представлені на рис. 1.6.

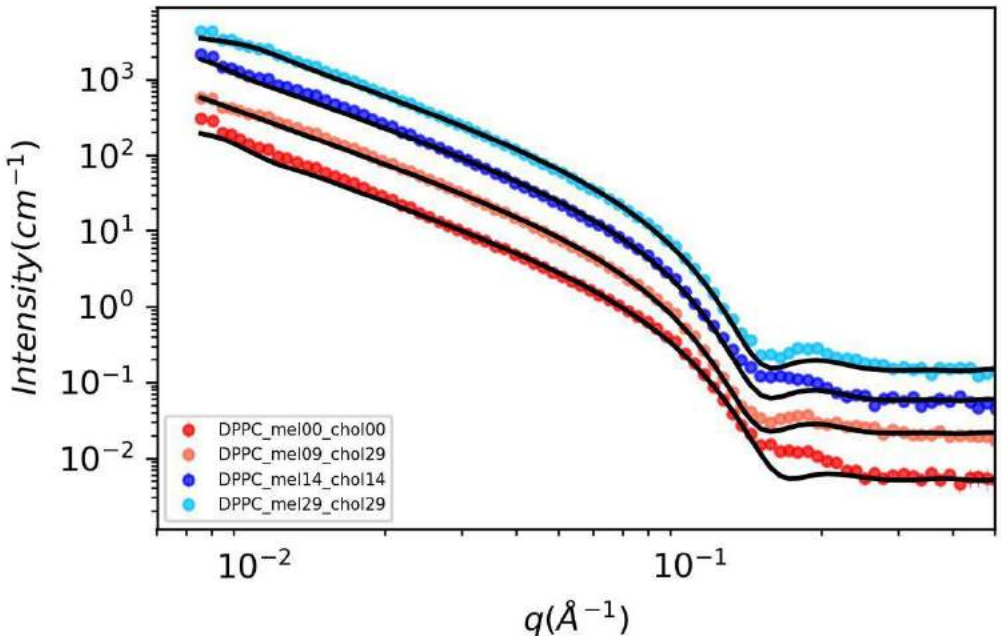


Рисунок 1.6 – Криві малокутового розсіяння нейтронів на розчинах ліпідних везикул для Системи 3 (помаранчеві точки), Системи 4 (сині точки) та Системи 6 (бірюзові точки). Червоні точки – крива розсіяння від Системи 1 (Рис.2), наведена для порівняння.

Значення товщин ліпідних бішарів для кожної системи, отримані в результаті підгонки експериментальних кривих моделлю везикули, представлені в Таблиці 1.1.

Таблиця 1.1 – Товщини ліпідних бішарів, визначені в результаті підгонки кривих малокутового розсіяння нейтронів

		Вміст мелатоніну, %	D, Å
Система 1	ДПФХ _mel00_chol00	0	50,9 ± 0,1
Система 3	ДПФХ _mel09_chol29	9	55,0 ± 0,1
Система 4	ДПФХ _mel14_chol14	14	54,9 ± 0,1
Система 6	ДПФХ _mel29_chol29	29	54,6 ± 0,1

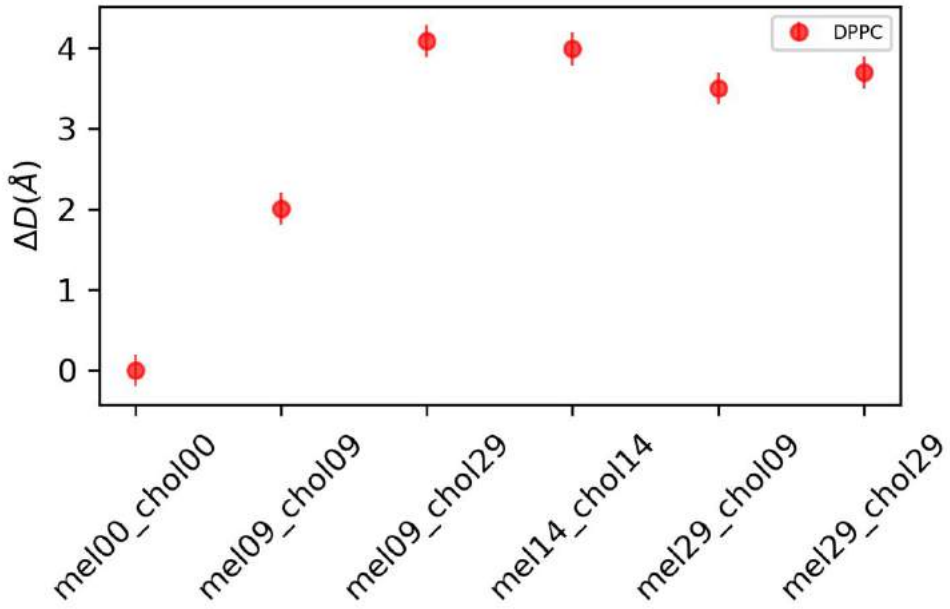


Рисунок 1.7 – Зміна товщини ліпідного бішару для ліпідних систем з різним вмістом холестерину та мелатоніну (Системи 2 – 6) відносно товщини бішару однокомпонентної ліпідної системи ДПФХ (Система 1)

На рис. 1.7 подано графічне представлення отриманих даних, а саме порівняння товщини ліпідного бішару для ліпідних систем з різним вмістом холестерину та мелатоніну (Системи 2 – 6) відносно товщини бішару однокомпонентної ліпідної системи ДПФХ (Система 1).

На відміну від холестерину, який розташовується в області ліпідних хвостів та збільшує товщину ліпідного бішару, мелатонін локалізується в області голів ліпіду, зменшуючи ступінь впорядкування ліпідних молекул у мембрані, і, як наслідок, товщину самої мембрани [15].

1.5 Структурні особливості взаємодії S-протеїну SARS-COV-2 з модельними ліпідними мембранами

Для визначення впливу S-протеїну коронавірусу SARS-CoV-2 на структурні параметри модельної ліпідної мембрани було проведено дослідження методом малокутового розсіяння нейтронів (МКРН) на системах диміристоїлфосфатидилхоліну (ДМФХ), що містять домішки холестерину або мелатоніну, які впливають на структурні параметри ліпідної мембранної системи. Геометрія моделі представлена на рис. 1.8.

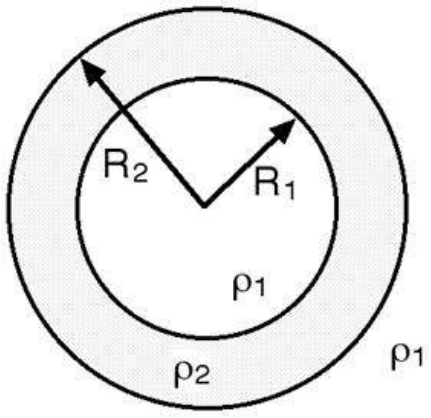


Рисунок 1.8 – Схема моделі везикули, де ρ_1 – густина розсіяння нейтронів розчинника, ρ_2 – середня густина розсіяння везикули, R_1 та R_2 – внутрішній та зовнішній радіуси везикули.

Експерименти методом малокутового розсіяння нейтронів проводились для наступних систем: водний розчин ДМФХ (Система 1), ДМФХ + 15%Мелатоніну (або холестерину) (Система 2), ДМФХ + 30%Мелатоніну (або холестерину) (Система 3). Як описувалось вище, взаємодія ліпідної мембрани з S-протеїном коронавірусу відбувається за участі трансмембранного білка ACE2. Проте, оскільки на попередньому етапі виконання проєкту не вдалося придбати необхідні компоненти, досліджувалась безпосередня взаємодія модельної мембрани з RBD SARS-CoV-2. Таким чином, розглядалась система ДМФХ + 30% мелатоніну(або холестерину) + RBD SARS-CoV-2 (Система 4).

Модельні криві, отримані в програмі SASView, представлені лініями різних кольорів, відповідно до кольору експериментальних даних кожної досліджуваної системи та температури, при якій проводився експеримент (10°C та 37°C). Таким чином, дані для Системи 1 (водний розчин ДМФХ) при температурі 10°C показані чорним кольором, а при температурі 37°C – червоним кольором. Відповідно, дані для Системи 2 (ДМФХ + 15%Мелатоніну) при температурі 10°C показані зеленим, а при 37°C – синім кольором. Даним для Системи 3 відповідають точки бірюзового та пурпурового кольору, відповідно, а для Системи – жовтого та коричневого кольору. На рис. 1.9 схематично показаний принцип позначення модельних кривих, отриманих при проведенні експериментальних досліджень, різними кольорами. На рис. 1.10 представлені отримані експериментальні дані для розглнутих систем з домішками мелатоніну.

Рисунок 1.9 – Схема позначення кольором експериментальних даних для досліджених зразків.

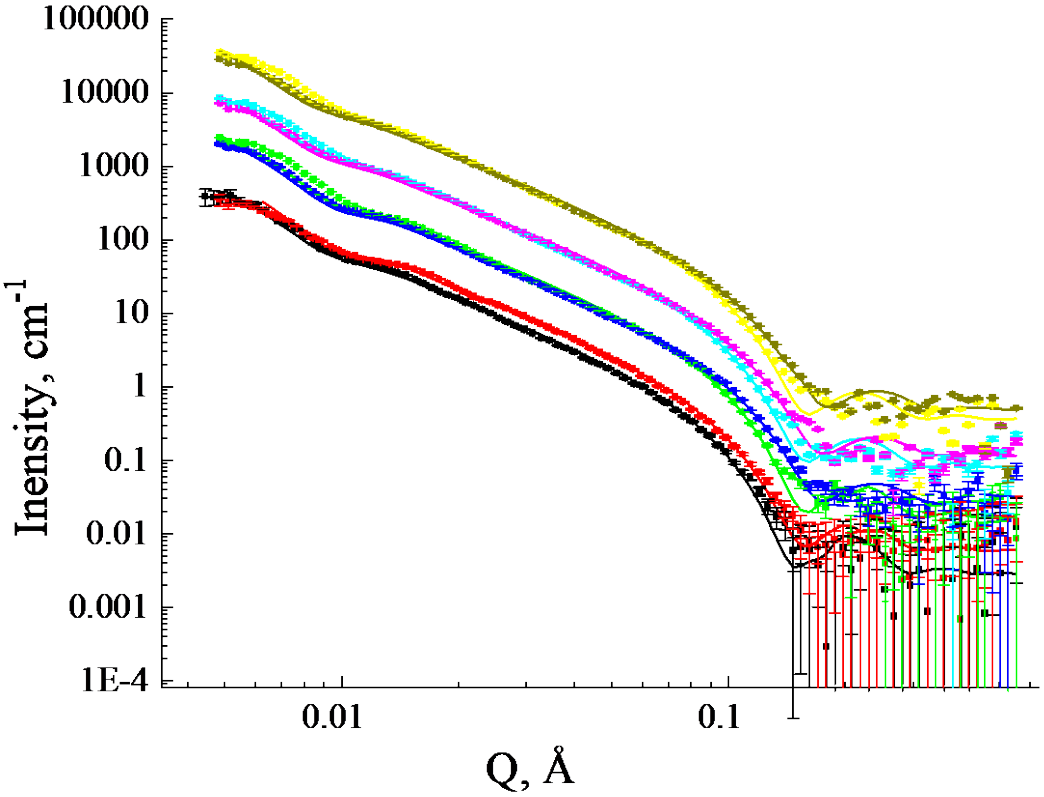


Рисунок 1.10 – Криві малокутового розсіяння нейтронів на розчинах ліпідних везикул з домішками мелатоніну для температур 10°C та 37°C для Систем 1 – 4. Лініями відповідного кольору показано результати апроксимації експериментальних даних моделлю везикули. Криві для кожної наступної системи зсунуті по осі ординат відносно першої системи для кращої візуалізації.

В результаті аналізу для кожної з досліджуваних систем було знайдено товщини ліпідних бішарів та внутрішній радіус везикули. Отримані структурні параметри наведені в Таблиці 1.2. Таким чином, збільшення концентрації мелатоніну в ліпідній мембрані ДМФХ призвело до зменшення товщини ліпідного бішару, що корелює з літературними даними [16, 17]. При додаванні RBD SARS-CoV-2 товщина ліпідного бішару продовжує зменшуватись. Крім того, з наведених даних видно, що при 10°C товщина ліпідного бішару більша, ніж при 37°C для усіх розглянутих систем.

Таблиця 1.2. Товщини ліпідних бішарів та внутрішні радіуси везикул, визначені в результаті підгонки кривих малокутового розсіяння нейтронів

	Температура, °C	Внутрішній радіус везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å
ДМФХ/D_2O	10	240	42,6 ± 0,1
	37	267	40,2 ± 0,1
ДМФХ/15% Мел/D_2O	10	236	40,1 ± 0,1
	37	249	36,0 ± 0,1
ДМФХ/30% Мел/D_2O	10	230	39,6 ± 0,1
	37	252	35,8 ± 0,1
ДМФХ/30% Мел/D_2O + RBD SARS-CoV-2	10	230	39,3 ± 0,1
	37	259	35,6 ± 0,1

Для визначення додаткового впливу фазового стану системи були обрані наступні температурні точки для проведення експерименту: 10, 20, 30, 37ºС, які дозволяють оцінити вплив додаткових речовин у гель-фазі (10 та 20ºС) та у рідкокристалічному стані системи (30 та 37ºС). Спочатку зразки нагрівались від 10 до 37 ºС, а потім охолоджувались знову до 10 ºС. В результаті аналізу експериментально зареєстрованих кривих малокутового розсіяння нейтронів на рідинних системах ліпідних везикул для кожної з досліджуваних систем було знайдено товщини ліпідних бішарів та діаметр везикули. Отримані структурні параметри наведені в Таблиці 1.3. Порядок представлення температур в таблиці відповідає порядку проведення експерименту: 10, 20, 30, 37, 30, 20 та 10 ºС.

Для візуалізації та покращення сприйняття відповідних параметрів були побудовані графіки залежності товщини ліпідних бішарів та діаметрів везикул від температури зразка. Отримані графіки представлені на рис. 1.11. Значення температур та їх порядок відповідає порядку проведення експерименту.

Таблиця 1.3. Товщини ліпідних бішарів та діаметри везикул, визначені в результаті підгонки кривих малокутового розсіяння нейтронів, для різних фазових станів ліпідних систем

	ДМФХ/$Д_2O$		**ДМФХ/15% Мелатонін/$Д_2O$**		**ДМФХ/30% Мелатонін/$Д_2O$**		**ДМФХ/30% Мелатонін/$Д_2O$ + RBD SARS-CoV-2**	
T, ºC	Діаметр везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å	Діаметр везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å	Діаметр везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å	Діаметр везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å
10	551±3	52.1±0.2	502±3	49.9±0.2	495±4	49.4±0.2	504±4	49.2±0.2
20	578±4	50.9±0.2	504±4	48.9±0.2	530±4	48.4±0.2	538±4	48.4±0.2
30	641±4	47.1±0.2	551±4	45.4±0.2	585±4	45.6±0.2	595±4	45.3±0.2
37	644±4	45.7±0.2	569±4	45.2±0.2	597±4	45.0±0.2	605±4	44.8±0.2
30	642±4	47.3±0.2	564±4	46.2±0.2	586±4	45.6±0.2	595±4	45.6±0.2
20	578±4	51.1±0.2	518±4	49.6±0.2	532±4	48.6±0.2	543±4	48.4±0.2
10	553±3	52.1±0.2	516±4	50.2±0.2	509±4	49.3±0.2	512±4	49.1±0.2

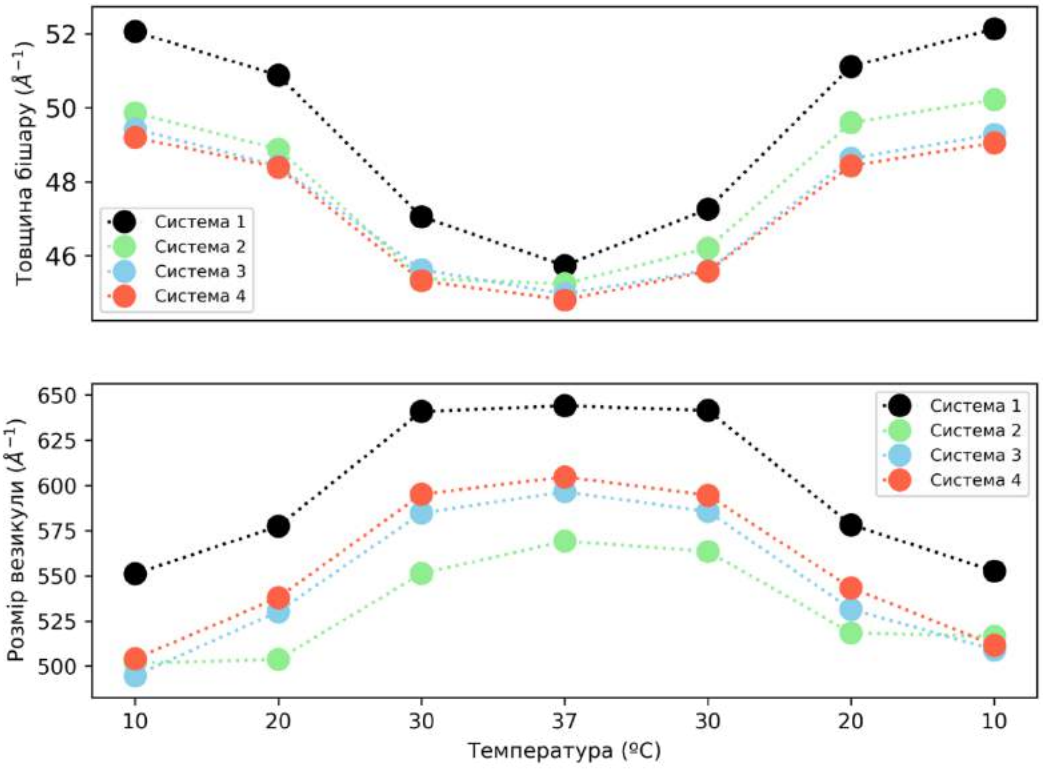


Рисунок 1.11 – Товщини бішару та діаметр везикули, отримані у результаті апроксимації кривих малокутового розсіяння нейтронів для систем ДМФХ (Система 1), ДМФХ + 15%Мелатоніну (Система 2), ДМФХ + 30%Мелатоніну (Система 3) та ДМФХ + 30% мелатоніну + RBD SARS-CoV-2 (Система 4).

З аналізу даних видно, що товщина ліпідного бішару знижується з підвищенням температури та співпадає з літературними даними. Також отримане зниження товщини мембрани з підвищенням концентрації мелатоніну в системі. З аналізу впливу мелатоніну на розміри везикул можна зробити висновок про зростання розміру везикули при підвищенні температури. Різниця у розмірах везикули в залежності від концентрації мелатоніну та його наявності в рідинній системі може бути наслідком процедури екструдування зразків. При цьому можна стверджувати, що рідинна система знаходиться у стабільному стані та не змінюється при зміні фазового стану системи.

Додавання активної частини S-протеїну SARS-CoV-2 в рідинну систему ДМФХ/30% Мелатонін/$Д_2О$ не змінює структурних параметрів ліпідного бішару в залежності від температури, а отже й фазового стану системи (див. табл. 1.3 та рис. 1.11). З аналізу даних можна зробити висновок, що додавання активної частини S-протеїну не впливає на стабільність системи при зміні фазового стану. Оскільки мелатонін в ліпідному бішарі локалізується в області ліпідних голів, то він може заважати проникненню в цю область молекулам S-протеїну [15, 18]. Таким чином можна зробити припущення, що додавання мелатоніну в мембрану може запобігати взаємодії коронавірусного S-протеїну з ліпідною мембраною.

Аналогічні експериментальні дослідження були проведені для таких самих систем з додаванням холестерину. Таким чином, було досліджено наступні системи: ДМФХ/$Д_2О$ (Система 1), ДМФХ/15% холестерину/$Д_2О$ (Система 2), ДМФХ/30% холестерину/$Д_2О$ (Система 3), ДМФХ/30% холестерину/$Д_2О$ + RBD SARS-CoV-2 (Система 4). Кожен зразок було досліджено за температур 10°C, 20°C, 30°C, 37°C, 30°C, 20°C та 10°C для отримання інформації про стабільність системи та зміну її основних структурних параметрів при зміні фазового стану системи. Температурний діапазон обраний для дослідження стану системи в околі температури фазового перетворення ДМФХ (24.3ºC).

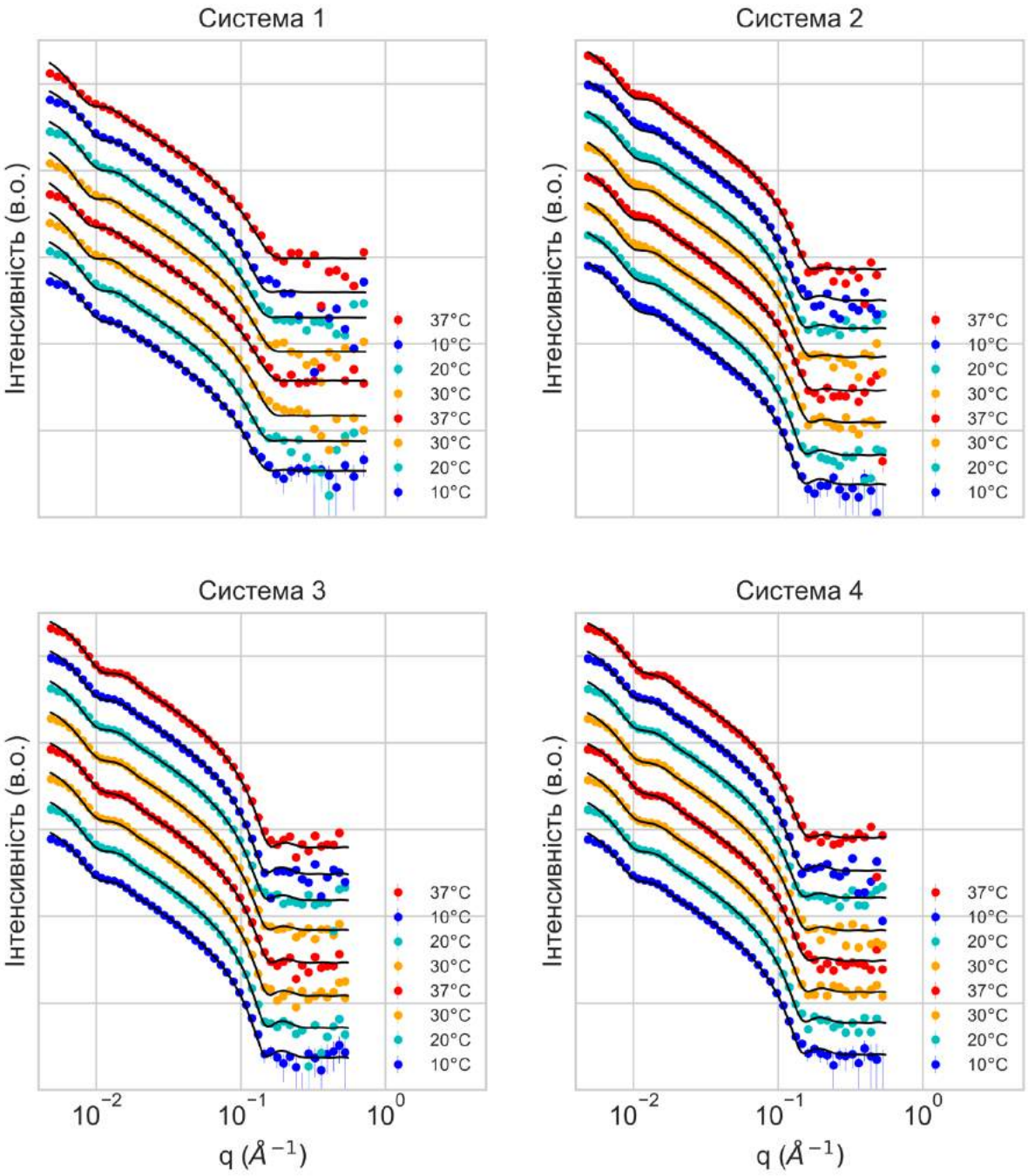


Рисунок 1.12 – Криві малокутового розсіяння нейтронів на рідинних системах ліпідних везикул для систем ДМФХ (Система 1), ДМФХ + 15% холестерину (Система 2), ДМФХ + 30% холестерину (Система 3) та ДМФХ + 30% холестерину + RBD SARS-CoV-2 (Система 4). Суцільними лініями показано результати підгонки експериментальних даних. Колір експериментальних даних відповідає температурі експерименту: синій, бірюзовий, помаранчевий та червоний – 10, 20, 30 та 37ºС відповідно.

Для визначення структурних параметрів досліджуваного зразка отримані експериментальні криві були промодельовані з використанням моделі одношарової везикули за допомогою програми SasView. Отримані модельні криві зображено на рис. 1.12 лініями відповідних кольорів. В результаті підгонки експериментальних даних було знайдено товщини ліпідних бішарів D для кожної ліпідної системи, а також розмір везикул. Отримані значення представлені в Таблиці 1.4.

Таблиця 1.4. Товщини ліпідних бішарів та внутрішні радіуси везикул, визначені в результаті підгонки кривих малокутового розсіяння нейтронів

	ДМФХ/$Д_2O$		**ДМФХ/15% Холестерин/$Д_2O$**		**ДМФХ/30% Холестерин/$Д_2O$**		**ДМФХ/30% Холестерин/$Д_2O$ + RBD SARS-CoV-2**	
T, °C	Діаметр везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å	Діаметр везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å	Діаметр везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å	Діаметр везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å
10	551±3	52.1±0.2	543±4	54.1±0.2	574±4	55.1±0.1	575±4	55.0±0.2
20	578±4	50.9±0.2	552±4	53.5±0.2	578±4	54.6±0.1	573±4	54.4±0.2
30	641±4	47.1±0.2	599±4	51.1±0.2	574±4	53.5±0.2	554±4	53.0±0.2
37	644±4	45.7±0.2	613±4	49.8±0.2	555±4	52.4±0.2	516±4	51.8±0.2
30	642±4	47.3±0.2	609±4	50.6±0.2	567±4	53.5±0.2	549±4	53.0±0.2
20	578±4	51.1±0.2	559±4	53.4±0.2	578±4	54.6±0.2	570±4	54.5±0.2
10	553±3	52.1±0.2	549±4	54.0±0.2	577±4	55.2±0.2	573±4	54.8±0.2

Для візуалізації та покращення сприйняття відповідних параметрів були побудовані графіки залежності товщини ліпідних бішарів та діаметрів везикул від температури зразка. Отримані графіки представлені на рис. 1.13. Значення температур та їх порядок відповідає порядку проведення експерименту.

Аналіз отриманих експериментальних даних показує, що збільшення концентрації холестерину в ліпідній системі призводить до збільшення товщини ліпідного бішару незалежно від фазового стану ліпідної системи. Даний результат корелює з дослідженнями, проведеними на попередньому етапі виконання проекту, а також з відомими нам літературними даними [15, 19].

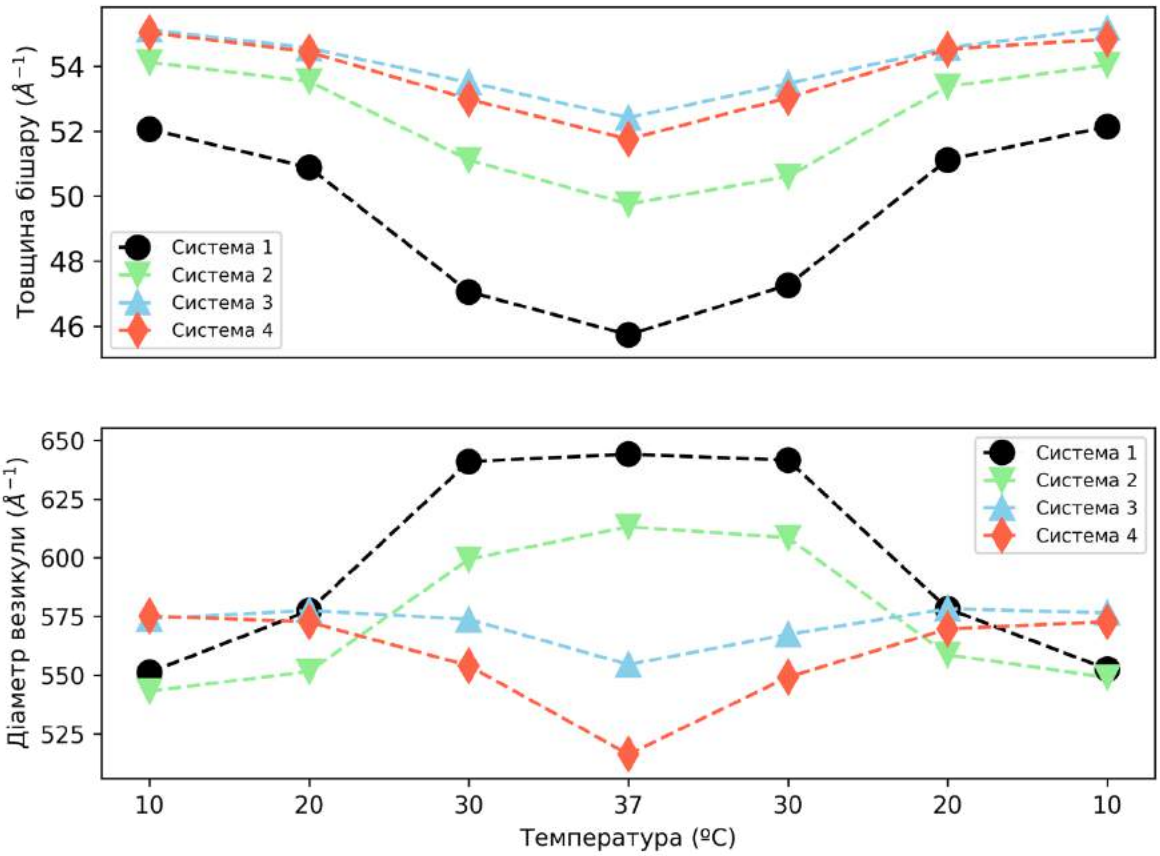


Рисунок 1.13 – Товщини бішару та діаметр везикули отримані у результаті апроксимації кривих малокутового розсіяння нейтронів для систем ДМФХ (Система 1), ДМФХ + 15% холестерину (Система 2), ДМФХ + 30% холестерину (Система 3) та ДМФХ + 30% холестерину + RBD SARS-CoV-2 (Система 4). Похибки апроксимації даних відображені на експериментальних даних, однак не перевищують розмірів символів.

Взаємодія ліпідної мембрани з активною частиною S-протеїну в залежності від фазового стану ліпіду відбувається по різному. Так, коли ліпід знаходиться в гель фазі (за температури 10°C), то активна частина S-протеїну не змінює структурних параметрів ліпідного бішару. Це може означати, що взаємодія між ліпідною мембраною та активною частиною S-протеїну не відбувається. При цьому, за температур 30 та 37°C, коли ліпід перебуває в рідкокристалічній фазі, додавання RBD SARS-CoV-2 в систему ДМФХ/30%

Холестерин/$Д_2О$ призводить до збільшення товщини мембрани, що свідчить про наявність взаємодії S-протеїну з мембраною. Відомо, що збільшення температури ліпідної системи призводить до порушення ступеня упаковки ліпідних молекул в мембрані. При цьому збільшується відстань між ліпідними головами, та з'являються порожнини, куди може проникати білкова молекула. При цьому з графіків залежності діаметру везикули в рідинних системах від температури можна простежити різку зміну цієї залежності при збільшенні концентрації холестерину з 15 до 30%. Це може бути наслідком збільшення асиметрії у мембрані за концентрацій холестерину вище 20% [19]. Додавання S-протеїну у рідинну систему з концентрацією холестерину 30% збільшує цей ефект, особливо у рідкокристалічній фазі системи.

Таким чином можна зробити висновок про те, що додавання холестерину в мембрану сприяє взаємодії S-протеїну SARS-CoV-2 з мембраною. Цей ефект може бути пов'язаний з щільністю пакування ліпідних молекул у мембрані.

На рис. 1.14 представлено графік зміни товщини ліпідного бішару в залежності від доданих домішок в розчин ДМФХ/D_2O згідно з результатами експериментальних досліджень, наведених вище. На графіку наведено значення відносної товщини бішару для коректного порівняння зміни товщини за різної температури, що впливає на фазовий стан ліпідної системи (гель фаза при 10 °C та рідкокристалічна фаза при 37 °C).

Як показали проведені експериментальні дослідження, додавання активної частини S-протеїну SARS-CoV-2 в ліпідну систему ДМФХ/30% Мелатонін/D_2O практично не змінило структурних параметрів ліпідного бішару при обох температурах у межах похибки експерименту. Оскільки мелатонін у ліпідному бішарі локалізується в області ліпідних голів, то він може заважати проникненню в цю область молекулам S-протеїну [15, 18]. Таким чином можна стверджувати, що збільшення концентрації мелатоніну в мембрані запобігає взаємодії коронавірусного S-протеїну з ліпідною мембраною.

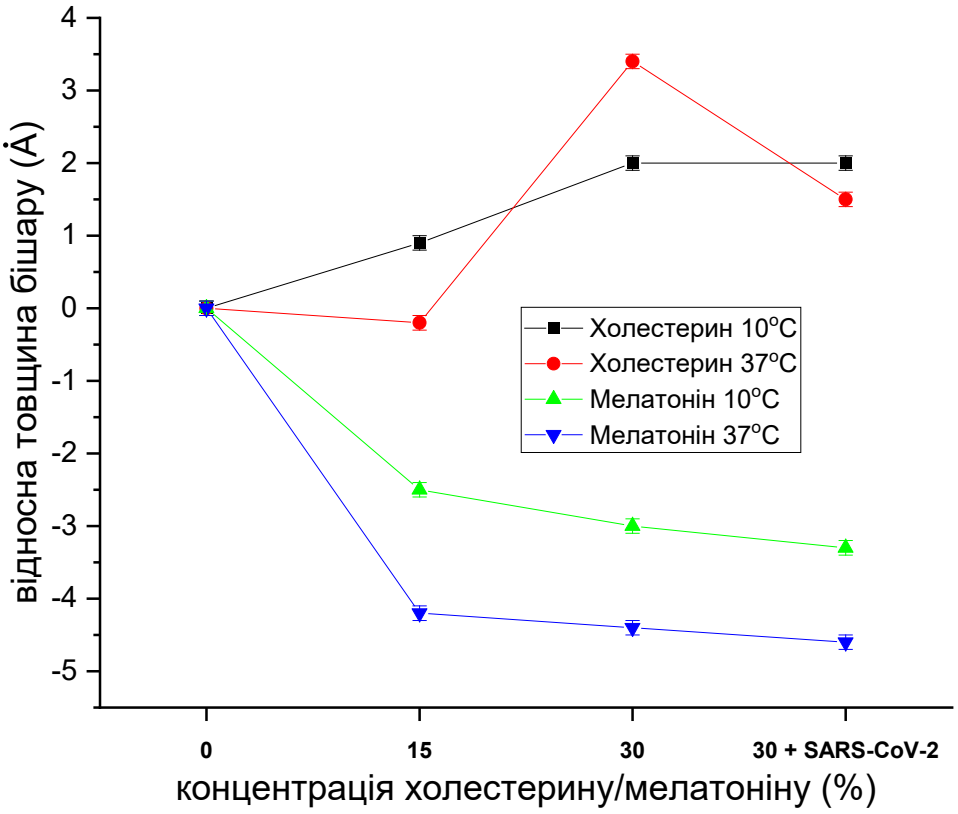


Рисунок 1.14 – Залежність відносної товщини бішару везикули від концентрації домішок холестерину або мелатоніну, доданих у систему. Значення нормовані відносно системи чистого розчину ДМФХ у D_2O за даної температури.

На відміну від систем з додаванням мелатоніну, за присутності домішок холестерину в системі взаємодія ліпідної мембрани з активною частиною S-протеїну вже відбувається, причому ця взаємодія різна в залежності від фазового стану ліпіду. Так, коли ліпід знаходиться в гель фазі (за температури 10°C), то активна частина S-протеїну не змінює структурних параметрів ліпідного бішару. Це може означати, що взаємодія між ліпідною мембраною та активною частиною S-протеїну не відбувається. В свою чергу, за температури 37°C, коли ліпід перебуває в рідкокристалічній фазі, додавання RBD SARS-CoV-2 в систему ДМФХ/30% Холестерин/D_2O призводить до зменшення товщини мембрани, що свідчить про наявність взаємодії S-протеїну з мембраною. Відомо, що збільшення температури ліпідної системи призводить

до порушення ступеня упаковки ліпідних молекул в мембрані. При цьому збільшується відстань між ліпідними головами, та з’являються порожнини, куди може проникати білкова молекула.

Таким чином, можна зробити припущення про взаємодію активної частини S-протеїну виключно з головними частинами мембрани, оскільки вона відбувається навіть при відсутності в модельній системі трансмембранного білка ACE2.

2 ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ДИНАМІКИ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН МЕТОДОМ КОМП'ЮТЕРНОГО МОДЕЛЮВАННЯ

Окрім експериментальних досліджень особливостей структури ліпідних мембран, було проведено також квантово-хімічне моделювання структури та властивостей досліджуваних систем. Зазвичай біологічні мембрани функціонують у водному середовищі, тому для дослідження процесів, що відбуваються на їхніх поверхнях, важливо мати інформацію про особливості міжмолекулярної взаємодії між молекулами води. Тому, перш ніж проводити комп'ютерне моделювання особливостей структури ліпідних мембран різного компонентного складу, були проведені розрахунки структурних елементів води, що оточує ліпідні мембрани.

2.1 Квантово-хімічне моделювання спектроскопічних проявів міжмолекулярної взаємодії у воді

З використанням методів квантової хімії були знайдені оптимальні структури кластерів, які утворюються внаслідок формування водневого зв'язку між різною кількістю молекул води. Методами комп'ютерного моделювання були розраховані коливальні спектри відповідних оптимізованих кластерів води різного розміру. Таким чином були визначені спектральні прояви міжмолекулярної взаємодії у воді, яка оточує ліпідні мембрани.

Чисельними методами оптимізовано структури від мономера (n=1) до гексамера (n=6) молекул води. Оптимізовані в гармонічному наближенні методом функціонала густини DFT:M06-2X з базисним набором aug-cc-pVDZ структури кластерів представлені на рис. 2.1. Як видно, кластери з n=3-5 та гексамер типу «циклічний стілець» мають форму плоских замкнутих кілець (рис. 2.1(а)-(д)). Для пошуку глобального мінімуму поверхні потенціальної енергії (ППЕ) для гексамера було проведено оптимізацію й інших його ізомерів:

«клітка», «призма» та ізомер у формі комбінації пентамера та тримера (далі – «комбінований»), на рис. 2.1 зображення (е), (є) та (ж), відповідно.

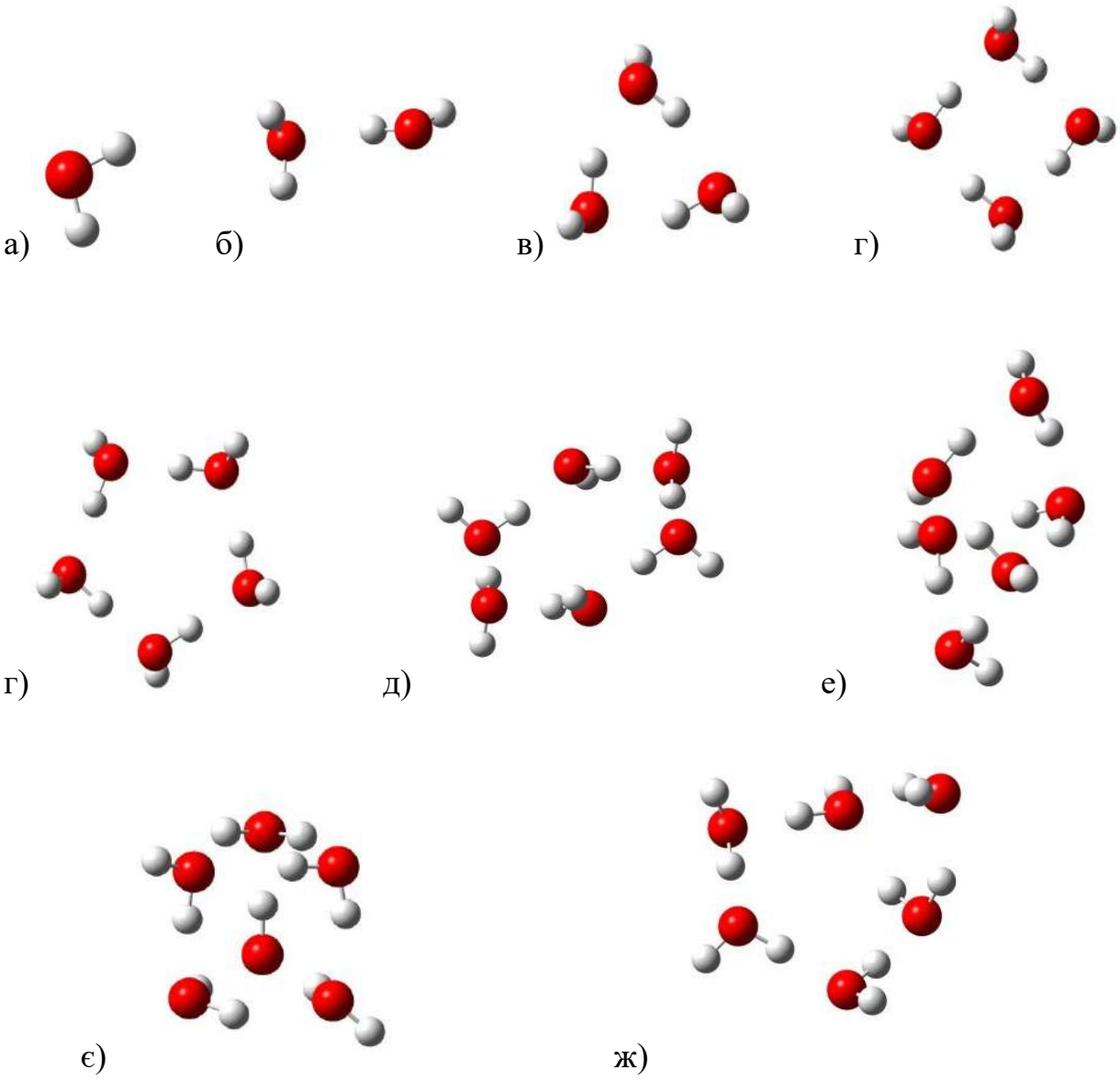


Рисунок 2.1 – Оптимізовані структури кластерів води: а) мономер H_2O; б) димер $(H_2O)_2$; в) кільцевий тример $(H_2O)_3$; г) кільцевий тетрамер $(H_2O)_4$; ґ) кільцевий пентамер $(H_2O)_5$; д) гексамер «циклічний стілець» $(H_2O)_6^{ring}$; е) гексамер «клітка» $(H_2O)_6^{cage}$; є) гексамер «призма» $(H_2O)_6^{prisma}$; ж) гексамер «комбінований» $(H_2O)_6^{combo}$

В процесі оптимізації структур було розраховано значення повної електронної енергії (E_0, Хартрі), яка включає в себе кінетичну енергію руху електронів для оптимізованих положень ядер атомів та потенціальну енергію (міжелектронна та між'ядерна взаємодії, а також взаємодія електронів з ядрами), оцінені середні довжини (O···H_O, Å) та енергії водневого зв'язку з розрахунком на одну молекулу (E_{OH}), та оптимізовані вказаними квантово-хімічними методами значення структурних параметрів мономера, димера, плоских кільцевих кластерів та ізомерів гексамера. Деякі величини наведені в різних одиницях вимірювання з урахуванням, що 1 Хартрі = 627,51 ккал/моль = 2625,5 кДж/моль. Структурними параметрами кільцевих плоских кластерів є значення деформаційного кута молекул води (∠HOH, °) та значення кута водневого зв'язку X–H···Y (∠H_O···O, °), довжина ковалентного зв'язку OH, не задіяного в утворенні водневого зв'язку (O-H, Å), та довжина ковалентного зв'язку OH, задіяного в утворенні водневого зв'язку (H_O, Å). Отримані дані методом DFT:M06-2X/aug-cc-pVDZ представлені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Розраховані методом DFT:M06-2X/aug-cc-pVDZ повна електронна енергія (+ZPE), енергія водневого зв'язку (+BSSE), середні міжмолекулярна та внутрішньомолекулярна відстані та кути для мономера, димера та плоских кільцевих кластерів

	$E_{0(ZPE)}$, Хартрі	$E_{OH(BSSE)}$, ккал/моль	∠HOH, °	∠O-H···O, °	O-H, Å	H_O, Å	O···H_O, Å
H_2O	-76,4	-	104,7	-	0,96216	-	-
$(H_2O)_2$	-152,8	-1,5	105,1	169,5	0,96108	0,969	1,94
$(H_2O)_3$	-229,2	-3,9	106,0	150,3	0,96117	0,975	1,89
$(H_2O)_4$	-305,6	-5,0	105,7	167,5	0,96126	0,982	1,76
$(H_2O)_5$	-382,0	-5,3	105,6	175,5	0,96102	0,9831	1,73
$(H_2O)_6^{ring}$	-458,4	-5,4	105,4	177,9	0,96099	0,9833	1,72

З таблиці 2.1 видно, що з кожним додаванням ще однієї молекули води у кластер зростають (за абсолютним значенням) повна енергія кластерів та енергія водневого зв'язку E_{OH}. Графічно залежність енергії та довжини водневого зв'язку від кількості молекул води в кластері показана на рис. 2.2. Оскільки енергія має від'ємні значення то на графіку зростання її абсолютного значення відображається у спаданні кривої.

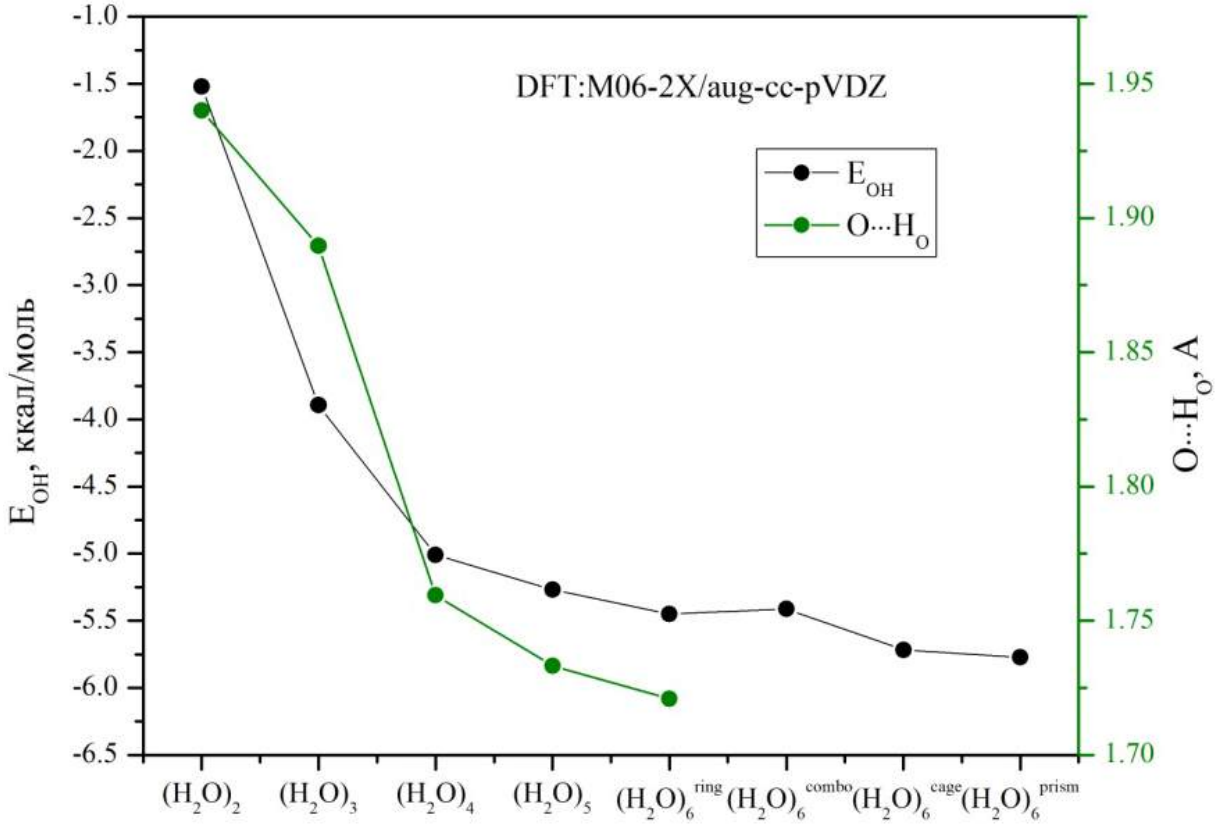


Рисунок 2.2 – Розраховані методом DFT:M06-2X/aug-cc-pVDZ значення енергії та довжини водневого зв'язку для кластерів води різного розміру

Значення кута ∠HO···O також збільшується із збільшенням кількості молекул в кластері і для пентамера та гексамера наближається до 180°. В той же час довжина водневого зв'язку O···HO зменшується від 1,94 Å в димері до 1,72 Å в гексамері (див. рис. 2.2). При збільшенні кількості молекул

зменшується також величина деформаційного кута молекул води в кільцевих агрегатах, а довжина ковалентного зв'язку НО є найдовшою для кластерів з кількістю молекул 5 і 6. Такі зміни в структурних особливостях, відповідно до визначення та властивостей водневого зв'язку, свідчать, що із збільшенням кількості молекул в кластері водневий зв'язок міцнішає.

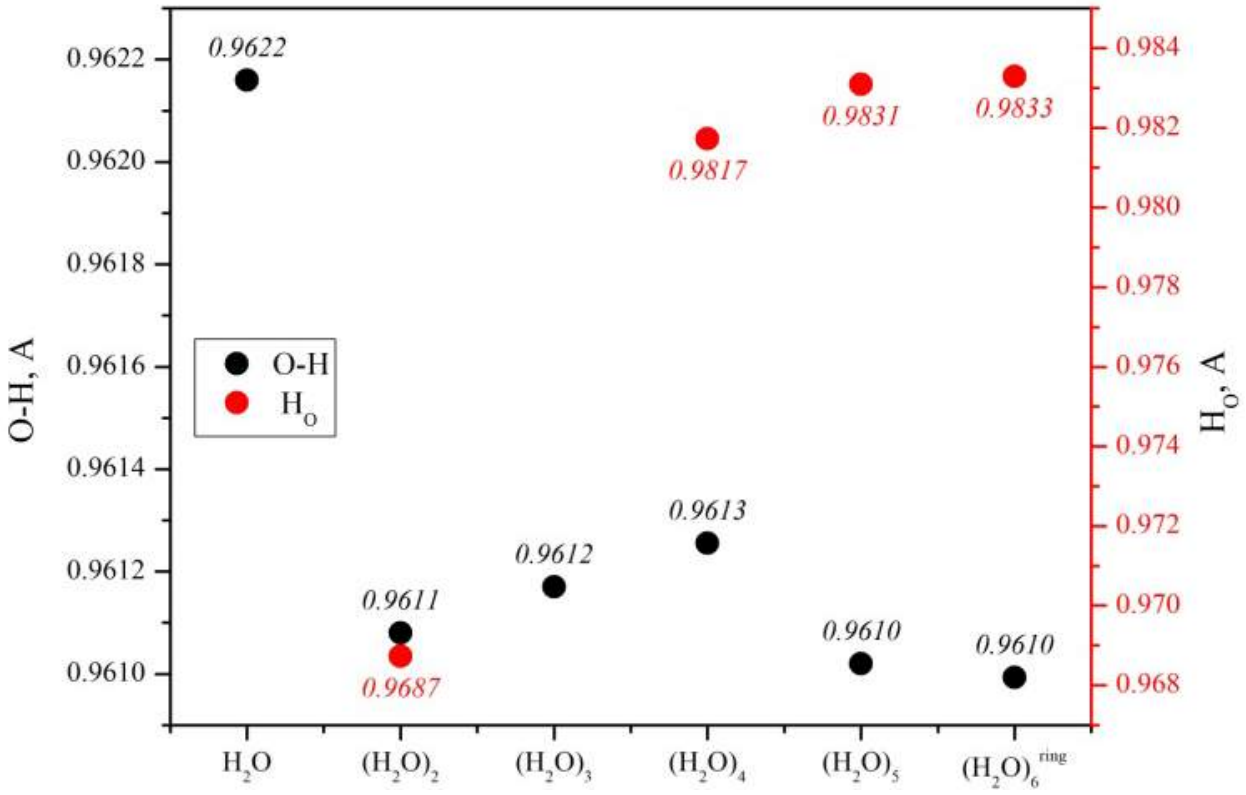


Рисунок 2.3 – Розраховані значення довжини ковалентного зв'язку ОН, не задіяного в утворенні водневого зв'язку (О-Н, Å), та довжини ковалентного зв'язку ОН, задіяного в утворенні водневого зв'язку (H_O, Å) в кластерах води

На рис. 2.3 і 2.4 наведено порівняння структурних характеристик димера та кільцевих плоских структур, розрахованих методом DFT:M06-2X/aug-cc-pVDZ. На рис. 2.3 показані розраховані значення довжини ковалентного зв'язку ОН, не задіяного в утворенні водневого зв'язку (О-Н, Å), та довжини ковалентного зв'язку ОН, задіяного в утворенні водневого зв'язку (H_O, Å) для димера та кільцевих кластерів, що містять від 3 до 6 молекул води. На рис 2.4

наведені значення деформаційного кута (∠HOH, °) і кута водневого зв'язку X–H···Y (∠HO···O, °) для тих самих кластерів.

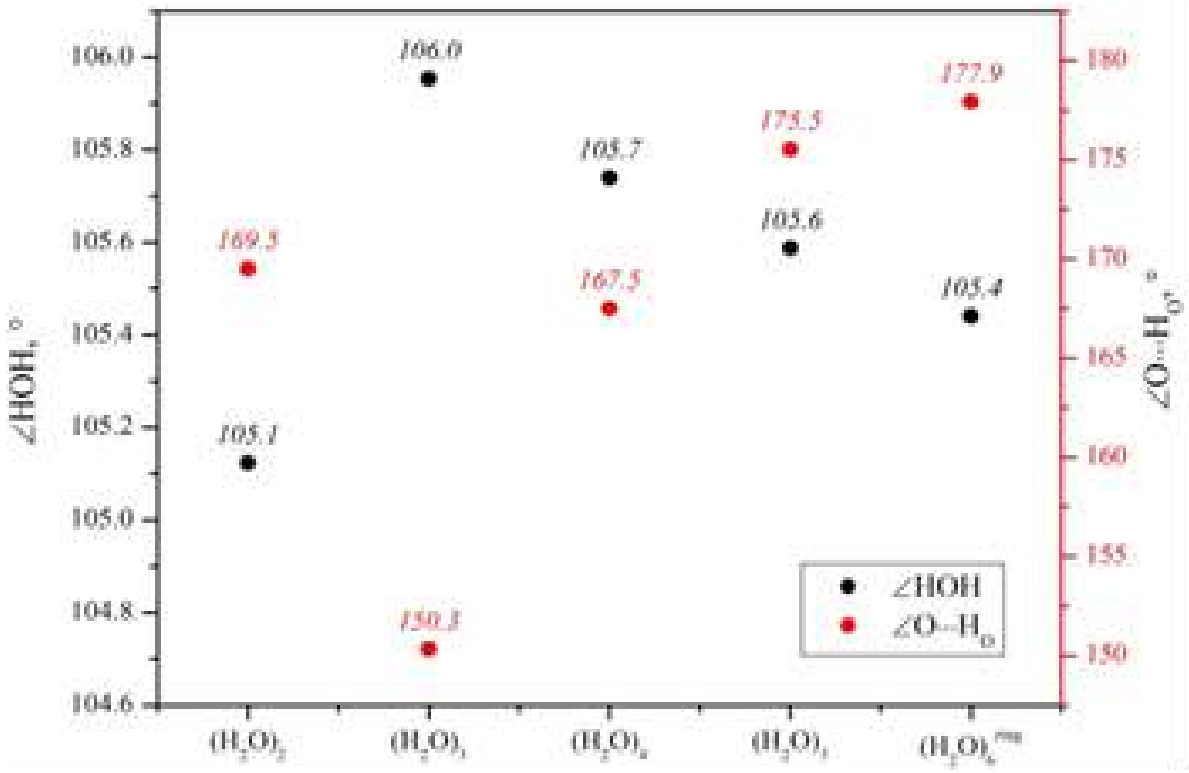


Рисунок 2.4 – Розраховані значення деформаційного кута (∠HOH, °) і кута водневого зв'язку X–H···Y (∠H_O···O, °) для кластерів води різного розміру

Методом DFT:M06-2X/aug-cc-pVDZ були розраховані спектри комбінаційного розсіяння (КРС) кластерів води різного розміру у вакуумі. На рис. 2.5 наведено порівняння розрахованих спектрів КРС в області валентних коливань ОН груп з експериментально зареєстрованими спектрами води при трьох різних температурах: 20, -10 та -30 ºС. Порівняння показує, що малі кластери (дві, три молекули води) менш ймовірні у структурі води в конденсованій фазі (рідкий та твердий стан), ніж кластери більшого розміру (4, 5 або 6 молекул води). Такі висновки корелюють з результатами розрахунків енергій відповідних кластерів, які теж показують більшу стабільгість кластерів, які складаються з 4 і більше молекул.

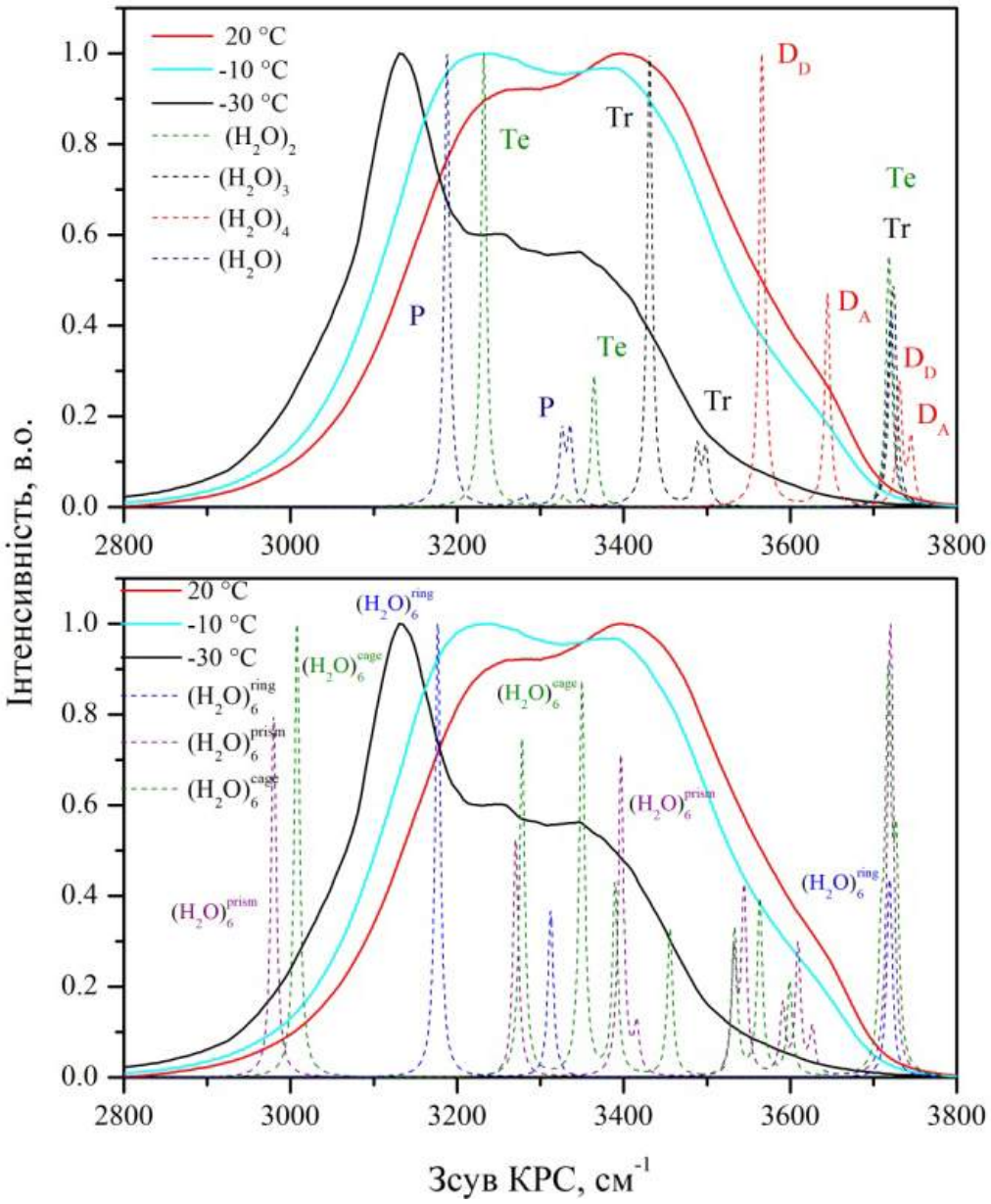


Рисунок 2.5 – Розраховані методом DFT:M06-2X/aug-cc-pVDZ та експериментально зареєстровані спектри КРС води в області валентних ОН коливань

2.2 Визначення статичного структурного фактору подвійного шару молекул фосфоліпідів за допомогою комп'ютерного моделювання

Для виконання аналізу запланованих в рамках даного проекту експериментів з розсіювання нейтронів модельними ліпідними мембранами

було розглянуто відомі підходи до одержання структурного фактору подвійного шару молекул фосфоліпідів за допомогою комп'ютерного моделювання. Структурний фактор (СФ) безпосередньо пов'язаний із перерізом розсіяння нейтронів зразком із вказаних молекул, а саме [20, 21]

$$I(\vec{q},E_f)=\frac{\partial^2\sigma}{\partial\Omega\partial E_f}=\frac{k_f}{k_i}\frac{1}{\hbar}\cdot S(\vec{q},\omega)$$

де E_f – енергія розсіяного нейтрона, $\omega=(E_f-E_i)/\hbar$, а E_i – енергія нейтрона початкового пучка, $\vec{q}=\vec{k}_i-\vec{k}_f$ – переданий хвильовий вектор, σ – переріз розсіяння, dE_f та $d\Omega$ є діапазонами, відповідно, енергії розсіяного нейтрона та тілесного кута, в який відбувається розсіяння, k_i та k_f – модулі хвильових векторів плоских хвиль де Бройля падаючого та розсіяного нейтронів відповідно, а динамічний структурний фактор $S(\vec{q},\omega)$ є результатом Фур'є-перетворення

$$S(\vec{q},\omega)=\frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty}F(\vec{q},t)\cdot e^{i\omega t}dt=\frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty}e^{i\omega t}dt\int G(\vec{r},t)\cdot e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}}d\vec{r},$$

від проміжної функції розсіювання

$$F(\vec{k},t)=\int G(\vec{r},t)\cdot e^{-i\vec{k}\cdot\vec{r}}d\vec{r}\,.$$

Остання, своєю чергою, є результатом Фур'є-перетворення просторово-часової кореляційної функції ван Хова [20]

$$G(\vec{r},t'-t)=\left\langle\int\hat{\rho}(\vec{r}+\vec{r}',t')\hat{\rho}(\vec{r}',t)d\vec{r}'\right\rangle, \qquad (2.1)$$

в якій

$$\hat{\rho}(\vec{r}',t)=\sum_{j=1}^{N}b_j\cdot\delta\left(\vec{r}'-\vec{r}_j(t')\right)$$

є динамічною функцією густини розсіяння системи, а в разі використання класичної механіки для опису траєкторій частинок системи $\vec{r}_j(t')$ – радіус-вектором j-го атома системи (ядро якого характеризується довжиною

розсіювання нейтронів b_j) в момент часу t'. При цьому для проміжної функції розсіювання маємо

$$F(\vec{q},t'-t)=\left\langle \sum_{l=1}^{N} b_l \exp\left(i\cdot(\vec{q}\cdot\vec{r}_l(t'))\right)\cdot\sum_{j=1}^{N} b_j \exp\left(-i\cdot(\vec{q}\cdot\vec{r}_j(t))\right)\right\rangle=\left\langle B^*(\vec{q},t')\cdot B(\vec{q},t)\right\rangle$$

де було введено позначення

$$B(\vec{q},t)=\sum_{j=1}^{N} b_j \exp\left(-i\cdot(\vec{q}\cdot\vec{r}_j(t))\right). \qquad (2.2)$$

Таким чином, в рамках використаних наближень величина $B(\vec{q},t)$ повністю визначає інтенсивність розсіяння

$$I(\vec{q},E)=\frac{\partial^2\sigma}{\partial\Omega\partial E_f}=\frac{k_f}{k_i}\frac{1}{2\pi\hbar}\cdot\int_{-\infty}^{+\infty}\left\langle B^*(\vec{q},t_0+t)\cdot B(\vec{q},t_0)\right\rangle\cdot e^{i\omega t}dt\,. \qquad (2.3)$$

В процесі послідовного квантово-механічного виведення розглядуваної теорії розсіяння нейтронів показується (див., наприклад, (7.5.9) у розділі 7.5 в [20]), що під кутовими дужками в (2.1) слід розуміти операцію обчислення статистичного середнього (по ансамблю), а $\vec{r}_j(t)$ у виразі (2.2) відповідає оператору координати *j*-ї частинки в представленні Гайзенберга. Однак, спираючись на ергодичну гіпотезу статистичне середнє в цьому контексті часто на практиці замінюють середнім по часу:

$$\left\langle A(t_1)B(t_2)\right\rangle=\lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_0^T A(t_1+t')B(t_2+t')dt'\,,$$

а для $\vec{r}_j(t)$ використовують координату *j*-ї частинки, одержану із розв'язку рівнянь руху класичної механіки, здійсненого, наприклад в ході комп'ютерного моделювання методом молекулярної динаміки.

Використання усереднення за часом замість в (2.1) та (2.3) дає можливість одержання альтернативного способу обчислення СФ за результатами молекулярно-динамічного моделювання [20, 22]. Для цього використовують таке перетворення

$$\frac{d^2}{dt_1^{\,2}}\left\langle A(t_1)B(t_2)\right\rangle = \lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_0^T \frac{d^2}{dt_1^{\,2}}\left(A(t_1+t')\right)B(t_2+t')dt' =$$

$$= \lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_0^T \frac{d}{dt'}\left(\frac{d}{dt_1}A(t_1+t')\right)B(t_2+t')dt' =$$

$$= \lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_0^T \left[\frac{d}{dt'}\left(\left(\frac{d}{dt_1}A(t_1+t')\right)B(t_2+t')\right)-\left(\frac{d}{dt_1}A(t_1+t')\right)\left(\frac{d}{dt'}B(t_2+t')\right)\right]dt' =$$

$$= \lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\int_0^T \left[-\left(\frac{d}{dt_1}A(t_1+t')\right)\left(\frac{d}{dt_2}B(t_2+t')\right)\right]dt' = -\left\langle \dot{A}(t_1)\dot{B}(t_2)\right\rangle$$

де крапкою позначено похідну по часу, A і B – деякі динамічні величини, а також вважається, що $\left(\frac{d}{dt_1}A(t_1+t')\right)B(t_2+t')$ лишається скінченим при всіх t', тож

$$\lim_{T\to\infty}\frac{1}{T}\left[\left(\frac{d}{dt_1}A(t_1+T)\right)B(t_2+T)-\left(\frac{d}{dt_1}A(t_1)\right)B(t_2)\right]=0.$$

Застосування такого перетворення дає змогу перейти від радіус-векторів $\vec{r}_j$ частинок до векторів їхніх швидкостей $\vec{v}_j$ у виразі для інтенсивності розсіяння. При цьому врахуємо, що

$$\dot{B}(\vec{q},t) = -i\vec{q}\cdot\sum_{j=1}^{N}\vec{v}_j(t)b_j\exp\left(-i\cdot(\vec{q}\cdot\vec{r}_j(t))\right), \qquad (2.4)$$

а також помножимо обидві частини рівності (2.3) на $\left(i\hbar\omega\right)^2 = -\left(E_f - E_i\right)^2 = -\Delta E^2$ одержавши

$$-\Delta E^2\cdot I(\vec{q},E_f) = \frac{k_f}{k_i}\frac{1}{2\pi\hbar}\cdot\int_{-\infty}^{+\infty}\left\langle B^*(\vec{q},t_0+t)\cdot B(\vec{q},t_0)\right\rangle\cdot\left(i\hbar\omega\right)^2 e^{i\omega t}dt =$$

$$= \frac{k_f}{k_i}\frac{\hbar}{2\pi}\cdot\int_{-\infty}^{+\infty}\left\langle B^*(\vec{q},t_0+t)\cdot B(\vec{q},t_0)\right\rangle\cdot\frac{d^2}{dt^2}\left(e^{i\omega t}\right)dt =$$

$$= \frac{k_f}{k_i}\frac{\hbar}{2\pi}\cdot\int_{-\infty}^{+\infty}\frac{d^2}{dt^2}\left(\left\langle B^*(\vec{q},t_0+t)\cdot B(\vec{q},t_0)\right\rangle\right)\cdot e^{i\omega t}dt$$

звідки, з урахуванням $\frac{d^2}{dt^2}\left(\left\langle B^*(\vec{q},t_0+t)\cdot B(\vec{q},t_0)\right\rangle\right) = -\left\langle \dot{B}^*(\vec{q},t_0+t)\cdot\dot{B}(\vec{q},t_0)\right\rangle$ одержимо

$$\Delta E^2 \cdot I(\vec{q}, E_f) = \frac{k_f}{k_i} \frac{\hbar}{2\pi} \cdot \int_{-\infty}^{+\infty} \left\langle \dot{B}^*(\vec{q}, t_0 + t) \cdot \dot{B}(\vec{q}, t_0) \right\rangle \cdot e^{i\omega t} dt ,$$

$$\Delta E^2 \cdot I(\vec{q}, E_f) = \frac{k_f}{k_i} \frac{\hbar}{2\pi} \cdot \int_{-\infty}^{+\infty} \left\langle J^*(\vec{q}, t_0 + t) \cdot J(\vec{q}, t_0) \right\rangle \cdot e^{i\omega t} dt , \qquad (2.5)$$

де було уведено позначення

$$J(\vec{q}, t) = \vec{q} \cdot \sum_{j=1}^{N} \vec{v}_j(t) b_j \exp\left(-i \cdot (\vec{q} \cdot \vec{r}_j(t))\right) \qquad (2.6)$$

для величини, яку в літературі часто пов'язують із поздовжньою і поперечними складовими вектора потоку [23, 24].

Однак, такий зв'язок із вектором $\vec{j}(\vec{q}, t) = \sum_{j=1}^{N} \vec{v}_j(t) \exp\left(-i \cdot (\vec{q} \cdot \vec{r}_j(t))\right)$ в роботах [23, 24] стає можливим лише за припущення, що амплітуди розсіяння b_j є однаковими для всіх частинок системи, що в загальному випадку може не справджуватися. Таким чином, вирази (2.5) і (2.6) є більш загальними, аніж використані в цих роботах. Окрім того, наведена вище процедура отримання цих виразів дозволяє простежити причини необхідності домноження інтенсивності розсіяння $I(\vec{q}, E_f)$ на $(\Delta E)^2$ в разі обчислення СФ із кореляційної функції величин (2.6), а не безпосередньо із просторово-часових кореляційних функцій ван Хова. На відміну від них, вирази (2.5)–(2.6) фактично зводяться до обчислення Фур'є-образів від кореляційної функції швидкостей частинок (а не їхніх радіус-векторів), які можна також визначити за результатами комп'ютерного моделювання методом молекулярної динаміки.

Окремо розглянемо частковий випадок розрахунку статичного структурного фактору (ССФ), з яким пов'язана інтенсивність пружного ($E_f = E_i, \omega = 0$) розсіяння нейтронів. У цьому випадку $\Delta E = 0$, тож замість виразів (2.5)–(2.6) необхідно використовувати (2.2)–(2.3). Для розрахунку ССФ із даних молекулярно-динамічного моделювання було використано модельну систему, яка містила подвійний шар із 128 молекул дипальмітоїлфосфатидилхоліну (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,

ДПФХ) в оточенні 2000 об’єднань молекул води. Моделювання проводилося в пакеті GROMACS версії 5.1.4 з використанням силового поля Martini [25] для об’єднаних атомів. При цьому була використана топологія молекул ДПФХ, апробована [26–28] для вказаного силового поля. Кожне із 768 об’єднань молекул води було представлене типом W силового поля Martini версії 2.0. При цьому використовували тривимірні періодичні граничні умови, а розрахунок проводили у NPT-ансамблі за температури 325 К, яку контролювали за допомогою v-rescale-термостату, і тиску 1,0 атм, який підтримували напівізотропним баростатом Парінело-Рамана. Застосування силового поля Martini для об’єднаних атомів дало змогу вибрати часовий крок для інтегрування рівнянь руху до 30 фс, за якого досягається загальна тривалість траєкторії 54 нс при $1{,}8 \cdot 10^6$ кроках. При моделюванні розглядались такі геометрії системи, за яких вектор $\vec{q}$ лежить в площині (*x,y)* (рис. 2.6), а ССФ можна вважати функцією $S(q_x, q_y)$, та у площинах (*x,z*) (рис. 2.7, *а*) та (*y,z*) (рис. 2.7, *б*).

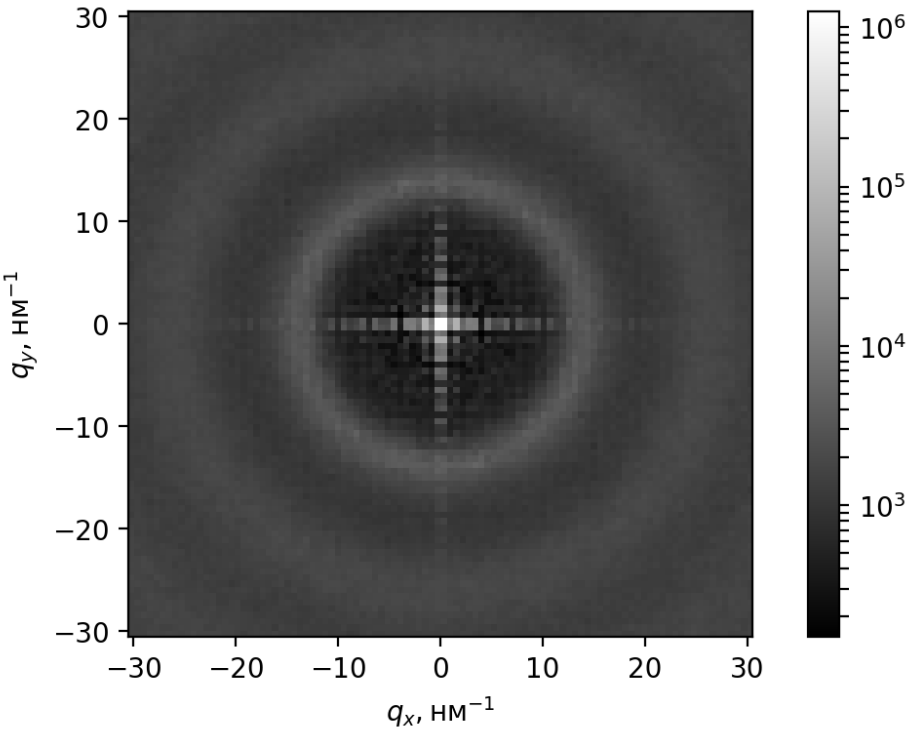
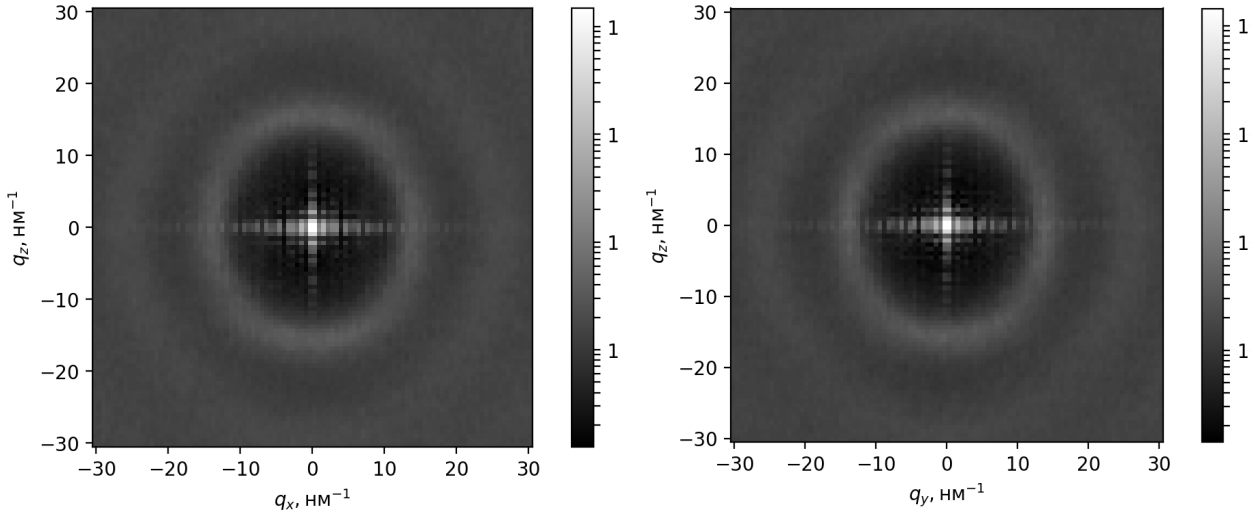


Рисунок 2.6 – Статичний структурний фактор $S(q_x, q_y)$ подвійного шару з молекул фосфоліпіду дипальмітоїлфосфатидилхоліну, одержаний за допомогою комп’ютерного моделювання



а *б*

Рисунок 2.7 – Статичні структурні фактори подвійного шару з молекул фосфоліпіду дипальмітоїлфосфатидилхолін, одержані за допомогою комп'ютерного моделювання для випадків вектора розсіяння, що лежить в площині (*x,z*) (*а*) та (*y,z*) (*б*).

Числовий розрахунок Фур'є-перетворення для просторової частини кореляційної функції ван Хова виконували за допомогою спеціально створеної в рамках даної роботи програми мовою програмування Python2. Усереднення здійснювалося по 1000 миттєвих координатах частинок системи, що належали лише молекулам ДПФХ, які вибиралися із траєкторії з кроком 1,5 пс. Одержаний статичний СФ (ССФ) представлено на рис. 2.6 та 2.7. Для виконання обчислень за виразом (2.2) використовувалася лише одна періодична комірка системи, внаслідок чого на рис. 2.6 та 2.7 в області найменших значень переданого хвильового вектора спостерігаються додаткові максимуми від дифракції на розмірах комірки.

Детальніший аналіз радіального розподілу ССФ дозволив виявити пік при ~14 нм$^{-1}$, що відповідає характерній відстані ~5 Å і узгоджується із середньою відстанню між молекулами фосфоліпідів в площині (*x,y*).

2.3 Загальна характеристика систем, вибраних для моделювання взаємодії мембрани з вірусом методом молекулярної динаміки

Із-поміж складових частин коронавірусу SARS-CoV2 рецептор-зв'язувальна ділянка (receptor-binding domain – RBD) глікопротеїну «шипа» S (spike glycoprotein) вступає у взаємодію з клітиною організму, що інфікується, на одній із найбільш ранніх стадій інфікування клітин організму. Мембранним протеїном-рецептором, взаємодія «шипа» S із яким ініціює біологічний процес проникнення вірусу в клітину, є ангіотензин-перетворювальний ензим 2 (angiotensin-converting enzyme 2 – ACE2) [1–4].

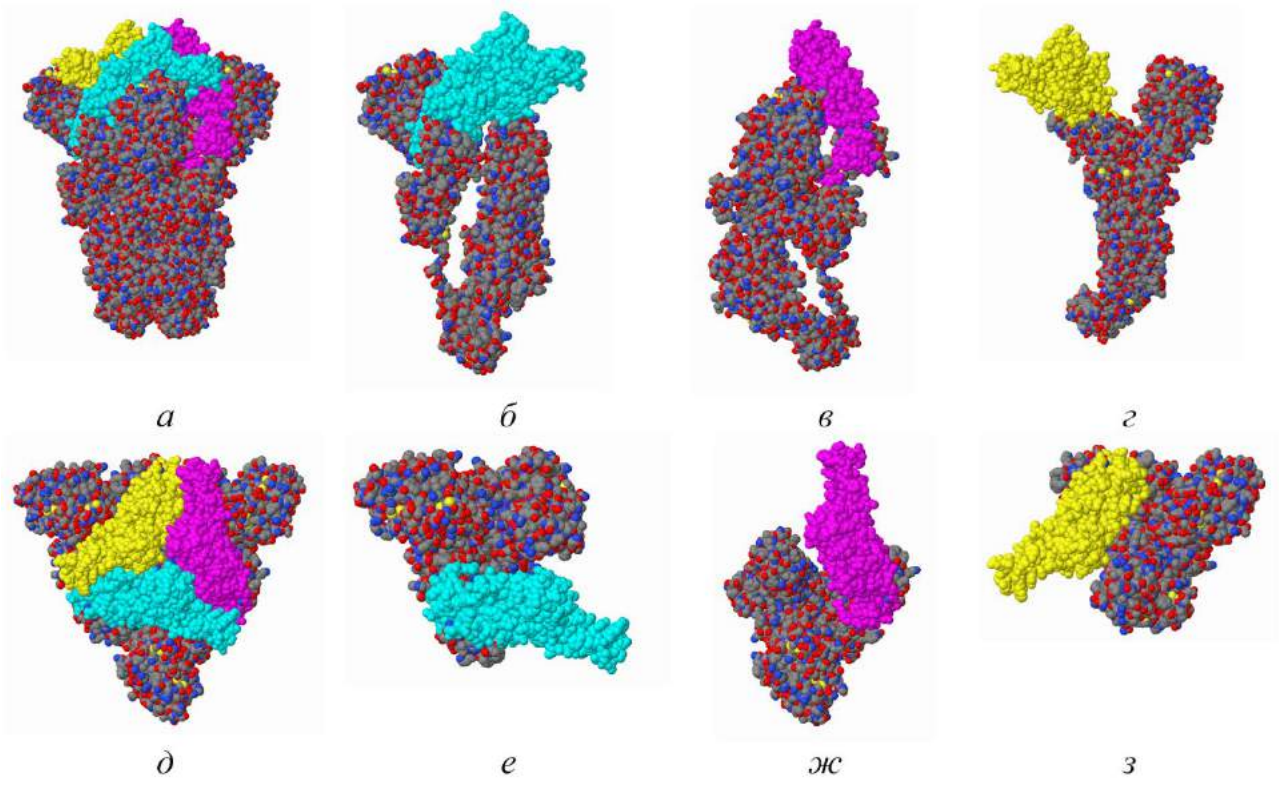
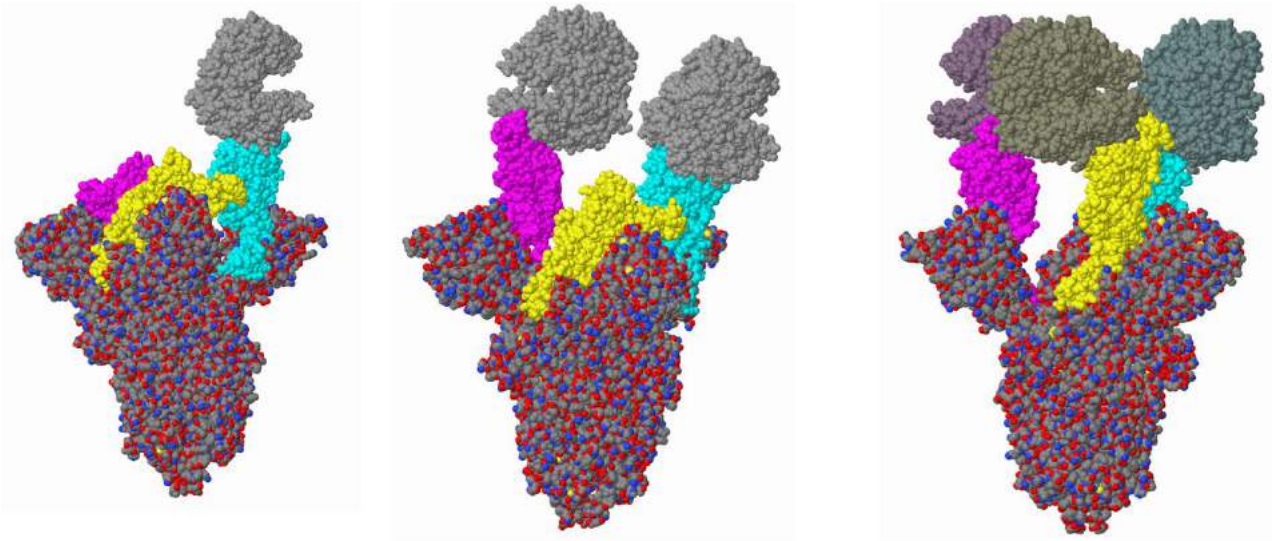


Рисунок 2.8 – Просторова будова глікопротеїну «шипа» S вірусу SARS-CoV-2 за даними структури 6ZB4 [29] з бази PDB, зорієнтованого головною віссю паралельно (*а–г*) та перпендикулярно (*д–з*) до площини рисунка. Окремі ланцюги, що формують тример шипа, показано на рисунках *б–г* та *е–з*. На всіх зображеннях ділянку RBD, відповідальну за зв’язування з рецептором ACE2, виділено суцільним кольором.

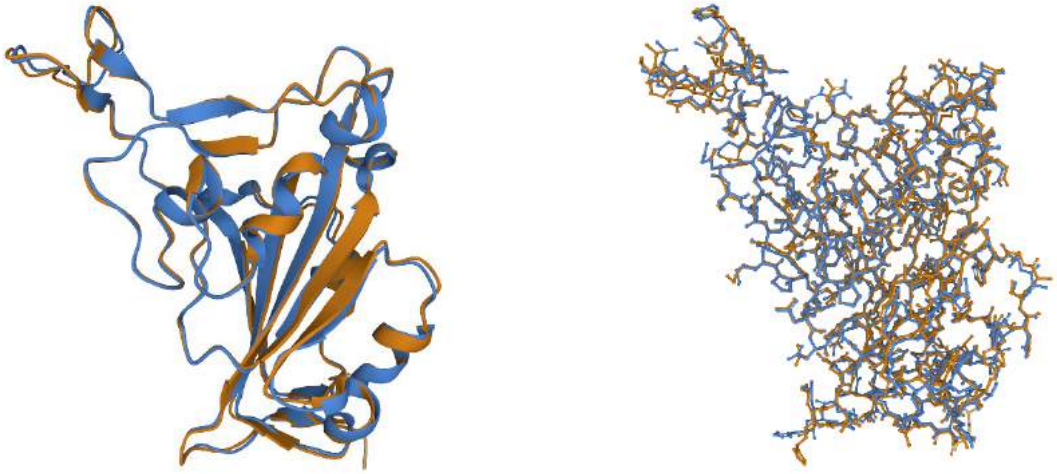
Загальна структура RBD на сьогодні є відомою із численних рентгеноструктурних експериментів та результатів електронної мікроскопії. Зі структурної точки зору, глікопротеїн «шипа» S утворений трьома однаковими субодиницями (рис. 2.8), кожна з яких має дві частини – S1 (включає амінокислотами білкового ланцюга з номерами 13–685 із загалом 1273 амінокислот глікопротеїну «шипа» S [2, 3]) та S2 (див. огляд у [4]). У свою чергу, RBD, яка відіграє ключову роль у взаємодії «шипа» S із ACE2, є ділянкою його частини S1, якій відповідають амінокислоти з номерами 319–541 [2, 3]. Відомо також [30, 31], що при взаємодії RBD із ACE2 частина S1 «шипа» S змінює свою конформацію (рис. 2.9). Водночас, можлива взаємодія тих RBD, які під час проникнення вірусу у клітину лишаються незв'язаними із ACE2, є вивченою недостатньо.



а *б* *в*

Рисунок 2.9 – Зміна просторової структури глікопротеїну «шипа» S вірусу SARS-CoV-2 при його зв'язуванні з одним (*а*, PDB код 7A94 [31]), двома (*б*, PDB код 7A97 [31]) та трьома (*в*, PDB код 7A98 [31]) рецепторами ACE2 (позначені темним суцільним кольором).

Примітно, що попри зумовлену зв’язуванням з рецептором ACE2 зміну просторової структури "шипа" загалом, сама структура RBD не зазнає в цьому процесі істотних змін. Так, на рис. 2.10 представлено результат порівняння експериментальних просторових структур RBD із [32, 33]: у комплексі із антитілом CR3022 (PDB код 6ZLR) [32], при взаємодії з яким сайт зв’язування RBD, притаманний його взаємодії із ACE2, залишається вільним, та в комплексі із ACE2 – природною "мішенню" RBD (PDB код 6M0J) [33]. Для порівняння двох вказаних структур їх було суміщено та здійснено пошук їх оптимального просторового розташування за методом jFATCAT [34, 35] та знайдено, що середньоквадратичне відхилення (RMSD) α-вуглецевих атомів (C_α) в порівнюваних структурах склало 0,64 Å.



а *б*

Рисунок 2.10 – Порівняння третинної (*а*) та атомарної (*б*) будови RBD у PDB-структурах 6ZLR [32] (позначено золотистим кольором) та 6M0J [33] (позначено синім кольором)

Аналіз структур RBD у складі комплексів із ACE2 (рис. 2.11), який відрізняється від такого рецептора клітин організму людини тим, що походить із іншого організму (кажана [36] - PDB-код 7C8J (рис. 2.11 *а*) або собаки [37] -

PDB-код 7E3J (рис. 2.11 *б*)) або має мутації (PDB-код 7DMU [38] (рис. 2.11 *в*)) показує, що у структурі RBD відбуваються мінімальні зміни. Так, відповідно до результатів співставлення зі структурою 6M0J [33] за методом jFATCAT [34, 35] середньоквадратичні відхилення (RMSD) α-вуглецевих атомів (C_α) у порівнюваних структурах склало 0,68 Å у випадку 7DMU, 0,62 Å для 7C8J та 0,56 Å для 7E3J.

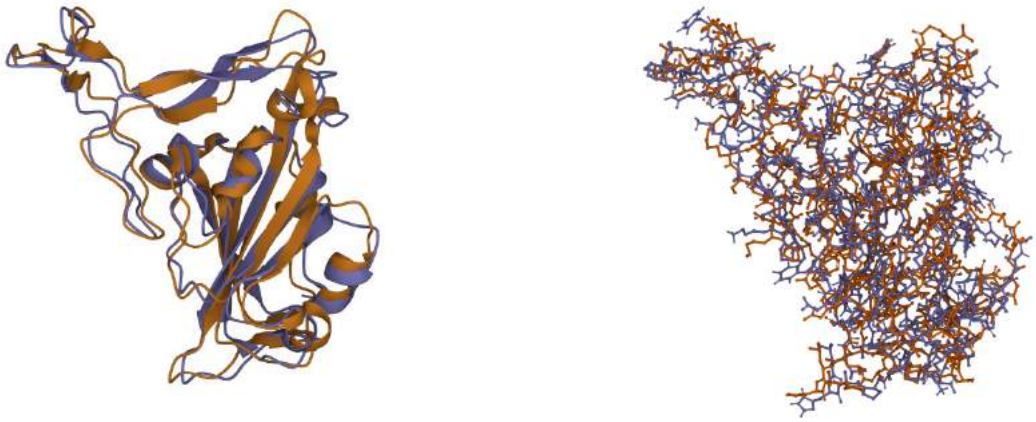
а *б* *в*

Рисунок 2.11 – Порівняння третинної (*а*) будови RBD у складі PDB-структури 6M0J [33] (позначено золотистим кольором) із аналогічними (позначені синім кольором) у складі PDB-структур 7C8J [36] (*а*) та 7E3J [37] (*б*), 7DMU [38] (*в*).

Окрім аналізу відомих кристалографічних структур білкових комплексів за участю RBD, нами було проведено моделювання структури RBD як окремої макромолекули у водному розчиннику. Для цього із PDB-структури 6M0J [33] було виокремлено RBD як окрему макромолекулу (2024 атомів) та вміщено її у комірку для моделювання методом молекулярної динаміки, яка містила також 15386 молекул води, 47 йонів Cl^- та 45 йонів Na^+ для забезпечення електронейтральності системи та підтримання фізіологічної концентрації йонів (~0,15 моль/л) у ній. Моделювання проводили у пакеті GROMACS [39] з використанням наборів потенціалів міжатомної взаємодії ("силового поля")

GROMOS 53a6. Після зрівноважування системи, яке виконували протягом 100 пс у NVT- та 100 пс у NPT-ансамблях із фіксацією атомів RBD з допомогою прикладення пружної сили (пружна стала 1000 кДж/(моль·нм^2)), основна стадія молекулярно-динамічного моделювання виконувалася NPT-ансамблі та тривала 10 нс. Температура в усіх моделюваннях підтримувалася рівною 298 К: за допомогою модифікованого v-rescale-термостата [40] при зрівноважуванні системи та з допомогою термостата Нуза-Гувера для основного моделювання. Підтримання сталого тиску (1,0 атм) в системі здійснювалося ізотропним баростатом Парінелло-Рамана.

Порівняння третинної та атомарної структур RBD, одержаної на останньому часовому кроці молекулярно-динамічного моделювання, із відповідною кристалографічною структурою (PDB-код 6M0J [33]) цієї ж макромолекули наведено на рис. 2.12. У цьому випадку середньоквадратичне відхилення (RMSD) α-вуглецевих атомів (C_α) у порівнюваних структурах склало 2,12 Å.



а *б*

Рисунок 2.12 – Порівняння третинної (*а*) та атомарної (*б*) будови RBD у кристалографічній PDB-структурі 6M0J [33] (позначено золотистим кольором) із одержаною після 10 нс молекулярно-динамічного моделювання у складі рідинної системи на основі води (позначено синім кольором)

Таким чином, як аналіз відомих експериментальних даних, так і результати комп'ютерного моделювання методом молекулярної динаміки вказують на те, що структура RBD навіть після його виокремлення із частини S1 загального полімерного ланцюга глікопротеїну «шипа» S залишається слабко чутливою до компонентного складу та агрегатного стану свого оточення. Ця обставина дозволяє в подальшому використовувати RBD як окрему макромолекулу в експериментах методом розсіяння нейтронів та у комп'ютерному моделюванні як модельний об'єкт для вивченні взаємодії відповідної ділянки цілого «шипа» S із ліпідними мембранами різного складу.

2.4 Методика молекулярно-динамічного моделювання

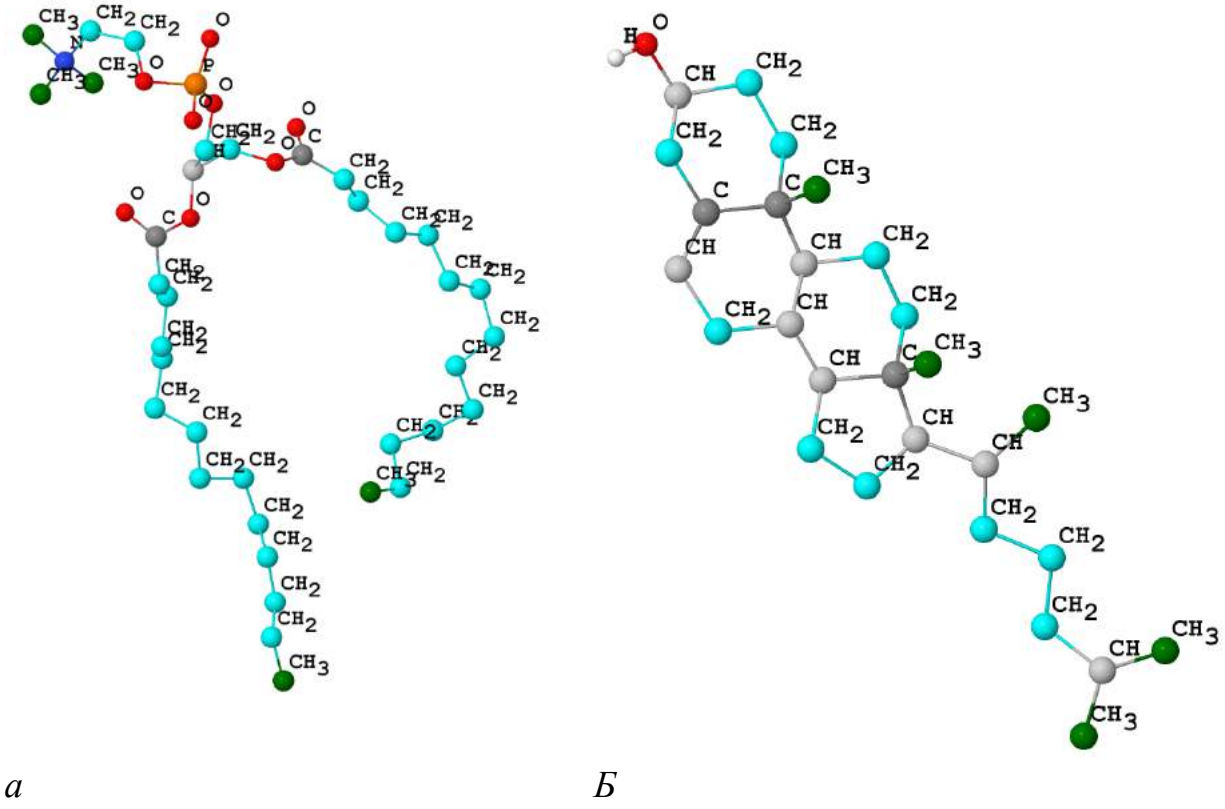
Для виявлення змін атомарної структури модельних ліпідних мембран внаслідок їхньої взаємодії з оточенням (зокрема, домішками у вигляді окремих органічних молекул або білків) було проведено комп'ютерне моделювання методом молекулярної динаміки та подальший аналіз одержаних траєкторій для визначення фізико-хімічних властивостей мембран у досліджуваних системах. У відповідності до вибору систем, які досліджувалися експериментально, для проведення моделювання розглядався подвійний шар із 170 молекул диміристоїлфосфатидилхоліну (ДМФХ) у водному оточенні. При цьому кількість молекул ДМФХ у комірці моделювання було обрано так, щоб, з одного боку, загальна кількість всіх атомів у системі була якомога меншою (аби за фіксований час обчислень мати змогу промоделювати траєкторії якомога більшої тривалості), але, з іншого боку, аби розміри ділянки модельної ліпідної мембрани, яка вміщується в одній комірці моделювання (без врахування періодинчних граничних умов) була достатніми для розміщення поряд ділянки RBD глікопротеїну «шипа» S як окремої макромолекули.

Окрім того, було проведено декілька тестових моделювань RBD у водному оточенні за допомогою загрубленого силового поля Martini [41, 42] для

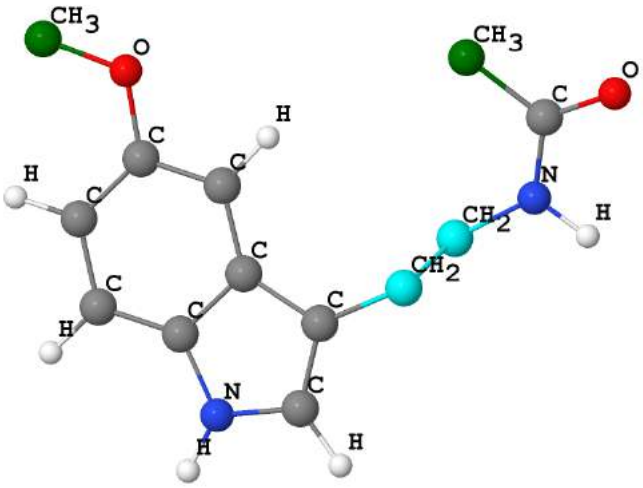
об’єднаних атомів, в якому більшість амінокислот представляються однією "ефективною" частинкою, для амінокислот, що мають позитивний заряд використовуються дві, а для амінокислот, що містять кільця, - три чи чотири такі частинки, тоді як амінокислоти Gly і Ala моделюються тими ж частинками, які відповідають ланкам пептидного зв’язку [42]. У проведених тестових моделюваннях було виявлено, що при використанні силового поля Martini третинна структура RBD у водному оточенні не зберігається – на відміну від випадку, коли моделювання здійснювалося з використанням згаданого вище силового поля GROMOS.

Тому, аби забезпечити можливість вивчення впливу RBD та інших домішок на структуру модельних ліпідних мембран в рамках одного і того ж методу моделювання, усі подальші етапи комп’ютерного моделювання здійснювалися з використанням силового поля GROMOS 53a6 [43]. Це силове поле, хоча і використовує наближення об’єднаних атомів використовується для груп CH_n (n = 1, 2, 3; рис. 2.13), але для більшості інших хімічних елементів в моделюванні використовується один силовий центр (частинка) на один атом. Таким чином, наближення, на яке спирається модель силового поля GROMOS 53a6, можна охарактеризувати як проміжне між загрубленим силовим полем для об’єднаних атомів (на зразок поля Martini) та 'all-atom'-силових полів, у яких кожному атому ставиться у відповідність одна або більше (як, наприклад, при використанні моделей води TIP4P, TIP5P з окремими додатковими частинками, що моделюють заряд неподіленої електронної пари атома кисню) частинок.

Молекулярно-динамічне моделювання виконували в пакеті GROMACS (версії 2020). Параметризації потенціалів взаємодії ("топології") для молекул ДМФХ були взяті з роботи [16], молекул холестерину - з роботи [17], а для молекул мелатоніну - створені за допомогою методу [44, 45] (імплементованого на сервері ATB, https://atb.uq.edu.au). Розчинник було представлено молекулами води, параметризованими в моделі SPC, сумісною із силовим полем GROMOS 53a6.



а *Б*



в

Рисунок 2.13 – Структура молекул ДМФХ (*а*), холестерину (*б*) та мелатоніну (*в*) в представленні об’єднаних атомів неполярних груп CH_n, яке застосовується у силовому полі GROMOS. Кратність усіх ковалентних зв’язків показана одинарною задля наочності.

Загальна методика моделювання включала створення наближеної початкової конфігурації систем, мінімізацію потенціальної енергії створеної конфігурації, термостатування системи у NVT-ансамблі протягом 100 пс та подальше моделювання у NPT-ансамблі. Останнє складалося зі зрівноважування системи задля стабілізації тиску у ній та основної стадії моделювання тривалістю у 20 нс, за траєкторіями на якій в подальшому обчислювалися необхідні фізико-хімічні властивості. При цьому час зрівноважування обирався для кожної системи окремо, починаючи від щонайменше 40 нс, шляхом його поступового збільшення до тих пір, поки протягом останніх щонайменше 20 нс залежність від часу таких характеристик системи як її повна енергія та розміри комірки моделювання уздовж кожної із координатних осей характеризуватиметься лише флуктуаціями навколо певного сталого значення, яке не матиме вираженої тенденції до збільшення або зменшення з часом. Так, для системи із 170 молекул ДМФХ у воді час зрівноважування складав 20 нс, для системи із 170 молекул ДМФХ у воді з додаванням 26 молекул мелатоніну (в подальшому позначеної як "15%мел.", де відсотки вказують відносну кількість молекул домішки відносно кількості молекул ДМФХ) - 80 нс, для аналогічної системи із 51 молекулою мелатоніну (в подальшому позначеної як "30%мел.") - 180 нс; для системи із 170 молекул ДМФХ у воді з додаванням 26 молекул холестерину (в подальшому позначеної як "15%хол.") - 80 нс, для аналогічної системи із 51 молекулою холестерину (в подальшому позначеної як "30%хол.") - 80 нс.

В усіх моделюваннях температуру системи підтримували рівною 298 К за допомогою модифікованого v-rescale-термостата [40] з характеристичним часом 1,0 пс, а при моделюванні у NPT-ансамблі використовували також напів-ізотропний баростат Парінелло-Рамана (з характеристичним часом 2,0 пс, однаковим для контролювання компонентів тиску у напрямках *xy* та *z*) для підтримання сталого тиску 1,0 атм. На систему накладалися періодичні граничні умови.

У випадку систем, що містили RBD підготовка до моделювання також включала зрівноважування системи у NVT- та NPT-ансамблях, але в цьому випадку після етапу мінімізації потенціальної енергії системи спочатку виконували моделювання тривалістю у 100 пс в NVT-ансамблі із фіксацією атомів RBD за допомогою гармонічного утримуючого потенціалу (силова стала 1000 кДж/(моль·нм^2)), а далі протягом 100 пс із такою самою фіксацією атомів RBD протягом 100 пс систему моделювали у NPT-ансамблі. Лише після цього фіксацію атомів прибирали та переходили до основного моделювання етапу моделювання у NPT-ансамблі. При цьому час зрівноважування в NPT-ансамблі системи із 170 молекул ДМФХ у воді із додаванням RBD складав 240 нс, а для аналогічної системи, яка також містина 51 молекулу мелатоніну (в подальшому позначеної як "30%мел + RBD ") - 180 нс. Окрім цього, оскільки білкова макромолекула RBD містить амінокислоти, які за фізіологічних умов мають ненульовий заряд, до складу системи, що моделювалася, було додано два йони Cl^-.

Структуру RBD для створення усіх досліджуваних модельних систем із його вмістом було взято із бази PDB за кодом 6M0J [33]. Вибір цієї структури із-поміж багатьох наявних у базі PDB експериментальних структур було здійснено таким чином, аби відповідна кристалографічна структура не мала амінокислот, координати атомів яких залишилися невизначеними після обробки експериментальних даних, не мала змінених амінокислот (мутацій) та містила загалом якомого більше амінокислотних залишків із діапазону номерів амінокислот 319–541 частини S1 глікопротеїну «шипа» S коронавірусу SARS-CoV2. Додатково було застосовано умову приналежності амінокислотної послідовності структури PDB до стандартної послідовності P0DTC2 (SPIKE_SARS2) із бази UniProtKB. Перевагу віддавали структурам із меншою похибкою визначення координат атомів.

2.5 Результати моделювання впливу домішок на структурні властивості модельної ліпідної мембрани

Для вивчення впливу на фізико-хімічні властивості модельної ліпідної мембрани молекул мелатоніну, холестерину та RBD, насамперед в рамках однієї і тієї ж методики проведення моделювання одержано властивості модельної ліпідної мембрани без домішок, які нижче буде прийнято за відправну точку для порівняння. За найбільш релевантні властивості мембрани при цьому було обрано її ефективну товщину, профіль (розподіл) густини мембрани та окремих її компонент, а також площу та об'єм, які припадають на одну молекулу ДМФХ. У зв'язку з тим, що межа між подвійним шаром амфіфільних молекул (модельною мембраною) та її оточенням (наприклад, водою) не є строго визначеною геометричною поверхнею, в літературі існують різні підходи до визначення ефективної товщини такого подвійного шару [46]. Одним з цих підходів є товщина за Луззаті [47–49]

$$d_L = \int_{b_1}^{b_2} w(z) \cdot dz \qquad (1)$$

де b_1 та b_2 - z-координати меж комірки моделювання, а також використана вагова функція

$$w(z) = 1 - \frac{\rho_{H_2O}(z)}{\rho_{H_2O(max)}} \qquad (2)$$

яка залежить від густини $\rho_{H_2O}(z)$ молекул розчинника (води) у зрізі комірки моделювання, що має координату z, та густини $\rho_{H_2O(max)}$ цих же молекул в області, що достатньо віддалена від амфіфільних молекул. При цьому значення вагової функції $w(z)$ можна інтерпретувати як (усереднену) ймовірність перебування молекули розчиненої речовини у площині, всі точки якої мають координату z. За такої інтерпретації (1) можна розглядати як добуток товщини комірки $b_2 - b_1$ в напрямку, перпендикулярному площині мембрани, та частки

$\int_{b_1}^{b_2} w(z) \cdot \frac{dz}{b_2 - b_1}$ товщини комірки моделювання, яку займають амфіфільні молекули.

У той же час, підхід, заснований на виразах (1)–(2), не можна буде застосувати до систем, які не є однорідними в площині *x*O*y*, зокрема - до системи, що містить RBD. Тому з-поміж складових молекули ДМФХ було виділено різні атомні групи (гідрофобні "хвости", гідрофільні "голови" та окремі атоми цих "голів") і за товщину мембрани прийнято відстань між точками максимумів густини однієї з груп: d_H – у випадку аналізу максимумів густини усіх атомів, що складають гідрофільну "голову" молекули ДМФХ, $d_{H(P)}$ – при врахуванні лише атомів фосфору (P) гідрофільних "голів", $d_{H(N)}$ – при врахуванні лише атомів азоту (N) гідрофільних "голів". Аналіз залежностей густин вибраних атомних груп від координати *z* наведено на рис. 1.7.

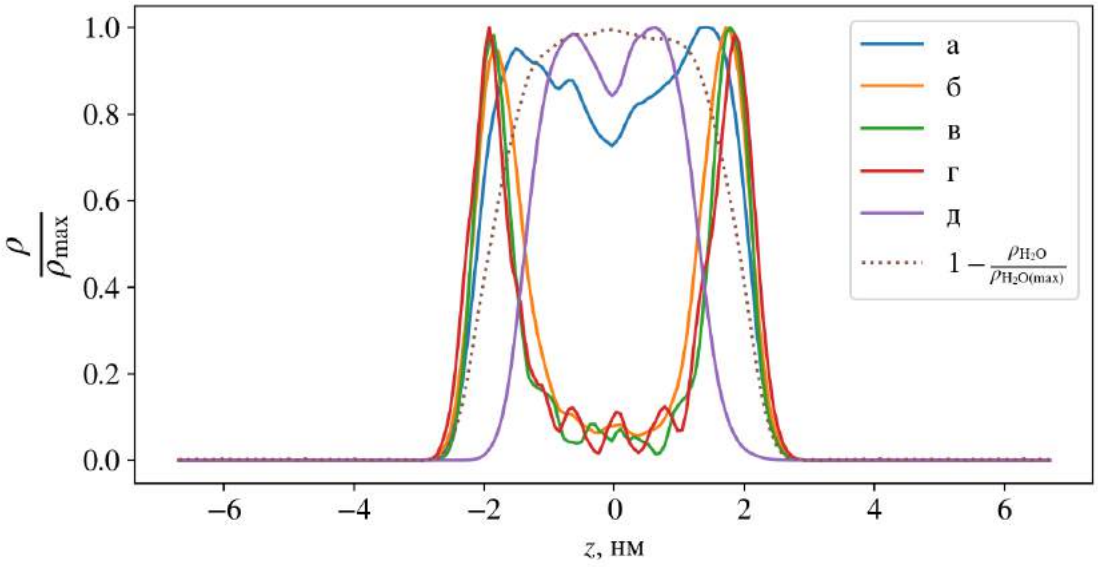


Рисунок 2.14 – Розподіли густини (у відносних одиницях) для молекул ДМФХ (*а*) та їхніх складових (гідрофільних "голів" - *б*, атомів P гідрофільних "голів" - *в*, атомів N гідрофільних "голів" - *г*, гідрофобних "хвостів" - *д*) уздовж осі z, що перпендикулярна до площини модельної мембрани, для рідинної системи ДМФХ у воді. Для порівняння пунктиром показано також графік вагової функції *w*(*z*), яка визначається розподілом густини розчинника у комірці.

Одержані у такий спосіб оцінки d_L, d_H, $d_{H(P)}$ та $d_{H(N)}$ для товщини модельної ліпідної мембрани у складі усіх досліджених систем наведені в Табл. 2.2. Окрім них, в цій таблиці подано середню площу, яка припадає на одну молекулу ДМФХ. Таку площу визначали шляхом ділення усередненої за прикінцеві 20 нс траєкторій площі комірки моделювання у площині *x*O*y*, паралельній до подвійного шару молекул ДМФХ, на 85 – середню кількість молекул ДМФХ у кожній із двох половин подвійного шару. При здійсненні такої оцінки ефективної площі окремих поправок на вміст молекул домішок у системі не вводили.

Таблиця 2.2. Залежність структурних параметрів модельної ліпідної мембрани, утвореної подвійним шаром молекул ДМФХ, у складі водної рідинної системи від вмісту домішок

Домішки	Товщина мембрани, нм				Площа на 1 молекулу DMPC, нм^2
	d_L	d_H	$d_{H(P)}$	$d_{H(N)}$	
(відсутні)	3,68	3,57	3,63	3,77	0,622
15%мел.	3,70	3,47	3,67	3,47	0,632
30%мел.	3,68	3,22	3,64	3,29	0,654
15%хол.	3,80	3,69	3,89	3,96	0,646
30%хол.	3,98	3,82	3,82	3,96	0,658
RBD	–	3,66	3,66	3,80	0,610
30%мел. + RBD	–	3,08	3,16	3,31	0,632

Варто зазначити, що як одержані значення ефективної товщини модельної ліпідної мембрани в досліджених системах, так і одержані значення площі, що припадає на одну молекулу ДМФХ, узгоджуються із відповідними діапазонами значень для ДМФХ у воді, відомими з експерименту [47]: 3,63 – 3,69 нм для товщини за Луззаті та 0,58 – 0,67 нм^2 для площі.

Для всіх досліджених систем, що не містили RBD, із-поміж товщин d_H, $d_{H(P)}$ та $d_{H(N)}$ найближчою до товщини бішару за Луззаті d_L виявилася відстань $d_{H(P)}$ між максимумами густини атомів фосфору молекули ДМФХ, тому саме її для подальшого було прийнято за ефективну товщину мембрани.

Окрім цього, у Табл. 2.3 наведено усереднені за прикінцеві 20 нс траєкторій об'єми комірки моделювання для всіх досліджених систем. Додатково до цього, із використанням таких же як і для решти систем наближень і способів моделювання, було знайдено, що середній об'єм комірки із 16456 молекулами води складає 505,1 нм^3.

Таблиця 2.3. Кількість молекул води у комірці моделювання та її середній об'єм для систем, що моделювали вплив домішок на структуру та властивості ліпідної мембрани, утвореної подвійним шаром молекул DMPC

Домішки	Кількість молекул води	Об'єм комірки, нм^3
(відсутні)	16456	695,2
15%мел.	17841	746,6
30%мел.	18984	790,3
15%хол.	17421	740,8
30%хол.	18489	789,8
RBD	16979	738,9
30%мел. + RBD	19342	829,0

Із таких даних в наближенні адитивності об'ємів, що припадають на одну молекулу кожного із компонентів системи, та нехтуючи об'ємом йонів, було знайдено, що середній об'єм, який припадає на одну молекулу ДМФХ, складає 1,12 нм^3 (що узгоджується із діапазоном значень 1,095 – 1,101 нм^3 [47] для ефективного об'єму однієї молекули ДМФХ, відомому з експериментів), а

середній об’єм, який припадає на одну молекулу мелатоніну та холестерину - 0,34 нм^3 (незалежно від концентрації) та 0,61 нм^3 (15%хол.) або 0,63 нм^3 (30%хол.) відповідно. З використанням одержаних значень було здійснено також оцінку ефективного об’єму RBD у водній рідинній системі зі 170 молекулами ДМФХ та аналогічній системі із додаванням 51 молекули мелатоніну. Одержані значення склали 27,7 нм^3 в обох системах. Таким чином, не було виявлено істотного впливу складу досліджуваних систем на взаємне розташування їхніх молекул, яке б характеризувалося зміною питомого об’єму таких молекул.

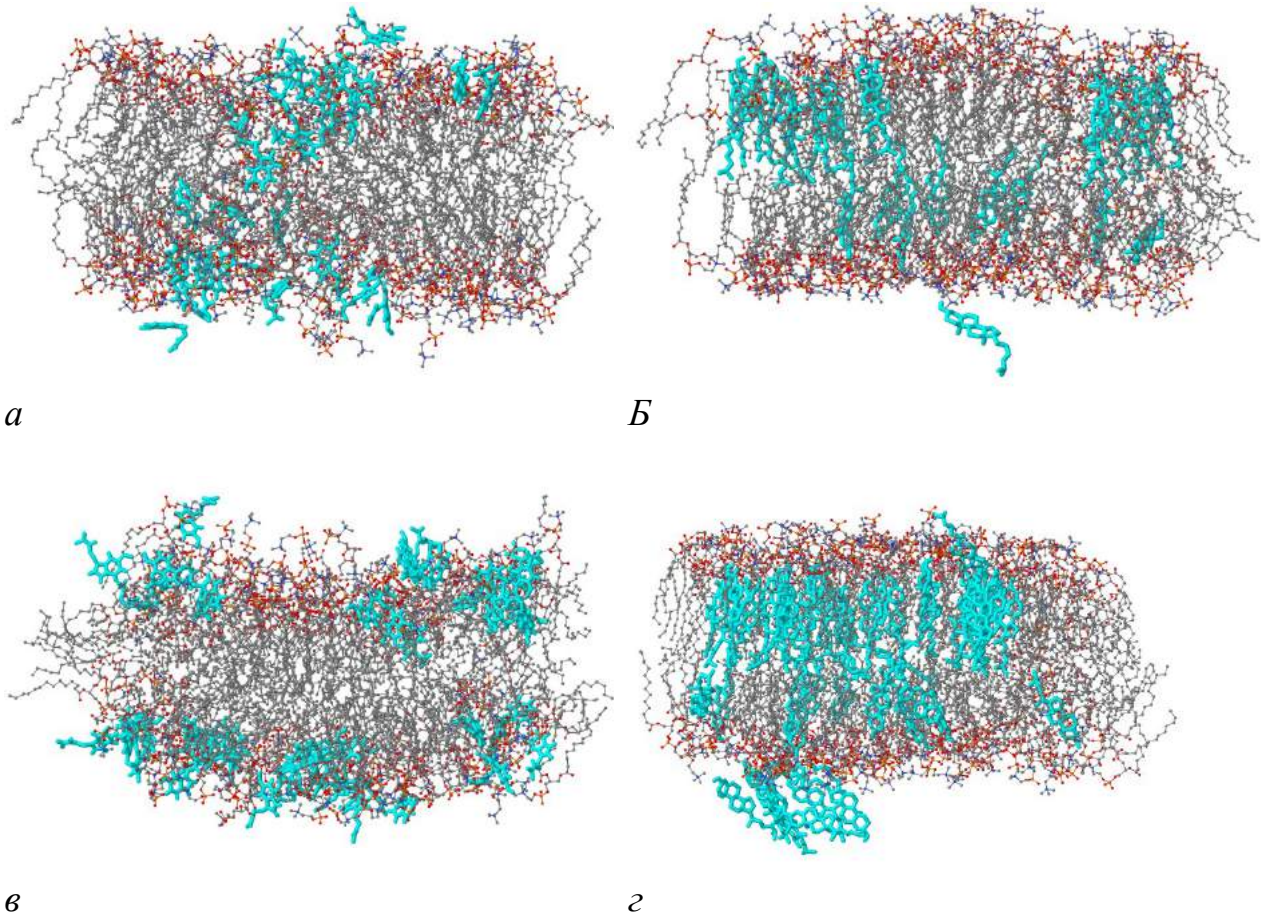


Рисунок 2.15 – Взаємне розташування модельної ліпідної мембрани, утвореної молекулами ДМФХ, та 15% (*а*, *б*) і 30% (*в*, *г*) домішок (зображені лазуровим кольором) у вигляді молекул мелатоніну (*а*, *в*) або холестерину (*б*, *г*). Задля наочності молекули розчинника не зображені.

Графічне представлення структури досліджених систем з модельною ліпідною мембраною та домішками мелатоніну та холестерину, побудоване на основі координат атомів в останній момент часу траєкторій, одержаних методом молекулярної динаміки, наведено на рис. 2.15. Здебільшого молекули мелатоніну вбудовуються у подвійний шар молекул ДМФХ поблизу його поверхні контакту із водою. Молекули холестерину, більшість атомних груп у яких є неполярними, також вбудовуються у модельну мембрану, але розміщуються переважно в її гідрофобній частині. Разом із тим, у випадку систем із холестерином частина його молекул наприкінці розрахованих молекулярно-динамічних траєкторій все ще перебували в оточенні розчинника, що може вказувати на недостатній час зрівноважування цих систем та необхідність використання додаткових кількісних критеріїв, за якими можна було б визначити момент досягнення структурою системи свого рівноважного стану.

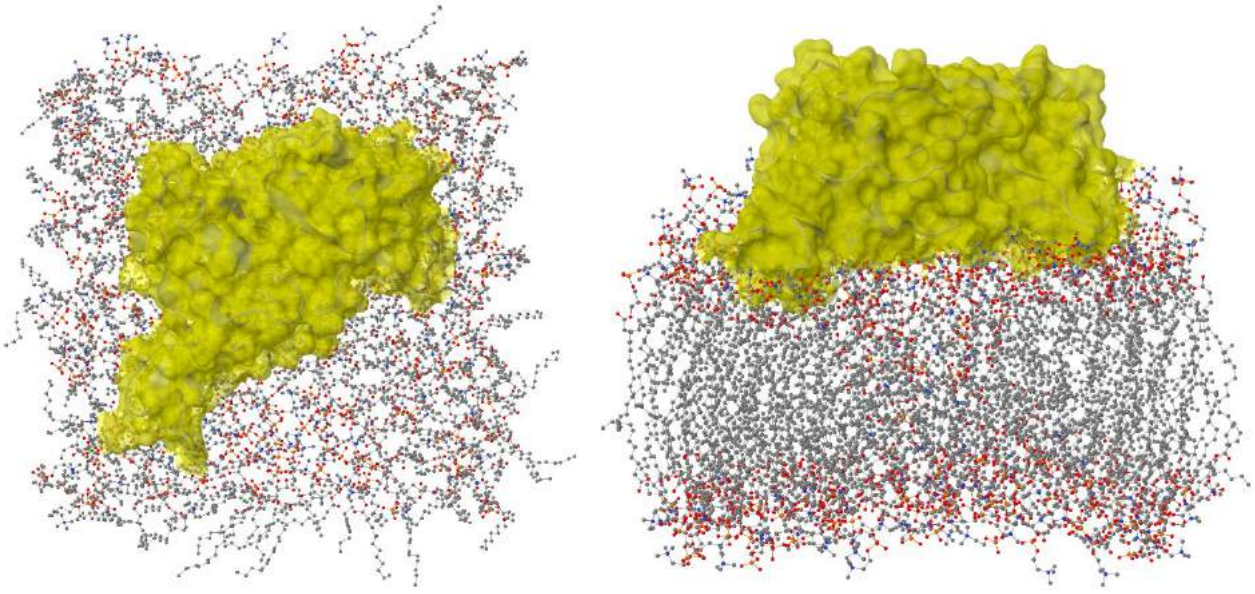


Рисунок 2.16 – Взаємне розташування модельної ліпідної мембрани, утвореної молекулами ДМФХ та ділянки RBD глікопротеїну «шипа» S вірусу SARS-CoV-2 як окремої макромолекули (зображена поверхнею, доступною для розчинника) за результатами моделювання методом молекулярної динаміки.

Задля наочності структуру утвореного комплексу представлено у двох ракурсах, а молекули розчинника не зображені.

Для подальшого моделювання взаємодії модельної ліпідної мембрани із RBD з-поміж досліджених систем було обрано дві: рідинну систему із ДМФХ у воді без домішок та таку ж систему із 51 молекулою мелатоніну. Структури двох обраних систем, які відповідають останньому моменту часу із розрахованих методом молекулярної динаміки траєкторій, наведено на рис. 2.16 та 2.17. При цьому для зображення білкової складової системи побудовано поверхню, доступну для розчинника із ефективним радіусом частинок 1,4 Å, що є типовим для води.

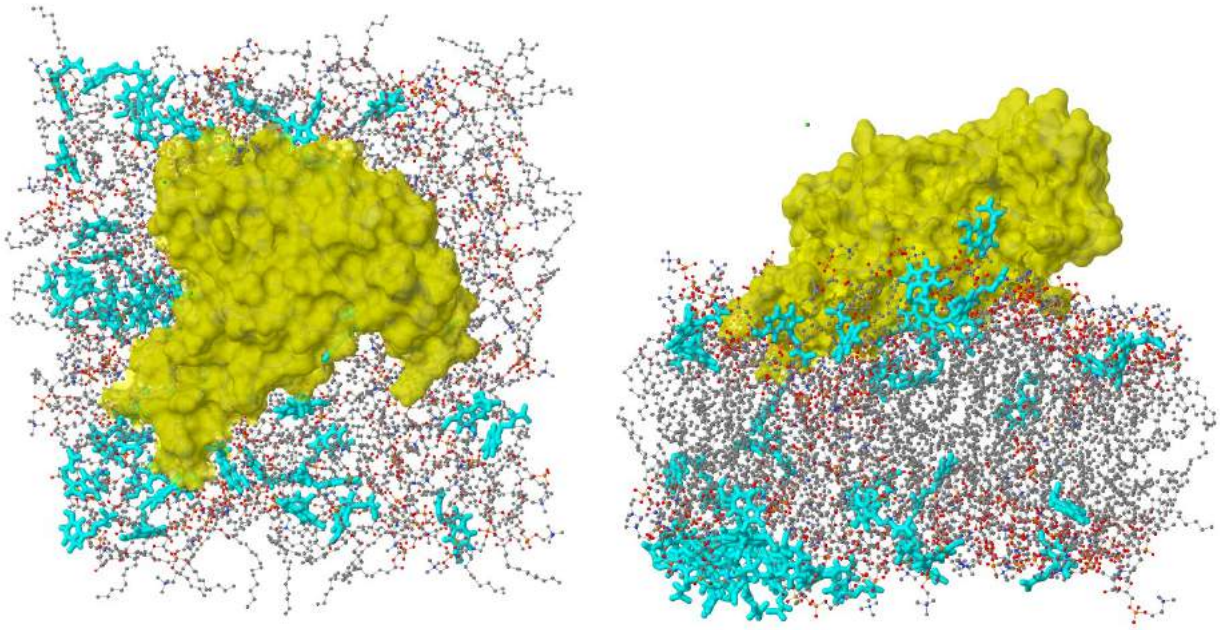


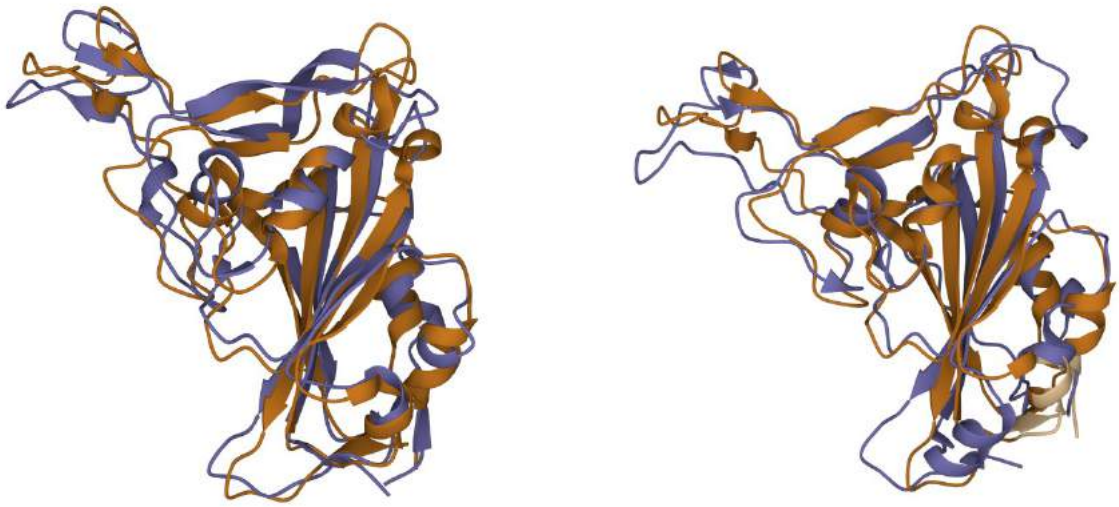
Рисунок 2.17 – Взаємне розташування модельної ліпідної мембрани, утвореної молекулами DMPC, молекул мелатоніну (зображені лазуровим кольором) та ділянки RBD глікопротеїну «шипа» S вірусу SARS-CoV-2 як окремої макромолекули (зображена поверхнею, доступною для розчинника) за результатами моделювання методом молекулярної динаміки. Задля наочності структуру утвореного комплексу представлено у двох ракурсах, а молекули розчинника не зображені.

Хоча в обох випадках у початковій конфігурації системи RBD розміщувалася в оточенні розчинника і не перебувала в безпосередньому контакті із подвійним шаром молекул ДМФХ, наприкінці траєкторій дві вказані компоненти системи вже мають спільну поверхню контакту. У випадку системи із домішками мелатоніну цей контакт супроводжується також витісненням молекул домішки у розчинник. В подальшому доцільно докладніше проаналізувати існуючі взаємодії між молекулами ДМФХ та макромолекулою RBD та визначити відповідну енергію зв'язування.

Додаткові прояви взаємодії RBD з модельною ліпідною мембраною можна виявити також із аналізу її впливу на зміну просторової структури RBD. Ці зміни є більшими, аніж у випадках взаємодії RBD із ACE2 (коли RMSD для атомів C_α складає 0,64 Å), зокрема - ACE2 із модифікаціями його структури (RMSD в межах 0,62 - 0,68 Å), або у випадку переходу від RBD у кристалічному стану до водного оточення у складі рідинної системи (RMSD складає 2,12 Å). Так, після суміщення (рис. 2.18) та знаходження оптимального просторового розташування за методом jFATCAT [34, 35] просторових структур RBD, одержаних із кристалографічної структури 6M0J [33] та систем, досліджених методом молекулярної динаміки, було знайдено, що середньоквадратичне відхилення (RMSD) атомів C_α в порівнюваних структурах склало 2,87 Å для випадку RBD із водної рідинної системи з молекул ДМФХ та 3,17 Å для аналогічної системи із вмістом 51 молекули мелатоніну.

Разом із тим, в усіх досліджених системах із вмістом RBD третинна структура цієї білкової макромолекули загалом зберігається. Разом із узгодженістю структурних параметрів досліджених модельних ліпідних мембран із відомими експериментальними значеннями це вказує на коректність наближень, на які спираються обрані методи комп'ютерного моделювання, та дає змогу на наступному етапі використати структури та траєкторії атомів досліджених систем, одержані методом молекулярної динаміки, для розрахунку спектрів розсіяння цими системами нейтронів та використання таких

результатів для інтерпретації відповідних спектрів, зареєстрованих в експерименті.



а *б*

Рисунок 2.18 – Порівняння третинної структури RBD у кристалічному стані (позначено золотистим кольором, PDB-код 6M0J [33]) із відповідною структурою, що реалізується у складі водної рідинної системи, що містить модельну ліпідну мембрани з молекул DMPC, (а) та в складі такої ж системи із додаванням молекул мелатоніну (*б*), відповідно до результатів моделювання методом молекулярної динаміки (позначено синім кольором)

2.6 Динамічний структурний фактора модельної ліпідної мембрани з домішками та його залежність від компонентного складу системи

Динамічний структурний фактор розраховували на основі результатів моделювання методом молекулярної динаміки для систем, що містили модельну ліпідну мембрану, утворену 170-ма молекулами ДМФХ (назва за IUPAC: (2R)-2,3-Bis(tetradecanoyloxy)propyl 2-(trimethylazaniumyl)ethyl phosphate) в оточенні молекул води, та містили один із наступних комплектів домішок: 26 молекул мелатоніну (в подальшому позначеної як "15%мел.", де

відсотки вказують відносну кількість молекул домішки відносно кількості молекул DMPC); 51 молекулу мелатоніну ("30%мел."); 26 молекул холестерину ("15%хол."); 51 молекулу холестерину ("30%хол."); RBD ("RBD"); RBD та 51 молекулу мелатоніну ("30%мел + RBD "); система без додаткових домішок. На цьому етапі за початкові умови приймали ті координати і швидкості усіх частинок системи, які були знайдені на останньому часовому кроці у траєкторіях виконаних раніше моделювань (тривалістю щонайменше 80 нс кожне). Нове моделювання проводили протягом додаткових 0,5 нс, зберігаючи координати і швидкості усіх частинок системи кожні 0,01 пс. При цьому інші параметри нового моделювання не змінювали порівняно із виконаними раніше. Для кожного із одержаних 50 000 "кадрів" (які відповідають моментам часу t_n) розраховували скалярну величину

$$J_K(\vec{q},t_n)=\frac{\vec{q}}{q}\cdot\sum_{j=1}^{N_K}\vec{v}_j(t_n)b_j\exp\left(-i\cdot(\vec{q}\cdot\vec{r}_j(t_n))\right), \qquad (1)$$

де $\vec{q}=\vec{k}_i-\vec{k}_f$ – переданий хвильовий вектор, $q=|\vec{q}|$, $\vec{r}_j(t)$ та $\vec{v}_j(t)$ – вектори, відповідно, координат і швидкостей *j*-ої частинки системи в момент часу *t*, b_j – амплітуда довжини розсіяння нейтронів для хімічного елемента атома *j*-ої частинки системи, *K* – номер речовини, частинки якої утворюють одну з хімічних компонент системи. Для кожного з "кадрів" підсумовування в (1) проводили лише за частинками, що складають молекули окремо кожної з речовин, що входять до складу системи, та зберігали одержані значення. Це дозволило після завершення найбільш ресурсоємної стадії обчислень аналізувати вклад J_K кожної із речовин до загального динамічного структурного фактору індивідуально. Оскільки моделювання методом молекулярної динаміки здійснювалося з використанням силового поля GROMOS, в якому групи CH_m (m = 1, 2, 3) представляються однією частинкою, за амплітуду довжини розсіяння нейтронів такої частинки приймалася сума відповідних амплітуд для атомів, що її складають. Для ядер атомів усіх наявних в системі хімічних елементів використовували значення амплітуд довжини

когерентного розсіяння нейтронів b_j із [50].

Фур'є-образ кореляційної функції $\varphi_{\vec{q}}(t) = \left\langle J^*(\vec{q}, t_0 + t) \cdot J(\vec{q}, t_0) \right\rangle$ пов'язаний із двічі диференційним перерізом розсіяння нейтронів I виразом [51]

$$(\Delta E)^2 \cdot I(\vec{q}, E_f) = \frac{k_f}{k_i} \frac{\hbar}{2\pi N} \cdot q^2 \cdot \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi_{\vec{q}}(t) \cdot e^{i\omega t} dt ,$$

де $I = \dfrac{d^2\sigma}{d\Omega dE_f}$ – двічі диференційний переріз непружного розсіяння, E_i – енергія нейтрона падаючого пучка, E_f – енергія розсіяного нейтрона, $\Delta E = E_i - E_f$ – зміна енергії нейтрона при розсіюванні, $\omega = \Delta E / \hbar$, N – загальна кількість розсіюючих центрів в зразку. Фур'є-образ

$$\Phi_{\vec{q}}(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi_{\vec{q}}(t) \cdot e^{i\omega t} dt \qquad (2)$$

кореляційної функції $\varphi(t)$ пов'язаний також і з динамічним структурним фактором системи виразом [51, 52]

$$S(\vec{q}, \omega) = \frac{q^2}{\omega^2} \cdot \frac{1}{N} \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi_{\vec{q}}(t) \cdot e^{i\omega t} dt .$$

Останній пов'язаний із інтенсивністю непружного розсіяння нейтронів

$$I(\vec{q}, E_f) = \frac{k_f}{k_i} \frac{1}{2\pi\hbar} \cdot S\left(\vec{q}, E_f / \hbar\right), \qquad (3)$$

а також – із поздовжньою компонентою кореляційної функції струму

$$C_L(\vec{q}, \omega) = \frac{1}{N} \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi_{\vec{q}}(t) \cdot e^{i\omega t} dt \qquad (4)$$

виразом [52]

$$S(\vec{q}, \omega) = \frac{q^2}{\omega^2} \cdot C_L(\vec{q}, \omega) . \qquad (5)$$

Оскільки при використанні двічі диференційного перерізу розсіяння нейтронів як вихідної величини для вивчення динамічних властивостей систем

[23] як правило аналіз проводять саме для приведеної величини $\frac{\omega^2}{q^2} S(\vec{q},\omega) \sim \frac{(\Delta E)^2}{q^2} \cdot I(\vec{q},E_f) \sim \Phi_{\vec{q}}(\omega) \sim C_L(\vec{q},\omega)$,

нижче докладно аналізуватимемо лише Фур'є-образ $\Phi_{\vec{q}}(\omega) \sim C_L(\vec{q},\omega)$.

Обчислення кореляційної функції $\varphi_{\vec{q}}(t) = \left\langle J^*(\vec{q},t_0+t) \cdot J(\vec{q},t_0) \right\rangle$ виконували виходячи з припущення про справедливість ергодичної гіпотези, замінюючи статистичне середнє на усереднення за часом

$$\varphi_{\vec{q}}(t) = \frac{1}{N_T} \sum_{k=0}^{N_T-1} J^*(\vec{q},k\tau+t) \cdot J(\vec{q},k\tau),$$

де покладали $\tau =$ 0,01 пс, а N_T визначалося з умови $k\tau + t \le 0{,}5$ нс ($N_T \sim 48 \cdot 10^3$). У такий спосіб знаходили значення кореляційної функції для ряду дискретних значень її аргументу в діапазоні від 0 до 7,5 пс із кроком 0,01 пс. При загальній тривалості траєкторії у 500 нс це відповідало усередненню $J^*(\vec{q},t_0+t) \cdot J(\vec{q},t_0)$ за $\sim 10^2$ незалежними конфігураціями системи. При цьому було з'ясовано, що збільшення кроку τ лише підвищує шумову компоненту одержуваного із $\varphi_{\vec{q}}(t)$ динамічного структурного фактору.

При обчисленні $\Phi_{\vec{q}}(\omega)$ використовували властивість кореляційної функції $\varphi_{\vec{q}}(-t) = \varphi_{\vec{q}}{}^*(t)$, яка слідує із незалежності $\left\langle J^*(\vec{q},t_0+t) \cdot J(\vec{q},t_0) \right\rangle$ від t_0, завдяки якій

$$\Phi_{\vec{q}}(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi_{\vec{q}}(t) \cdot e^{i\omega t} dt = 2\,\mathrm{Re} \int_{0}^{+\infty} \varphi_{\vec{q}}(t) \cdot e^{i\omega t} dt, \qquad (6)$$

де було враховано, що $\int_{-\infty}^{0} \varphi_{\vec{q}}(t) \cdot e^{i\omega t} dt = \int_{0}^{+\infty} \varphi_{\vec{q}}(-t) \cdot e^{-i\omega t} dt$. Одержана рівність показує, що застосований спосіб обчислення завжди приводитиме до суто дійсного динамічного структурного фактору, як це і мало бути з огляду на його фізичний зміст (3).

З огляду на характерні значення півширини контурів, на які зазвичай розділяють динамічний структурний фактор при його аналізі [23], задля подальшого зменшення шумової компоненти у одержуваних Фур'є-образах $\varphi_{\bar{q}}(t)$ виконували їхнє згладжування шляхом обчислення згортки із гаусівською функцією

$$g(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma^2} \right).$$

Цю операцію реалізували шляхом домножування вихідного сигналу (функції $\varphi_{\bar{q}}(t)$) на "віконну функцію" у вигляді гаусівського контуру. Математична еквівалентність такого підходу базується на зв'язку Фур'є-образу згортки із добутком Фур'є-образів функцій, що згортаються, а його фізичний зміст полягає у виключенні із розгляду найбільш компонент кореляційної функції з найдовшими часами релаксації (~5 пс). Істотно, що Фур'є-образом функції $g(t)$ є також гаусівська функція.

Слід відзначити, що в загальному випадку (при використанні симетричних меж інтегрування у (2)) "віконна функція" мала би застосовуватися до сигналу $\varphi_{\bar{q}}(t)$ на деякому проміжку $[-T, T]$, однак при застосуванні перетворення (6) фактично має використовуватися лише та половина "віконної функції", яка відповідає проміжку $[0, T]$. В такому разі, роздільна здатність одержуваного Фур'є-образу у частотній шкалі становитиме $\Delta\omega \sim 1/T$, де коефіцієнт пропорційності залежить від вигляду конкретної "віконної функції". При $T \sim 5$ пс матимемо оцінку $\hbar\Delta\omega \sim 0{,}1$ меВ, що значно менше за характерну ширину (~10 меВ) контурів затухаючих гармонічних осциляторів, суперпозицією яких зазвичай апроксимують $\Phi_{\bar{q}}(\omega)$ [23, 52]. Відповідно до цього, для згладжування одержуваного частотного спектра обрали характерну ширину гаусівського контура $\sigma = 2$ пс.

З огляду на те, що значення функції $\varphi_{\bar{q}}(t)$ з проведеного моделювання відомі лише для моментів часу з кроком $\tilde{\tau} = 0{,}01$ пс, максимальну частоту

компоненти спектру цієї функції, яку можна знайти із Фур'є-образу $\Phi_{\bar{q}}(\omega)$, оцінимо екстраполювавши константою кожне зі значень $\varphi_{\bar{q}}(k\tilde{\tau})$ на проміжок часу $\left[k\tilde{\tau}-\tilde{\tau}/2,\ \ k\tilde{\tau}+\tilde{\tau}/2\right]$. У цьому випадку матимемо

$$\Phi_{\bar{q}}(\omega) \approx 4\frac{\sin\left(\frac{\omega\tilde{\tau}}{2}\right)}{\omega}\cdot \mathrm{Re}\sum_{k=0}^{\lfloor T/\tilde{\tau}\rfloor}\varphi_{\bar{q}}(k\tilde{\tau})\cdot g(k\tilde{\tau})\cdot e^{i\omega k\tilde{\tau}}, \qquad (7)$$

де перший співмножник має свій перший нуль при $\omega = 2\pi/\tilde{\tau}$. Половину цієї величини можна відтак прийняти за оцінку $\omega_{\max} = \pi/\tilde{\tau}$ для максимальної частоти, яку можна надійно визначити. Зокрема, при $\tilde{\tau} = 0{,}01$ пс маємо $\hbar\omega_{\max} \approx$ 207 меВ.

На рис. 2.19 наведено динамічний структурний фактор, одержаний у описаний вище спосіб згідно із (7) для молекул системи "30% мел." (з 30% домішками мелатоніну), для двох випадків – коли розсіяння на молекулах розчинника враховувалося (рис. 2.19, *а*, *в*) та коли воно не враховувалося (рис. 2.19, *б*, *г*). В останньому випадку амплітуди довжини розсіяння для атомів молекул розчинника були покладені рівними нулю. В експерименті цього можна досягти використовуючи методики варіації нейтронного контрасту, обравши за розчинник суміш H_2O та D_2O у співвідношенні, яке мінімізуватиме загальну інтенсивність розсіяння нейтрона на розчиннику. Із наведених даних випливає, що внесок молекул модельної ліпідної мембрани та наявних у ній домішок проявляється переважно в області змін енергії нейтрона $\hbar\omega < 25$ меВ та в діапазоні модуля переданого хвильового вектора $q < 15$ нм$^{-1}$. Саме цю область надалі буде проаналізовано детальніше. Натомість, при $\hbar\omega > 40$ меВ основний вклад в розсіювання дають молекули води.

Було виявлено, що вже за наявного у дослідженій системі співвідношення $9\cdot10^{-3}$ кількості молекул ДМФХ до кількості молекул води розсіяння на молекулах розчинника є значно більш інтенсивним, аніж на молекулах ДМФХ та/або молекулах домішки (мелатоніну).

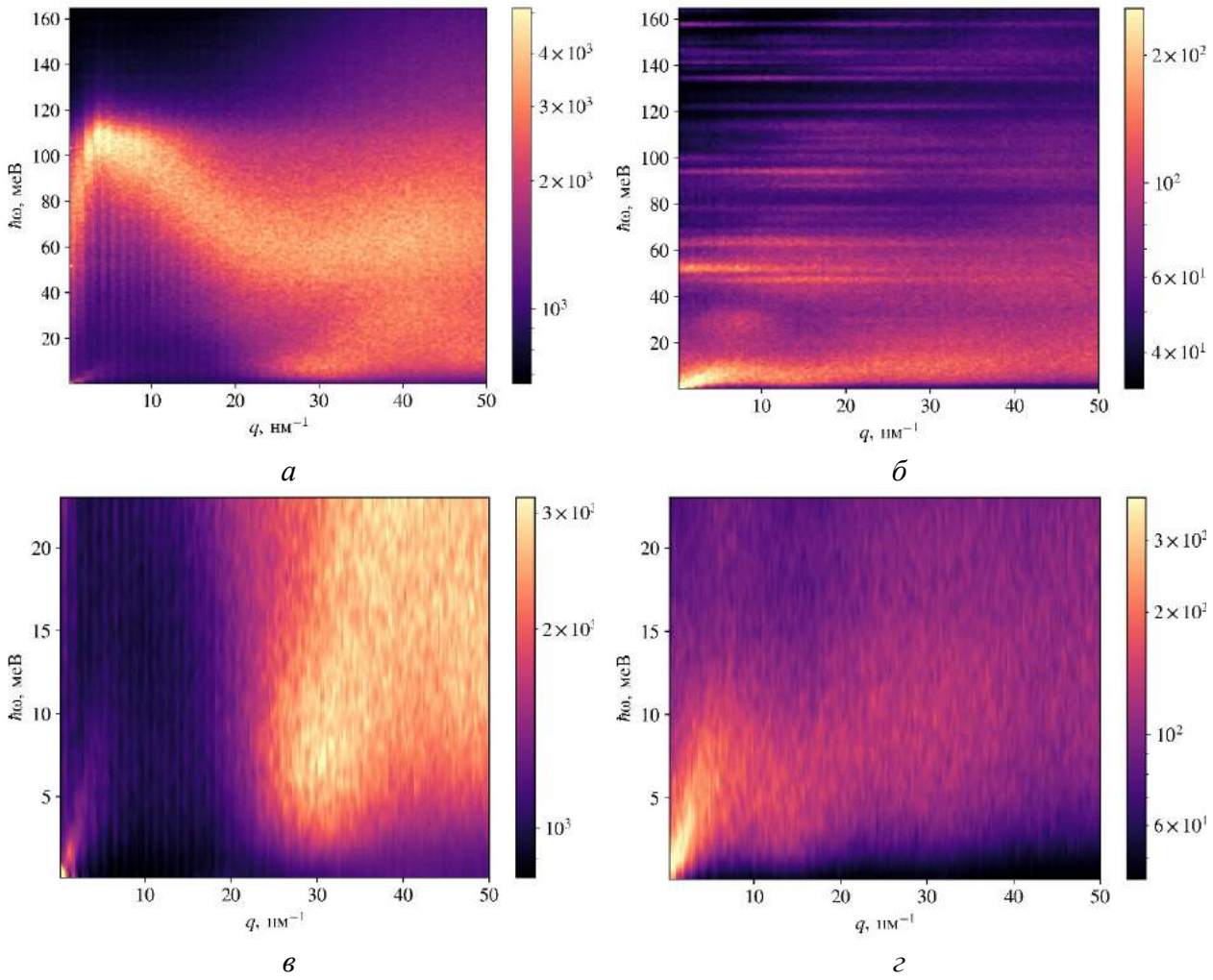


Рисунок 2.19 – Динамічний структурний фактор для молекул рідинної системи з молекул DMPC у водному оточенні з домішками мелатоніну (30% за відносною кількістю молекул домішки відносно кількості молекул DMPC) при врахуванні розсіяння на молекулах води (*а, в*) та без врахування цього ефекту (*б, г*). На рисунках *в* та *г* у збільшеному вигляді представлено область рисунків *а* та *б* відповідно, для діапазону зміни енергії до 25 меВ.

Аналогічний висновок справджується для усіх досліджених систем, про що свідчать відповідні залежності інтенсивності розсіяння I від зміни енергії розсіяного нейтрона для вибраних значень модуля q переданого хвильового вектора, наведені на рис. 2.20, *а*, *в*, *г*.

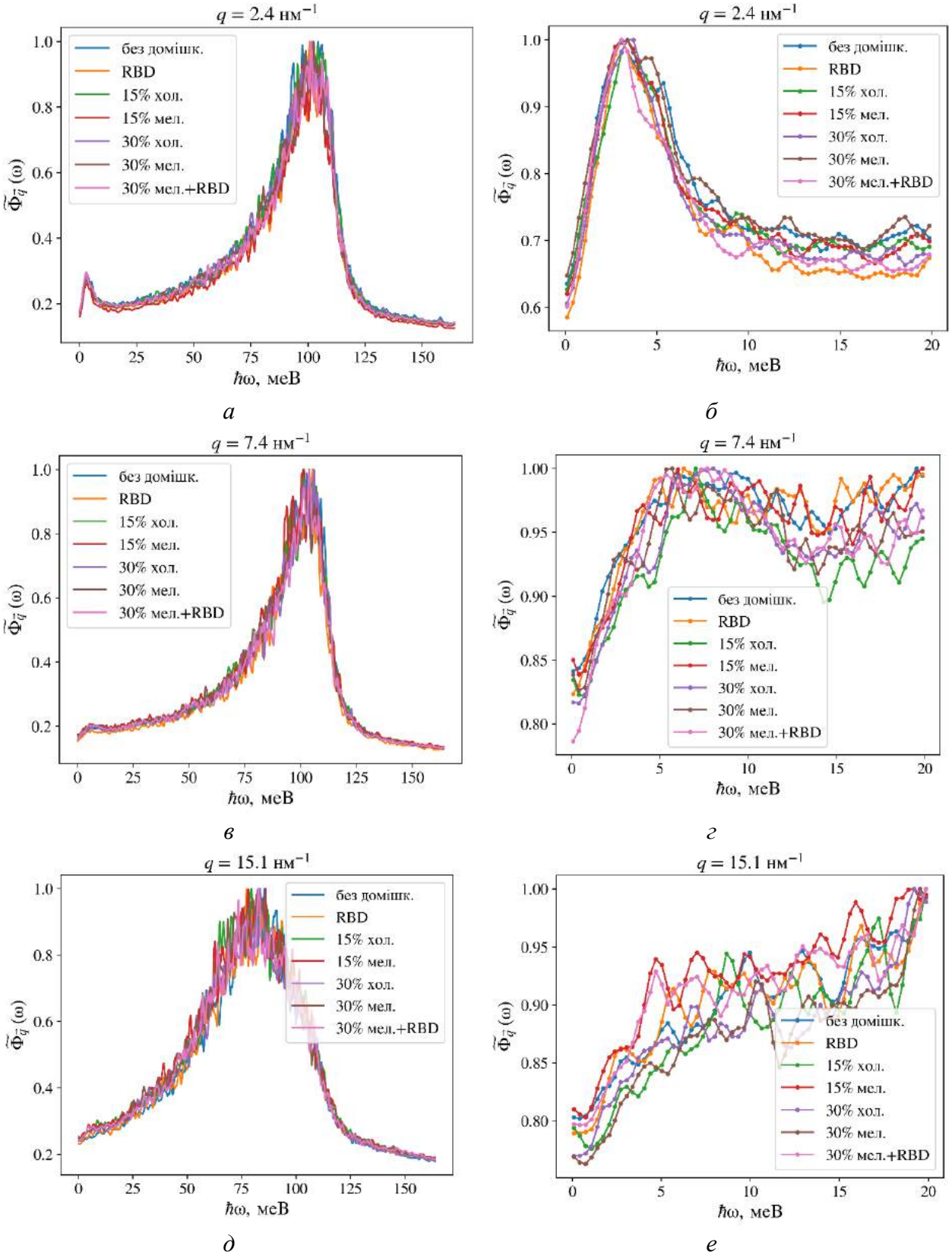


Рисунок 2.20 – Залежність нормованого на максимальне значення динамічного структурного фактора досліджених систем від зсуву енергії $\hbar\omega$ розсіяного нейтрона (*а*, *в*, *д* – у усьому розглянутому діапазоні енергій, *б*, *г*, *е* – у діапазоні до 20 меВ) при вибраних значеннях модуля переданого хвильового вектора q з урахуванням розсіяння на молекулах розчинника

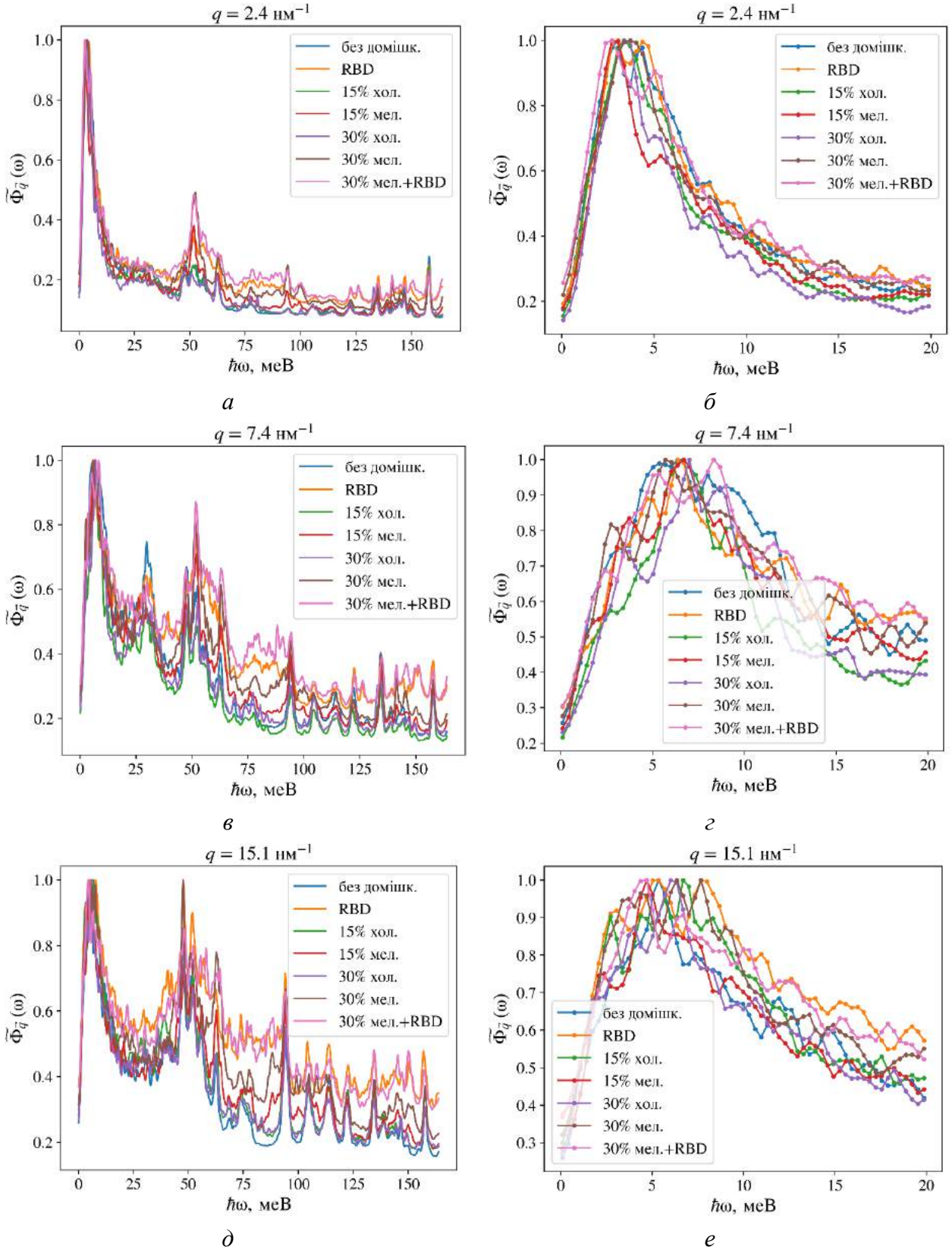


Рисунок 2.21 – Залежність нормованого на максимальне значення динамічного структурного фактора досліджених систем від зсуву енергії ħω розсіяного нейтрона (*а*, *в*, *д* – у усьому розглянутому діапазоні енергій, *б*, *г*, *е* – у діапазоні до 20 меВ) при вибраних значеннях модуля переданого хвильового вектора *q* без врахування розсіяння на молекулах розчинника

Для зручності на цих залежностях наведено величину $\tilde{\Phi}_{\bar{q}}(\omega) = \dfrac{\Phi_{\bar{q}}(\omega)}{\max\limits_{\omega} \Phi_{\bar{q}}(\omega)}$, яка відповідає Фур'є-образу $\Phi_{\bar{q}}(\omega)$, нормованому на своє максимальне (при даному q) значення.

Зокрема, при врахуванні розсіяння на молекулах розчинника вже при $q \approx 7$ нм$^{-1}$ відмінності між системами стають меншими, аніж випадкові зміщення точок, обумовлені випадковими шумовими ефектами. Це означає, що в разі одержанні динамічного структурного фактора подібних систем із експериментальних даних необхідно використовувати методики варіації нейтронного контрасту задля мінімізації розсіяння нейтронів розчинником.

Одержані із результатів комп'ютерного моделювання залежності динамічного структурного фактора від зміни енергії розсіяного нейтрона, які відповідають випадку нульового вкладу молекул розчинника у процес розсіяння нейтронів, наведено на рис. 2.21, зокрема на рис. 2.21, *б*, *г*, *д* – в діапазоні енергій, який характеризує динаміку ліпідної мембрани та наявних у ній домішок.

На відміну від попереднього випадку, у разі відсутності розсіяння нейтронів на молекулах розчинника локальний максимум $\tilde{\Phi}_{\bar{q}}(\omega)$ є добре вираженим в усьому діапазоні $q < 15$ нм$^{-1}$. Подальший аналіз одержаних максимумів було проведено для кожного значення q із наборів $0{,}4$ нм$^{-1} + k \cdot 1$ нм$^{-1}$ та $1{,}0$ нм$^{-1} + k \cdot 1$ нм$^{-1}$, де $k = \overline{1,\ 19}$. При цьому залежності $\tilde{\Phi}_{\bar{q}}(\omega)$ за кожного з q було апроксимовано лінійною суперпозицією спектральних контурів затухаючого гармонічного осцилятора для більш надійного визначення положення максимуму ω_0 та його напівширини Γ. Такі дані дають інформацію про властивості фононів в досліджуваних системах [23], зокрема – залежність $\omega_0(q)$ є дисперсійною кривою їхньої акустичної гілки, а напівширина $\Gamma(q)$ пов'язана із характерним часом життя фононів із відповідним хвильовим вектором [52].

При цьому частотну залежність спектральних контурів затухаючого гармонічного осцилятора приймали у вигляді [52]

$$b(\omega) = \omega^2 \cdot \frac{A}{\left(\omega^2 - \omega_0{}^2\right)^2 + \left(\omega\Gamma\right)^2}\ , \qquad (8)$$

де Γ – напівширина контура, ω_0 – положення його максимуму, A – амплітуда (ваговий коефіцієнт у лінійній суперпозиції), а спільний множник ω^2 обумовлений взаємозв'язком (див. (4) та (5)) Фур'є-образу $\Phi_{\vec{q}}(\omega) = N \cdot C_L(\vec{q},\omega)$ кореляційної функції $\varphi(t)$ та динамічного структурного фактора $S(\vec{q},\omega)$ при кожному із розглядуваних значень q.

Для апроксимації залежностей $\tilde{\Phi}_{\vec{q}}(\omega)$ при обраних значеннях q використовували суперпозицію із 5 контурів вигляду (8), усі параметри яких оптимізували за допомогою спеціально створеної комп'ютерної програми. Апроксимацію виконували в діапазоні $\hbar\omega < 65$ меВ. При цьому використовували квазіньютонівський метод L-BFGS-B, заснований на алгоритмі Бройдена-Флетчера-Гольдфарба-Шанно та реалізований у бібліотеці SciPy версії 1.6.2. Аналітичні перші похідні квадрату відхилення між $\tilde{\Phi}_{\vec{q}}(\omega)$ та суперпозицією контурів визначали за допомогою методів автоматичного диференціювання, реалізованих у бібліотеці PyTorch версії 1.9.0. В процесі проведення апроксимації на параметри контурів (8) накладали наступні обмеження: $A > 0$ (для всіх контурів), $\hbar\omega_0 \geq 20$ меВ і $\Gamma > 0$ (для трьох допоміжних контурів) та $1\ \text{меВ} < \hbar\omega_0 \leq 10$ меВ і $0 < \hbar\Gamma \leq 20$ меВ (для двох основних контурів).

Одержані залежності $\omega_0(q)$ та $\Gamma(q)$ наведено на рис. 2.22 та 2.23, відповідно. З лінійної апроксимація початкової ($q < 5$ нм$^{-1}$) ділянки одержаних дисперсійних кривих було знайдено середню швидкість поширення звуку для фононів у досліджуваних системах: ~$1{,}1 \cdot 10^3$ м/с.

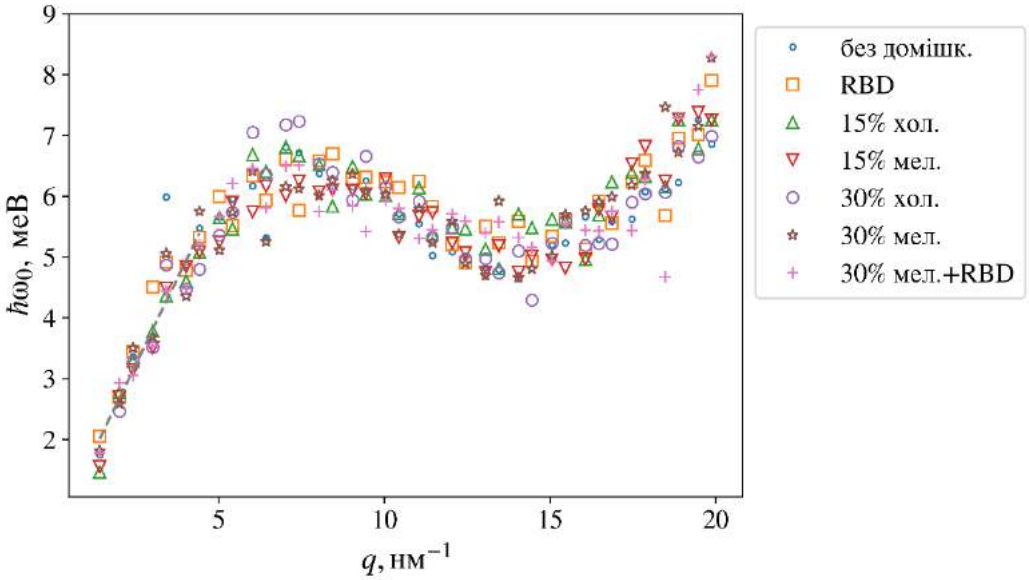


Рисунок 2.22 – Залежність координати ω_0 максимум контуру затухаючого гармонічного осцилятора від модуля переданого хвильового вектора q для досліджених систем. Пунктиром показано лінійну апроксимацію для спільної для усіх досліджених систем ділянки дисперсійних кривих.

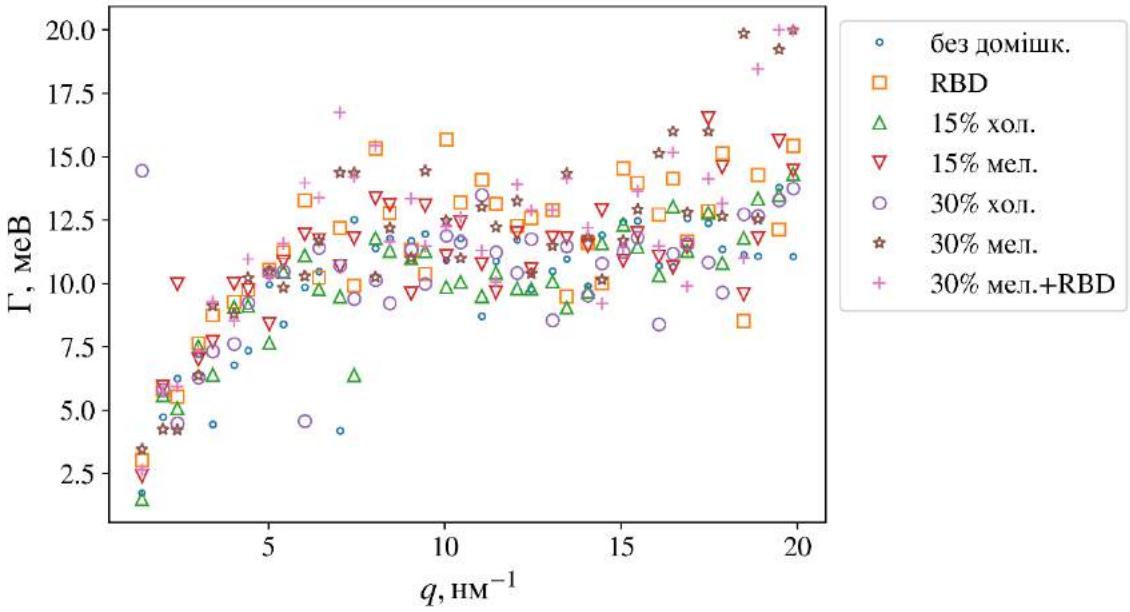


Рисунок 2.23 – Залежність напівширини Г максимум контуру затухаючого гармонічного осцилятора від модуля переданого хвильового вектора q для досліджених систем

Одержані залежності дають змогу уточнити ті діапазони зміни енергії нейтрона та переданого хвильового вектора, які найбільш детально характеризують прояви динамічних властивостей досліджених систем у їхньому динамічному структурному факторі, а отже – і на спектрах непружного розсіяння нейтронів. У той же час, як випливає з одержаних даних, незначний вплив розглянутих домішок на такі властивості спостерігається лише у випадку системи "30% хол. (рис. 2.21, *г*, рис. 2.22), тоді як для інших систем такий вплив, порівняно із системою без домішок, відсутній.

Таким чином, експериментальні дослідження динамічних властивостей для розглянутих систем доцільно проводити методом непружного розсіяння нейтронів лише за умови виключення вкладу розчинника (наприклад – із застосуванням методик варіації нейтронного контрасту) та в разі обрання діапазонів $q < 20$ нм$^{-1}$ та $\hbar\omega < 10$ меВ. При цьому виявлення впливу домішок в одержуваних результатах може потребувати роздільної здатності, яка є недосяжною в реальних експериментах.

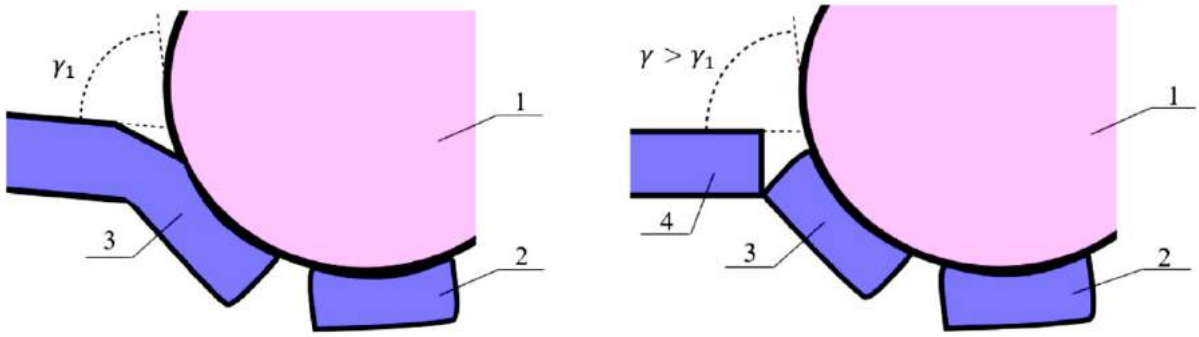
2.7 Моделювання деформаційної поведінки системи “коронавірус–клітина”

Деформаційну поведінку системи “коронавірус–клітина” описуватимемо в континуальному наближенні [53]. В такому разі коронавірус можна розглядати як кулю, а клітину як деяку сферу, що являє собою цитоплазматична мембрана (оболонку), заповнену рідиною (цитоплазма). Матеріал оболонки вважатимемо пружним середовищем.

Оскільки вірус є молекулярним комплексом щільно запакованих ланцюгових молекул, то його жорсткість суттєво перевищує жорсткість клітини. Цю обставину враховуватимемо, вважаючи, що куля, яка в нашій моделі відповідає коронавірусу, складається з абсолютно твердого матеріалу. Відповідно, при вторгненні в клітину згадана куля не деформується. Радіус кулі,

яка моделює коронавірус, позначимо через R, через r_1 – радіус сфери (клітини), через h – товщину цитоплазматичної мембрани (оболонки). Згідно з [54] приймаємо $h = (4 \div 6)$ нм. В подальших розрахунках приймаємо середнє значення $h = 5$ нм. Значення $R = 60$ нм запозичимо з [55].

Мембрана при контакті з коронавірусом зазнає деформації вигину. З рис. 2.24 видно, що найбільшого значення ця деформація досягає на межі контактної зони. Мірою деформації вигину на цій межі може служити кут γ . При вигині верхня половина перерізу знаходиться під дією розтягуючих напружень, причому свого найбільшого значення ці напруження мають на межі, а їх величина збільшується із ростом γ .



а *б*

Рисунок 2.24 – Схема руйнування цитоплазматичної мембрани: при $\gamma=\gamma_1$ (*а*) та при $\gamma>\gamma_1$ (*б*). Позначення: 1 - коронавірус, 2,3,4 - ділянки цитоплазматичної мембрани.

При деякому значенні $\gamma_1 = \arcsin\frac{a_1}{R}$, що відповідає значенню радіуса a_1 контактної зони, розтягуючі напруження досягають величини, достатньої для утворення тріщини. Як відомо, прийнято розрізняти два етапи в розвитку тріщини. На першому етапі розмір тріщини менший деякого критичного значення, а зростання тріщини потребує затрат енергії. На другому етапі розмір

тріщини є більшим за критичний, а зростання тріщини відбувається мимовільно. В нашому випадку, коли тріщина є замкнутою конічною поверхнею, розміром тріщини служить її ширина – відстань від поверхні мембрани до нижнього краю тріщини.

Зважаючи на те, що розтягуючі напруження зосереджені в верхній половині перерізу, критичний розмір тріщини мусить бути меншим за $h/2$. Після закінчення другого етапу свого розвитку, тріщина роз'єднує ділянки 2 і 3 (рис. 2.24) цитоплазматичної мембрани.

При подальшому заглибленні коронавірусу в клітину і, відповідно, при подальшому збільшенні кута γ виникає нова тріщина, яка роз'єднує ділянки 3 і 4 (рис. 2.24, *б*). Утворення цієї тріщини потребує значно менше затрат енергії порівняно з тріщиною, зображеною на рис. 2.24, *а*, адже, як це видно з рис. 2.24, *б*, справа ділянка 3 межує з першою тріщиною, яка ослаблює матеріал в своєму околі. Процес утворення тріщин продовжується в міру того, як коронавірус заглиблюється в клітину, тому коли коронавірус опиняється в середині клітини, його поверхня виявляється покритою зруйнованою цитоплазматичною мембраною. Відповідно до викладеного механізму руйнування, процес деформування клітини розділятимемо на дві стадії, вважаючи, що перша реалізується при $a < a_1$, а друга – при $a > a_1$.

Задля оцінки значення a_1 побудуємо механічну модель для опису енергії деформації клітини в процесі проникнення в неї коронавірусу. Відраховуватимемо потенціальну енергію U системи "коронавірус–клітина" від значення енергії, що відповідає невзаємодіючим коронавірусу та клітині та представимо U у вигляді суми двох складових: енергії U' деформацій клітини, спричинених коронавірусом, та енергії U'' енергії зв'язків, утворених коронавірусом з поверхнею клітини. У межах такого розділення знайдемо компоненти U' та U'' у двох випадках: 1) за умови відсутності тріщини в мембрані (позначаючи енергію в цьому випадку $U_1 = U_1' + U_1''$), 2) за умови, що

в системі існують тріщини (в цьому випадку енергію позначимо через $U_2 = U_2' + U_2''$).

При деформації мембрани клітини поява згинаючого моменту, що діє в перерізі з нормаллю *r*, обумовлена вертикальним зміщенням *W* в точці плоскої ділянки. Зокрема, у випадку малих деформацій, матимемо

$$W = \sqrt{R^2 - r^2} - \left(R - b\right) \approx b - \frac{r^2}{2R}, \qquad (1)$$

де *b* – глибина занурення коронавірусу у клітину, відрахована від площини, що містить максимальний геометричний контур перетину кулі, яка моделює коронавірус, та клітини. Оскільки при цьому плоска ділянка, яка зазнає деформацій вигину фактично являє собою пластинку, для інтенсивності згинаючого моменту можна використати теорію вигину пластинок [56], згідно з якою

$$M_r = -D \cdot \left(\frac{d^2 W}{dr^2} + \nu \frac{1}{r} \frac{dW}{dr} \right), \qquad (2)$$

де *D* – циліндрична жорсткість пластинки, а ν – коефіцієнт Пуассона. У той же час, згідно з [57], інтенсивність поперечної сили Q_r визначається рівністю

$$Q_r = \frac{dM_r}{dr}. \qquad (3)$$

Хоча в точці $r = a$, де інтенсивність згинаючого моменту M_r спадає до нуля стрибкоподібно, інтенсивність поперечної сили Q_r згідно з рівністю (3) формально є нескінченною, однак потрібно врахувати, що в континуальній теорії за одиницю виміру приймають розмір фізичного нескінченно малого об'єму. В дійсності, одиниця виміру є скінченою величиною і в нашому випадку дорівнює *h*. Ця обставина дозволяє при $r = a$ записати наближені рівності

$$Q_r \approx \frac{M_r}{h} \approx \frac{D\left(1+\nu\right)}{Rh}.$$

Відповідно, вертикальна сила *F*, створена деформацією оболонки, визначається формулою

$$F = Q_r 2\pi a = 2\pi \frac{D(1+\nu)}{h}\frac{a}{R}$$

Використовуючи зв'язок $a^2 = 2Rb$ та рівність $F = -\frac{dU_1'}{db}$, одержимо остаточно для U_1'

$$U_1' = \frac{2}{3}\left(\frac{2}{R}\right)^{1/2}\frac{2\pi D(1+\nu)}{h}b^{3/2} = \frac{2}{3}\frac{\pi D(1+\nu)}{h}\frac{a^3}{R^2}. \qquad (4)$$

Натомість, утворення зв'язків між коронавірусом та клітиною будемо розглядати як зміну поверхневого натягу $\alpha = \alpha_2 - \alpha_1$, де α_2 – поверхневий натяг на ділянці, яка контактує з коронавірусом, α_1 – поверхневий натяг на тій же ділянці за відсутності коронавірусу. Відповідно, для енергії зв'язку U_1'' маємо формулу

$$U_1'' = -\alpha S = -\alpha\pi a^2, \qquad (5)$$

де знак "–" пов'язаний з тим, що утворення зв'язків призводить до зменшення енергії.

Оцінимо тепер значення α. Згідно із [58], зв'язки, які виникають між коронавірусом та поверхнею мембрани – це зв'язки між булавоподібними S-білками, що утворюють корону вірусу, та білками, які знаходяться в цитоплазматичній мембрані. За значення енергії E такого зв'язку, маючи на увазі роботи [56, 58], візьмемо значення (10÷12) ккал/моль. Позначимо через l відстань між білками мембрани, що утворюють ці зв'язки. Для величини α приймемо оцінку $\alpha = E/l^2$. З урахуванням [59] l = 70 Å, тож маємо $\alpha = 2\cdot 10^{-3}$ Н/м.

Якщо запозичити із [60] значення $D = 10^{-18}$ нм, а для ν прийняти його найбільше значення 0,5 (див., наприклад, [58]), то у відповідності до (4) та (5) залежність $U_1 = U_1' + U_1''$ від a зображатиметься графіком 1 на рис. 2.25.

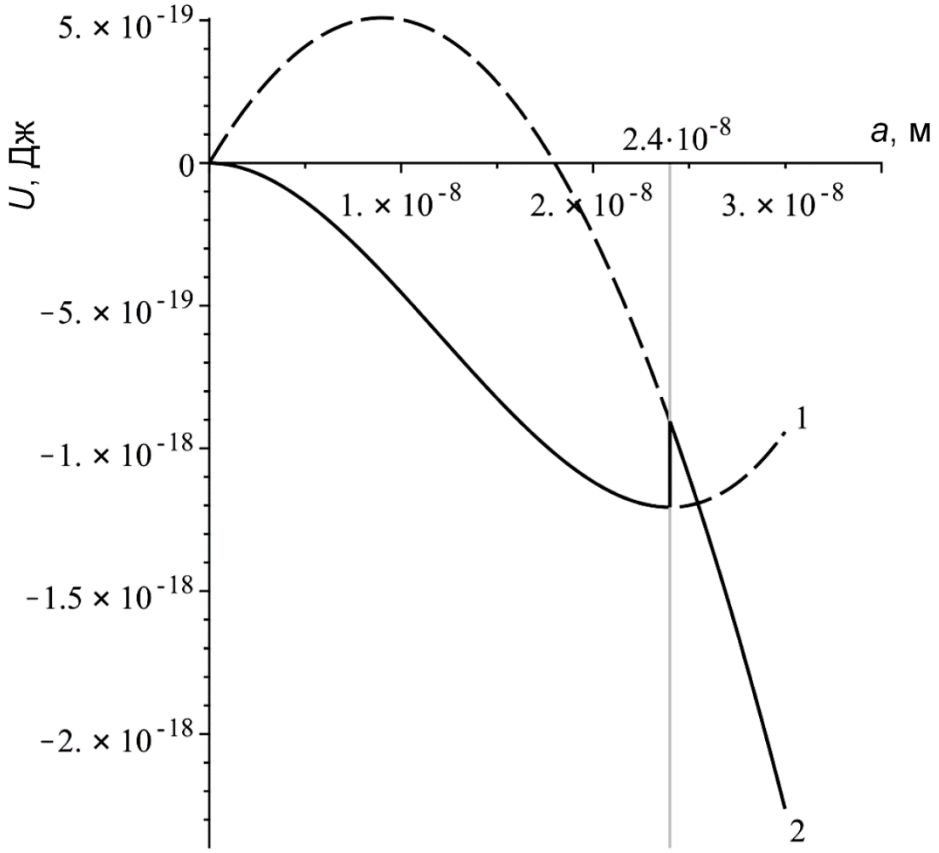


Рисунок 2.25 – Залежність складових U_1 та U_2 енергії U системи “коронавірус–клітина” від радіуса a контактної зони. Вертикальною лінією позначене граничне значення $a_1 = 2.4 \cdot 10^{-8}$ м.

Розглянемо тепер випадок, коли в системі існують тріщини. Для складової U_2'' в цьому випадку скористаємося виразом $U_2'' = -\alpha\pi a^2$, аналогічним до (5), та врахуємо, що контуром тріщини є коло радіуса a, а отже

$$U_2' = q2\pi a \qquad (6)$$

і тому

$$U_2 = q2\pi a - \alpha\pi a^2, \qquad (7)$$

де q – лінійна густина енергії. Оцінимо коефіцієнт q. Оскільки основу мембрани складають ліпідні молекули, які утворюють два прилягаючі один до одного шари (із товщиною h_1 одного шару ~2 нм), а осі молекул в середньому

направлені перпендикулярно до поверхні мембрани, то вважатимемо критичний розмір тріщини рівним h_1. Взаємодію ж між ліпідними молекулами переважно забезпечують їхні вуглеводні ланцюги. Позначимо через E_1 характерну енергію зв'язку між групами CH_2 двох сусідніх ланцюгів, через l_1 – відстань між сусідніми зв'язками, що поєднують ці ланцюги, а через l_2 – відстань між осями взаємодіючих ланцюгів. Загальна кількість зв'язків, що припадає на одиницю площі дорівнює $1/(l_1 l_2)$. Відповідно, для утворення тріщини шириною h_1 необхідно затратити енергію $\frac{2\pi a h_1}{l_1 l_2} E_1$. Порівнюючи цей вираз із (6), знайдемо оцінку

$$q = \frac{h_1}{l_1 l_2} E_1 .$$

Оскільки йдеться про вуглеводневі ланцюги, використаємо відомі із [61] дані для парафінів: $l_1 = 2{,}5$ Å, $l_2 = 5$ Å, $E_1 = 1{,}1 \cdot 10^{-21}$ Дж. В такому разі, одержимо $q = 1{,}8 \cdot 10^{-11}$ Н.

Залежність $U_2(a)$, що відповідає цьому значенню q, представлена графіком 2 на рис. 2.25.

Оскільки умовою самовільного протікання процесу є $dU_i / da < 0$ $(i = 1, 2)$, що справджується лише для залежності $U_2(a)$, то згідно з одержаними залежностями, деформування повинне починатись з першого процесу, який не супроводжується утворенням тріщини. Однак, для цього процесу умова $dU_i / da < 0$ виконується лише до граничного значення $a < a_1 = 2{,}4 \cdot 10^{-8}$ м. При цьому на інтервалі значень a від $0{,}8 \cdot 10^{-8}$ м до $2{,}4 \cdot 10^{-8}$ м маємо $U_2 > U_1$, а тому другий процес не відбувається. У той же час, оскільки $dU_1 / da > 0$ при $a > a_1$, то перший процес припиняється при досягненні величиною a значень a_1. При цьому $U_2(a_1) > U_1(a_1)$ на величину $\sim 4 \cdot 10^{-19}$ Дж, а отже, для початку на цьому етапі другого процесу (який за цих значень a вже задовольняє умові $dU_2 / da < 0$) необхідне надання системі вказаної енергії задля долання енергетичного бар'єра $U_2(a_1) - U_1(a_1)$. Один зі способів долання цього бар'єра полягає у впливі

теплових флуктуацій. При цьому необхідну для подолання бар'єра енергію система набуває за певний час, який визначає тривалість зупинки проникнення вірусу перед початком руйнування мембрани.

Таким чином, для деформацій, які виникають в клітині при проникненні в неї коронавірусу, характерні такі особливості. Процес деформування клітини, пов'язаний із проникненням в неї коронавірусу, складається із двох стадій. На першій стадії у цитоплазматичній мембрані виникають переважно деформації вигину, які досягають найбільшого значення на межі контактної зони між клітиною та коронавірусом. Ці деформації є пружними, а форма клітини зазнає незначних змін. Перша стадія закінчується, коли радіус контактної зони стає приблизно рівним $2{,}4 \cdot 10^{-8}$ м. При цьому на межі контактної зони матеріал цитоплазматичної мембрани руйнується, що призводить до появи енергетичного бар'єра, приблизно рівного $\sim 4 \cdot 10^{-19}$ Дж, який перешкоджає подальшому проникненню коронавірусу в клітину. Друга стадія починається після подолання бар'єра. На цій стадії продовжується руйнування мембрани, її деформації є пластичними, а форма клітини значно змінюється, завдяки чому коронавірус, огорнувшись мембраною, проникає всередину клітини.

3 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ СТРУКТУРИ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН МЕТОДОМ КОЛИВАЛЬНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

3.1 Спектроскопія ІЧ поглинання модельних систем ліпідних мембран

Коливальна спектроскопія є одним із стандартних методів дослідження модельних ліпідних мембран, який вже десятки років ефективно застосовується для вивчення таких систем [62]. Ми зареєстрували спектри ІЧ поглинання досліджуваних систем на основі ліпіду ДМФХ. На рис. 3.1 наведено експериментально зареєстрований Фур'є-спектр інфрачервоного поглинання розчину ДМФХ у D_2O.

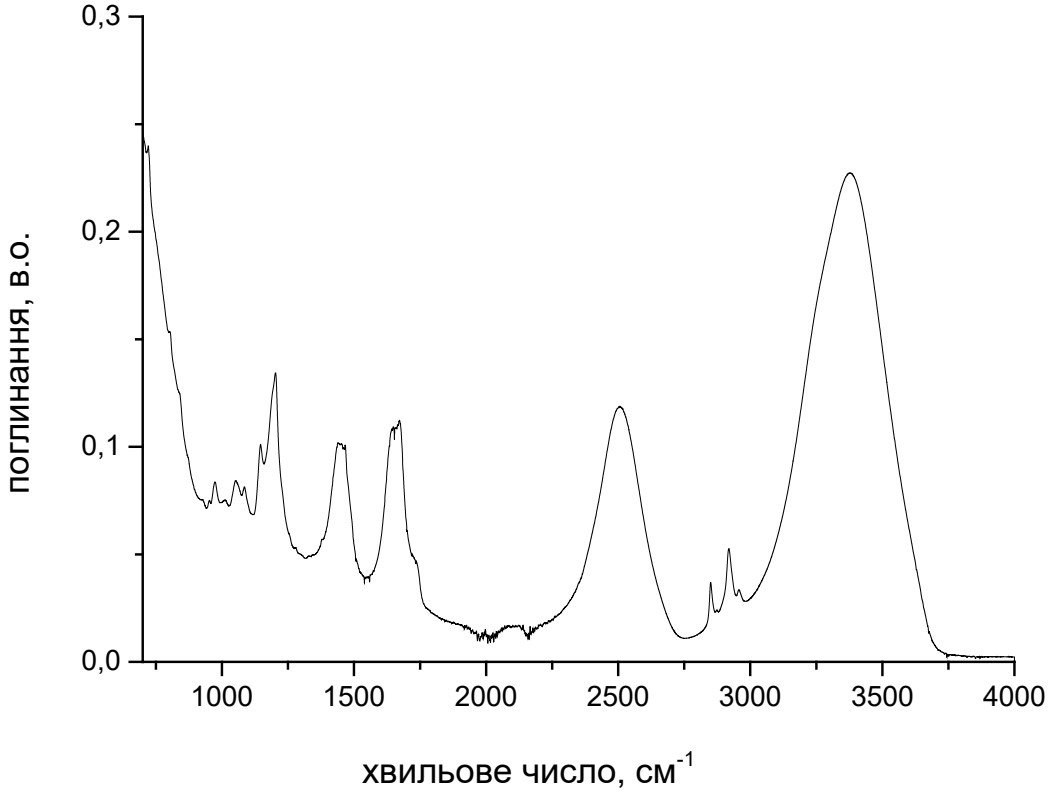


Рисунок 3.1 – Експериментально зареєстрований спектр ІЧ поглинання розчину ДМФХ у D_2O

У наведеному спектрі добре помітні широкі смуги на частоті близько 2500 $см^{-1}$ (валентні OD коливання) та 1215 $см^{-1}$ (деформаційні ножничні DOD коливання). Також дуже інтенсивно проявляються валентні OH коливання на частотах поблизу 3300 $см^{-1}$. Очевидно, що через досить низьку концентрацію ліпідних везикул інтенсивність смуг поглинання ДМФХ набагато нижча за інтенсивність смуг розчинника. Коливання саме молекул ДПФХ можна помітити поблизу 1460 $см^{-1}$ (деформаційні коливання CH_2 групи) та в інтервалі 2850 – 2920 $см^{-1}$ (валентні симетричні та антисиметричні коливанні тієї ж CH_2 групи).

З метою позбавлення від переважаючого поглинання води у спектрах досліджуваний зразок було додатково висушено. На рис. 3.2 наведено спектр ІЧ поглинання того ж самого зразка ДМФХ після висушування.

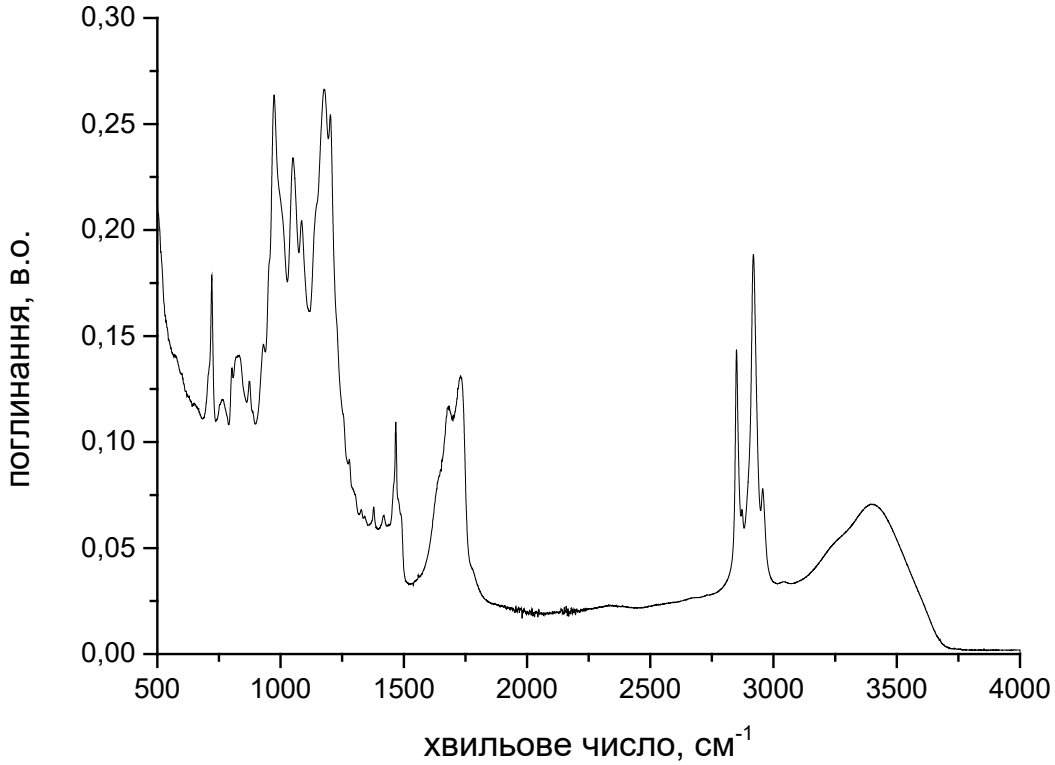


Рисунок 3.2 – Експериментально зареєстрований спектр ІЧ поглинання висушеного зразка ДМФХ

На спектрі, наведеному на рис. 3.2, чітко видно досить багато смуг поглинання молекул ДМФХ [73] , а саме:

970 $см^{-1}$ - валентні коливання групи $(CH_3)_3N^+$,

1060 $см^{-1}$ – симетричні валентні C-O-C коливання,

1080 $см^{-1}$ – валентні коливання групи PO_2^-,

1177 $см^{-1}$ - антисиметричні валентні C-O-C коливання,

1197 $см^{-1}$ – деформаційні віялові CH_2 коливання,

1470 $см^{-1}$ – деформаційні ножничні CH_2 коливання,

1734 $см^{-1}$ – валентні C=O коливання,

2852 $см^{-1}$ – симетричні валентні CH_2 коливання,

2920 $см^{-1}$ – антисиметричні валентні CH_2 коливання,

а також можна помітити коливання на частоті близько 3030 $см^{-1}$, які відносять до асиметричних валентних CH_3 коливань в групі $(CH_3)_3N^+$.

Крім того, у спектрі добре проявляються коливання H_2O: валентні поблизу 3300 $см^{-1}$ та деформаційні на 1650 $см^{-1}$. Прояв цих коливань пов’язаний з високою гігроскопічністю зразків, в результаті чого під час вимірювань вода з атмосфери потрапляє в систему.

Структурні параметри модельних ліпідних мембран досліджувались методом малокутового розсіяння нейтронів, тому спектри ІЧ поглинання досліджуваних сумішей реєструвались як перед опроміненням нейтронами, так і після нього. На рис. 3.3 показані спектри ІЧ поглинання ДМФХ перед опроміненням нейтронами (чорна крива) та після нього (червона крива). Як видно, обидва спектри практично співпадають, тобто опромінення нейтронами не впливає на структуру досліджуваних зразків. Аналогічні контрольні вимірювання були зроблені для всіх досліджуваних систем: з додаванням холестерину, мелатоніну та RBD вірусу SARS-CoV2. Жодних змін у спектрах ІЧ поглинання не було виявлено.

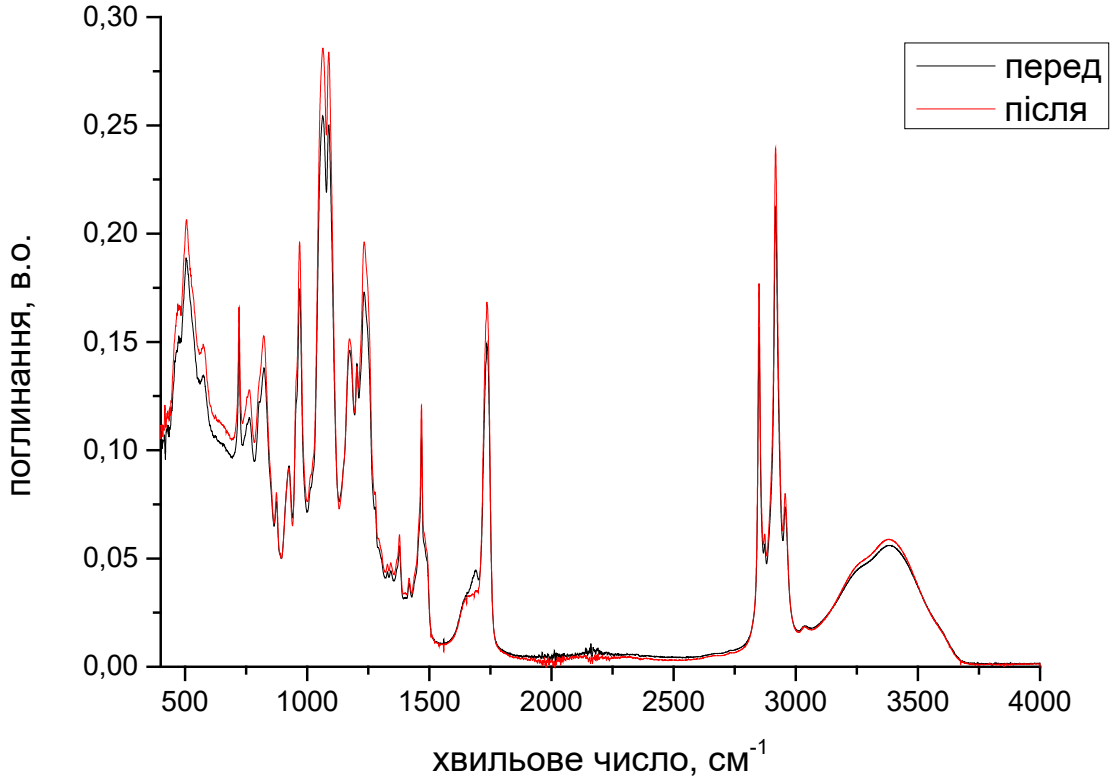


Рисунок 3.3 – Спектри ІЧ поглинання ДМФХ перед та після опромінення нейтронами

Оскільки коливальні спектри зразків у висушеному вигляді виявились набагато інформативнішими за аналогічні спектри у розчині, всі наступні системи також було висушено перед тим, як реєструвати спектри ІЧ поглинання та комбінаційного розсіяння світла.

На рис. 3.4 наведені зареєстровані спектри ІЧ поглинання систем ДМФХ+15% мелатоніну і ДМФХ+30% мелатоніну. Видно, що між цими спектрами практично немає різниці, тобто збільшення концентрації мелатоніну в два рази ніяк не впливає на зовнішній вигляд спектрів. Більше того, отримані спектри практично не відрізняються від спектру ДМФХ без домішок. Цей факт може бути пов’язаний з тим, що концентрація мелатоніну у системі занадто низька для того, щоб його смуги поглинання були помітні в спектрі на фоні смуг

поглинання ДМФХ. Так, найбільш інтенсивно у спектрі ІЧ поглинання метаноніну повинні проявлятись смуги валентних C=O коливань біля 1680 $см^{-1}$, деформаційних CNH коливань на частоті 1430 $см^{-1}$, валентних C-N коливань (1256 $см^{-1}$), валентних C-O коливань (1187 $см^{-1}$), деформаційних коливань груп CH_3 (1137 $см^{-1}$), а також крутильні коливання в діапазоні 520 – 580 $см^{-1}$ [64]. Проте, в усіх перелічених частинах спектру не було помічено практично ніяких відмінностей від відповідних спектрів систем без додавання мелатоніну.

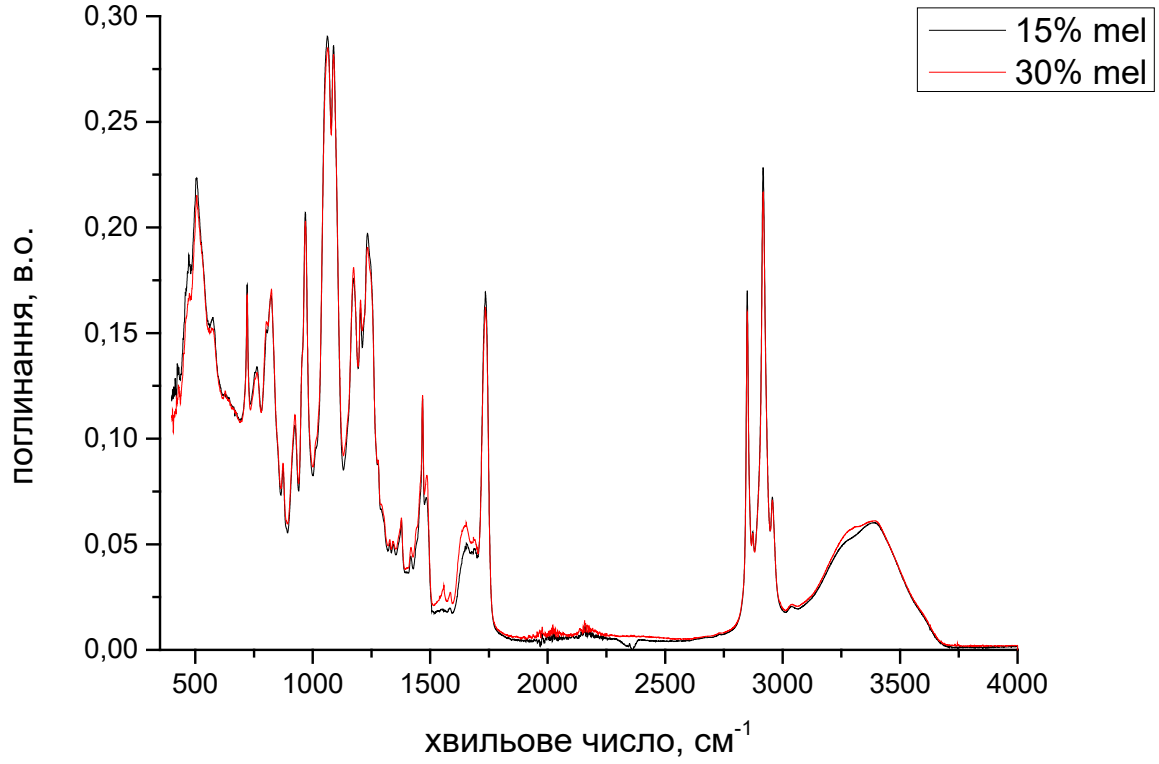


Рисунок 3.4 – Спектри ІЧ поглинання систем ДМФХ з додаванням 15% (чорна крива) та 30 % (червона крива) мелатоніну

На рис. 3.5 представлені зареєстровані спектри ІЧ поглинання систем ДМФХ+15% холестерину і ДМФХ+30% холестерину. Як видно, ці два спектри майже не відрізняються один від одного, так само як і від спектрів ІЧ поглинання досліджених систем без додавання холестерину. Це знову ж таки пов’язане з тим, що концентрація холестерину недостатньо висока для

реєстрації його присутності в системі методом ІЧ спектроскопії. Єдиною відмінністю між спектрами на рис. 3.5 можна вважати збільшення поглинання на частоті 3400 $см^{-1}$ при збільшенні концентрації холестерину. Як відомо, на цій частоті в спектрі ІЧ поглинання холестерину знаходиться смуга валентних О-Н коливань [65], які накладаються на смугу валентних О-Н коливань молекул води.

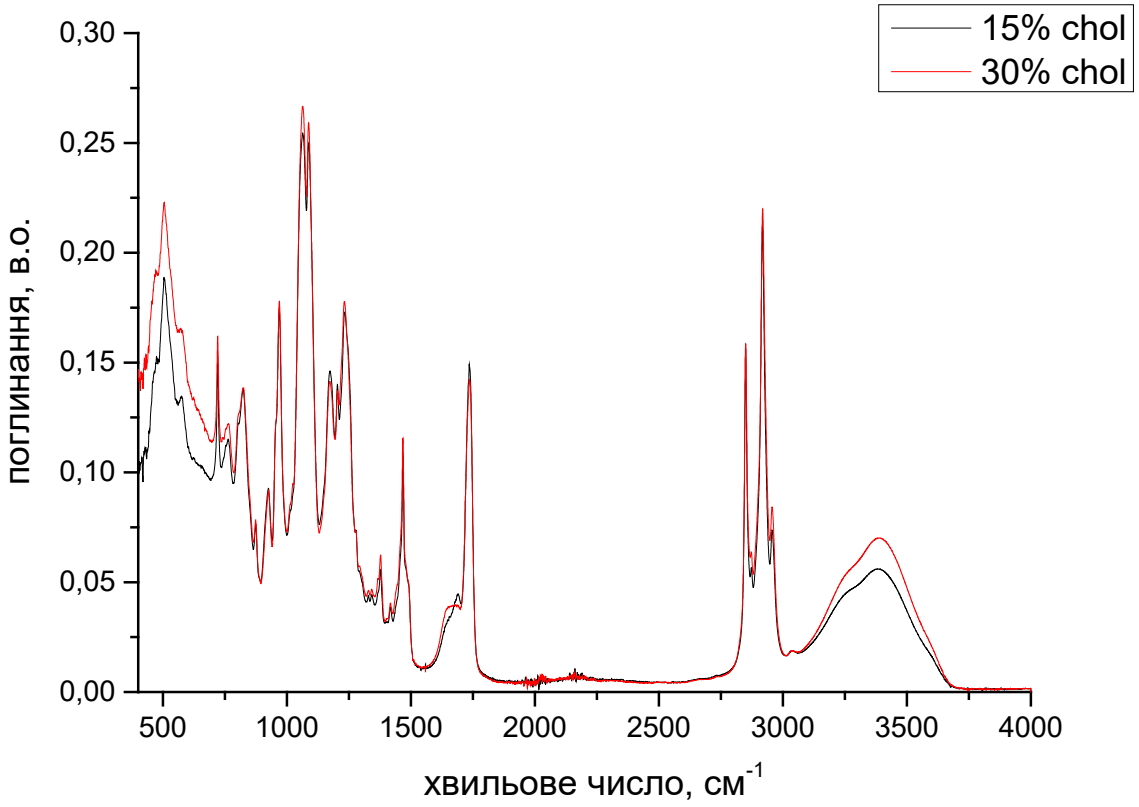


Рисунок 3.5 – Спектри ІЧ поглинання систем ДМФХ з додаванням 15% (чорна крива) та 30 % (червона крива) холестерину

При додаванні білка RBD SARS-CoV2 до систем ДМФХ+30% мелатоніну та ДМФХ+30% холстерину також ніяких змін у зовнішньому вигляді спектрів не спостерігалось. Варто зазначити, що спектри ІЧ поглинання всіх розглянутих систем реєструвались при кімнатній температурі, коли ДМФХ перебуває у гель-фазі. Як було показано у першому розділі, зміна товщини мембрани та

відповідна реакція на додавання білків до системи спостерігалась тільки для системи з холестерином при температурі 37°С, коли ДМФХ перебуває у рідкокристалічній фазі. Тому очікується, що більш інформативними будуть коливальні спектри модельних мембран з домішками при вищих температурах.

3.2 Спектри КРС модельних систем ліпідних мембран

Спектроскопія комбінаційного розсіяння світла (КРС) є комплементарним методом до методу спектроскопії інфрачервоного поглинання, тобто може дати додаткову інформацію, яка доповнить дані ІЧ спектрів. Тому були зареєстровані та проаналізовані спектри комбінаційного розсіяння світла тих самих зразків, для яких реєструвались ІЧ поглинання.

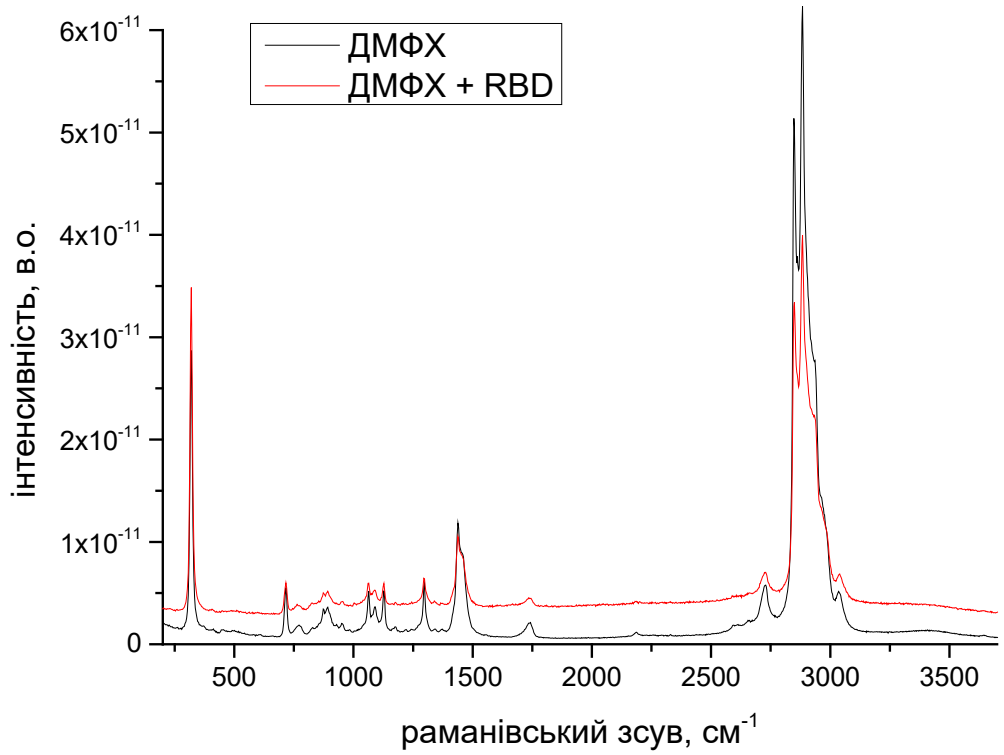


Рисунок 3.6 – Експериментально зареєстровані спектри комбінаційного розсіяння світла ДМФХ (чорна крива) та системи ДМФХ + RBD SARS CoV2 (червона крива)

На рис. 3.6 показані зареєстровані спектри комбінаційного розсіяння ДМФХ без домішок (чорний колір) та ДМФХ з додаванням RBD SARS-CoV2 (червоний колір). Як видно, у спектрах КРС проявляється менше смуг, ніж в спектрах ІЧ поглинання, причому їх кількість та положення не змінюються при додаванні білків до системи.

Спектри КРС реєструвались також для для систем ДМФХ з додаванням мелатоніну та холестерину з концентраціями 15% та 30% для обох випадків. Як кількість смуг, так і їх положення не змінювались у жодному з випадків в порівнянні з спектрами ДМФХ без домішок. При додаванні у системи ДМФХ + 30% мелатоніну/холестерину білків RBD SARS CoV2 також не було виявлено додаткових проявів у спектрах КРС, аналогічно тому, як це спостерігалось для спектрів ІЧ поглинання. На рис. 3.7 наведений зареєстрований спектр КРС системи ДМФХ + 30% мелатоніну + RBD SARS CoV2, а на рис. 3.8 – спектр КРС системи ДМФХ + 30% холетерину + RBD SARS CoV2.

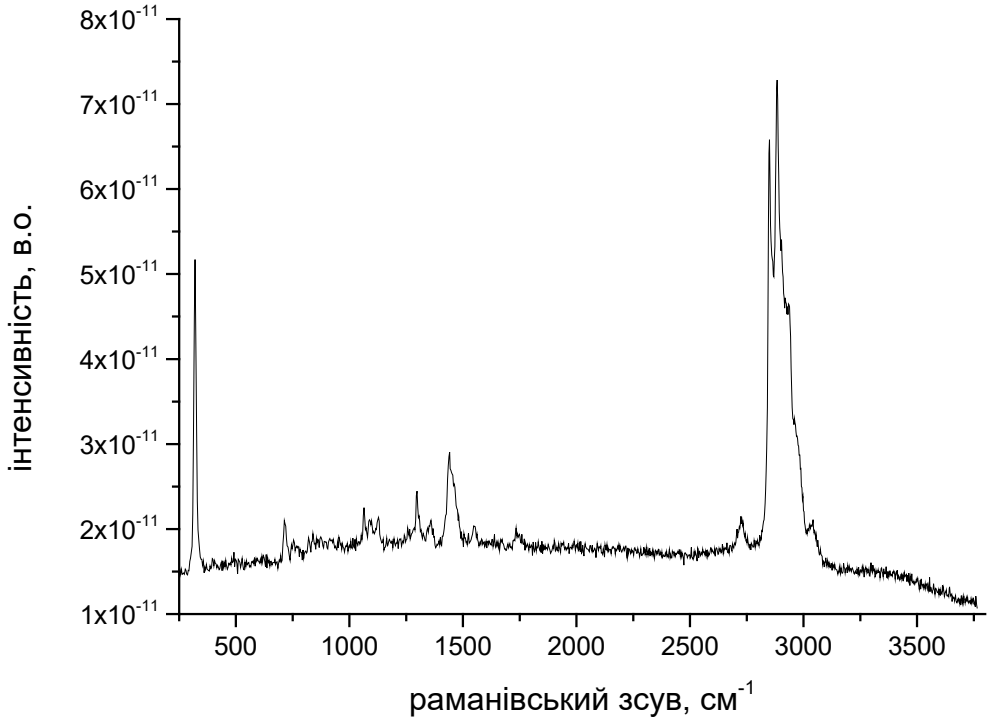


Рисунок 3.7 – Експериментально зареєстрований спектр КРС системи ДМФХ + 30% мелатоніну + RBD SARS CoV2

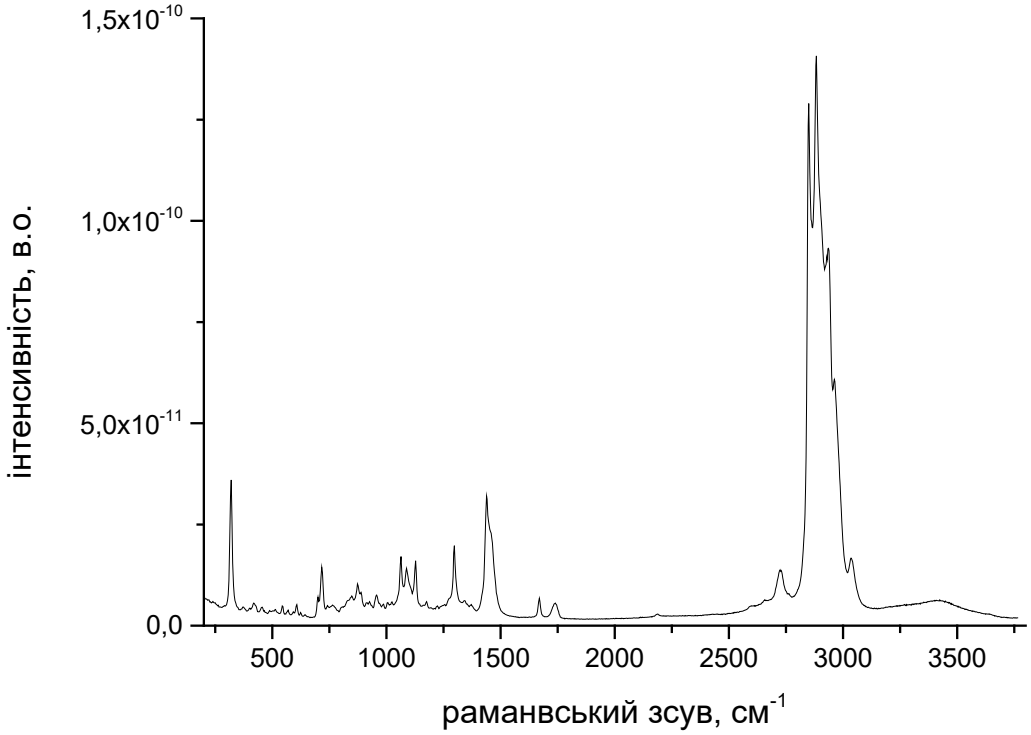


Рисунок 3.8 – Експериментально зареєстрований спектр КРС системи ДМФХ + 30% холетерину + RBD SARS CoV2

3.3 Спектральні прояви впливу холестерину на на структуру ліпідної мембрани на основі ДОФХ

Для виготовлення зразків використовувався фосфоліпід диолеоїлфосфатидинхолін (ДОФХ). Оскільки ДОФХ, який має вигляд порошку білого кольору, у воді не розчиняється, його спочатку розчиняють у хлороформі, а потім хлороформ випаровують за допомогою потоку азоту при кімнатній температурі. Після цього отриманий зразок було розділено на дві частини, до однієї з яких було додано холестерин у кількості 30% від об’єму фосфоліпіда. На наступному етапі до обох зразків додали дистильовану воду та фосфатний буфер DPBS, під дією якого формуються ліпосоми. Таким чином ми

отримали два види ліпосом – без холестерину та з холестерином. Обидва зразки доводились до однорідності шляхом перемішування за допомогою ультразвукових хвиль, після чого вони заморожувались у рідкому азоті та розморожувались при кімнатній температурі. Цей цикл обробки ультразвуком, заморожування та розморожування було повторено 5 разів. В результаті отримали однорідні розчини ліпосом у воді.

На рис. 3.9 показано зареєстровані спектри ІЧ поглинання фосфоліпіду ДОФХ після його розчиненні у хлороформі та випаровування хлороформу (спектр синього кольору) і ліпосом, утворених з цього фосфоліпіду.

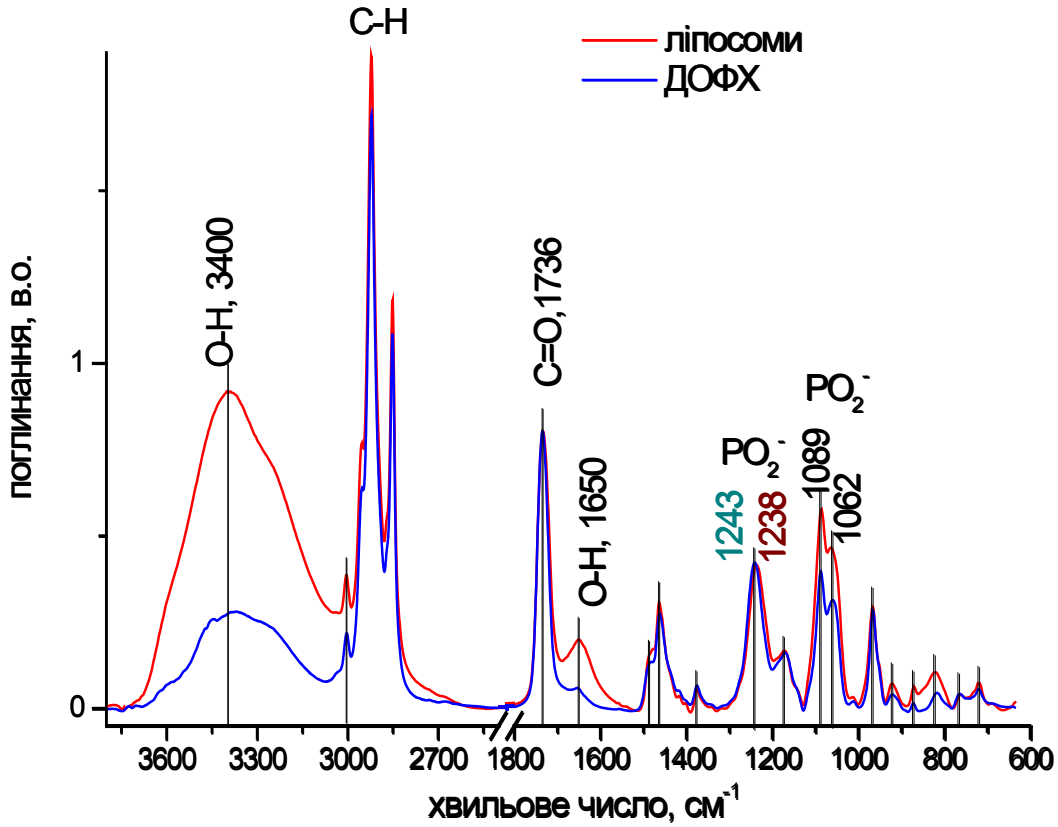


Рисунок 3.9 – Спектри ІЧ поглинання ДОФХ та утворених ліпосом

Спектр складається з набору смуг, кожна з яких відповідає коливанням певного хімічного зв’язку або функціональної групи. Так, широка смуга з максимумом біля 3400 $см^{-1}$ відповідає валентним коливанням гідроксильної групи О-Н, смуги з частотами в інтервалі 2800 – 3000 $см^{-1}$ – валентним

коливанням зв'язків С-Н, які входять у групи CH_2 і CH_3, смуга з частотою 1736 $см^{-1}$ – коливанням зв'язку С=О.

Порівняння спектрів на рис. 3.9 показує, що при утворенні ліпосом відбуваються певні зміни у структурі ліпідної мембрани. Найбільші зміни спостерігаються в спектральній області, де розташовані коливання групи PO_2^- , яка належить до ліпідної голови молекули фосфоліпіду. Цим коливанням відповідають 4 смуги. При формуванні ліпосом зростає інтенсивність двох із них – 1062 і 1089 $см^{-1}$, а для смуги з максимумом поблизу 1240 $см^{-1}$ спостерігається зміщенні її положення: у спектрі ДОФХ ця смуга має частоту 1243 $см^{-1}$, а у спектрі ліпосом – 1238 $см^{-1}$. Також зростає інтенсивність валентних та деформаційних коливань О-Н, на 3400 $см^{-1}$ та 1650 $см^{-1}$, відповідно, що свідчить про присутність молекул води між шарами ліпідів у ліпосомах.

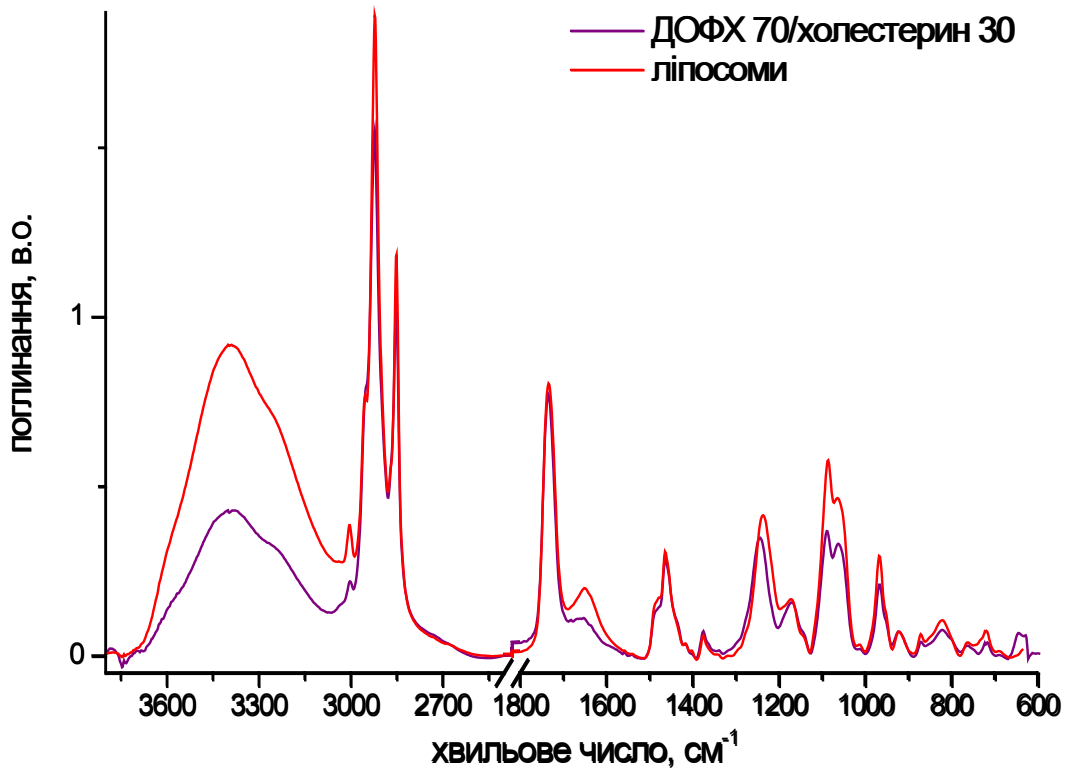


Рисунок 3.10 – Спектри ІЧ поглинання ліпосом з ДОФХ (червоний спектр) та ліпосом з додаванням 30% холестерину (фіолетовий спектр)

На рис. 3.10 показані спектри ліпосом з ДОФХ і таких самих ліпосом з додаванням 30% холестерину.

При порівнянні спектрів на рис. 2 також можна помітити відмінності між ними. По-перше, при додаванні холестерину знижується інтенсивність смуг поглинання ОН, як на частоті валентних коливань 3400 $см^{-1}$, так і на частоті деформаційних коливань 1650 $см^{-1}$. По-друге, знижується інтенсивність поглинання смуг PO_2^- на частотах 1062 і 1089 $см^{-1}$. І нарешті, максимум смуги поблизу 1240 $см^{-1}$ зміщується у бік вищих частот – з 1238 $см^{-1}$ до 1245 $см^{-1}$. Всі ці зміни говорять про зміни у структурі ліпідної мембрани у присутності холестерину.

ВИСНОВКИ

Експериментальні дослідження модельних ліпідних мембран різного компонентного складу методом малокутового розсіяння нейтронів показали, що збільшення концентрації мелатоніну в ліпідній мембрані призводить до зменшення товщини ліпідного бішару, а збільшення концентрації холестерину, навпаки, призводить до збільшення товщини ліпідного бішару незалежно від фазового стану ліпідної системи.

Показано, що додавання активної частини S-протеїну SARS-CoV-2 в ліпідну систему ДМФХ/30% Мелатонін/D_2O практично не змінює структурних параметрів ліпідного бішару при різних температурах (в різних фазових станах) у межах похибки експерименту. Оскільки мелатонін у ліпідному бішарі локалізується в області ліпідних голів, то він може заважати проникненню в цю область молекулам S-протеїну. Таким чином можна стверджувати, що збільшення концентрації мелатоніну в мембрані запобігає взаємодії коронавірусного S-протеїну з ліпідною мембраною.

За присутності домішок холестерину в системі взаємодія ліпідної мембрани з активною частиною S-протеїну відбувається залежно від фазового стану ліпіду. Так, коли ліпід знаходиться в гель фазі (за температури 10°C), то активна частина S-протеїну не змінює структурних параметрів ліпідного бішару, тобто взаємодія між ліпідною мембраною та активною частиною S-протеїну не відбувається. При температурі 37°C, коли ліпід перебуває в рідкокристалічній фазі, додавання RBD SARS-CoV-2 в систему ДМФХ/30% Холестерин/D_2O призводить до зменшення товщини мембрани, що свідчить про наявність взаємодії S-протеїну з мембраною.

Показано, що взаємодія активної частини S-протеїну відбувається саме з з головними частинами мембрани, а не з трансмембраннми білками, оскільки вона відбувається навіть при відсутності в модельній системі трансмембранного білка ACE2.

Методом квантово-хімічного моделювання розраховано структури та коливальні спектри кластерів води різного розміру. Визначено коливальні частоти гідроксильних груп молекул води, які відповідають кластерним структурам кожного типу. Таким чином визначені спектральні прояви міжмолекулярної взаємодії у воді, яка оточує ліпідні мембрани.

Розраховано статичний структурний фактор подвійного шару молекул фосфоліпідів. Аналіз радіального розподілу статичного структурного фактору показав, що середня відстань між молекулами фосфоліпідів в площині становить близько 5 Å, що узгоджується з наявними літературними даними.

Методом молекулярної динаміки проведено комп'ютерне моделювання змін атомарної структури модельних ліпідних мембран внаслідок їхньої взаємодії з оточенням (домішками у вигляді окремих органічних молекул або білків). Показано, що структура рецептор-зв'язувальної ділянки (RBD) коронавірусу SARS-CoV2 навіть після його виокремлення із загального полімерного ланцюга глікопротеїну «шипа» S залишається слабко чутливою до компонентного складу та агрегатного стану свого оточення.

Розрахунки динамічного структурного фактора модельної ліпідної мембрани з домішками та його залежності від компонентного складу системи, втконані на основі результатів молекулярно-динамічного моделювання, дали змогу уточнити діапазони зміни енергії нейтрона та переданого хвильового вектора, які найбільш детально характеризують прояви динамічних властивостей досліджених систем у їхньому динамічному структурному факторі, а отже – і на спектрах непружного розсіяння нейтронів. Показаго, що незначний вплив розглянутих домішок на такі властивості спостерігається лише у випадку системи з додаванням 30% холестерину, тоді як для інших систем такий вплив, порівняно із системою без домішок, відсутній.

Таким чином встановлено, що експериментальні дослідження динамічних властивостей розглянутих систем доцільно проводити методом непружного розсіяння нейтронів лише за умови виключення вкладу розчинника (наприклад

– із застосуванням методик варіації нейтронного контрасту) та в разі обрання діапазонів $q < 20$ нм$^{-1}$ та $\hbar\omega < 10$ меВ. При цьому виявлення впливу домішок в одержуваних результатах може потребувати роздільної здатності, яка є недосяжною в реальних експериментах.

Моделювання деформаційної поведінки системи “коронавірус–клітина” в континуальному наближенні показало, що процес деформування клітини, пов’язаний із проникненням в неї коронавірусу, складається із двох стадій. На першій стадії у цитоплазматичній мембрані виникають переважно деформації вигину, які досягають найбільшого значення на межі контактної зони між клітиною та коронавірусом. Коли радіус контактної зони стає приблизно рівним $2{,}4 \cdot 10^{-8}$ м, на межі контактної зони матеріал цитоплазматичної мембрани руйнується, що призводить до появи енергетичного бар’єра $\sim 4 \cdot 10^{-19}$ Дж, який перешкоджає подальшому проникненню коронавірусу в клітину. На другій стадії, яка починається після подолання бар’єра, продовжується руйнування мембрани, форма клітини значно змінюється, завдяки чому коронавірус, огорнувшись мембраною, проникає всередину клітини.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, *367*(6483), 1260-1263.
2. Xia, S., Zhu, Y., Liu, M., Lan, Q., Xu, W., Wu, Y., Ying, T., Liu, S., Shi, Z., Jiang, S. & Lu, L. (2020). Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cellular & molecular immunology, 17(7),* 765-767.
3. Smits, V. A., Hernández-Carralero, E., Paz-Cabrera, M. C., Cabrera, E., Hernández-Reyes, Y., Hernández-Fernaud, J. R., Gillespie, D.A., Salido, E., Hernández-Porto, M. & Freire, R. (2021). The Nucleocapsid protein triggers the main humoral immune response in COVID-19 patients. *Biochemical and biophysical research communications, 543,* 45-49.
4. Комісаренко, С. Світова коронавірусна криза. – К.: ЛАТ&К, 2020. – 120 с.
5. Ahyayauch, H., M, A. Alonso, and Felix, *Lipid Bilayers in the Gel Phase Become Saturated by Triton X-100 at Lower Surfactant Concentrations Than Those in the Fluid Phase.* 2012. **102**(11): p. 2510-2516.
6. Zhang, J. and Q. Liu, Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. Protein Cell, 2015. 6(4): p. 254-64.
7. Bongiorno, D., L. Ceraulo, M. Ferrugia, F. Filizzola, A. Ruggirello, and V.T. Liveri, Localization and interactions of melatonin in dry cholesterol/lecithin mixed reversed micelles used as cell membrane models. Journal of Pineal Research, 2005. 38(4): p. 292-298
8. Rosales-Corral, S.A., D. Acuna-Castroviejo, A. Coto-Montes, J.A. Boga, L.C. Manchester, L. Fuentes-Broto, A. Korkmaz, S.R. Ma, D.X. Tan, and R.J. Reiter, Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. Journal of Pineal Research, 2012. 52(2): p. 167-202.
9. Yu, L., B. Li, M. Zhang, Z. Jin, W. Duan, G. Zhao, Y. Yang, Z. Liu, W. Chen, S. Wang, J. Yang, D. Yi, J. Liu, and S. Yu, Melatonin reduces PERK-eIF2alpha-ATF4-mediated endoplasmic reticulum stress during myocardial ischemia-reperfusion injury: role of RISK and SAFE pathways interaction. Apoptosis, 2016. 21(7): p. 809-24.
10. Kuklin, A.I., D.V. Soloviov, A.V. Rogachev, P.K. Utrobin, Y.S. Kovalev, M. Balasoiu, O.I. Ivankov, A.P. Sirotin, T.N. Murugova, T.B. Petukhova, Y.E. Gorshkova, R.V. Erhan, S.A. Kutuzov, A.G. Soloviev, and V.I. Gordeliy, *New opportunities provided by modernized small-angle neutron scattering two-detector system instrument (YuMO).* Journal of Physics: Conference Series, 2011. **291**(1): p. 012013.
11. Kirilov, A.S., E.I. Litvinenko, N.V. Astakhova, S.M. Murashkevich, T.B. Petukhova, V.E. Yudin, V.I. Gordelii, A.K. Islamov, and A.I. Kuklin, Evolution of the SONIX Software Package for the YuMO Spectrometer at the IBR-2

Reactor, Instruments and Experimental Techniques. Pribory i tekhnika eksperimenta, 2004. 47(6): p. 334-336.
12. Soloviev, A.G., T.M. Solovjeva, O.I. Ivankov, D.V. Soloviov, A.V. Rogachev, and A.I. Kuklin, SAS program for two-detector system: seamless curve from both detectors. Journal of Physics: Conference Series, 2017. 848(1): p. 012020.
13. Kuklin, A.I., A.V. Rogachev, D.V. Soloviov, O.I. Ivankov, Y.S. Kovalev, P.K. Utrobin, S.A. Kutuzov, A.G. Soloviev, M.I. Rulev, and V.I. Gordeliy, Neutronographic investigations of supramolecular structures on upgraded small-angle spectrometer YuMO. Journal of Physics: Conference Series, 2017. 848(1): p. 012010.
14. Ratajczak, M.K., E.Y. Chi, S.L. Frey, K.D. Cao, L.M. Luther, K.Y.C. Lee, J. Majewski, and K. Kjaer, *Ordered nanoclusters in lipid-cholesterol membranes.* Physical review letters, 2009. **103**(2): p. 028103.
15. Murugova, T., O. Ivankov, E. Ermakova, T. Kondela, Hrubovčák, Pavol, V. Skoi, A. Kuklin, and N. Kučerka, Structural changes introduced by cholesterol and melatonin to the model membranes mimicking preclinical conformational diseases. General physiology and biophysics, 2020. 39(02): p. 135-144.
16. Kukol, A. (2009). Lipid models for united-atom molecular dynamics simulations of proteins. Journal of Chemical Theory and Computation, 5(3), 615-626.
17. Neto, A. J., & Cordeiro, R. M. (2016). Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1858(9), 2191-2198.
18. Ivankov, O.I., et al., Interactions in the model membranes mimicking preclinical conformational diseases, in Advances in biomembranes and lipid self-assembly, A. Iglic, M. Rappolt, and A.J. Garsia-Saez, Editors. 2020, Elsevier. p. 185-214.
19. Kondela, T., E. Dushanov, M. Vorobyeva, et al., Investigating the competitive effects of cholesterol and melatonin in model lipid membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2021. 1863(9): p. 183651
20. Hansen, J.-P., McDonald, I.R. Theory of simple liquids. Academic Press, 2006, – 428 p.
21. Gokel, G. W., Barbour L. Comprehensive Supramolecular Chemistry II. Elsevier, 2017 p. - 4568 p.
22. Schoen, M., Vogelsang, R., and Hoheisel, C. Computation and analysis of the dynamic structure factor S (k, ω) for small wave vectors: A molecular dynamics study for a Lennard-Jones liquid. Molecular Physics, 1986. 57(3): p. 445-471.
23. Bolmatov, D., Cai, Y. Q., Zav'yalov, D., and Zhernenkov, M. Crossover from picosecond collective to single particle dynamics defines the mechanism of lateral lipid diffusion. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes (2018), 1860(11): p. 2446-2455.
24. Bolmatov, D., Soloviov, D., Zhernenkov, M., Zav'yalov, D., Mamontov, E., Suvorov, A., Cai Y.Q., and Katsaras, J. Molecular Picture of the Transient Nature of Lipid Rafts. Langmuir (2020), 36(18): p. 4887-4896.

25. Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., & De Vries, A. H. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. The Journal of Physical Chemistry B (2007), 111(27): p. 7812-7824.
26. Marrink, S.J., de Vries, A.H., and Mark, A.E. Coarse grained model for semi-quantitative lipid simulations. The Journal of Physical Chemistry B (2004), 108(2): p. 750-760.
27. Marrink, S.J., de Vries, A.H., Harroun, T.A., Katsaras, J., and Wassall, S.R. Cholesterol shows preference for the interior of polyunsaturated lipid membranes. Journal of the American chemical society (2008), 130: p. 10-11.
28. Risselada, H.J., and Marrink, S.J. The molecular face of lipid rafts in model membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences (2008), 105: p. 17367–17372.
29. Toelzer, C., Gupta, K., Yadav, S. K., Borucu, U., Davidson, A. D., Williamson, M. K., Shoemark, D. K., Garzoni, F. , Staufer, O., Milligan, R., Capin, J., Mulholland, A. J., Spatz, J., Fitzgerald, D., Berger, I. & Schaffitzel, C. (2020). Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein. Science, 370(6517), 725-730
30. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., McLellan, J. S. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science eabb2507. doi:10.1126/science.abb2507pmid:32075877.
31. Benton, D. J., Wrobel, A. G., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., Rosenthal, P. B., Skehel, J. J. & Gamblin, S. J. (2020). Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. Nature, 588(7837), 327-330.
32. Nichols, C., Ng, J., Keshu, A., Fraternali, F., & De Nicola, G. F. (2020). A New Crystal Form of the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain: CR3022 Complex—An Ideal Target for In-Crystal Fragment Screening of the ACE2 Binding Site Surface. Frontiers in pharmacology, 11, 2110.
33. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L. & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. Nature, 581(7807), 215-220.
34. Ye, Y., & Godzik, A. (2003). Flexible structure alignment by chaining aligned fragment pairs allowing twists. Bioinformatics, 19(suppl_2), ii246-ii255.
35. Prlić, A., Bliven, S., Rose, P. W., Bluhm, W. F., Bizon, C., Godzik, A., & Bourne, P. E. (2010). Pre-calculated protein structure alignments at the RCSB PDB website. Bioinformatics, 26(23), 2983-2985.
36. Liu, K., Tan, S., Niu, S., Wang, J., Wu, L., Sun, H., Zhang, Y., Pan, X., Qu, X., Du, P., Meng, Y., Jia, Y., Chen, Q., Deng, C., Yan, J., Wang, H.W., Wang, Q., Qi, J., Gao, G.F. (2021). Cross-species recognition of SARS-CoV-2 to bat ACE2. Proc Natl Acad Sci USA, 118 (1), e2020216118.
37. Zhang, Z., Zhang, Y., Liu, K., Li, Y., Lu, Q., Wang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Liao, H., Zheng, A., Ma, S., Fan, Z., Li, H., Huang, W., Bi, Y., Zhao, X., Wang,

Q., F. Gao, G., Xiao, H., Tong, Z., Qi, J. & Sun, Y. (2021). The molecular basis for SARS-CoV-2 binding to dog ACE2. Nature communications, 12(1), 4195.

38. Higuchi, Y., Suzuki, T., Arimori, T., Ikemura, N., Mihara, E., Kirita, Y., Ohgitani, E., Mazda, O., Motooka, D., Nakamura, S., Sakai, Y., Itoh, Y., Sugihara, F., Matsuura, Y., Matoba, S., Okamoto, T., Takagi, J., Hoshino, A. (2021). Engineered ACE2 receptor therapy overcomes mutational escape of SARS-CoV-2. Nat Commun 12: 3802.
39. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1, 19-25.
40. Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys. 126*, pp. 014101.
41. Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., & De Vries, A. H. (2007). The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, **111**(27): p. 7812-7824.
42. Monticelli, L., Kandasamy, S. K., Periole, X., Larson, R. G., Tieleman, D. P., & Marrink, S. J. (2008). The MARTINI coarse-grained force field: extension to proteins. *Journal of chemical theory and computation*, *4*(5), 819-834.
43. Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., Van Gunsteren, W. F. (2004) A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* 25, 1656−1676.
44. Malde, A. K., Zuo, L., Breeze, M., Stroet, M., Poger, D., Nair, P. C., Oostenbrink, C. & Mark, A. E. (2011). An automated force field topology builder (ATB) and repository: version 1.0. *Journal of chemical theory and computation*, *7*(12), 4026-4037.
45. Stroet, M., Caron, B., Visscher, K. M., Geerke, D. P., Malde, A. K., & Mark, A. E. (2018). Automated topology builder version 3.0: prediction of solvation free enthalpies in water and hexane. *Journal of chemical theory and computation*, *14*(11), 5834-5845.
46. Marzuoli, I., Margreitter, C., & Fraternali, F. (2019). Lipid head group parameterization for GROMOS 54A8: a consistent approach with protein force field description. *Journal of chemical theory and computation*, 15(10), 5175-5193.
47. Poger, D., & Mark, A. E. (2010). On the validation of molecular dynamics simulations of saturated and cis-monounsaturated phosphatidylcholine lipid bilayers: a comparison with experiment. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(1), 325-336.
48. Nagle, J. F., & Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469(3), 159-195.
49. Luzzati, V., & Husson, F. (1962). The structure of the liquid-crystalline phases of lipid-water systems. *The Journal of cell biology*, *12*(2), 207-219.

50. Varley F. Sears (1992) Neutron scattering lengths and cross sections, Neutron News, 3:3, 26-37, DOI: 10.1080/10448639208218770
51. Sturm, K. (1993). Dynamic structure factor: An introduction. Zeitschrift für Naturforschung A, 48(1-2), 233-242.
52. Fransson, E., Slabanja, M., Erhart, P., & Wahnström, G. (2021). dynasor—A Tool for Extracting Dynamical Structure Factors and Current Correlation Functions from Molecular Dynamics Simulations. Advanced Theory and Simulations, 4(2), 2000240.
53. Л.А. Булавін, Ю.Ф. Забашта, К.І. Гнатюк. Особливості деформацій, які виникають у клітині при проникненні в неї коронавірусу // Укр. фіз. журн. 2021. Т. 66, № 9, с. 784-790.
54. А.С. Давыдов. Биология и квантовая механика (Наукова думка, 1979).
55. S. Klein, M. Cortese, S.L. Winter, M. Wachsmuth-Melm, Ch.J. Neufeldt, B. Cerikan, M.L. Stanifer, S. Boulant, R. Bartenschlager, P. Chlanda. (2020). SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. Nature communications, 11(1), 1-10.
56. Junior, J. B. (2020). Interaction Energies of the Human ACE2 Molecular Recognition by SARS-CoV-2. Virology: Current Research, 2(4), 1-6.
57. С.П. Тимошенко. Курс теории упругости (Наукова думка, 1972).
58. A.B. Jena, N. Kanungo, V. Nayak, G.B.N. Chainy, J. Dandapat. Catechin and Curcumin interact with corona (2019-nCoV/SARS-CoV2) viral S protein and ACE2 of human cell membrane: insights from Computational study and implication for intervention. SCI REP-UK (2021), DOI: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-22057/v1
59. Poo, M. M., & Cone, R. A. (1974). Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. Nature, 247(5441), 438-441.
60. R. Skalak. Rheology of red blood cell membrane. Microcirculation 1, 53–70 (1976).
61. P.H. Geil. Polymer Single Crystals (Interscience Publishers, 1963) [ISBN: 978-0470295106].
62. Blume A. Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies, Current Opinion in Colloid & Interface Science, 1996. 1: p. 64-77.
63. Ter-Minassian-Saraga L., Okamura E., Umemura J., Takenaka, T. Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy of hydration of dimyristoylphosphatidylcholine multibilayers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1998. 946(2), 417–423.
64. Gunasekaran S., Balaji R., Kumaresan S., Anand G., Srinivasan S. Experimental and theoretical investigations of spectroscopic properties of N-acetyl-5-methoxytryptamine. Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy, 2008. 53(4): p. 149-162.
65. Gupta U., Singh V., Kumar V., Khajuria Yu. Spectroscopic Studies of Cholesterol: Fourier Transform Infra-Red and Vibrational Frequency Analysis. Mater. Focus. 2014. 3 (3): p. 211 – 217.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ВИДАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Булавін Л.А., Куклін О.І., Носовський А.В., Соловйов Д.В. Нейтронні та рентгенівські дослідження ліпідних мембран. НАН України, Ін-т проблем безпеки АЕС. – Чорнобиль: Ін-т проблем безпеки АЕС, 2021. – 160 с.
2. Nikolaienko T.Yu., Bulavin L.A. The machine-learned radii of atoms // Computational and Theoretical Chemistry, Volume 1204, October 2021, 113389, DOI: 10.1016/j.comptc.2021.113389
3. Л.А. Булавін, Ю.Ф. Забашта, К.І. Гнатюк. Особливості деформацій, які виникають у клітині при проникненні в неї коронавірусу // Укр. фіз. журн. 2021. Т. 66, № 9, с. 784-790.
4. Соловйов Д.В., Іваньков О.І., Булавін Л.А., Дорошенко І.Ю., Онук М.М. Дослідження структурних особливостей взаємодії S-протеїну SARS-CoV-2 з ліпідними мембранами методом малокутового розсіяння нейтронів // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія фізико-математичні науки, 2021. - №2. – С.127 -130.
5. Nikolaienko T.Yu., Bulavin L. A. Partitioning electrostatic molecular properties into the localized contributions // XI Conference of Young Scientists ”Problems of Theoretical Physics” (dedicated to the 55-th anniversary of Bogolyubov Institute for Theoretical Physics), December 21-23, 2020, Kyiv, Ukraine. – P.69.
6. Soloviov D.V., Doroshenko I.Yu., Nikolaienko T.Yu., Ivankov O.I., Bulavin L.A. The influence of SARS-CoV-2 receptor binding domain on the model lipid membrane structure: a SANS study // 9th International Conference "Nanotechnologies and Nanomaterials" NANO-2021. – 25 – 28 August, 2021. - Lviv, Ukraine. - P. 438.
7. L. Bulavin, D. Solovyov, I. Doroshenko, T. Nikolaenko, O. Ivankov. Influence of Structure and Physical Properties of a Lipid Membrane on the Progress of a Virus Disease // Book of abstracts of Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals". - 21-24 September, 2021. - Kyiv, Ukraine. - P. 94.
8. Bulavin L.A., Solovyov D.V., Doroshenko I.Yu., Nikolaenko T.Yu., Ivankov O.I. Dependence of a lipid membrane physical properties on its structure and composition // Book of abstracts of 7th International Conference “Nanobiophysics: Fundamental and applied aspects”. – 4-8 October, 2021. – Kharkiv, Ukraine. – P. 35.
9. M. Onuk, D. Solovyov, I. Doroshenko, T. Nikolaenko, O. Ivankov, L.Bulavin. Probing the interaction of SARS-CoV-2 receptor binding domain with model lipid membranes with spectroscopic methods // 13th International IUPAC Conference on Polymer-Solvent Complexes & Intercalates POLYSOLVAT-13, 9-13 November, Osaka, Japan. – P. 75.

10. I. Doroshenko, L. Bulavin, D. Solovyov, T. Nikolaenko, O. Ivankov, M. Onuk. Spectroscopic study of interaction of SARS-CoV-2 receptor binding domain with model lipid membranes // Materials of republican conference «Fundamental and ibovative investigations и инновационные исследования в развитии физики и их перспективы» - Ташкент, 14 октября 2021 г. – С. 16 – 17.